

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини

Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова праця

на правах рукопису

УДК 611.013.395:615.361]:57.086.13:616.72-007.248-002

ВВЕДЕНСЬКИЙ ДМИТРО БОРИСОВИЧ

ДИСЕРТАЦІЯ

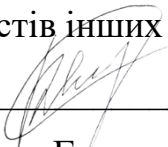
КРІОКОНСЕРВОВАНІ МУЛЬТИПОТЕНТНІ МЕЗЕНХІМАЛЬНІ
СТРОМАЛЬНІ КЛІТИНИ З РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ В ТЕРАПІЇ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АРТРИТУ

222 – Медицина

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктор філософії

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


_____ Введенський Д.Б.

Науковий керівник Гольцев Анатолій Миколайович, академік, доктор медичних
наук, завідувач відділу кріопатофізіології та імунології ІПКіК НАН України

Харків – 2023

АНОТАЦІЯ

Введенський Д.Б. Кріоконсервовані мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини з різних джерел в терапії експериментального артриту. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Медицина (галузь знань 22 Охорона здоров'я), Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2023.

Дисертаційна робота присвячена вивченню впливу кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) щурів отриманих з різних джерел (жирова та хрящова тканини) за умов локального та системного введення на динаміку перебігу експериментального артриту.

На першому етапі роботи було проведено дослідження цілісності мембран клітин після кріоконсервування з використанням тесту на виключення трипанового синього. Показник життєздатності у випадку кріоконсервованих ММСК жирової тканини був знижений у 1,28 рази відносно відповідного нативного аналогу. Зниження відсотку життєздатних клітин спостерігалось також в ММСК хрящової тканини після кріоконсервування в 1,24 рази стосовно нативного аналогу. Слід зазначити, що вірогідної різниці в дослідженому показнику між групами ММСК ЖТ та ММСК ХТ не було виявлено.

В умовах культивування нативні та кріоконсервовані ММСК з жирової тканини характеризувались наявністю парусних, зірчастих і веретеноподібних клітинних елементів. ММСК із хрящової тканини були представлені полігональними та веретеноподібними клітинами. На 10-ту добу культивування у кріоконсервованих ММСК з жирової тканини спостерігали 68% конфлюент, а у разі кріоконсервованих ММСК хрящової тканини щільність моношару досягала 80%. Характер проліферації досліджених культур був схожим, але приріст клітин був більшим у ММСК хрящової тканин на всьому терміні спостереження як у разі культивованих, так і кріоконсервованих зразків.

Результати визначення кількості життєздатних клітин Annexin V⁻/7AAD⁻ значуще зменшувалася після кріоконсервування на 9,86% у випадку ММСК ЖТ та на 7,88% у випадку ММСК ХТ. Показник кількості Annexin V⁺/7AAD⁺ та Annexin V⁻/7AAD⁺ клітин (пізні стадії апоптозу, некроз) значуще збільшувався після кріоконсервування на 8,96% у випадку ММСК ЖТ та на 7,4% у випадку ММСК ХТ. При цьому слід зазначити, що кількість клітин Annexin V⁺/7AAD⁻ (рання стадія апоптозу) в КрММСК ЖТ та ХТ значуще не відрізнялась від показників у нативних зразках.

Досліджені нативні культури характеризувалися типовим для ММСК фенотипом із високим рівнем експресії ($\geq 90\%$) CD 44, CD 90, CD 73, CD 105 та низьким рівнем експресії ($\leq 1\%$) гемопоетичного маркера CD 45. Проте в зразках КрММСК ЖТ та ХТ спостерігали вірогідне зниження щодо нативних аналогів кількості CD 44⁺ клітин на 11,1 та 8,8% відповідно. Відомо, що маркер CD 44 відповідає за основні функції клітини, серед яких адгезія, хоумінг клітин у периферичні та лімфоїдні органи та вогнища запалення, клітинна активація й збільшення продукції цитокінів і факторів росту.

Наступним етапом роботи було дослідження проліферативних характеристик нативних та кріоконсервованих ММСК жирової та хрящової тканин (рис.). Динаміка росту досліджених культур була схожою, але приріст клітин був вірогідно більшим у ММСК ХТ протягом всього строку спостереження. На 3 добу культивування в ММСК ХТ та ММСК ЖТ та приріст клітин значуще не відрізнявся. На 7 та 10 добу культивування в ММСК ХТ досліджуваний показник був вище в 2,5 та 1,8 рази відповідно порівняно з ММСК ЖТ.

Результати визначення міграційної активності ММСК ЖТ та ХТ свідчили про вірогідне збільшення щільності клітин в зоні дефекту при культивуванні ММСК ХТ стосовно ММСК ЖТ на всіх строках спостереження. На 4-у добу дослідження в КрММСК ЖТ та ХТ спостерігали зниження щільності клітин стосовно нативних аналогів у 1,3 та 1,2 рази відповідно. Однак, значущих

відмінностей у дослідженому показнику на 7-у добу між нативними та кріоконсервованими ММСК із обох досліджених джерел не спостерігали.

Оцінка загального стану показала, що у тварини при введенні фізіологічного розчину (контрольна група) на 7 добу моделювання спостерігали ознаки запального процесу в суглобі – набряк і гіперемія, а також збільшення індексу артриту в 1,58 рази відносно інтактних. Ця тенденція зберігалася протягом усього строку експерименту. У тварин дослідних груп 1 та 2 (локальне введення) вираженість набряку суглобів на 14 добу зменшилась у 1,15 та 1,20 рази відповідно порівняно з контрольною групою. На 28 добу спостереження у тварин цих груп індекс артриту був відповідно в 1,26 і 1,28 рази нижчим, ніж у групі з введенням фізіологічного розчину. Системне введення призвело до менш вираженого зниження цього показника порівняно з локальним, але тенденція до зниження зберігалась. Проте індекс артриту не досягав рівня інтактних тварин у жодній досліджуваній групі.

На 28 добу з проведення клітинної терапії у тварин контрольної групи (АА та введення фізіологічного розчин) на гістологічних препаратах надп'ятково-гомількового суглоба виявлено грубі структурні порушення, що відповідали 3-4 ступеню ураження за шкалою OARSI. Поверхня суглобового хряща була нерівномірною та представлена шаром хряща з ознаками розволокнення. У тварин з АА та локальним введенням КрММСК ЖТ та ХТ (групи 1 та 2) під час гістологічного дослідження не встановлено прогресування деструктивних змін у суглобовому хрящі, синовіальній оболонці та капсулі (1-2 ступень ушкодження за шкалою OARSI). В групі тварин з внутрішньовенним введенням КрММСК ЖТ та ХТ (група 3 та 4), виявлено зміни у суглобовому хрящі, субхондральній кістці, синовіальній оболонці та капсулі суглоба, які відображують хронізацію помірно вираженого запального процесу (2-3 ступень ушкодження за шкалою OARSI). Порівняно з локальним введенням, зафіксовано більш виражене ураження в капсулі, що проявлялося дифузною запальною інфільтрацією.

Аналіз результаті світлової мікроскопії свідчив, що відносна площа ділянок позитивно забарвлених на глікозаміноглікани у суглобовому хрящі інтактних тварин становила $92,6 \pm 5,6 \%$. У контрольній групі тварин із введенням фізіологічного розчину досліджуваний показник становив $26,4 \pm 5,1 \%$, що у 3,51 рази нижче, ніж у інтактних. У тварин з локальним введенням (групи 1 та 2) відносна площа позитивно забарвлених на глікозаміноглікани сайтів становила $61,7 \pm 5,7 \%$ та $69,3 \pm 6,1 \%$, що відповідно у 2,34 та 2,63 рази перевищувало відповідні значення контрольної групи тварин.

У тварин із системним введенням (3 та 4 групи) досліджуваний показник становив відповідно $48,7 \pm 5,2 \%$ та $45,1 \pm 6,8 \%$, що у 1,84 та 1,71 рази перевищувало відповідні значення у групі тварин із введенням фізіологічного розчину. Проте слід зазначити, що в усіх досліджуваних групах вміст глікозаміногліканів не досягав інтактного значення.

Аналіз результатів імуноцитохімічного дослідження показав, що відносна площа ЦОГ-2 позитивно забарвлених ділянок у суглобовому хрящі інтактних тварин становила $7,9 \pm 0,7 \%$. У контрольній групі тварин із введенням фізіологічного розчину досліджуваний показник становив $56,3 \pm 2,8 \%$, що у 7,13 рази вище, ніж в інтактній групі. У тварин із локальним введенням КрММСК із жирової та хрящової тканин відносна площа ділянок, позитивно забарвлених на ЦОГ-2, становила $21,7 \pm 5,1 \%$ та $29,4 \pm 6,5 \%$ відповідно, що було у 2,59 та 1,91 рази нижче відповідних значень у контролі. група тварин. У щурів за умов системного введенні (3 і 4 групи) досліджуваний показник становив $34,7 \pm 5,6 \%$ і $35,1 \pm 5,8 \%$ відповідно, що в 1,62 і 1,60 рази нижче відповідного значення в контролі. Однак слід зазначити, що в усіх досліджуваних групах ЦОГ-2 не досягав інтактного рівня. Зниження вмісту ЦОГ-2 у суглобовому хрящі спостерігалось у всіх груп тварин, які отримували КрММСК. Однак тяжкість цього процесу була різною в залежності від способу введення. При локальному застосуванні спостерігався більш виражений процес зменшення запалення в хрящовій тканині.

Протягом усього періоду дослідження тварин щоденно спостерігали за станом здоров'я, побічних явищ не спостерігалось. У інтактних тварин протягом експерименту відзначалося поступове збільшення маси тіла, тоді як у тварин з АА ця динаміка була згладжена. Контрольні тварини після індукції АА трохи втрачали масу тіла, внаслідок чого наприкінці експерименту вони відставали за масою від інтактних щурів (у 1,2 рази). На 28 добу спостереження маса тіла тварин дослідних груп досягала рівня інтактних щурів.

Спленомегалія є одним з характерних симптомів АА. У тварин контрольної групи встановлено підвищення індексу (1,7 рази) та клітинності (2,8 рази) селезінки відносно відповідного значення показника в інтактній групі. Ймовірно, це явище пов'язане з переважанням росту стромальних елементів селезінки при АА.

У тварин із локальним введенням КрММСК із жирової та хрящової тканин (1 та 2 групи) на 28 добу індекс селезінки був у 1,27 та 1,36 рази нижчим за відповідне значення в контрольній групі тварин (нелікований АА). Досліджуваний показник у 3 і 4 групах порівняно з контролем знизився відповідно в 1,49 і 1,38 рази. Отримані результати свідчили, що у тварин усіх дослідних груп індекс клітинності селезінки був нижчим за відповідні значення контрольної групи (в середньому в 2 рази). Проте слід зазначити, що в усіх досліджуваних групах він не досягав інтактного значення.

Т-клітини та макрофаги відіграють центральну роль у патогенезі та прогресуванні РА. У дослідженні встановлено, що у щурів спостерігалися зміни кількісних показників імунокомпетентних клітин селезінки. У групі контрольних тварин (АА без терапії) спостерігалось зниження кількості загальних CD3⁺ Т-лімфоцитів у 2,13 рази, а також субпопуляцій CD4⁺ (хелперів) у 2,12 рази, CD8⁺ (супресорів) у 1,77 рази та CD4⁺/CD8⁺ (PI імуnoreгуляторний індекс) в 1,2 рази відносно групи інтактних тварин.

У тварин із локальним введенням КрММСК із жирової та хрящової тканин (1 та 2 групи) вміст Т-клітин був вищим за відповідні показники в

контрольній групі. А саме, відповідно було 1,79 і 1,85 рази для CD3⁺, 1,76 і 1,84 рази для CD4⁺, 1,44 і 1,5 рази для CD8⁺ та 1,22 і 1,23 рази для CD4⁺/CD8⁺. Однак у групах 1 і 2 вміст Т-клітин у селезінці не досягав значень в групі інтактних тварин. При дослідженні субпопуляційного складу лімфоцитів селезінки після клітинної терапії при системному введенні (групи 3 і 4) нормалізували вміст Т-клітин (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺).

У контрольній групі (не лікований АА) спостерігалось зниження кількості CD4⁺CD25⁺ клітин у 1,41 рази порівняно з групою інтактних. У тварин із локальним введенням КрММСК з жирової та хрящової тканин (1 та 2 групи) вміст Т-reg відповідно перевищував відповідні показники контрольної групи у 1,66 та 1,51 рази. У щурів із системним введенням (групи 3 та 4) досліджуваний показник був у 1,32 та 1,46 рази вищим за відповідні значення у групі контролю (не лікований АА).

Отримані в роботі результати свідчили, що у тварин контрольної групи показник вмісту загального білку перевищував значення інтактних тварин протягом усього строку експерименту. У тварин, які отримували клітинну терапію як за умов локального (група 1 та 2), так і системного введення (група 3 та 4), динаміка вмісту загального білку мала тенденцію до зниження з 14 доби спостереження та на 21 і 28 добу статистично не відрізнялася від відповідного показника в групі інтактних тварин.

У крові щурів контрольної групи відзначалося підвищення показнику ШОЕ в порівнянні з інтактними тваринами протягом всього строку спостереження, а саме: на 14 добу в 4,9 рази, на 21 добу в 4,4 рази та на 28 добу в 2,4 рази. Слід зазначити, що в усіх експериментальних групах досліджений показник мав тенденцію до нормалізації починаючи з 14 доби. На 28 добу ШОЕ в групах 1 та 2 статистично не відрізнялась від інтактних тварин. В групах 3 та 4 досліджений показник був відповідно в 1,8 і 1,7 рази нижче порівняно з контролем, однак нормалізації цього показника на відміну від перших двох експериментальних груп не відбулося.

У тварин контрольної групи відзначалося підвищення показнику СРБ протягом всього строку експерименту, а саме: на 14 добу в 8,6 рази, на 21 добу в 6,6 рази та на 28 добу в 5,2 рази стосовно відповідних показників у інтактних тварин. У тварин з клітинною терапією досліджений показник мав тенденцію до нормалізації починаючи з 14 доби. Так, в сироватці крові тварин груп 1 та 2 вміст СРБ був нижчим відповідно в 1,8 та 1,7 рази стосовно контролю на 28 добу. Показник СРБ в групах 3 та 4 на 28 добу був нижчим в 2,2 рази стосовно контролю. В групі тварин з системним введенням КрММСК відновлення вмісту СРБ відбувалось швидше. Однак слід зазначити, що в усіх експериментальних групах досліджений показник не досягав рівня інтактних тварин.

Підвищення показнику РФ у щурів контрольної групи спостерігали протягом всього строку експерименту, а саме: на 14 добу в 1,9 рази, на 21 добу в 2,9 рази та на 28 добу 3,6 рази стосовно відповідних показників у інтактних тварин. У тварин з клітинною терапією досліджений показник мав тенденцію до зниження починаючи з 14 доби. Так вміст РФ в сироватці крові тварин груп з локальним введенням (група 1 та 2) на 28 добу був відповідно в 2,6 та 2,5 рази нижче стосовно контролю. В групі тварин з системним введенням (групи 3 та 4) відновлення вмісту РФ в крові експериментальних тварин відбувалось більш інтенсивно, що на 21 та 28 добу призводило до його зниження відповідно в 2,1 та 2,7 рази стосовно групи контрольних тварин. Однак слід зазначити, що в усіх експериментальних групах досліджений показник не досягав рівня інтактних тварин.

Загальна активність системи антиоксидантного захисту (АОЗ) в сироватці крові тварин контрольної групи (введенні фізіологічного розчину) значно знижувалася порівняно з інтактними щурами протягом усього періоду спостереження. Слід зазначити, що у тварин усіх груп з клітинною терапією досліджуваний показник мав тенденцію до нормалізації з 21-ї доби. Так, на 28 добу досліджуваний показник у 1 та 2 групах був вищим у 1,92 та 2,12 рази відповідно у порівнянні з контрольною групою. Активність системи АОЗ у

групах 3 і 4 на 28 добу була в 1,67 і 1,6 рази вище відповідно порівняно з групою тварин, яким вводили фізіологічний розчин. Таким чином, відновлення активності системи антиоксидантного захисту відбувалося більш інтенсивно в групі тварин із локальним введенням КрММСК із хрящової тканини.

У тварин із локальним введенням спостерігалася тенденція до зниження вмісту лейкоцитів з 14-ї доби спостереження. А на 28 добу досліджуваний показник у 1 та 2 групах статистично не відрізнявся від інтактних тварин. Вміст лейкоцитів у 3 та 4 групах на 28 добу після терапії був відповідно у 1,22 та 1,19 рази нижчим порівняно з групою тварин із введенням фізіологічного розчину, але нормалізації цього показника на відміну від перших двох дослідних груп не відбулося.

Таким чином, у роботі представлено теоретичне узагальнення і нове вирішення на доклінічному етапі актуальної наукової проблеми медицини, а саме кріомедицини і ортопедії – подолання та корекція наслідків артриту в експерименті шляхом використання кріоконсервованих ММСК з хрящової і жирової тканин. Ці дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки новітніх біомедичних технологій з застосуванням стовбурових клітин та без посередньо методів лікування артритів у клінічній практиці.

Ключові слова: кріоконсервування, кріоконсервовані мезенхімальні стромальні клітини, артрит, регенерація, маркери запалення, щури.

ANNOTATION

Vvedenskyi D.B. Cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells derived from different sources in experimental arthritis therapy. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for the Doctor of Philosophy degree in specialty 091 Medicine (field of knowledge 22 Health Care), Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2023.

The dissertation covers the investigation of the influence of rats' cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) obtained from different sources (fat and cartilage tissues) under local and systemic administration on the experimental arthritis course dynamics.

At the first stage of the research the integrity of cell membranes after cryopreservation was studied by the trypan blue penetration test. The viability of cryopreserved MMSCs (crMMSCs) from adipose tissue (AT) was reduced by 1.28 times compared to the corresponding native analogue. A similar reduced percentage of viability was also observed in MMSCs obtained from cartilage tissue (CT) after cryopreservation. It should be noted that there was no significant difference in the viabilities between the AT and CT MMSCs.

Culturing of native and cryopreserved MMSCs obtained from adipose tissue was characterized by the presence of pennant shaped, stellate and spindle-shaped cell morphologies. MMSCs obtained from cartilage tissue were represented by polygonal and spindle-shaped cells. On the 10th day of cultivation of crMMSCs derived from adipose tissue, the confluency of the monolayer was close to 68%, and for crMMSCs from cartilage tissue it reached 80%. The nature of the proliferative activity of the studied cultures was similar, but cell growth was higher in the MMSCs obtained from cartilage tissue throughout the observation period, both during culturing of native and cryopreserved samples.

The results of determining the number of viable cells according to the Annexin V-/ 7AAD-test decreased and significantly differed after cryopreservation of AT

MMSCs (by 9.86%) and for CT MMSCs that was by 7.88%. At the same time, the number of Annexin V⁺/7AAD⁺ and Annexin V⁻/7AAD⁺ cells (late stages of apoptosis, necrosis) significantly increased after cryopreservation, namely, by 8.96% for AT MMSCs and by 7.4% for CT MMSCs. At the same time, it should be noted that the number of Annexin V⁺/7AAD cells (early stage of apoptosis) in CrMMSCs of AT and CT did not differ significantly from the indices of native samples.

The investigated native cultures were characterized by a phenotype typical for MMSCs with a high rate of expression ($\geq 90\%$) of CD 44, CD 90, CD 73, CD 105 and a low rate of expression ($\leq 1\%$) of the hematopoietic profile cell marker CD 45. However in the samples of AT and CT CrMMSCs a probable decrease in the number of CD 44⁺ cells (by 11.1 and 8.8%, respectively) was observed compared to native analogues. This fact is of particular informational value, considering the role of the CD 44 marker, which is responsible for the main functions of a cell, including adhesion, homing of cells to peripheral and lymphoid organs as well as inflammation foci, cell activation and increased production of cytokines and growth factors.

The next stage of this research represented the study of the proliferative characteristics of native and cryopreserved MMSCs of adipose and cartilage tissues. It was established that the spectrum of cell growth in the studied cultures was similar, but the cell growth dynamics was likely greater in the CT MMSCs within the entire observation period. On the 3rd day of culturing in AT MMSCs and CT MMSCs, cell growth did not differ significantly. On days 7 and 10 of culturing, the investigated index was 2.5 and 1.8 times higher, respectively, compared to AT MMSCs.

The results of determining the migratory activity of AT and CT MMSCs indicated a probable increase in the density of cells in the defect zone during culturing of AT MMSCs in comparison with CT MMSCs at all observation periods. On the 4th day of the study, a 1.3- and 1.2-fold decrease in cell density compared to the native counterparts was observed in CrMMSCs of AT and CT, respectively. However, even on day 7 of culture growth, no significant differences in the studied index between native and crMMSCs from both studied sources were observed.

The assessment of the general condition of the animals showed no significant

changes in it on day 7 after the introduction of physiological solution (control group). However, on the 7th day of adjuvant arthritis (AA) modeling, the inflammation signs were observed in the joints of the animals, namely edema and hyperemia, an increase in arthritis index (AI) by 1.58 times compared to intact animals, that confirms the development of the experimental rheumatoid arthritis (RA), that is, AA. This trend was kept throughout the whole experiment. In the animals of experimental groups 1 and 2 (local administration of the medicine), the manifestation of swelling of the joints on the 14th day decreased by 1.15 and 1.20 times, respectively, compared to the control group. On the 28th day of observation, the level of reduction in the arthritis index increased by 1.26 and 1.28 times lower in the groups, respectively, and was almost equal in the group with the introduced physiological solution. A comparative analysis of the effectiveness of different types of MMSCs shows that their systemic use led to a less pronounced decrease in IA compared to local, although the downward trend remained. However, the AI did not reach the level of intact animals in any one of the studied groups.

Histological studies showed on the 28th day after the induction of AA in the animals of the control group (AA and administration of physiological solution) the development of gross structural disorders in the area of the supracalcaneal-tibial joint, which corresponded to the 3-4 degree of bone damage according to the OARSI scale. The surface of the articular cartilage was uneven and was represented by a layer of cartilage with signs of fibrillation. In animals with AA and local introduction of AT and CT CrMMSCs (groups 1 and 2), no progression of destructive changes in articular cartilage, synovial membrane and capsule (1-2 degrees of damage according to the OARSI scale) was established during histological examination.

In the group of animals with intravenous injection of AT and CT CrMMSC (groups 3 and 4), the changes were found in the articular cartilage, subchondral bone, synovial membrane and joint capsule, that reflected the chronicity of a moderately pronounced inflammation (2-3 degrees of damage according to the OARSI scale). Compared with local administration, a more pronounced lesion in the capsule was found, that was manifested by diffuse inflammatory infiltration.

Light microscopy analysis showed that the relative area of those positively stained for glycosaminoglycans in the articular cartilage of intact animals was $92.6 \pm 5.6\%$. In the control group of animals injected with saline, the studied index was $26.4 \pm 5.1\%$, which is 3.51 times lower than in intact animals. In the animals with local administration (groups 1 and 2), the relative area of sites positively stained for glycosaminoglycans was $61.7 \pm 5.7\%$ and $69.3 \pm 6.1\%$, which, respectively, was 2.34 and 2.63 times higher than the corresponding values of the control group of animals.

In animals with systemic administration (groups 3 and 4), the studied index was $48.7 \pm 5.2\%$ and $45.1 \pm 6.8\%$, respectively, which was 1.84 and 1.71 times higher than the corresponding values in the group of animals with introduced physiological solution. However, it should be noted that in all studied groups the content of glycosaminoglycans did not reach the intact value.

The analysis of the results of the immune cytochemical study showed that the relative area of COX-2 positively stained areas in the articular cartilage of intact animals was $7.9 \pm 0.7\%$. In the control group of animals injected with saline, the studied index was $56.3 \pm 2.8\%$, which was 7.13 times higher than in the intact group. In animals with local administration of CrMMSCs from adipose and cartilage tissues, the relative area of areas positively stained for COX-2 was $21.7 \pm 5.1\%$ and $29.4 \pm 6.5\%$, respectively, which was in 2.59 and 1.91 times lower than the corresponding values in the control group of animals. In rats during multi-system administration (groups 3 and 4), the studied index was $34.7 \pm 5.6\%$ and $35.1 \pm 5.8\%$, respectively, which was 1.62 and 1.60 times lower than the corresponding value in the control.

However, it should be noted that COX-2 did not reach the intact level in all studied groups. A decrease in COX-2 content in articular cartilage was observed in all groups of animals treated with CrMMSCs. However, the degree of deviation of this index from the control was different depending on the administration way. With the local application of cell therapy, a more pronounced reduction of inflammation in the cartilage tissue was observed.

During the entire period of the study, the health status of the animals of all groups was daily monitored. During the experiment, no side effects were noted in intact

animals, a gradual increase in body weight was observed, while animals with AA lost some body weight, as a result at the end of the experiment they lagged behind intact rats in weight (by 1.2 times). On the 28th day of observation, the body weight of the animals of the experimental groups reached the level of intact rats.

Splenomegaly is one of the characteristic symptoms of AA. In animals with induced AA, an increase in the splenomegaly index (by 1.7 times) and cellularity of the spleen (by 2.8 times) was found relative to the corresponding value of the index in the group of intact animals. Probably, this phenomenon is related to the predominant growth of stromal elements of the spleen in AA.

In animals with local administration of CrMMSC from adipose and cartilage tissues (groups 1 and 2) on day 28, the splenic index was 1.27 and 1.36 times lower than the corresponding value in the group of animals with untreated AA. The investigated index in groups 3 and 4 (systemic introduction of cells) decreased by 1.49 and 1.38 times, respectively, compared to the control. The findings demonstrated that the spleen cellularity index was lower than the corresponding values of the control group (twice in average) in the animals of all experimental groups. However, it should be noted that in all studied groups it did not reach the intact value.

Different subpopulations of T cells and macrophages are known to play an important role in the pathogenesis and progression of RA. In the performed study, it was established that certain changes in the quantitative indices of the indicated immune competent cells in the spleen were observed in the rats with AA. Thus, in the group of animals with AA without therapy (control), the number of total CD3⁺ T-lymphocytes decreased by 2.13 times, the subpopulation of CD4⁺ (helpers) by 2.12 times, and CD8⁺ (suppressors) by 1.77 times. The bottom line is that the ratio of CD4⁺/CD8⁺ subpopulations (IRI – immune regulatory index) also decreased by 1.2 times compared to the group of intact animals.

In animals with locally administered CrMMSCs from adipose and cartilage tissues (groups 1 and 2), the content of various subpopulations of T cells was higher than the corresponding indices in the group of untreated animals (control). Namely, for CD-3 + 1.79 and 1.85 times, 1.76 and 1.84 times for CD4⁺, 1.44 and 1.5 times for

CD8⁺ and 1.22 and 1.23 times for CD4⁺/CD8⁺. However, in groups 1 and 2, the content of T cells in the spleen did not reach the values in the group of intact animals. When studying the subpopulation composition of lymphocytes in the spleen of animals after cell therapy with multi-systemic administration (groups 3 and 4), the content of T cells (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺) was normalized.

The fact that the number of CD4⁺CD25⁺ (T-reg) cells decreased by 1.41 times in the control group (untreated with AA) compared to the group of intact animals is crucial. In animals with local injection of CrMMSCs from adipose and cartilage tissues (groups 1 and 2), the content of T-reg exceeded the corresponding indices of the control group by 1.66 and 1.51 times, respectively. In rats with multi-systemic administration (groups 3 and 4), the studied index was 1.32 and 1.46 times higher than the corresponding values in the control group (untreated with AA).

The results obtained in this research showed that in the animals of the control group, the index of total protein content exceeded the value of the intact animals throughout the experiment. In animals that received cell therapy both under local (group 1 and 2) and multi-systemic administration (group 3 and 4), the dynamics of total protein content tended to decrease from the 14th day of observation and did not significantly differ on the 21st and 28th days from the corresponding index in the group of intact animals.

In the blood of the rats of the control group, there was an increased ESR in comparison with intact animals during the entire observation period, namely: on the 14th day by 4.9 times, on the 21st day by 4.4 times and on the 28th day by 2.4 times. It should be noted that in all experimental groups the studied index tended to normalize starting from the day 4. On day 28, ESR in groups 1 and 2 did not significantly differ from intact animals. In groups 3 and 4, the studied index was, respectively, 1.8 and 1.7 times lower compared to the control, but the normalization of this index, unlike the first two experimental groups, did not occur.

In the animals of the control group, there was an increase in the CRP index during the entire period of the experiment, namely: on the 14th day by 8.6 times, on the 21st day by 6.6 times and on the 28th day by 5.2 times in relation to the

corresponding indices in intact animals. In animals with cell therapy, the investigated index had a tendency to normalize starting from the 14th day. Thus, in the blood serum of animals of groups 1 and 2, the CRP content was 1.8 and 1.7 times lower, respectively, compared to the control on day 28. The CRP index in groups 3 and 4 on day 28 was 2.2 times lower than the control. In the group of animals with a multi-system administration of CrMMSCs, recovery of CRP content occurred faster. However, it should be noted that in all experimental groups the studied index did not reach the level of intact animals.

An increased reactive factor (RF) in rats of the control group was observed during the entire period of the experiment, namely: on the 14th day by 1.9 times, on the 21st day by 2.9 times and on the 28th day by 3.6 times in relation to the corresponding indices in intact animals. In animals with cell therapy, the studied index tended to decrease starting from the 14th day. Thus, the content of RF in the blood serum of animals of groups with local administration (group 1 and 2) on the 28th day was, respectively, 2.6 and 2.5 times lower than the control. In the group of animals with generalized administration (groups 3 and 4), the restoration of RF content in the blood of experimental animals occurred more intensively, that on the 21st and 28th days led to its decrease by 2.1 and 2.7 times, respectively, compared to the group of control animals. However, it should be noted that in all experimental groups the studied index did not reach the level of intact animals.

The total activity of the antioxidant defense system (ADS) in the blood serum of animals of the control group (injection of physiological solution) significantly decreased compared to intact rats throughout the observation period. It should be noted that in animals of all groups with cell therapy, the studied index tended to normalize from the 21st day. Thus, on the 28th day, the studied index in groups 1 and 2 was 1.92 and 2.12 times higher, respectively, compared to the control group. The activity of the ADS system in groups 3 and 4 on the 28th day was 1.67 and 1.6 times higher, respectively, compared to the group of animals that were injected with physiological solution. Thus, the restoration of the activity of the antioxidant protection system occurred more intensively in the group of animals with local introduction of CrMMSCs

from cartilage tissue.

In animals with local administration, a tendency to a decrease in the content of leukocytes was found from the 14th day of observation. And on the 28th day, the studied index in groups 1 and 2 did not statistically differ from intact animals. The content of leukocytes in groups 3 and 4 on the 28th day after therapy was, respectively, 1.22 and 1.19 times lower compared to the group of animals with the introduced physiological solution, but the normalization of this index, unlike the first two experimental groups, did not occur.

Thus, the thesis presents theoretically generalizes and provides a new solution at the preclinical stage of experimental research of an actual scientific and clinical problem of medicine, namely cryomedicine and orthopedics, i.e. overcoming and correcting the negative consequences of an experimental arthritis by using crMMSCs derived from cartilage and adipose tissue. The findings can be used to justify and develop the most recent biomedical techniques to use the stem cells as a key element in the treatment of arthritis in clinical practice.

Keywords: cryopreservation, multipotent mesenchymal stromal cells, histological structure, administration way, inflammation markers, arthritis, regeneration.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у фахових журналах, внесених у міжнародні бази Scopus та Web of Science

1. Волкова НО, **Введенський ДБ**, Юхта МС, Гольцев АМ Вплив кріоконсервування на фенотип і функціональні властивості мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин із різних джерел. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2021; 31(3):268–272. <https://doi.org/10.15407/cryo31.03.268>
2. **Vvedenskyi DB**, Volkova NO, Yukhta MS, Ashukina NO, Goltsev AM Course correction of adjuvant arthritis with cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2021; 12(3):545–553. <https://doi.org/10.15421/022175>
3. **Vvedenskyi D**, Volkova N, Babenko N, Gaevska Y, Yukhta M, Goltsev A. Role of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells in modulation of some indices of cell immunity in adjuvant arthritis. Reumatologia/Rheumatology. 2022; 60(3): 213-219. <https://doi.org/10.5114/reum.2022.117842>

Статті в українських фахових журналах:

4. **Введенський ДБ**, Волкова НО, Юхта МС, Сокіл ЛВ, Гольцев АМ Вплив клітинної терапії на динаміку маркерів запалення в крові щурів з ад'ювантним артритом. Український журнал медицини, біології та спорту. 2022; 7(1): 62-67. <https://doi.org/10.26693/jmbs07.01.062>
5. **Введенський Д. Б.**, Волкова Н. О., Ашукіна Н. О., Юхта М. С., Гольцев А. М. Динаміка гістобудови хрящової тканини та гематологічних показників у щурів з ад'ювантним артритом Вісник проблем біології та медицини. 2023; 170(3): 386-394 <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-3-170-386-394>

Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

6. **Vvedenskyi DB, Volkova NO, Goltsev AM** Comparative evaluation of morpho-functional characteristics of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from different sources. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2019; 29(2): 175.
7. **Введенський ДБ, Волкова НО, Гольцев АМ** Вплив кріоконсервування на морфофункціональні характеристики мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової та хрящової тканин. *Фізіологічний журнал*. 2019; 65(3): 9.
8. **Введенський ДБ** Морфологічні параметри кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової та хрящової тканин. «Актуальні питання сучасної медицини». 2019, Харків, Україна, с.52.
9. **Введенський ДБ, Волкова НО, Останкова ЛВ, Гольцев АМ.** Вплив кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини на систему антиоксидантного захисту у щурів з ад'ювантним артритом «VIII національний конгрес патофізіологів України». 2020, Одеса, Україна, с.47-48.
10. **Введенський ДБ, Волкова НО, Гольцев АМ** Дослідження впливу кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини на динаміку показників загального стану щурів з ад'ювантним артритом «Актуальні питання сучасної медицини». 2020, Харків, Україна, с.54-55.
11. **Vvedenskyi DB, Volkova NO, Goltsev AM** Assessment of effectiveness of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from adipose tissue in adjuvant arthritis treatment *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2020; 30(3): 292.
12. **Введенський ДБ, Волкова Н. О, Гольцев А. М.** Корегування гострої фази ад'ювантного артриту кріоконсервованими мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами *Матеріали 45-ої щорічної міжнародної конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині:*

актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» 2021 (19–20 травня), Харків, Україна, с.25.

13. **Введенський Д. Б.,** Волкова Н. О., Юхта М. С., Гольцев А. М. Досвід застосування кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини для репарації ушкоджень суглобового хряща щурів з ад'ювантним артритом. «Актуальні питання сучасної медицини». 2021, Харків, Україна, с.32-33.

14. **Vvedenskyi D,** Yukhta M, Volkova N, Stepanyuk L, Goltsev A Cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells for correction of adjuvant arthritis Cryobiology. 2022; V109: 63. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.11.201>

15. **Введенський ДБ,** Волкова НО, Степанюк ЛВ, Сокіл ЛВ, Чернишенко ЛГ, Гольцев АМ Роль кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин в терапії ад'ювантного артриту. Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» 6-7 жовтня 2022, Львів, Україна, с.120-121.

16. **Введенський ДБ,** Волкова НО, Степанюк ЛВ, Сокіл ЛВ, Чернишенко ЛГ, Гольцев АМ Вплив клітинної терапії на маркери запалення хрящової тканини у щурів з ад'ювантним артритом» науково-практичній internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» 17 листопада 2022 року, Харків, Україна, с. 99-100.

17. **Vvedenskyi, D.,** Volkova, N., Yukhta, M., & Goltsev, A. (2022). Influence of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells on regulation of immune inflammation in adjuvant arthritis. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 32(4), 305-305. <https://doi.org/10.15407/cryo32.04.305a>

ЗМІСТ

	Стор.
АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	24
ВСТУП	25
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	34
1.1 Джерела отримання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин	34
1.2 Роль клітинної терапії в лікуванні захворювань опорно рухового апарату.	44
1.3 Базові принципи проведення клітинної терапії кріоконсервованих клітин для відновлення ушкоджень тканин опорно-рухового апарату.	53
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	62
2.1 Загальні положення	62
2.2 Культивування ММСК.	63
2.3 Кріоконсервування ММСК.	63
2.4 Визначення показника життєздатності ММСК.	64
2.5 Метаболічна активність ММСК	65
2.6 Морфологічні характеристики ММСК.	66
2.7 Фенотипічні характеристики ММСК.	66
2.8 Стан процесів апоптозу/некрозу в ММСК	66
2.9 Міграційна активність ММСК	66
2.10 Моделювання ад'ювантного артрити	66
2.11 Проведення клітинної терапії.	66
2.12 Гістологічне дослідження.	67
2.13 Визначення ГАГ в хрящовій тканині суглобів експериментальних тварин.	69

2.14	Визначення ЦОГ в хрящовій тканині суглобів експериментальних тварин.	69
2.15	Визначення маси тіла експериментальних тварин	69
2.16	Визначення індексу селезінки	70
2.17	Визначення індексу клітинності селезінки	70
2.18	Визначення вмісту у селезінці CD3+, CD4+, CD8+, CD4+CD25+ клітин	70
2.19	Визначення ШОЕ	71
2.20	Визначення індексу артриту	71
2.21	Визначення кількості лейкоцитів	72
2.22	Визначення загальної активності системи АОЗ в сироватці крові	72
2.23	Визначення загального білку в сироватці крові	72
2.24	Визначення СРБ в сироватці крові	72
2.25	Визначення РФ в сироватці крові	72
2.26	Статистичний аналіз.	73
РОЗДІЛ 3 ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ФЕНОТИП І ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ІЗ РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ		74
РОЗДІЛ 4 ОЦІНКА ВПЛИВУ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ МУЛЬТИПАТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН НА СТАН ХРЯЩОВОЇ ТКАНИНИ У ЩУРІВ З АД'ЮВАНТНИМ АРТРИТОМ		84
РОЗДІЛ 5 РОЛЬ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ІЗ РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ В МОДУЛЯЦІЇ ДЕЯКИХ ПОКАЗНИКІВ КЛІТИННОГО ІМУНЕТЕТУ У ЩУРІВ З АА.		101

РОЗДІЛ 6 ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ	109
МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ	
КЛІТИН ІЗ РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ НА ДИНАМІКУ МАРКЕРІВ	
ЗАПАЛЕННЯ В КРОВІ ЩУРІВ З АД'ЮВАНТНИМ	
АРТРИТОМ	
УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	118
ДОСЛІДЖЕННЯ	
ВИСНОВКИ	127
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	129
Додаток А	153
Додаток Б	156

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ММСК – мультипатентні мезенхімальні стромальні клітини

КрММСК – кріоконсервовані мультипатентні мезенхімальні стромальні клітини

ЖТ – жирова тканина

ХТ – хрящова тканина

АА – ад'ювантний артрит

ДМСО – диметилсульфоксид

ЕС – ембріональна сироватка

ОЩ – оптична щільність

7AAD – 7-аміно-актиноміцин Д

BD – Becton-Dickinson

об./хв – обертів на хвилину

МТТ – 3-(-4,5-диметилтіазоліл-2)-2,5-дифенілтетразолій бромистий

ум.од. – умовні одиниці

ГАГ – глікозаміноглікани

ЦОГ – циклооксигеназа

Т рег – Т регуляторні клітини

СРБ – С реактивний білок

РФ – ревматоїдний фактор

АОЗ – антиоксидантний захист

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Ушкоджена хрящова тканина відрізняється від інших тканин незначною швидкістю регенерації, тому при травмуванні, перевантаженнях або вікових змінах в тканинах суглобового хряща, дефектна ділянка зазвичай не відновлює початкову структуру та функцію, що призводить до хронічних дегенеративних ушкоджень суглобів, таких як артрит [1-3]. Ревматоїдний артрит (РА) – хронічне запальне мультисистемне захворювання аутоімунної природи з переважно симетричним ураженням периферичних суглобів. Незважаючи на значний прогрес у розумінні патофізіології РА, його етіологія залишається невідомою [4, 5]. Фактор некрозу пухлини (TNF)- α та інтерлейкін (IL)-6 відіграють важливу роль у патогенезі та підтримці запалення при РА. Наявність антитіл до цитрулінового пептиду допомагає у діагностиці у пацієнтів з недиференційованим поліартритом та пов'язана з більш агресивним ревматоїдним артритом. Природний перебіг РА викликає деформацію суглобів та інвалідність, а також скорочення очікуваної тривалості життя як через підвищений серцево-судинний ризик, так і через залучення легень, інфекцій, ятрогенії або пухлин. Рання діагностика та використання таргетних препаратів для індукції ранньої ремісії покращили прогноз РА [6, 7].

Регенеративна здатність суглобового хряща обмежена ймовірно через її гіпоклітинність, гіповаскулярність, низьку метаболічну активність хондроцитів та мезенхімальних прогенеторів (резиденти з'єднувальної тканини) [8]. Тому єдиним способом скоротити термін тимчасової втрати працездатності, знизити рівень інвалідності та підвищити рівень життя хворих після травм є сприяння прискоренню відновлення хрящової тканини за допомогою сучасних методів регенеративної медицини. Використання клітин, розмнужених *in vitro*, зокрема мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК), а також факторів росту, що продукуються цими клітинами,

вже показало свою ефективність у доклінічних та деяких клінічних дослідженнях [9, 10].

Виділення клітин мезенхімального походження з органів і тканин, їх культивування та, якщо це необхідно, диференціювання є першим етапом використання матеріалу в регенеративній медицині. Отриманий таким чином запас стовбурових та спеціалізованих клітин може зберігатися при низьких температурах без суттєвих змін морфо-функціональних характеристик, що дозволяє їх вільно транспортувати та розморожувати безпосередньо перед терапевтичним застосуванням.

Хоча джерел отримання ММСК на сьогоднішній день відомо досить багато, для регенерації суглобового хряща найбільш перспективними є клітини, отримані з кісткового мозку, жирової або хрящової тканини.

Як відомо ММСК та біологічно активні речовини, які вони продукують, можуть сприяти регенерації не лише шляхом прямої диференціації клітин, але і секрецією факторів росту [11, 12]. Останні є одними з найбільш важливих молекулярних родин, що беруть участь в регенерації. За допомогою білкових рецепторів фактори росту зв'язуються з клітинами-мішенями. Рецепторні зв'язки обумовлюють внутрішньоклітинні реакції, які, однак, до кінця не з'ясовані. Слід зазначити, що регуляторами прохондрогенних клітин та безпосередньо хондрогенного диференціювання є ряд внутрішньоклітинних сигнальних молекул і факторів росту, до яких відносяться, фактор росту фібробластів (FGF), трансформуючий фактор росту- β (TGF- β), кістковий морфогенетичний білок (BMP), тромбоцитарний фактор росту (PDGF), інсуліноподібний фактор росту (IGF), епідермальний фактор [13, 14].

Таким чином, накопичення знань, щодо біології ММСК дає нові уявлення про їхнє потенційне клінічне застосування, особливо для терапії артриту. ММСК мають трофічний, імуносупресивний, регенеративний потенціали, завдяки яким вони можуть впливати на перебіг хронічних дегенеративних розладів, запобігати деградації хряща та сприяти пригніченню місцевого

запалення і пошкодженню тканин при запальних аутоімунних захворюваннях та, зокрема, при ревматоїдному артриті.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Роботу виконано згідно з планом науково-дослідної роботи відділу кріопатофізіології та імунології ІПКіК НАН України, у рамках відомчих тематик: „Застосування клітинних біотехнологій для відновлення тканин опорно-рухового апарату *in vitro* та *in vivo* ”№ держ. реєстрації 0115U001532. «Використання сучасних клітинних нанобіотехнологій в терапії ревматоїдного артриту», № держ. реєстрації 0120U102974.

Мета і завдання дослідження.

Мета роботи -дослідити вплив кріоконсервованих ММСК щурів отриманих з різних джерел (жирова та хрящова тканини) за умов локального та системного введення на динаміку перебігу експериментального артриту.

Задля досягнення поставленої мети потребують вирішення наступні **завдання**:

1. Дослідити вплив кріоконсервування на фенотип і функціональні властивості мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин із різних джерел.
2. Визначити строки розвитку ад'ювантного артриту у щурів (гострої та хронічної фази) на основі дослідження динаміки дегенеративних змін в хрящовій тканині та показників маркерів запалення в крові щурів.
3. Оцінити вплив кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин на стан хрящової тканини у щурів з ад'ювантним артритом
4. Визначити роль кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин із різних джерел в модуляції деяких показників клітинного імунетету у щурів з ад'ювантним артритом.

5. Оцінити вплив кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин із різних джерел на динаміку маркерів запалення в крові щурів з ад'ювантним артритом.

Об'єкт дослідження – перебіг патологічних змін у системі гомеостазу та гомілкових суглобах щурів на тлі ад'ювантного артриту.

Предмет дослідження – біологічні властивості кріоконсервованих мультипатентних мезенхімальних стромальних клітин отриманих з жирової та хрящової тканини.

Методи дослідження. В роботі використані наступні методи досліджень: хірургічний – моделювання ад'ювантного артриту у щурів шляхом субплантарного введення повного ад'юванту Фрейнда, кріобіологічні – отримання культури мультипатентних мезенхімальних стромальних клітин отриманих з жирової та хрящової тканин, їх кріоконсервування, цитофлюориметричний та морфометричний аналіз культур клітин, гістологічний та морфометричний – для аналізу зрізів хрящової тканини гомілкового суглобу, імуногістохімічний – для аналізу зрізів хрящової тканини гомілкового суглобу на вміст ГАГ та ЦОГ-2, цитофлюориметричні – для визначення Т регуляторних клітин в селезінці експериментальних тварин, біохімічні – для визначення показників запалення крові, методи статистичної обробки отриманих результатів – для аналізу отриманих результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. *Уперше* досліджено вплив низькотемпературного консервування на морфофункціональні характеристики культур ММСК, отриманих із жирової та хрящової тканин та показало, що їх кріоконсервування із застосуванням низької швидкості охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -80°C і середовища кріоконсервування (10% ДМСО та 20% ембріональної сироватки) не призводить до активізації процесів апоптозу, дозволяє зберегти фенотип і здатність до міграції. *Уперше* показано, що як нативні, так і кріоконсервовані мультипатентні мезенхімальні стромальні клітини з жирової тканини характеризувалися більш низьким проліферативним та міграційним

потенціалами відносно мультипатентних мезенхімальних стромальних хрящової тканини. *Уперше* показано, що на 7 добу моделювання ад'ювантного артриту спостерігалися ознаки дегенеративних змін у суглобовому хрящі, які відповідали гострому артриту та корелювали з дослідженими гематологічними показниками запалення, та при збільшенні строку спостереження до 35 діб відбувалася хронізація процесу, що призводило до розвитку виражених артрозних порушень у суглобовому хрящі. *Уперше* показано, що локальне та системне введення кріоконсервованих мультипатентних мезенхімальних стромальних клітин із жирової та хрящової тканин призводить до корекції перебігу експериментального ад'ювантного артриту у щурів: індекс артриту, гістоструктура пошкодженого суглоба мали позитивну відновну динаміку. *Уперше* показано, що застосування локального способу введення клітин порівняно з системним мало більш потужний вплив на відновлення гістоструктури, вмісту ГАГ і ЦОГ-2 хряща у щурів з ад'ювантним артритом. *Уперше* показано, що системне та локальне введення кріоконсервованих мультипатентних мезенхімальних стромальних клітин, отриманих із жирової та хрящової тканин, призвело до корекції перебігу ад'ювантного артриту, що мало прояв у зменшенні вираженості клінічних проявів патології та відновленні кількості регуляторних клітин у селезінці ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+CD25^+$). *Уперше* показано, що застосування системного способу введення клітин порівняно з локальним мало більш потужний вплив на відновлення вмісту Т-клітин у щурів з ад'ювантним артритом. *Уперше* показано, що вміст загального білку, С-реактивного білку, ревматоїдного фактору, а також швидкість осадження еритроцитів у крові тварин після клітинної терапії кріоконсервованих мультипатентних мезенхімальних стромальних клітин мають позитивну відновлювальну динаміку як у випадку застосування клітин з жирової, так і з хрящової тканин. *Уперше* показано, що використання системного способу введення клітин порівняно з локальним призводить до більш вираженого ефекту відновлення маркерів запалення у щурів з ад'ювантним артритом.

Практичне значення отриманих результатів полягає в тому, що наведені в дисертаційному дослідженні положення, мають теоретичну та прикладну направленість і можуть бути використані у:

- освітньому процесі – як основа для розширення відомостей про сучасні регенеративні та протизапальні кріоконсервовані клітинні препарати у викладанні внутрішньої медицини, зокрема ортопедії та ревматології, впровадженні отриманих відомостей у науковий процес відповідних кафедр медичних та біологічних закладів вищої освіти;
- практичній діяльності закладів охорони здоров'я щодо розширення показів до медичного застосування кріоконсервованих мультипатентних мезенхімальних стромальних клітин;
- науково-дослідній діяльності – для проведення подальших поглиблених наукових досліджень регенеративно- репаративних ефектів кріоконсервованих мультипатентних мезенхімальних стромальних клітин.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проведено патентний та інформаційний пошук, проаналізовано джерела літератури за темою дисертаційної роботи, написано всі розділи дисертації. За допомогою наукового керівника здобувачем визначено мету й завдання роботи. Автором особисто отримано експериментальні результати, проведено їх аналіз, статистичну обробку та зроблено попередні висновки. Спільно з науковим керівником автором були інтерпретовані результати та зроблені остаточні висновки. Здобувачем спільно з к.б.н. Волковою Н.О. проведені дослідження з культивування та кріоконсервування мультипатентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової та хрящової тканин, спільно з к.б.н. Ашукіною Н.О. проведено аналіз гістологічних препаратів тварин з адьювантним артритом та терапією кріоконсервованими мультипатентними мезенхімальними стромальними клітинами з жирової та хрящової тканин.

В опублікованих у співавторстві роботах особистий внесок здобувача полягає:

- у роботах [137, 154-156] у проведенні інформаційно патентного пошуку, у аналізі результатів щодо впливу кріоконсервування на ММСК отриманих з різних джерел, написанні основного тексту статті та формулюванні висновків.
- у роботі [159] у проведенні експериментальних досліджень щодо формування моделі АА у щурів, участі у гістологічних дослідженнях хрящової тканини, аналізі результатів та формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку.
- у роботах [66, 160-164] у аналізі результатів щодо впливу КрММСК з різних джерел на гістобудову та маркери запалення в хрящовій тканині у тварин з АА, формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку;
- у роботах [173-175] в проведенні експериментальних досліджень щодо формування моделі АА у щурів, проведення клітинної терапії щурам з АА, участі у проведенні цитофлюориметричного дослідження, щодо визначення Т регуляторних клітин в селезінці експериментальних тварин, інтерпретації визначених у роботі, статистичній обробці результатів та підготовці матеріалів до друку.
- у роботах [178-180] у проведенні експериментальних досліджень щодо формування моделі АА у щурів, проведення клітинної терапії щурам з АА, участі у дослідженнях показників крові в динаміці у тварин з АА та клітинною терапією, аналізі результатів та формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 17 наукових працях, у тому числі 5 статей, з яких 3 – у рецензованих фахових періодичних виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз Scopus та/або Web of Science Core Collection (у тому числі 1 – у закордонних виданнях Q3 за класифікацією Scimago Journal & Country Rank), 2 статті – у рецензованих фахових періодичних виданнях України за спеціальністю «222 – Медицина» категорії Б та 12 тез у збірниках тез закордонних та вітчизняних науково-практичних заходів.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи були представлені на 43 щорічної міжнародної конференції молодих вчених конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології (Харків, 2019); XX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім.П.Г. Костюка з міжнародною участю (Київ, 2019); XVI міжнародній конференції студентів молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2019); VIII національному конгресі патофізіологів України». (Одеса, 2020); XVII міжнародній конференції студентів молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2020); 44 щорічної міжнародної конференції молодих вчених конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології (Харків, 2020); XVIII міжнародній конференції студентів молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2021); 45 щорічної міжнародної конференції молодих вчених конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології (Харків, 2021); конференції CRYO 2022 Joint Meeting of the Society for Cryobiology and the Society for Low Temperature Biology (Дублін, 2022); міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2022); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (Харків, 2022); 46 щорічної міжнародної конференції молодих вчених конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології (Харків, 2022).

Структура та обсяг дисертації. Структура дисертації обумовлена її метою, задачами, об'єктом і предметом, а також логікою розкриття теми дослідження та викладенням його результатів. Робота складається із основної частини (вступу, чотирьох розділів, узагальнення та висновків), списку використаних джерел та

додатків. Загальний обсяг дисертації становить 157 сторінок, з яких 100 сторінок основного тексту. Роботу ілюструють 25 рисунка та 11 таблиць. Список використаних джерел займає 24 сторінки та складається з 190 найменування.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Джерела отримання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин

Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) є соматичними стовбуровими клітинами, які мають здатність до самовідновлення, багатолінійної диференціації та імуномодуляції. ММСК можуть бути виділені з різних джерел, включаючи кістковий мозок, жирову тканину, пуповину, пуповинну кров, плаценту та інше. Спочатку ММСК були ідентифіковані як стромальні або опорні клітини для гемопоетичних стовбурових клітин у кістковому мозку. Численні дослідження демонструють імуномодулюючу та гомеостатичну роль ММСК у регулюванні запалення, демонструючи їх імуномодулюючу регуляцію через між клітинний контакт і паракринну передачу сигналів [1, 2, 15, 16]. ММСК також характеризуються секрецією факторів росту та здатністю до міграції до вогнища запалення [9, 15]. Ці властивості поєднуються з легкістю культивування, роблять ММСК придатними кандидатами для експериментальних та доклінічних досліджень, а також клінічних випробувань.

Ідентичність, характеристика та тканинні джерела ММСК були узгоджені Міжнародним товариством клітинної терапії (ISCT). Існує чотири мінімальні критерії для їх визначення [10], які включають фібробластоподібну морфологію, пластичну адгезію, багатолінійність і багатопотенційність здатність до диференціації в остеобласти, адіпоцити, і хондроцити, разом з експресією клітинної поверхні білки CD105, CD73, CD90 і CD45, CD34, CD14 або CD11b, CD19 або CD79a і HLA-DR негативними. Цей мінімальний набір ідентифікаційних критеріїв ММСК не пов'язаний з джерелом їх походження.

Травмована хрящова тканина характеризується низькою швидкістю репаративно-регенеративних процесів, тому при ушкодженнях ці ділянки у більшості випадків не відновлюють початкову структуру та функцію, що у свою чергу сприяє хронізації процесу [1]. Застосування клітин, розмножених in

vitro, зокрема ММСК, а також факторів росту, що продукуються цими клітинами, вже показало свою ефективність у доклінічних та деяких клінічних дослідженнях [2, 3].

Хоча джерел отримання ММСК на сьогоднішній день відомо досить багато [11], для регенерації суглобового хряща найбільш перспективними є клітини, отримані з кісткового мозку, жирової або хрящової тканини [8, 9].

За даними авторів [11, 12] ММСК та біологічно активні речовини, які вони продукують, можуть сприяти регенерації не лише шляхом прямої диференціації клітин, але і секрецією факторів росту. Останні є одними з найбільш важливих молекулярних родин, що беруть участь в регенерації. За допомогою білкових рецепторів фактори росту зв'язуються з клітинами-мішенями. Рецепторні зв'язки обумовлюють внутрішньоклітинні реакції, які, однак, до кінця не з'ясовані. Слід зазначити, що регуляторами прохондрогенних клітин та безпосередньо хондрогенного диференціювання є ряд внутрішньоклітинних сигнальних молекул і факторів росту, до яких відносяться, фактор росту фібробластів (FGF), трансформуючий фактор росту- β (TGF- β), кістковий морфогенетичний білок (BMP), тромбоцитарний фактор росту (PDGF), інсуліноподібний фактор росту (IGF), епідермальний фактор росту (EGF), ретиноева кислота, а також глікопротеїни [13-16].

Кістковий мозок – перший з відомих джерел стовбурових клітин дорослих донорів. Саме з нього почалась нова ера регенеративної медицини. І хоча процедура отримання ММСК з кісткового мозку є травматичною, їх швидко стали використовувати у ранніх клінічних дослідженнях різних патологій, у тому числі пошкоджень опорно-рухового апарату [17, 18]. Клітини з цього джерела були використані в більшій кількості клінічних випробувань, ніж отримані ММСК з будь-якого іншого джерела. Однак їх не можна легко отримати оскільки донор повинен пройти болісну та інвазивну процедуру аспірації кісткового мозку, як правило, з гребня клубової кістки. Це

спонукало дослідників шукати альтернативні джерела МСК, які можна було б легше отримати у більшій кількості.

Незабаром з'явилося альтернативне кістковому мозку джерело ММСК – жирова тканина, з якої вони можуть бути отримані за допомогою менш інвазивних методів й у більших кількостях. Жирова тканина виникла як одна з основними альтернативними джерелами алогенних ММСК є ретельно досліджуються через їх легкість ізоляції та доступність у великих кількостях тканин, корисних для закупівля достатньої кількості первинних клітин. ММСК отримані з жирової тканини (ММСК ЖТ) можуть диференціюватися в різні типи клітин як адипоцити, остеобласти, міоцити, хондроцити, нервові клітини, гепатоцити, епітеліальні клітини та ендотеліальні клітини [12]. Крім того, ММСК жирової тканини мають маркерний профіль експресії, подібний до ММСК, отриманих з кісткового мозку. Однак, відмічають відмінності цих клітин у проліферативному потенціалі, а також у рівні експресії деяких генів, що свідчить про відсутність повної ідентичності ММСК, отриманих з кісткового мозку та жирової тканини. Розкрито характеристику ММСК ЖТ ідентифікація некласичних маркерів, включаючи CD36, CD200 і CD274 [13]. ММСК ЖТ потребують більших доз факторів росту (TGF- β та IGF-1), щоб мати хондрогенну диференціацію, порівнянну з тією, що спостерігається в ВМ- ММСК [14].

Стовбурові клітини з хрящової тканини на сьогоднішній день розглянуті у небагатьох дослідженнях *in vivo* та *in vitro*. Вивчено проліферативний потенціал та здатність до мультилінійного диференціювання клітин-попередників хрящової тканини, виділених з гіалінового хряща. Це спостереження дозволило значно просунутися у розумінні патофізіології хрящової тканини, а також зробило внесок у пошук нового потенційного інструменту для терапії пошкоджень хрящової тканини. Кілька дослідницьких груп показали, що клітини, отримані з тканини хряща також відповідають критеріям ММСК. Вони мають високий проліферативний та клоногенний

потенціали, мультипотентні властивості та імунофенотип, що притаманний ММСК. Ці клітини у літературі [19-22] мають назви «cartilagederived stromal cells», «dedifferentiated chondrocytes» та «articular-derived dedifferentiated chondrocytes».

Результати більшості досліджень з використанням ММСК з різних джерел свідчать, що при використанні методик отримання хондроцитів існують серйозні недоліки, а саме клітини при культивуванні та диференціюванні мають різну стадію розвитку, однак вони не досягають гіпертрофічної стадії, яка відповідає хондроцитам з суглобового хряща. Це явище пояснюється тим, що синтез компонентів матриці хряща (колаген II типу і аггрекан) може відбуватися лише в присутності $TGF\beta$, який діє як індуктор повного хондрогенезу ММСК. Проте в інших дослідженнях, спрямованих на тестування хондрогенного потенціалу ММСК, автори пропонують комбінувати $TGF\beta$ та BMP [19].

В роботах авторів [20-22] було показано, що клітинні культури отримані з кісткового мозку та альтернативних джерел, – сухожильної та жирової тканин, – мають імунофенотип клітин попередників мезенхімального походження, зберігають здатність до проліферації, міграції та синтезу колагену I типу.

Виділення та культивування клітин мезенхімального походження з органів і тканин є першим етапом отримання матеріалу для використання в регенеративній медицині з метою терапії патологій різного генезу: захворювань опорно-рухового апарату, неврологічних, гінекологічних, серцево-судинних захворювань, пошкоджень серця та інше. [23- 25]

Крім того, імуномодуючі властивості клітин мезенхімального походження можуть бути використані при аутоімунних захворюваннях [26] та для імунокорекції в трансплантології [27].

На сьогодні в ортопедії активно розвивається новий напрямок – регенеративна медицина. В його основу лягло використання для стимулювання відновлювання тканинних структур факторів росту, що продукуються багатьма

клітинами, а також самих клітин, вирощуваних *in vitro*, зокрема мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) та біологічно активних речовин, які вони продукують. ММСК можуть сприяти регенерації не лише шляхом прямої диференціації клітин, але і секрецією факторів росту, таких як IGF-1, TGF β , PDGF та β FGF [28- 30]. Фактори росту є одними з найбільш важливих багатофункціональних молекулярних родин, що беруть участь в регенерації. Одним з найбільш перспективних аспектів застосування ММСК для відновлення ушкоджених тканин, є безпосередня модуляція репаративно-регенеративного процесу. Відомо, що фактори росту фібробластів (FGF) є одними з ключових факторів росту, які може сприяти відновленню біомеханічних та гістологічних властивостей ушкоджених сухожиль [31]. Ідентифіковані дві основні форми FGF: FGF-1 (кислий FGF) та FGF-2 (лужний FGF). Обидві форми виявили багатообіцяючу активність у стимулюванні кісткоутворення, а також показали стимулюючий ефект на клітини сухожилля [29, 30].

Було показано, що окремі цитокіни підсилюють регенерацію сухожиль: трансформуючий фактор росту- β (TGF- β), основний фактор росту фібробластів (b-FGF), фактор росту тромбоцитів (PDGF), інсулін, епідермальний фактор росту (EGF) і фактор росту ендотелію судин (VEGF) [31, 32].

У роботах авторів було проведено дослідження морфо-функціональних характеристик кріоконсервованих ММСК отриманих з кісткового мозку, жирової та сухожильної тканин та встановили, що ММСК сухожильної тканини характеризувалися більшою здатністю до колоніє утворення та проліферації, та нижчою здатністю до спрямованого диференціювання, ніж ММСК з кісткового мозку та жирової тканини [20].

Отримані результати слід розглядати в якості однієї зі спроб визначення оптимального потенційного джерела для застосування ММСК у поєднанні з факторами росту та диференціювання в регенеративній медицині ушкоджень тканин опорно-рухового апарату. Нині у більшості випадків механізми, за

допомогою яких трансплантовані клітини стимулюють регенеративно-репаративні процеси в ушкоджених тканинах залишаються недостатньо вивченими. Таким чином, поряд із кістковим мозком та жировою тканиною, які є найбільш поширеним джерелом стовбурових клітин, альтернативним джерелом ММСК може бути хрящова тканина. Визначена в роботі різна чутливість ММСК з не однакових джерел до впливу bFGF та TGF β дозволяє їх комбінувати *in vitro* при підготовці клітинного матеріалу в залежності від конкретної клінічної потреби. Результати проведеного дослідження можуть бути використані для створення кріобанку перспективних ліній клітин стромального походження з можливістю їх наступного застосування для потреб біотехнології та клітинної терапії.

Виділення клітин мезенхімального походження з органів і тканин, їх культивування та, якщо це потрібно, диференціювання є першим етапом використання матеріалу в регенеративній медицині. Отриманий таким чином запас стовбурових та спеціалізованих клітин може зберігатися при низьких температурах без суттєвих змін морфофункціональних характеристик, що дозволяє їх вільно транспортувати та розморожувати безпосередньо перед терапевтичним застосуванням [33].

Для вибору оптимальних середовищ для кріоконсервації необхідно враховувати рівномірну зміну температури при заморожуванні і відтаюванні, використовувати програмні заморожувачі і умови кріосховища для довгострокового зберігання в рідкому азоті. Першим значним фактором є оптимальна температура кріоконсервування, при якій клітини можуть зберігати свої морфо функціональні характеристики протягом тривалого часу. До складу кріозахисних середовищ клітинам необхідний реагент такий як ембріональна сироватка, у якості джерела поживних речовин. Однак, в деяких дослідженнях було встановлено, що тваринні білки важко видалити з ММСК і що ці резидентні білки можуть посилювати несприятливі реакції у пацієнтів, які отримують ці клітини для лікування [34]. В деяких

дослідженнях було показано, що при використанні в якості складової частини кріосередовища сироваткового альбуміну людини (замість ембріональної сироватки), після кріоконсервування ММСК зберігали свою життєздатність і проліферативний потенціал. [35, 36]. Крім того, для захисту клітин від ушкоджуючого впливу низьких температур необхідні кріозахисні речовини. Є велика кількість кріопротекторів [37], серед яких ДМСО є найбільш широко використовуваним в кріоконсервації ММСК. Однак ДМСО є токсичним як для людей, так і для тварин, що ускладнює використання кріоконсервованих ММСК для клінічних застосувань [38]. Через ці токсичні ефекти є необхідним після розморожування клітин проведення процедури видалення кріопротектору (додавання надлишкового об'єму ізотонічного розчину). Для кріоконсервування стовбурових клітин частіш за все використовують розчин ДМСО в кінцевій концентрації 10% [39]. Шайк, С. і др. [40] використовували кріозащитну середу, що містить 10% ДМСО у фосфатному буферному розчині, для кріоконсервації стовбурових клітин, взятих із ліпоаспірату здорового донора. Как и в предыдущем исследовании, Барсиа, Р.Н. и другие. [41] використовували 10% ДМСО і 90% фосфатний буфер для кріоконсервації МСК пуповини (UC-MSC). Шабо, Д. і др. [42] для заморожування UC-MSC використовували розчин, що містить 10% ДМСО, 0,9% декстрану і 5% HSA (людський сивороточний альбумін). Вишеупомянутые автори підтвердили, що розморожені клітини добре поділяються в культуру, здатні генерувати колонієутворюючі одиниці та експресувати поверхневі маркери. Їх фенотипи були аналогічно незамороженим культурам [43.], а криохорона не надавала істотного впливу на потенціал адипогенної та остеогенної диференціації клітин [44]. Свіжі МСК, які не піддалися кріоконсервації, і кріоконсервовані клітини показали супоставиму життєздатність, функціональність і цілостність [42]. Клетки зберігали імуномодулюючу здатність і ангіогенний потенціал після кріоконсервації [40]. Автори припускають, що в разі введення

криоконсервованих і свіжих клітин в одиничних дозах буде матися однакова клінічна ефективність [41].

Існує кілька методів поряд з впровадженням автоматизованих промивок клітин для видалення ДМСО із заморожених відігрітих клітин [45]. Зовсім недавно для криоконсервування тканин був введений новий метод з використанням суміші 0,05 М глюкози, 0,05 М сахарози і 1,5 М етиленгліколю в фосфатно-буферному сольовому розчині [46], який показав успішну наступну ізоляцію і характеристику ММСК після 3 місяців низькотемпературного зберігання тканини. Отже, цей метод не містить ДМСО і ембріональної сироватки тварин, але він ще не застосовується для криоконсервування ММСК. З цих даних ясно, що для клітин, які планують використовувати в клінічній практиці необхідний протокол криоконсервування або з низькою концентрацією ДМСО, або для заміни ДМСО нетоксичного альтернативою. Для криоконсервації ММСК другим важливим фактором є швидкість заморожування температури. Найчастіше повільне заморожування зі швидкістю $1^{\circ}\text{C} / \text{хв}$ є оптимальною швидкістю для збереження ММСК [47]. Для цієї мети контрольовані за швидкістю заморожувачі підходять для регулювання та підтримки температури в процесі криоконсервування. Кріозаморожувачі можуть бути запрограмовані для визначення точної температури, яку зразок відчуває під час криоконсервування [48]. Таким чином, для криоконсервування ММСК у вигляді суспензії загальноприйнятим вважається метод, що включає повільне охолодження ($1^{\circ}\text{C} / \text{хв}$) до -80°C з наступним зануренням у рідкий азот та швидким режимом відігрівання. У якості кріозахисного середовища у більшості випадків застосовують 10% ДМСО і 20% ембріональну сироватку великої рогатої худоби, який забезпечує високу життєздатність ММСК після заморожування-відігріву [49]. Слід зазначити, що кріостійкості клітин в суспензії сприяють їх сферична форма і відносно вільне розташування в середовищі, що полегшує зміну об'єму клітин у відповідь на збільшення

концентрації речовин у позаклітинній середовищі і дає можливість уникнути механічного пошкодження рухомим фронтом зростаючих кристалів льоду [50].

Муценко В. та ін. [51] розробили комбінований протокол для кріоконсервації тканинно-інженерних конструкцій. Пористі тривимірні каркаси на основі мінералізованої суспензії колагену, покриті амніотичними МСК *Callithrix jacchus*, піддавали 24-годинному попередньому заморожуванню з 100 мМ сахарози в культуральному середовищі, після чого до зразків по краплях додавали кріопротектор для отримання кінцевої концентрації 10 % DMSO і 20 % FBS. Деякі зразки були доповнені 300 мМ сахарозою. Потім зразки залишали на льоду на 15 хв, після чого видаляли надлишок кріопротекторної суміші. Після цього каркаси заморожували до -152 °C і зберігали при цій температурі протягом 5 днів, а потім розморожували. Оцінка життєздатності клітин у каркасах показала, що попередня обробка сахарозою зменшила розвиток осмотичного стресу під час заморожування. Крім того, кріоконсервація за протоколом, включаючи додавання сахарози в кріосреду, виявилася більш ефективною, ніж використання лише ДМСО. При оцінці механічних властивостей каркасів після кріоконсервації виявлено мікротріщини, які могли утворитися через розширення льоду в порах конструкції. Хоча метод заморожування «на відкритому повітрі» (таку назву дали автори) мінімізує кристалізацію залишків кріопротекторів, повністю усунути руйнівний вплив льоду на механічні властивості 3D-структур не вдалося [51].

Узагальнюючи наведені в огляді матеріали, можна зробити висновок, що технологію кріоконсервування MSC, незважаючи на її широке застосування в біобанкінгу, важко стандартизувати, багато в чому через варіабельність її різних фаз. Вибір кріопротектора та кріопротекторного середовища, як одного з перших кроків у кріоконсервації, ймовірно, демонструє найбільшу варіативність. Така варіативність зумовлена постійним пошуком нових

рішень як щодо кріопротекторів, так і щодо оптимізації складу кріопротекторної суміші. Тут розробка багатокомпонентних середовищ стає найперспективнішим засобом оптимізації, оскільки завдяки поєднанню різних речовин забезпечує створення нетоксичного заморожуючого середовища з високим кріопротекторним ефектом. Слід зазначити, що оптимізація та стандартизація вибору кріопротектора значною мірою сприятиме стандартизації всього процесу кріоконсервації, оскільки варіативність наступних етапів суттєво залежатиме від обраного кріопротектора та його концентрації. Наприклад, при використанні внутрішньоклітинних кріопротекторів потрібна інкубація при фізіологічних температурах, але це не стосується екзоклітинних протекторів; при низьких концентраціях кріопротекторів реалізується протокол повільного заморожування, і зразки згодом можна зберігати при будь-якій температурі ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ або в рідкому азоті), тоді як при високих концентраціях кріопротекторів лише склування та зберігання в рідкому азоті може бути використаний.

РОЗДІЛ 1.2. Роль клітинної терапії в лікуванні захворювань опорно рухового апарату.

Проблема лікування ревматичних захворювань актуальна в усьому світі. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, у розвинених країнах світу запальні захворювання суглобів і сполучної тканини посідають друге місце після серцево-судинної патології серед причин інвалідності та смертності. Ревматоїдний артрит характеризується аутоімунним хронічним запальним синовітом з прогресуючою деструкцією суглобів і широким спектром позасуглобових (системних) проявів [4]. Нині для лікування даної патології використовують нестероїдні протизапальні препарати, анальгетики, глюкокортикоїди, синтетичні базові протизапальні препарати та генно-інженерні біологічні препарати, які поділяються на п'ять класів: інгібітори фактора некрозу пухлин; анти-В-клітинні препарати; блокатор костимуляції Т-клітин, антагоністи рецепторів інтерлейкіну 1 та 6 [5, 6]. Крім системних препаратів при ревматоїдному артриті також широко застосовуються внутрішньосуглобові ін'єкції. Наприклад, місцева терапія глюкокортикоїдами зменшує запальну активність у тканинах суглобів шляхом зменшення клітинної інфільтрації та експресії прозапальних цитокінів, які індукують синовіт [52]. А місцеве застосування інгібіторів фактора некрозу пухлин призводить до значного зниження проліферації клітин синовіальної тканини [53]. Незважаючи на наявність на світовому фармацевтичному ринку великої кількості протиревматоїдних препаратів, а також певні успіхи в розробці різноманітних протоколів їх комбінованого застосування, терапія ревматоїдного артрити залишається актуальною задачею. Багато факторів беруть участь в ініціації та підтримці аутоімунного процесу при ревматоїдному артриті [54]. Однією з можливих причин захворювання є порушення регуляції сигнальних систем, що забезпечують баланс між процесами апоптозу і проліферації. Насправді в багатоклітинному організмі апоптоз виступає як невід'ємний компонент. Його генетичні та метаболічні порушення значною мірою сприяють патогенезу

деяких патологій, включаючи ревматоїдний артрит [55]. На цьому фоні було відзначено інфільтрація синовіальної оболонки лімфоцитами, моноцитами, плазматичними клітинами, які при кооперативній взаємодії виділяють медіатори, провокуючи запальну реакцію і руйнування тканин.

Сьогодні в терапії РА використовується широкий спектр імуномодуляторів [7, 56]. Ці препарати не завжди високоефективні, а результати іноді суперечливі та неоднозначні. Важливими факторами, що обмежують імуносупресивну терапію РА, є стійкість до раніше ефективних препаратів, яка часто виникає при їх тривалому застосуванні. Це підкреслює необхідність подальшої розробки нових ефективних та безпечних імуотропних засобів для корекції імунокомпетентної сфери хворих на артрит. У зв'язку з цим не можна не відзначити численні профілі імунокорегуючої активності клітинної терапії. Одним із перспективних терапевтичних підходів є застосування мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) [57]. Маючи високий регенеративний і репаративний потенціали, ці клітини здатні реалізовувати імуномодулюючий потенціал, у тому числі імуносупресивний [58]. Кістковий мозок, жирова тканина, пуповинна кров і ендотеліальні клітини-попередники є найпопулярнішими типами ММСК, які використовуються для лікування аутоімуних захворювань. ММСК викликають великий інтерес через їх джерело потенціалу, високий рівень проліферації, менш інвазивну техніку та відсутність етичних проблем порівняно з іншими методами лікування, тому вони мають значну перевагу. Імуносупресивні та протизапальні властивості ММСК призвели до перевірки терапевтичного потенціалу цих клітин на доклінічних моделях РА, як запальний артрит [59]. Декілька досліджень показали, що ММСК, отримані з кісткового мозку або жирової тканини, мають здатність «перезавантажувати» імунну систему, зменшуючи шкідливу відповідь Th1/Th17 і посилюючи захисну реакцію регуляторних Т-клітин, хоча в інших дослідженнях не вдалося продемонструвати поліпшення лікування ММСК. Непослідовні результати в

доклінічних моделях можуть бути наслідком кількох змінних, таких як джерело ММСК (сингенний, аутогенний або алогенний), походження тканини ММСК, час лікування, кількість введених клітин, шлях ін'єкції та режими лікування, різні умови культивування, а також відмінності в лініях тварин і в умовах утримання. І хоча результати експериментальних і клінічних досліджень останніх років свідчать про імуномодулюючу, загоювальну, протизапальну дію ММСК, сила і тривалість ефекту дуже різні, що свідчить про неповну корекцію досліджуваних параметрів, тим самим відкриваючи перспектива удосконалення цього методу лікування шляхом вибору дозочасових параметрів та способів їх введення.

Основною метою лікування ревматоїдного артриту є повне або часткове зниження активності захворювання. Раніше вважалося, що лікування протиревматичними препаратами «достатньо добре», а одужання вважалося настільки ж бажаним, наскільки недосяжним. Сьогодні вважається, що базова терапія може уповільнити прогресування захворювання та викликати стійку ремісію, особливо якщо вона розпочата з тривалістю симптомів менше 12 тижнів. Якщо їх призначення запізнюється, то не всі базові препарати можуть «встигнути» проявити свою дію. Чим більше тривалість захворювання (тривала хвороба ревматоїдного артриту), тим гірша реакція на «базові» препарати в порівнянні з пацієнтами, які отримують цю терапію на ранній стадії захворювання. Краще, якщо вони будуть призначені відразу після постановки діагнозу. Базуючись на аналогії з базовою терапією, у нашому дослідженні ми обрали ранню фазу експериментального ад'ювантного артриту для оцінки ефективності клітинної терапії [60].

На жаль, традиційні методи лікування, впливаючи лише на окремі ланки патогенезу ревматоїдного артриту, можуть бути ефективними для припинення розвитку патологічного процесу в суглобах, але їх застосування не має відновного ефекту. Ще одна проблема при лікуванні аутоімунних захворювань полягає в тому, що імунна система є складною, і застосовувані ліки зазвичай

націлені лише на одну або невелику частину системи [61]. Крім того, деякі фармакопейні препарати, які використовуються для лікування артриту, викликають залежність і мають побічні ефекти [62].

Проте регенеративні процеси в уражених ревматоїдним артритом суглобах можуть стимулюватися мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами (ММСК). Сьогодні виділення, культивування та кріоконсервація клітин мезенхімального походження є основою для отримання клітинного матеріалу, який використовується в регенеративній медицині для лікування патологій різного генезу [63].

Сьогодні ММСК залишаються предметом особливої уваги, оскільки вони характеризуються мультипотентністю, трофічним та імуномодуючим потенціалом, здатні підтримувати кровотворення та продукувати цитокіни, хемокіни та фактори росту [64]. Загалом такі властивості роблять ММСК одними з головних кандидатів для розробок біотехнології та тканинної інженерії. І оскільки ці клітини можуть задіяти складні механізми, які організм природним чином використовує для модуляції та відновлення імунного дисбалансу, терапія ММСК має потенціал для лікування та корекції аутоімунних розладів, включаючи ревматоїдний артрит, у спосіб, яким звичайні ліки ще не доступні. В даний час в цій області проводиться багато досліджень, але в роботах використовувалися ММСК, отримані з різних джерел, а також дуже різні режими лікування і дозування. Зокрема, терміни клітинної терапії та спосіб введення ММСК залишаються нерегульованими [65].

Раніше ми показали, що клітинні культури, отримані з кісткового мозку та альтернативних джерел (сухожилля, жирова тканина та хрящ), мають фенотип клітин-попередників мезенхімального походження, зберігають здатність до проліферації, колонієутворення та міграції. Кріоконсервовані ММСК (КрММСК) з цих досліджених джерел зберігали цілісність мембрани, здатність до адгезії, утворення колоній, проліферації, синтезу колагену типу I та спрямованої диференціації. Аналіз фенотипу показав, що досліджувана

культура КрММСК характеризується високим рівнем експресії ($\geq 90\%$) CD44, CD90, CD105, CD73 та низькою ($\leq 1\%$) експресією гемопоетичного маркера CD45. Культури клітин, отримані з усіх досліджених джерел, мають фенотип клітин-попередників мезенхімального походження. ММСК хрящової тканини характеризуються більшою здатністю до колонієутворення та проліферації та меншою здатністю до спрямованої диференціації, ніж ММСК кісткового мозку та жирової тканини [66]. В іншому дослідженні [67] показано вплив факторів росту та диференціації на КрММСК з кісткового мозку, жирової та хрящової тканин. Показано, що додавання фактора росту фібробластів до культурального середовища призводило до підвищення проліферативного потенціалу КрММСК з кісткового мозку та жирової тканини. А використання трансформуючого фактора росту β підвищувало синтез колагену II типу та глікозаміногліканів цими клітинами під час культивування. Але відповідь ММСК кісткового мозку на вплив цих факторів росту була більш вираженою порівняно з жировими. Проліферативна активність, синтез колагену II типу та глікозаміногліканів КрММСК з хрящової тканини не зазнавали змін під впливом досліджуваних факторів, але вони характеризувались відносно більшою активністю синтетичних процесів порівняно з КрММСК з кісткового мозку та жирової тканини.

Ревматоїдний артрит (РА) являє собою аутоімунне та запальне захворювання, при якому імунна система атакує здорові клітини, викликаючи набряк та запалення суглобів. РА також може поширюватися на інші ділянки тіла та переважно діагностується у жінок [68]. Причини РА ще належить повністю зрозуміти. Введення ММСК пацієнтам із РА показало позитивні результати у недавніх клінічних випробуваннях. Введення ММСК (сумарна доза клітин 4×10^7) 64 пацієнтам з діагнозом РА призвів до значного зниження рівня глобулінів крові та тромбоцитів протягом 1 року після терапії. Крім того, спостерігали достовірне зниження швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ), рівня С-реактивного білка та ревматоїдного фактору (РФ). Це зниження

серологічних та імунологічних маркерів у хворих на РА та відновлення активності імунної системи підкреслює терапевтичний та імуномодулюючий потенціали ММСК. Довгострокове полегшення загального стану пацієнтів та функції суглобів (вимірювана за шкалою DAS28) після застосування ММСК спостерігали через 1 рік та 3 роки [69]. Так в роботі авторів, було наведено дані саме клінічних досліджень використання клітинних препаратів в лікуванні РА. Спостереження проводили на 105 пацієнтах, у яких майже не було відповіді до традиційних ліків які застосовують при лікуванні РА, таких як протиревматичні препарати, що модифікують хворобу та нестероїдні протизапальні препарати. Для дослідження ефективності клітинної терапії, хворі були поділені на контрольну групу (без лікування) та групу яка отримувала ММСК. Була досліджена наступна схема лікування: терапія ММСК була проведена шляхом внутрішньовенного введення (1×10^6 клітин/кг (50 мл фізіологічного розчину)). Із 52 пацієнтів з терапією ММСК спостерігали відповідь на клітинну терапію через 12 тижнів та значне зниження показника активності захворювання. Також у пацієнтів контрольної групи та тих, у яких не спостерігали відповідь на введення ММСК, не було зазначено жодних значних змін в DAS28, що разом вказує на те, що лікування ММСК покращувало загальні клінічні симптоми [23, 24]. У пацієнтів з РА зазвичай спостерігається зниження CD4+CD25+Foxp3+ Treg позитивних клітин та підвищення відсотку CD4+IL-17A+ T17 клітин. Таким чином, низьке співвідношення між Treg до клітин T17 вказує на дисбаланс в імунній системі [69-71]. Це дослідження показало значне підвищення співвідношення Treg до T17 у групі з терапією ММСК порівняно з контрольною групою та групою без відповіді, що безпосередньо демонструє імуномодельючі ефекти ММСК при наявних дисрегуляторних процесах за умов розвитку РА. За літературними даними, як правило, у хворих на РА спостерігається низький рівень IL-10 та високий рівень IL-6. Отримані в роботі результати показали, що мало місце значне зниження рівня IL-6 та достовірне підвищення рівня IL-10 при контрольному огляді пацієнтів через 4 тижні після

проведення клітинної терапії. [69-72]. При клінічних випробуваннях ММСК при лікуванні РА у людини у фазі 1а тестували ММСК шляхом одноразового введення ММСК. Цитокіни у сироватці вимірювали для визначення ефективності лікування через 24 години. Результати показали зниження IL-8, IL-6, IL-1 β і TNF- α група, що отримала більш високу дозу клітин (1×10^8 клітин). Більше того, дуже важливим моментом є те, що жодних несприятливих факторів чи загроз безпеці не постерігалось [73].

В дослідженні авторів [74] з використанням моделі експериментального РА на мишах, яке було спрямоване на вивчення молекулярних механізмів, за допомогою яких ММСК з кісткового мозку впливають на стан при РА, було показано, що клітини ефективно сприяють зниженню рівня мікроРНК-584е за рахунок зменшення активності NF- κ B.

За даними наведеними в роботі [75], імплантація ММСК з кісткового мозку (40 мільйонів клітин на суглоб) у пацієнтів з РА призводила до виражених покращень колінного суглоба, ніж група плацебо, яка замість цього отримувала фізіологічний розчин. За даними авторів, не дивлячись на позитивні результати клітинної терапії у пацієнтів з ревматоїдним артритом, ці дослідження потребують повтору та збільшення кількості пацієнтів [75].

Остеоартрит (ОА), дегенеративне захворювання кісток, впливає на понад 32 мільйони дорослих у США. Характеристики цього захворювання включають дегенерацію суглобового хряща, зміни субхондральної та навколосуглобової кістки, і обмежене внутрішньосуглобове запалення, що супроводжується синовітом [76]. Багато досліджень аналізували вплив ММСК при лікуванні ОА, і численні клінічні дослідження показали позитивні результати. Внутрішньосуглобова ін'єкція гіалуронової кислоти в поєднанні з культивованими ММСК у пацієнтів з остеоартритом колінного суглоба після операції показали відновлення хрящової тканини за даними магнітно-резонансного спостереження у порівнянні з пацієнтами яким вводили тільки гіалуронову кислоту [77]. Крім того, було показано, що внутрішньосуглобове

введення ММСК з жирової тканини пацієнтам з ОА в суглоб сприяло покращенню функціонування коліна пацієнтів, знімала больовий синдром і не викликав ніяких негативних наслідків. Це полегшення болю і функції коліна можна пояснити зменшенням дефектів хряща та збільшенням об'єму хряща. Причому ін'єкційна доза 10^8 ММСК було визнано найбільш ефективним у зменшенні симптомів ОА [78].

Завдяки імуnoreгуляторним властивостям ММСК застосовують в дослідженнях в яких необхідно впливати як на вроджені, так і на адаптивні імунні відповіді. Відомо, що ММСК пригнічують проліферацію Т-лімфоцитів, індуковану мітогенними і алогенними лімфоцитами периферичної крові і ДК [79]. Інгібування Т-клітин є дозозалежним із піковим значним зниженням проліферації Т-лімфоцитів. ММСК також впливають на утворення регуляторних Т-клітин, які допомагають пригнічувати проліферацію алогенних лімфоцитів. Незважаючи на те, що точний механізм імуносупресивних ефектів ММСК ще належить повністю дослідити, ми зауважте з відомої літератури, що розчинні фактори такі як простагландин E2 (PGE2)], індоламін-2,3-діоксигеназа (IDO), фактор росту гепатоцитів (HGF) і трансформуючий фактор росту (TGF)- β 1 відіграють основну роль у імуносупресивному ефекті ММСК. Також вони можуть бути залучені до генерації та розвитку ДК, які є антигенпрезентуючими клітинами в імунній системі. Крім того, виявлено, що ММСК у спільному вирощуванні з ДК зменшують експресію CCR7 та інгібують диференціювання моноцитів в останні [80]. ММСК також здатні сприяти трансформації фенотипу M1-M2 макрофагів. Макрофаги є спеціалізованими імунними клітинами, які беруть участь у виявленні, фагоцитозі та видаленні патогенних агентів у вродженій імунній системі. Диференціювання моноцитів в макрофаги відбувається в тканинах у відповідь на сигнали мікрооточення, що призводить до придбання специфічних функціональних фенотипів [81, 82].

Слід зазначити, що ММСК опосередковують регуляцію макрофагів, тобто вони мають вирішальне значення для обмеженої реакції на запалення та

пошкодження при загоєнні тканин. Відомо, що ММСК регулюють запальну реакцію господаря на сепсис і значно покращують виживання господаря [83]. Ролі ММСК у регулюванні різних типів імунних клітин розглядають їх як відповідні терапевтичні кандидати для лікування імунозалежних захворювань. Поширені імунні розлади такі як аутоімунний цукровий діабет типу 1, ревматоїдний артрит, системний вовчак еритематоз, реакцію «трансплантат проти хазяїна» є мішенню для терапії ММСК

Результати аналізу літературних джерел з зосереджуванням на хворобах, що загрожують опорно руховому апарату та імунній системі, клінічні випробування з ММСК не обмежуються ними, і вони випробовуються в багатьох інших областях. За рахунок їх багатолінійної диференціації, потужній проліферації, секреторних факторів і відносної легкості ізоляції від різних частин тіла, ММСК можуть бути застосовані в численні умови. Крім того, ведуться активні зусилля щодо оптимізації методології введення ММСК та алгоритмів лікування захворювань ортопедичного профілю. В багатьох експериментальних випробувань використовували різні дози ММСК, порівнювали ефективність ММСК від різних джерел, використовували екзосоми отримані при культивуванні ММСК замість клітин та комбінували ММСК з іншими речовинами/клітинами. Та все ж питання ролі клітинної терапії в лікуванні артритів залишається актуальним.

РОЗДІЛ 1.3. Базові принципи проведення клітинної терапії кріоконсервованих клітин для відновлення ушкоджень тканин опорно-рухового апарату.

Важливим і актуальним питанням сучасної ортопедії на сьогодні є розробка чіткого патогенетичного обґрунтованого алгоритму лікування хворих з патологіями опорно рухового апарату. Тактика лікування характеризується неузгодженістю застосування різних методів терапії та їх низькою ефективністю, що пояснюється нездатністю задіяних методів відновити на достатньо високому рівні метаболічні та репаративні процеси в ушкоджених тканинах [84-86].

Завдяки успіхам у вивченні специфічних якостей стовбурових клітин, зокрема їх пластичності, стає реальним вдосконалення терапевтичного мислення, перш за все, в інтересах персоніфікованої медицини, а також розширення діагностичних та концептуальних аспектів корекції ряду патологій людини [87]. Через свої унікальні властивості ММСК є предметом особливої уваги, оскільки вони здатні до підтримки гомеостазу, секреції цитокінів, хемокінів та факторів росту, а також мають трофічний і імуномодулюючий потенціали. В цілому, ці властивості роблять їх одним з головних кандидатів для біотехнологічних та тканинно-інженерних розробок.

При застосуванні клітинної терапії для лікування патологій опорно-рухового апарату у більшості випадків використовують метод введення клітин *in situ* (локально) [88-90]. Існуючі експериментальні дані по внутрішньовенному введенню ММСК в організм інтактної тварини свідчать про імуномодулюючу дію та дифузний розподіл донорського матеріалу, в першу чергу по тканинам мезодермального походження [91, 92].

Існують різні типи факторів запалення в процесі пошкодження, відновлення та ремоделювання тканин разом із прогресуванням захворювання, ці фактори є незамінними для посилення реакції ММСК.

Однією з вроджених реакцій на гостру травму є формування відносно гіпоксичного мікросередовища *in situ*, яке виникає внаслідок збільшення потреби інфільтрованих клітин у кисні та високої швидкості метаболізму в поєднанні зі звуженням судин, спричиненим запальними стимулами [93]. Гіпоксія швидко підвищує рівень ICAM-1 у ділянках запалення через гіпоксій-індукований фактор 1α (HIF1 α) та ICAM-1 може помітно сприяти міграції ММСК до зон ураження [94]. Крім того, паракринні властивості ММСК вивільняти хемотаксичну та ангіогенних факторів значно посилюється в умовах гіпоксії. Це є передумовою для розгляду системного введення у якості альтернативи або доповнення для локального введення клітинного матеріалу.

Застосування системного введення базується на хоумінгу - здатності стовбурових клітин до міграції в «потрібне місце» - «рідний» орган і тканину (в свою стовбурову нішу) або в область пошкодження. Основу досліджень в області хоумінга заклали роботи Г. Сельє і А.Я. Фріденштейна. Наявність хоумінга довели Тілл і МакКулох експериментами по ендогенному колонієобразованію. Для спрямованої міграції стовбурової клітини необхідні дві групи процесів: по перше - зміни в кістковому мозку, в результаті яких вона залишає свою "нішу", набуває здатності до міграції, проліферації і диференціювання; по друге - виділення в місці пошкодження "маяків" міграції.

Як відомо, мікрооточення травми може впливати на міграцію, адгезію і диференціювання трансплантованих стовбурних клітин. Трансплантовані стовбурові клітини здатні до трансдиференціювання в тканинно-специфічні клітини або зливатися з існуючими природними клітинами для поліпшення функції органів шляхом внесення їх власних генетичних і клітинних матеріалів [95-97]. Через здатність ММСК до «самонаведення», існування якого підтверджено в багатьох експериментальних дослідженнях, вони

мігрують в пошкоджену тканину [98, 99], забезпечуючи ефекти клітинної терапії на рівні органів.

Було показано, що ММСК, за умов стимулювання інтерфероном- γ та фактором некрозу пухлини- α або IL-1, виявляли велику імуносупресивну здатність за рахунок підвищення експресії ICAM-1 та молекули адгезії судинних клітин-1, обидва *in vitro* та *in vivo* [100]. В роботах авторів було зазначено ключову роль у формуванні регуляторної ролі ММСК відіграє запальне середовище. Під час запалення макрофаги M1 або лімфоцити Т-хелперів типу 1 (Th1) секретують високі рівні прозапальних цитокінів, які надають ММСК виражену імуномодуючу здатність та продукує індукцибельну синтазу оксиду азоту (iNOS) у гризунів або індоельмін-2-3-диксоїгеназу (IDO) в інших видів ссавців для пригнічення чутливості Т-клітин [101, 102]. Хоча здатність до диференціювання та імуnoreгуляторні функції окремих клонів ММСК гетерогенні, застосування ММСК у комбінації з прозапальними агентами рівномірно посилювало їх інгібуючу дію на Т-клітинну відповідь і усувало різницю в ступені супресії. Запальні сигнали поляр для відновлення тканин. У свою чергу, фактори, що вивільняються ММСК, сприяють ремоделюванню мікрооточення пошкодженої тканини [103].

Завдяки своїм імуномодельючим властивостям ММСК мають здатність перешкоджати Т-клітинам, В-клітинам, антиген презентуючим клітинам - і природним кілерам опосередкованим клітинами імунним відповідям. Викликаючи критичні зміни в їх імунобіології, ММСК можуть брати участь в імунному гомеостазі. Цілком ймовірно, що ММСК перевиховують імунні клітини, щоб індукувати розвиток регуляторних імунних клітин з толерогенними властивостями [104]. Ці регуляторні імунні клітини, такі як регуляторні Т-клітини, регуляторні В-клітини, регуляторні антиген презентуючі клітини і природні кілери, будуть збиратися, щоб створити толерогене середовище, відповідне для модуляції імунної відповіді [105].

Численні дослідження показали, що ММСК впливають на імунні відповіді Т- і В-клітин: по-перше, ММСК пригнічують проліферацію Т-клітин, секрецію цитокінів та цитотоксичність і регулюють баланс Th1/Th2 [106]; по-друге, ММСК регулюють функції регуляторних Т-клітин [107]; по-третє, ММСК підвищують життєздатність В-клітин, але також можуть пригнічувати їх проліферацію і зупиняти клітинний цикл [108]; По-четверте, ММСК інгібують дозрівання, активацію і подачу антигену дендритних клітин [109], а по-п'яте ММСК також інгібують індуковано інтерлейкином-2 активацію кілерних-клітин [110, 111]. Коригувальний ефект внутрішньовенної ін'єкції ММСК кісткового мозку на перебіг запалення, ймовірно, пов'язаний з протизапальними та імуномодуючими властивостями. Була ідентифікована секреція деяких чинників, таких як фактор росту ендотелію судин, ангіопоетин-1, фактор росту фібробластів, трансформуючий фактор росту бета-1, фактор росту гепатоцитів, нейротрофічних факторів мозку, нейротрофічний фактор лінії гліальних клітин і тромбоцитарний фактор росту [112]. Крім того, ефекти ММСК виходять за межі конститутивних імуномодуючих властивостей з вивільненням цитокінів і факторів, таких як фактор некрозу пухлин α , інтерлейкін-1, інтерлейкін-6 та IFN- γ [113].

ММСК виявляють свої імуномодуючі ефекти, при взаємодії як з вродженими, так і з адаптивними імунними клітинами. ММСК знижують експресію костимулюючих молекул МНС II, CD40 і CD86 на зрілих ДК, а також пригнічують дозрівання культивованих ДК частково за рахунок ІЛ-6-залежного механізму, інгібуючи, таким чином, проліферацію Т-клітин, включаючи HLA-G151 і LIF [114]. Спленоцити за умов сумісного культивування продукують велику кількість ІЛ-10, який є важливим цитокіном, що спонукає ММСК секретувати розчинну ізоформу HLA-G5 для пригнічення вродженого імунітету. ММСК зазвичай виконують свою терапевтичну функцію за рахунок врівноваження прозапальних та протизапальних реакцій, які зазвичай опосередковані придушенням

надмірних Th1-відповідей та перемиканням на Th2-тип. Повідомляється, що антагоніст рецептора інтерлейкіну-1 (IL-1Ra), що продукується ММСК, змінює запальну та фіброзну реакцію при хронічному пошкодженні легень [115]. IL-1Ra також може викликати поляризацію макрофагів з фенотипу M1 на M2 і прискорювати загоєння. IL-4 поляризує мікроглію у бік протизапального фенотипу з підвищеною фагоцитарною здатністю очищати позаклітинний α -синуклеїн, що вказує на нейропротекторну роль при паркінсонічному розладі. Цитокіни (IL-4, IL-5 та IL-13) та імуноглобуліни типу Th2 у сироватці за рахунок збільшення продукції TGF- β в активованому шляху STAT6 [116]. Було показано, що TGF- β у ММСК кісткового мозку опосередковує більшість супресивних ефектів, особливо для індукції регуляторних Т-клітин та інгібування адаптивних імунних реакцій [117]. В мікроглії, стимульованій ЛПС, TGF- β перешкоджає їх поляризації до фенотипу M1 шляхом інгібування передачі сигналів NF- κ B і відновлює їх експресію CX3CR1 [35]. Однак аутокринний TGF- β в ММСК обмежуватиме імуносупресивний ефект ММСК шляхом інгібування їх експресії iNOS SMAD3-залежним чином [118].

Механізми, що лежать в основі багатогранної імуномодулюючої функції ММСК, описані широко. Слід виділити деякі важливі регуляторні фактори, які визначають взаємодію між МСК та імунними реакціями. Так наприклад вісь ЦОГ 2-PGE2.

В дослідженнях ММСК для лікування РТПХ, було виявлено, що ММСК виявляли потужну дозозалежну імуносупресивну дію на реакцію лімфоцитів, ефект, опосередкований експресією ферментів ЦОГ1/ЦОГ2 і продукцією PGE2 [119]. Імуносупресивна роль ММСК залежить від PGE2 [120]. ЦОГ2 є індукованим ферментом, який в основному присутній на люмінальній поверхні ендоплазматичного ретикулуму, а також на внутрішній і зовнішній мембранах ядерної оболонки [121]. ЦОГ1 конститутивно експресується в більшості клітин та відіграє життєво важливу роль у регуляції функції нирок

та захисті слизової оболонки шлунка. Повідомлялося, що вісь COX2/PGE2 є важливим медіатором опосередкованої ММСК імунної регуляції, яка включає в себе програмування пластичності макрофагів, придушення активності NK-клітин, і придушення диференціювання Th17 [122]. Важливо відзначити, що PGE2 зберігає імунний привілей алогенних ММСК під час терапевтичної інфузії. В експериментальній моделі пошкодження печінки було виявлено, що PGE2 зв'язується з EP протанойдним рецептором 4 (EP4) на попередниках CD11c+B220-DC і індукує їх диференціювання у напрямку регуляторного фенотипу PI3K залежним чином [123]. Слід зазначити, що COX2 також необхідний ремоделювання тканин, опосередкованого ММСК, особливо відновлення кісток. ЦОГ-2 може посилювати потенціал остеогенезу та пригнічувати хондрогенне диференціювання в скелетних стовбурових клітинах за допомогою канонічного сигнального шляху Wnt/ β -катеніна. Вісь ЦОГ-2/PGE2 відіграє ключову роль у сприянні остеогенному диференціювання ММСК у початковій прозапальній фазі. опосередковується макрофагами M1 [124]. У той же час секретований ММСК PGE2 діє на макрофаги, змінюючи метаболічний статус, зміщуючись у бік поляризації M2, [43] що сприяє диференціації ММСК і регенерації тканини.

В роботі авторів [125] було показано, що локальне та системне введення кріоконсервованих ММСК кісткового мозку тваринам з тендопатією призводить до активізації репаративно-регенеративних процесів в ушкоджених сухожиллях. За даними імунофлюоресцентного аналізу свідчить, що застосування кріоконсервованих ММСК кісткового мозку пришвидшує синтетичні процеси в тканині сухожилку та на 45 день після застосування призводить до відновлення вмісту колагену I типу. За допомогою люмінесцентної мітки підтверджено присутність в зоні дефекту введених КрАММСК на протязі 21 доби.

В раніш проведених нами дослідженнях показано, що локальне введення культивованих ММСК зупиняє прогресування дегенеративних змін та сприяє

відновлюванню ушкодженої структури сухожиль [126, 127]. Для оцінки впливу трансплантованого клітинного матеріалу на відновлення ушкодженої тканини або органа застосовують гістологічні, біохімічні, біофізичні, імунологічні методи, але не завжди проводиться дослідження місцезнаходження введених клітин. Таким чином, цікавим напрямком є проведення порівняльної оцінки здатності до хоумінгу та стимуляції регенеративних процесів КрММСК. Ці дослідження дозволять оцінити строк збереження клітин в тканині, що відновлюється та репаративний потенціал самих клітин. В роботах авторів [128] було показано, що локальне введення культивованих аутологічних ММСК зупиняє прогресування дегенеративних змін та сприяє відновлюванню ушкодженої структури сухожиль. Отже, проведені дослідження свідчать, що локальне введення КрММСК, впливає на інтенсивність диференціювання клітинних елементів в зоні дегенеративно-дистрофічного процесу. Слід зазначити, що зміни, які відбувалися в тканині Ахіллових сухожиль за умов системного введення КрММСК, охоплювали обмежені ділянки дегенеративно-дистрофічного процесу та мали менш виражений регенераторний ефект. Отримані результати ймовірно пов'язані як з відносно слабким кровопостачанням в сухожиллях так і з часом потрібним для міграції клітин в зону ураження [129-131]. Наведена різниця між контрольною та дослідними групами свідчить про ефективність застосування КрММСК, що виражалось в відновленні гістологічної структури ушкодженої тканини та тенденцією до нормалізації вмісту колагену. Таким чином, показано принципову можливість застосування як локального так і системного введення КрММСК кісткового мозку для відновлення дегенеративно-дистрофічно змінених Ахіллових сухожиль у експериментальних тварин.

У роботі Ченг, вивчали алогенні ММСК та диференційовані ММСК хондроцити при ревматоїдному артриті [132]. Як ММСК, так і ММСК диференційовані у хондроцити пригнічували реакції Т-клітин, що реагують

на колаген II, при РА. Чанда та ін. оцінили терапевтичний потенціал ММСК кісткового мозку дорослих при захворюваннях скелета [133]. При ревматоїдному артриті системна ін'єкція ММСК, розроблених для експресії ІЛ-10, значно зменшувала симптоми порівняно з нативними ММСК. Алогенні ММСК значно зменшили запалення суглобів і допомогли у формуванні хряща. ММСК мають здатність модулювати імунну систему як частину паракринного ефекту. Індукцію толерантності імунної системи звинувачують у системних ефектах при РА. Іхім та ін. детально описав роль аутологічних клітин стромальної судинної фракції в лікуванні РА [134]. ММСК є «розумними імуномодуляторами», що виробляють протизапальні фактори, такі як TGF- β , HLA- γ , IL-10 тощо, лише у відповідь на імунні/запальні стимули, а не в базовому стані [110, 124, 134]. За умов внутрішньовенного введення окрім їхньої регенеративної здатності, мають додаткову перевагу у наведенні на травмовану або пошкоджену тканину. Ця селективна здатність до самонаведення не викликає глобального пригнічення імунітету та несприятливих ефектів. Було оцінено різні джерела ММСК, включаючи кістковий мозок, судинну строму, пуповину, жирову тканину та алогенні ММСК. ММСК, отримані з пуповини, мали кращі властивості як алогенна клітинна терапія, особливо для резистентного РА. Це може бути наслідком кращої імуномодулюючої здатності порівняно з ММСК, отриманими з кісткового мозку [134, 135]. МСК, отримані з жирової тканини, показали багатообіцяючі результати завдяки різноманітним факторам, включаючи легкий доступ, велику кількість жирової тканини та сильніші імуносупресивні ефекти. Подібним чином отримані з синовіальної оболонки ММСК можуть бути екстраговані з різних ділянок і мають широку проліферативну здатність, потенціал диференціації за кількома лініями та низьку імуногенність [136].

Таким чином, підсумовуючи наведені дані можна зробити заключення, що ММСК мають здатність мігрувати хемотактичним шляхом до тканин,

демонструючи запалення і пошкодження в організмі, мультилінійно диференціюватися, секретувати різні фактори росту та цитокіни, виявляти протизапальну активність і створювати анаболічне мікрооточення. Крім того, показана безпосередня контактна імуномодуляція клітин. Таким чином, ММСК беруть участь в регенерації пошкоджених тканин по-різному. З одного боку, вони безпосередньо диференціюються в тканино специфічні клітини і таким чином замінюють пошкоджені або втрачені клітини. З іншого боку, вони побічно впливають на регенерацію тканин шляхом секреції розчинних факторів. По-третє, вони здатні модулювати запальну реакцію. Таким чином, вони можуть стимулювати васкуляризацію, клітинну проліферацію, диференціювання і модулювати запальний процес.

Тому актуальним є проведення порівняльного дослідження оцінки лікувального ефекту КрММСК отрисаних з жирової та хрящової тканин за умов їх локального та системного введення тваринам з експериментальним артритом.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Загальні положення

Дослідження проведено на базі ІПКіК НАН України у відділі кріопатофізіології та імунології (завідувач відділу – академік Гольцев А.М.). Робота виконана в контексті відомчих НДР: „Застосування клітинних біотехнологій для відновлення тканин опорно-рухового апарату *in vitro* та *in vivo* ”№ держ. реєстрації 0115U001532. «Використання сучасних клітинних нанобіотехнологій в терапії ревматоїдного артриту», № держ. реєстрації 0120U102974.

Усі досліди на тваринах проводили згідно з міжнародними принципами біоетики, законодавством України, матеріалами IV Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (18.03.1986 р.), та протоколу Комітету з біоетики. Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (№ 2018-01). У дослідженні використовували безпородних білих щурів-самців (віком 12-14 тижнів). Щурів утримували в пластикових клітках (по 5 тварин) при контрольованій температурі (18–22 °С), вологості (30–70 %) та освітленні (світловий інтервал від 800 до 2000) з вільним доступом до води та їжі згідно зі стандартної дієти.

Біоетичні аспекти дослідження Всі експериментальні дослідження над лабораторними тваринами виконано з урахуванням вимог належної лабораторної практики «GLP» (Good Laboratory Practice), відображених в настанові «Лікарські засоби. Належна лабораторна практика», затвердженої Законом України наказом МОЗ України № 95 від 16 лютого 2009 р. і з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях від 18 березня 1986 р., Директиви Європейського парламенту та Ради ЄС

2010/63/ЄС від 22 вересня 2010 р. про захист тварин, які використовуються для наукових цілей, наказу МОЗ України від 14 грудня 2009 р. № 944 «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів», Закону України від 21 лютого 2006 р. № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». Комплексну програму досліджень розглянуто та погоджено Комітетом з біоетики при ІПКіК НАН України (витяг з Протоколу № 2 від 11 березня 2020 р.; витяг з Протоколу № 4 від 16 вересня 2021 р.).

2.2 Культивування ММСК.

Первинну суспензію клітин із біоптатів жирової та хрящової тканин щурів ($n = 5$) отримували шляхом ферментативної обробки [137]. Для цього зразки тканин промивали розчином Хенкса (ПАА, Австрія) з гентаміцином (150 мкг/мл) (Фармак, Україна) та інкубували в розчині колагенази II типу (1,5 мг/мл) (ПанЕко, Росія) при 37 °C протягом 18 годин. Потім клітини виділяли з біоптатів шляхом ресуспендування з подальшим центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 3 хвилин. Супернатант видаляли, до осаду додавали культуральне середовище і клітинну суспензію поміщали на культуральний пластик. Щільність посіву клітин становила $1 \cdot 10^4$ на 1 см^2 культурального пластику. Поживне середовище в усіх випадках містило: середовище IMDM (RAA, Австрія), 10% фетальну бичачу сироватку (HyClone, США), канаміцин (150 мкг/мл) (Фармак, Україна) та амфотерицин В (5 мкг/мл) (RAA, Австрія). Живильне середовище змінювали кожні 3 дні. Використовували стандартні умови культивування при 37 °C в атмосфері 5% CO₂ в інкубаторі (Sanyo, Японія). Після досягнення моношару культури клітин пересівали 0,25 % розчином трипсину (ПАА, Австрія) та версену (ПанЕко, Росія) у співвідношенні 1:1.

2.3 Кріоконсервування ММСК.

Кріоконсервацію культур ММСК проводили під захистом 10% диметилсульфоксиду («Sigma Aldrich», США) з додаванням 20% фетальної

бичачої сироватки. Розчин кріопротектора готували на живильному середовищі. Отриману суспензію поміщали в Nunc CryoTubes (Sigma-Aldrich, США) до 1 мл. Швидкість охолодження становила від 1 °C/хв до –80 °C з подальшим зануренням у рідкий азот [137, 138]. Відігрів проводили на водяній бані при 40 °C до утворення рідкої фази. Видалення кріопротектора здійснювали додаванням розчину Хенкса (RAA, Австрія) 1:9 з подальшим центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 5 хвилин. Схема експериментального дизайну першого етапу дослідження наведена на рис.2.1.

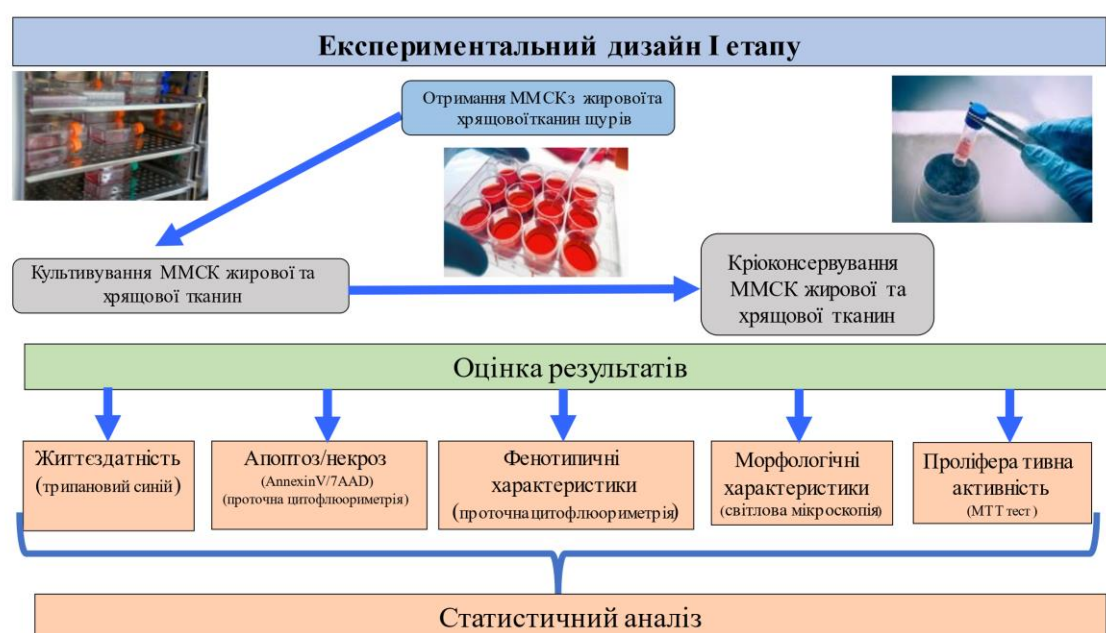


Рис.2.1. Схема експериментального дизайну першого етапу дослідження.

2.4 Життєздатність ММСК.

Життєздатність клітин визначали за методом суправітального фарбування трипановим синім. Для цього 10 мкл суспензії клітин змішували з 10 мкл насиченого розчину трипанового синього (Fluka, Індія). Підрахунок клітин проводили через 1-5 хвилин після змішування в камері Горяєва. Відсоток життєздатних клітин визначали як процентне співвідношення стійких до фарбування барвником і загальної кількості підрахованих клітин за формулою:

$$S = n_1/n_2 \times 100\%,$$

де S – відсоток життєздатних клітин, n_1 – кількість підрахованих стійких до фарбування барвником клітин, n_2 – загальна кількість підрахованих клітин.

2.5 Метаболічна активність ММСК.

Метаболічну активність клітин визначали за допомогою МТТ-тесту. Для цього до досліджуваних зразків ($1 \cdot 10^6$ клітин) додавали 0,5 мл розчину МТТ (Sigma, США) у концентрації 5 мг/мл та інкубували 3 години при 37 °C. Потім середовище повністю видаляли та додавали 1 мл диметилсульфоксиду на зразок для розчинення кристалів формазану з подальшим центрифугуванням протягом 10 хвилин при 1000 об/хв. Оптичну густину розчину формазану в супернатанті вимірювали за допомогою біохімічного аналізатора СЕМ 7 (ERBA, Чехія) за довжини хвилі 540 нм. Без клітинне середовище використовували як бланк.

В досліджених культурах ММСК на термінах культивування 1, 3, 7, 10 діб визначали кількість життєздатних клітин за допомогою МТТ-тесту [139]. Вимірювання оптичної щільності проводили на біохімічному аналізаторі СЕМ 7 (ERBA, Чеська Республіка) при довжині хвилі 540 нм.

2.6 Морфологічні характеристики ММСК.

Морфологічні характеристики нативних та кріоконсервованих ММСК досліджували на 10 добу культивування. Препарати клітин фіксували 4% розчином параформальдегіду з наступним фарбуванням азур-еозином за Романовським-Гімзою протягом 10 хв при кімнатній температурі.

2.7. Імунофенотип ММСК.

Для імунофенотипічного аналізу МСК після заморожування-відігріву фарбували моноклональними антитілами CD45-FITC, CD44-FITC, CD73-FITC, CD90-FITC, CD105-PE (“BD Biosciences”, США) згідно інструкції фірми виробника. Вимірювання проводили на проточному цитометрі FACS Calibur (“BD Biosciences”). Результати аналізували за допомогою програми Win MDI v.2.8.

2.8 Стан процесів апоптозу/некрозу

стан процесів апоптозу/некрозу методом проточної цитофлуориметрії за допомогою барвників Annexin-V-FITC (Annexin V) (BD) та 7-Amino-Actinomycin D (7AAD) (BD). Вимірювання проводили на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur ("BD Biosciences"). Результати аналізували за допомогою програми Win MDI v.2.8 .

2.9. Міграція ММСК.

Здатність ММСК до міграції визначали за швидкістю заповнення дефекту моношару. Для цього МСК у кількості $1,5 \times 10^3$ на cm^2 висівали в 6-лункові планшети і культивували протягом 5 діб до утворення конфлюенту, після чого за допомогою пластикової лопатки проводили зіскаблювання моношару (розмір дефекту $2 \times 0,1$ см). На 4 та 7 добу препарати клітин фіксували 4% розчином параформальдегіду з наступним фарбуванням за Романовським-Гімза азуром-II і еозином. За допомогою світлового мікроскопу проводили підрахунок кількості клітин в зоні дефекту.

2.10. Моделювання ад'ювантного артриту

Модель ад'ювантного артриту індукували у самців щурів субплантарним введенням повного ад'юванту Фрейнда в дозі 0,25 мл (SantaCruz, США). Вибрана експериментальна модель відповідає змінам ревматоїдного артриту у людей: індукований ад'ювантом артрит має загальні симптоми, такі як набряк суглобів, інфільтрація лімфоцитів і деградація хряща (Choudhary, 2018). У роботі використовували кріоконсервовані ММСК з жирової та хрящової тканин щурів. Схема експерименту наведена на рисунку 2.2.

2.11 Проведення клітинної терапії.

На 7 добу ад'ювантного моделювання артриту дослідним тваринам вводили: контрольній групі ($n = 5$) – фізіологічний розчин; 1 дослідна група ($n = 5$) – КрММСК з жирової тканини в дозі $0,25 \cdot 10^6$ клітин локально; дослідна група 2 ($n = 5$) – КрММСК із хрящової тканини в дозі $0,25 \cdot 10^6$ клітин локально; дослідна група 3 ($n = 5$) – КрМММК з жирової тканини в дозі $0,5 \cdot 10^6$ клітин

системно; дослідна група 4 ($n = 5$) – КрММСК із хрящової тканини у дозі $0,5 \cdot 10^6$ клітин системно. Як контроль також була сформована група інтактних тварин ($n = 5$).

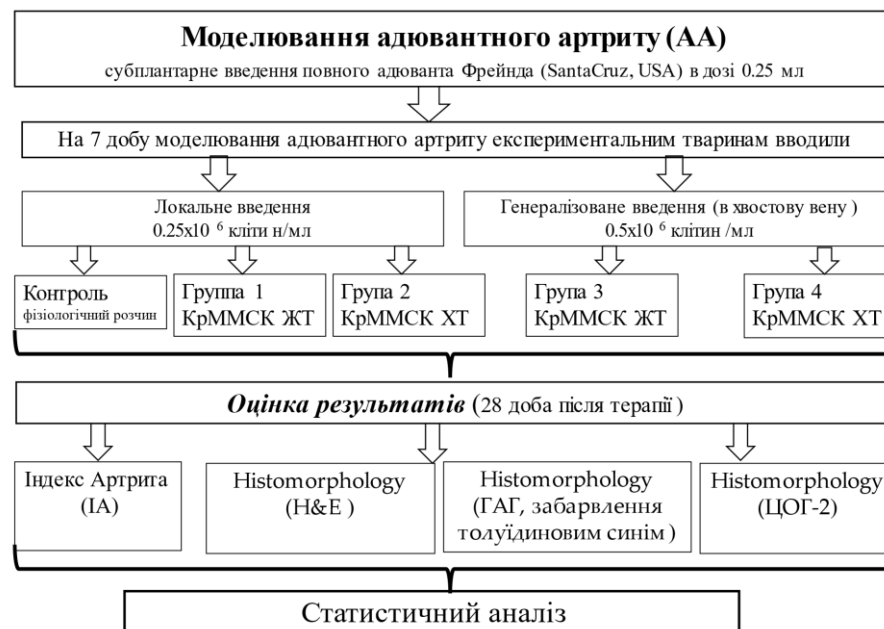


Рис.2.2. Схема експериментального дизайну першого етапу дослідження.

2.12. Гістологічне дослідження.

Дослідження проводили в атестованій лабораторії морфології сполучної тканини (Свідоцтво про відповідність системі вимірювань вимогам ДСТУ ISO 10012:2005 № 01-0021/2019 від 8 лютого 2019 р., чинно до 8 лютого 2022 р.) та атестованих відділах трансплантології та експериментального моделювання з експериментально-біологічною клінікою (Свідоцтво про відповідність системі вимірювань вимогам ДСТУ ISO 10012:2005 № 01-0020/2019 від 8 лютого 2019 р., чинно до 8 лютого 2022 р.); лабораторної діагностики та імунології з клінічною діагностикою (Свідоцтво про відповідність системі вимірювань вимогам ДСТУ ISO 10012:2005 № 01-0019/2019 від 8 лютого 2019 р., чинно до 8 лютого 2022 р.).

На 28 добу після терапії тварин контрольної та дослідної груп вилучали з досліду. Була проведена гуманна евтаназія шляхом асфіксії CO₂. Для

гістологічного дослідження виділяли надп'яtkово-гомiлкові суглоби щурів дослідних контрольної груп. Матеріал фіксували в розчині 10 % нейтрального формаліну, декальцинували в 4 % розчині мурашиної кислоти, зневоднювали в етилових спиртах збільшеної концентрації (від 70° до 96°), у розчині 96° спирту з хлороформом (1:1), заливали матеріал у парафін [140]. Виготовлені на санному мікромомі «Reichert» (Австрія) аксіальні гістологічні зрізи суглобів забарвлювали гематоксиліном Вейгерта та еозином.

Аналізували матеріал у світловому мікроскопі Olympus BX63 (Японія). Для фотографування використано цифрову камеру DP73 (Olympus, Японія) і програмне забезпечення «Cell Sens Dimension 1.8.1» (Olympus, 2013). Зміни у структурі клітин та міжклітинної речовини в суглобовому хрящі оцінювали згідно зі загальними рекомендаціями щодо визначення ступенів ураження хряща, розробленими Міжнародним товариством з дослідження остеоартрозу (Osteoarthritis Research Society International – OARSI) [141], та їх модифікацією для щурів (табл. 2.1) [142].

Таблиця 2.1

Шкала оцінювання дегенеративних змін у суглобовому хрящі

Ступінь ураження суглобового хряща	Характеристика дегенеративних змін
0	Немає
1	Мінімальні: втрата 5-10 % матриксу або хондроцитів
2	Помірні: 11-25 %
3	Середні: 26-50 %
4	Виражені: 51-75 %
5	Тяжкі: понад 75 %

2.13. Визначення ГАГ в хрящовій тканині суглобів експериментальних тварин.

Гістохімічне фарбування толуїдиновим синім (Flyka, Німеччина) проводили на депарафінованих зрізах суглобів. Відносну площу ділянок із фарбуванням на глікозаміноглікани (фіолетовий колір) вимірювали за допомогою програми ZEISS ZEN 2 (blue edition) (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Німеччина) та визначали відсоток як відношення площі метахроматичного фарбування до загальної площі суглобового хряща приймається за 100%.

2.14 Визначення ЦОГ в хрящовій тканині суглобів експериментальних тварин.

Імуногістохімічне фарбування депарафінованих зрізів гомілковостопних суглобів проводили моноклональними антитілами до циклооксигенази-2 (ЦОГ-2) у титрі 1:100 (Thermo Fisher Scientific, США). Фарбування проводили згідно з протоколом, рекомендованим для системи визначення пероксидази Ultra Vision Quanto HRP DAB (Thermo Fisher Scientific, США). Позитивно забарвлені ЦОГ-2 клітини (коричневого кольору) підраховували за допомогою програми ZEISS ZEN 2 (blue edition) (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Німеччина), а їх відсоток визначали як відношення кількості пофарбованих клітин до загальної кількості одиниць (на 1 мм²) прийнято за 100%. Для негативного контролю ЦОГ-2 депарафіновані зрізи фарбували згідно з тим самим протоколом, замінюючи антитіла ізотипом імуноглобуліну G миші.

2.15 Визначення маси тіла експериментальних тварин

На 28 добу тварин тварин зважували в умовах віварію з використанням електронних ваг. Схема експериментального дизайну третього етапу дослідження наведена на рис.2.3.

2.16 Визначення індексу селезінки

Селезінковий індекс оцінювали за формулою: маса органу / маса тварини $\times 100$. Для цього у тварин експериментальних груп виділяли селезінку та зважували на електронних вагах.

2.17. Індекс клітинності селезінки

На 28 добу після терапії Індекс клітинності селезінки розраховували як відношення кількості клітин у селезінці піддослідних тварин до середньої кількості клітин в органі інтактних тварин. Суспензію клітин отримували із селезінки тварин досліджуваних груп шляхом гомогенізації органу в 5 мл розчину Хенкса в гомогенізаторі Поттера. Клітинну суспензію центрифугували (1000 об/хв, 10 хв) і видаляли супернатант. Клітинний осад розбавляли 2 мл середовища, піпетували і підраховували кількість ядерних клітин у камері Горяєва.

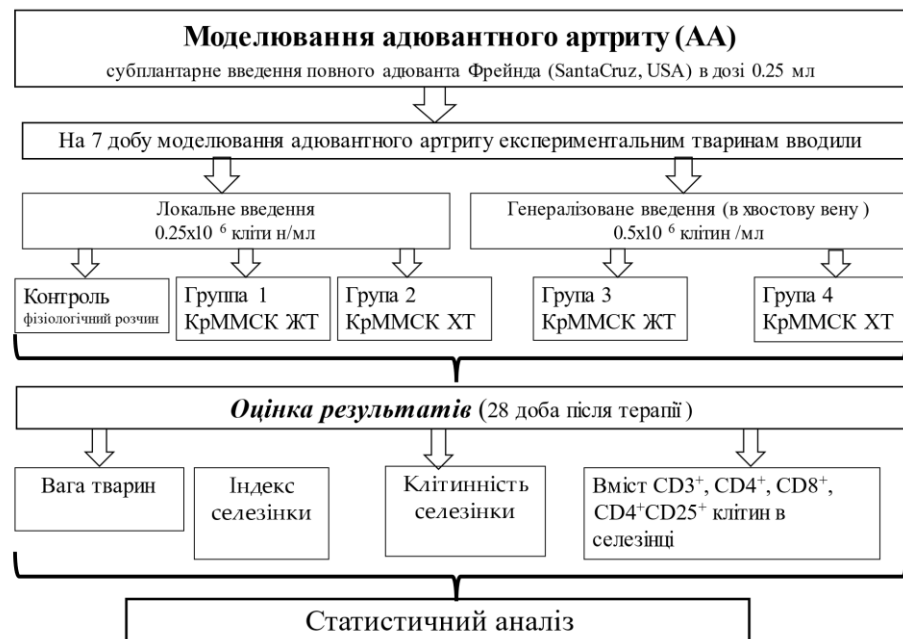


Рис.2.3. Схема експериментального дизайну третього етапу дослідження.

2.18. Визначення вмісту у селезінці CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁺

Кількість окремих субпопуляцій імунних клітин селезінки визначали методом проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл,

мічених FITC (BD, США) до CD3 (загальні Т-лімфоцити), CD4 (Т-хелпери), CD8 (Т-супресори). Крім того, індекс імунної регуляції (IRI) розраховували за співвідношенням Т-хелперів і Т-супресорів ($CD4^+ / CD8^+$). Для кількісного визначення клітин Т-reg використовували моноклональні антитіла до мембранних структур CD4 та CD25 (BD Pharmingen, США). Як ізотипний контроль використовували імуноглобуліни тих же ізотипів. Флуоресценцію клітин оцінювали за допомогою проточного цитометра FACS Calibur (BD, США). Усі процедури та маніпуляції з клітинами проводили стандартним способом згідно з інструкцією виробника. Аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення WinMDI 2.8 (США). У кожному зразку аналізували щонайменше 10 000 клітин.

2.19 Визначення ШОЕ

На 14, 21 та 28 добу визначали ШОЕ в крові експериментальних тварин за методом [143]

2.20. Визначення індексу артриту,

Індекс артриту визначали на 14, 21 і 28 добу як відношення окружності суглоба дослідної лапи до неушкодженого суглоба тієї ж тварини.

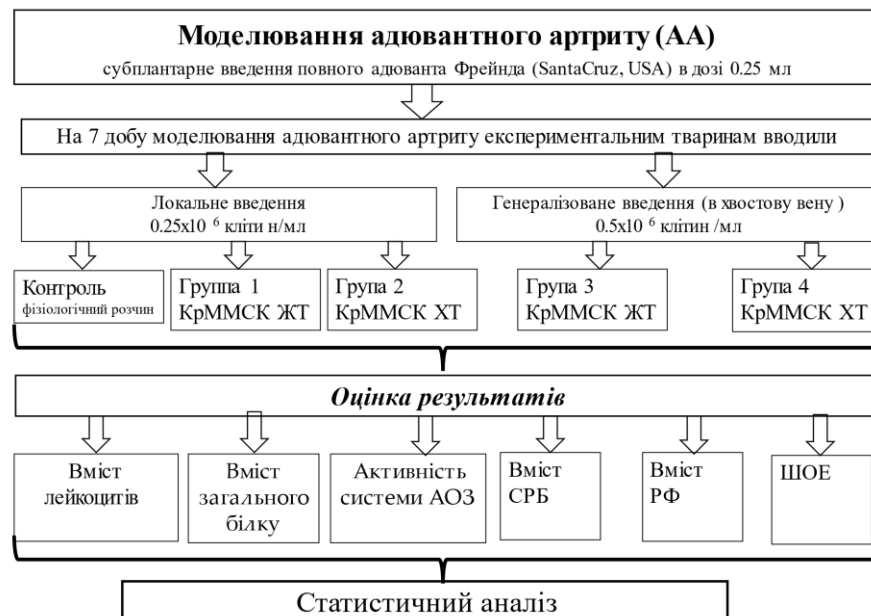


Рис.2.4. Схема експериментального дизайну четвертого етапу дослідження.

2.21. Визначення кількості лейкоцитів в крові.

Визначення кількості лейкоцитів в крові експериментальних тварин проводили за загальноприйнятою методикою з використанням камери Горяєва.

2.22. Визначення активності загальної системи антиоксидантного захисту (АОЗ) в сироватці крові.

Активність системи АОЗ оцінювали кількісно методом УФ-спектрофотометрії (ERBA CHEM 7, Erba Lachema sro, Брно, Чеська Республіка) за допомогою тест-набору (Randox, Великобританія) відповідно до інструкцій виробника та нормалізували на 1 мг білка (Randox, Великобританія).

2.23 Визначення вмісту загального білку в сироватці крові.

Вимірювання проводили на біохімічному аналізаторі CHEM 7 (ERBA, Чеська Республіка) за допомогою відповідних тест-систем «Randox» (Великобританія). Вміст загального білка в сироватці крові визначали спектрофотометричним методом за біуретовою реакцією, яка полягає в тому, що в лужному середовищі йони двохвалентного купруму (CuSO_4) взаємодіють із білками з утворенням комплексу фіолетового кольору. Концентрацію білка визначали спектрофотометрично за світлопоглинанням при довжині хвилі $\lambda = 546$ нм та виражали у г/л.

2.24 Визначення вмісту С-реактивного білку (СРБ) в сироватці крові.

Вимірювання проводили на біохімічному аналізаторі CHEM 7 (ERBA, Чеська Республіка) за допомогою відповідних тест-систем «Randox» (Великобританія).

2.25. Визначення вмісту ревматоїдного фактору (РФ) в сироватці крові.

Вимірювання проводили на біохімічному аналізаторі CHEM 7 (ERBA, Чеська Республіка) за допомогою відповідних тест-систем «Randox» (Великобританія).

2.26. Статистична обробка.

Перевірка нормальності розподілу кількісних ознак проводилася з використанням спільного критерію перевірки на симетричність і нульового коефіцієнту ексцесу. При нормальному розподілі змінних достовірність відмінностей між групами оцінювали за допомогою t-критерію Стюдента. Статистичні параметри, що наводяться далі у вигляді $M \pm m$, мають такі позначення: M – середнє, m – стандартна помилка середнього, n – обсяг аналізованої групи, p – рівень значущості (критичне значення рівня значущості приймалося рівним 0,05). Аналіз даних проводився з використанням пакетів програм «Microsoft Excel» та «Statistica 8». Всі експерименти проводилися в чотирьох паралелях та у трикратному повторі.

РОЗДІЛ 3 ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ФЕНОТИП І ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ІЗ РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ

Відновлення тканин опорно-рухового апарату є актуальним напрямком сучасної регенеративної медицини. Перспективним шляхом є залучення в медичну практику досягнень молекулярної та клітинної біології, зокрема, застосування кріоконсервованих ММСК, отриманих з різних джерел [144 –147]. Виділення, культивування та кріоконсервування клітин мезенхімального походження є основними етапами отримання клітинного матеріалу, який використовується в регенеративній медицині для терапії патологій різного генезу [11, 137]. Виділення, культивування і кріоконсервування клітин мезенхімального походження є базою для отримання клітинного матеріалу, який використовується в регенеративній медицині для терапії патологій різного генезу. Сьогодні мезенхімальні стовбурові клітини ізолюють з різних тканин, таких як кістковий мозок, жир, пуповинні кров, шкіра та деякі інші. Завдяки своїм властивостям мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) є предметом особливої уваги, оскільки вони є мультипотентними, підтримують гемопоез і мають трофічний та імуномодуючий потенціал завдяки їх здатності до секреції цитокінів, хемокінів і факторів росту. В цілому ці властивості роблять їх одним із головних кандидатів для біотехнологічних і тканинно-інженерних розробок.

Виділення клітин мезенхімального походження з органів і тканин, їх культивування та, якщо це потрібно, диференціювання є першим етапом використання матеріалу в регенеративній медицині [148, 149]. Отриманий таким чином запас стовбурових та спеціалізованих клітин може зберігатися при низьких температурах без суттєвих змін морфофункціональних характеристик, що дозволяє їх вільно транспортувати та розморожувати безпосередньо перед терапевтичним застосуванням.

Хоча джерел отримання ММСК на сьогоднішній день відомо досить багато [10, 11], для регенерації суглобового хряща найбільш перспективними є клітини, отримані з кісткового мозку, жирової або хрящової тканини [20 – 22]. За даними авторів [10, 11] ММСК та біологічно активні речовини, які вони продукують, можуть сприяти регенерації не лише шляхом прямої диференціації клітин, але і секрецією факторів росту.

Раніше було показано, що клітинні культури отримані з кісткового мозку та альтернативних джерел, – сухожильної та жирової тканин, – мають імунофенотип клітин попередників мезенхімального походження [21], зберігають здатність до проліферації, міграції та синтезу колагену І типу [20, 36].

На першому етапі роботи було проведено дослідження цілісності мембран клітин після кріоконсервування з використанням тесту на виключення трипанового синього (рис. 3.1).

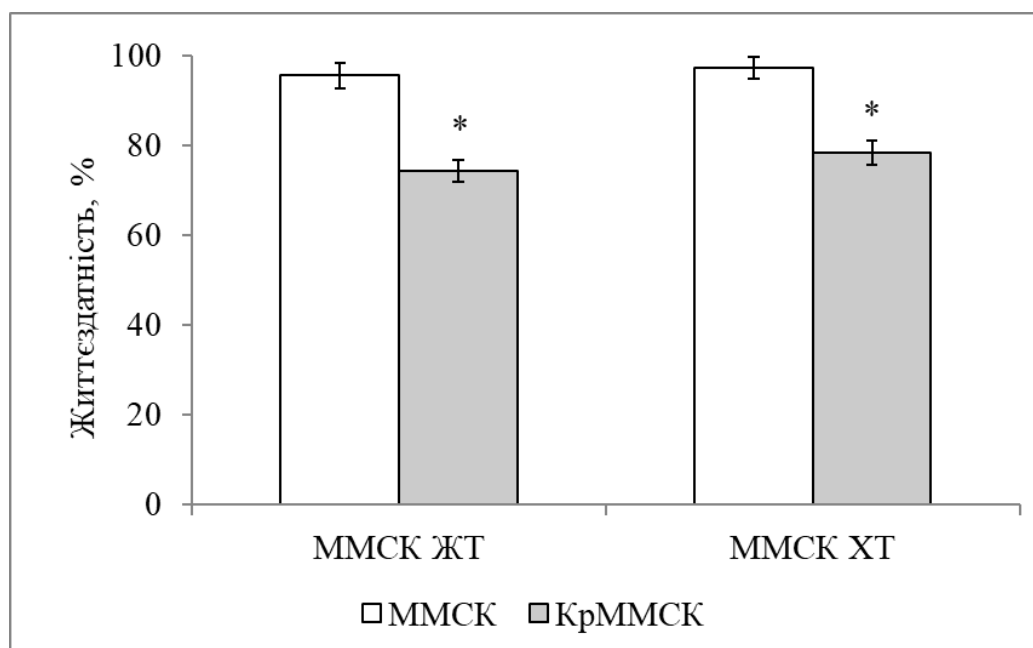


Рис. 3.1. Життєздатність культивованих та кріоконсервованих ММСК з жирової та хрящової тканин. Примітка: *– різниця є статистично значущою відносно нативного аналогу ($p < 0,05$; $n = 5$).

Показник життєздатності у випадку кріоконсервованих ММСК жирової тканини був знижений у 1,28 рази відносно відповідного нативного аналогу. Зниження відсотку життєздатних клітин спостерігалось також в ММСК хрящової тканини після кріоконсервування в 1,24 рази стосовно нативного аналогу. Слід зазначити, що вірогідної різниці в досліджуваному показнику між групами ММСК ЖТ та ММСК ХТ не було виявлено.

Наступним етапом роботи було визначення здатності до проліферації ММСК жирової та хрящової тканин до та після кріоконсервування (рис. 3.2 та 3.3). Результати дослідження проліферативних характеристик свіжоізолюваних ММСК жирової та хрящової тканин наведені на рис. 3.2.

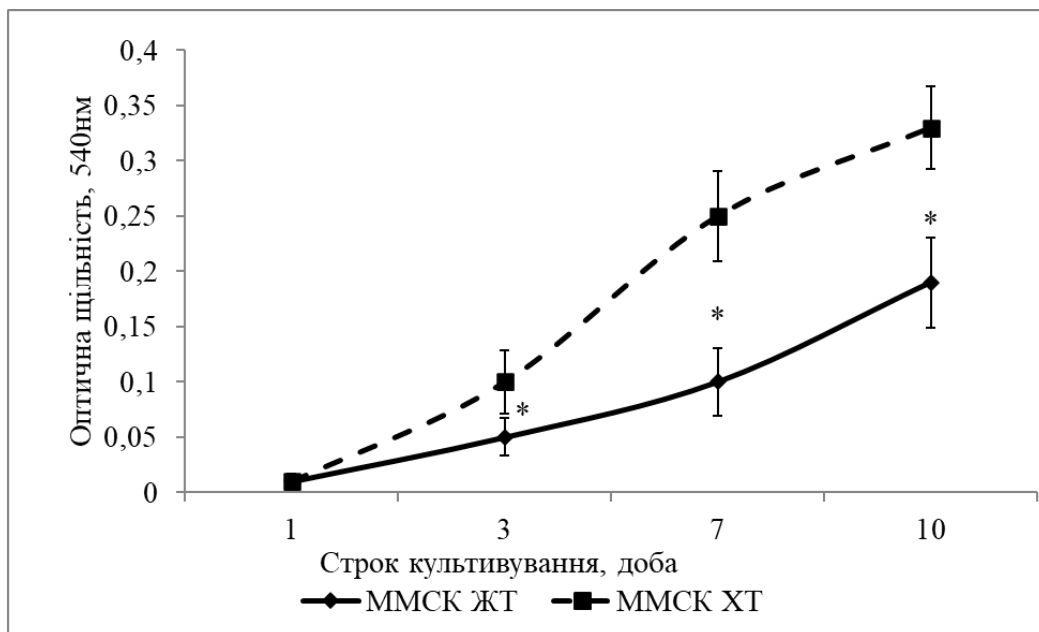


Рис. 3.2. Проліферативна активність (MTT-тест) ММСК з жирової та хрящової тканин. Примітка: * – різниця є статистично значущою відносно ММСК ХТ ($p < 0,05$; $n = 5$).

У досліджених культурах клітини адгезували до пластика та утворювали кластери з 10-15 клітин на 3-5 добу спостереження. Динаміка росту досліджених культур була схожою, але приріст клітин був вірогідно більшим у

ММСК ХТ протягом всього строку спостереження. Так на 3 добу культивування в ММСК ХТ приріст клітин був вище в 1,8 рази порівняно з ММСК ЖТ. При збільшенні строку культивування спостерігали аналогічну тенденцію росту досліджених культур, а саме на 7 та 10 добу культивування в ММСК ХТ досліджуваний показник був нижче в 2,4 та 1,6 рази відповідно порівняно з ММСК ЖТ. Слід зазначити, що у наступних пасажах досліджувані культури мали стабільну здатність до проліферації.

Наступним етапом роботи було дослідження проліферативних характеристик кріоконсервованих ММСК жирової та хрящової тканин (рис. 3.3).

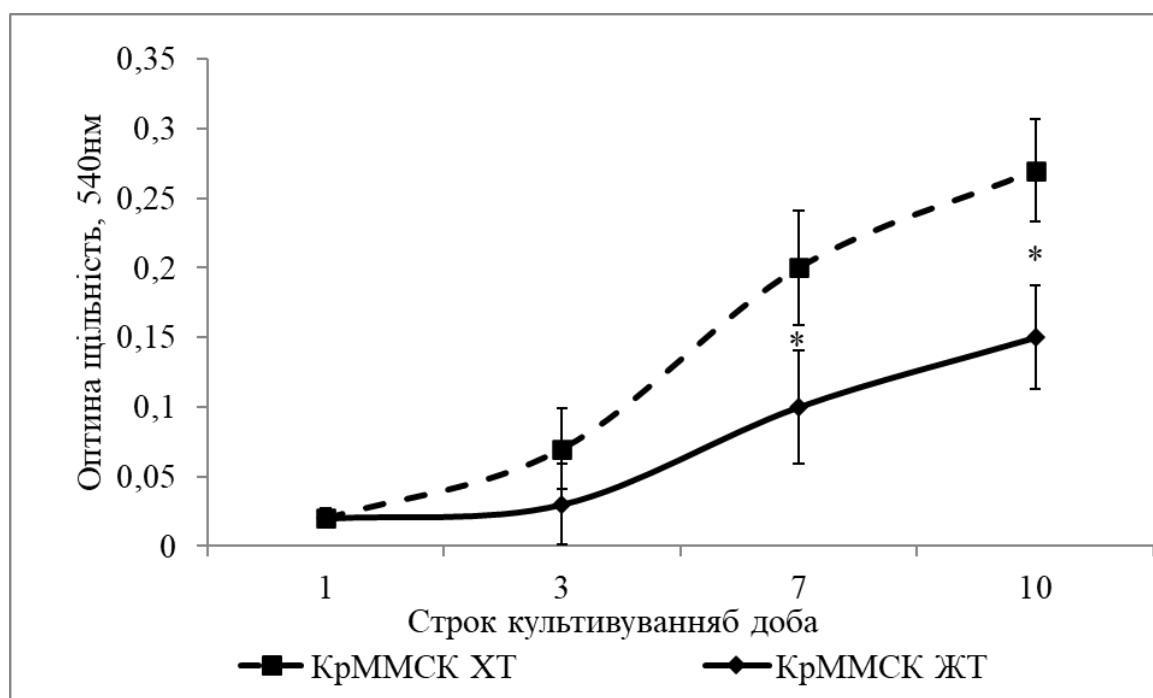


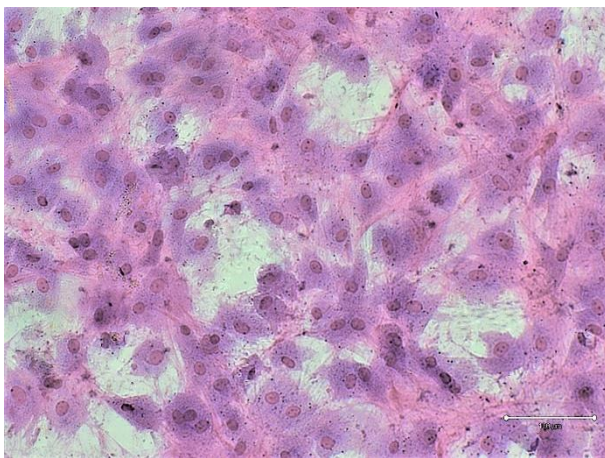
Рис. 3.3. Проліферативна активність (MTT-тест) кріоконсервованих ММСК з жирової та хрящової тканин. Примітка: *— різниця є статистично значущою відносно кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин хрящової тканини ($p < 0,05$; $n = 5$).

У досліджених культурах клітини адгезували до пластика та утворювали кластери з 10-15 клітин на 5-7 добу спостереження. Динаміка росту

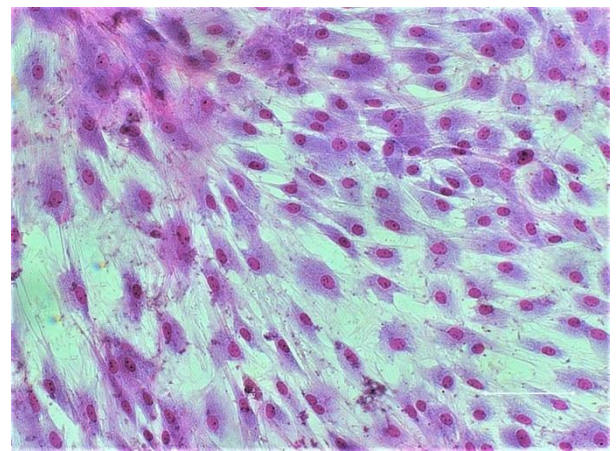
досліджених культур була схожою, але приріст клітин був вірогідно більшим у КрММСК ХТ протягом всього строку спостереження. На 3 добу культивування в КрММСК ХТ та КрММСК ЖТ та приріст клітин значуще не відрізнявся. На 7 та 10 добу культивування в ММСК ХТ досліджуваний показник був вище в 2,5 та 1,8 рази відповідно порівняно з ММСК ЖТ.

Слід зазначити, що у наступних пасажах досліджувані кріоконсервовані культури мали більш високу здатність до проліферації, ніж одразу після кріоконсервування. Це явище, ймовірно, пов'язано, з одного боку, з пригніченням проліферативної активності після кріоконсервування, а з другого – адаптацією клітин до культуральних умов [20-22].

В умовах культивування нативні та кріоконсервовані ММСК з жирової тканини характеризувались наявністю парусних, зірчастих і веретеноподібних клітинних елементів (рис. 3.4 а).



а



б

Рис. 3.4. Морфологічні характеристики нативних (а) та кріоконсервованих (б) ММСК з жирової тканини на 10 добу культивування. Світлова мікроскопія, фарбування азур-еозином.

Як нативні так і кріоконсервовані ММСК із хрящової тканини були представлені полігональними та веретеноподібними клітинами (рис. 3.4 б). На 10-ту добу культивування кріоконсервованих ММСК жирової тканини

спостерігали 68% конфлюент, а у разі кріоконсервованих ММСК хрящової тканини щільність моношару досягала 80%. Характер проліферації досліджених культур був схожим, але приріст клітин був більшим у ММСК хрящової тканин на всьому терміні спостереження як у разі культивованих, так і кріоконсервованих зразків.

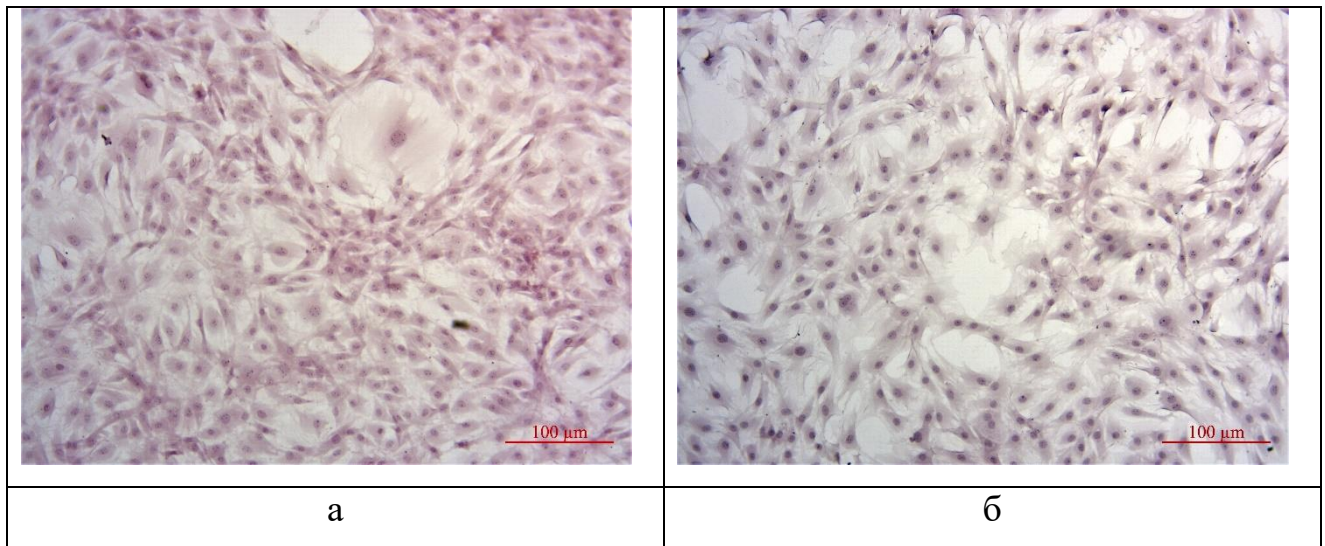


Рис. 3.5. Морфологічні характеристики нативних (а) та кріоконсервованих (б) ММСК з хрящової тканини на 10 добу культивування. Світлова мікроскопія, фарбування азур-еозином.

Аналіз отриманих результатів показав, що відносна кількість живих клітин знижувалася після кріоконсервування як у випадку КрММСК ЖТ так і в зразках КрММСК ХТ порівняно з нативними ММСК з відповідних джерел (табл. 3.1). Результати визначення кількості життєздатних клітин Annexin V⁻/7AAD⁻ значуще зменшувалася після кріоконсервування на 9,86% у випадку ММСК ЖТ та на 7,88% у випадку ММСК ХТ. Показник кількості Annexin V⁺/7AAD⁺ та Annexin V⁻/7AAD⁺ клітин (пізні стадії апоптозу, некроз) значуще збільшувався після кріоконсервування на 8,96% у випадку ММСК ЖТ та на 7,4% у випадку ММСК ХТ. При цьому слід зазначити, що кількість клітин Annexin V⁺/7AAD⁻ (рання стадія апоптозу) в КрММСК ЖТ та ХТ значуще не відрізнялась від показників у нативних зразках. В роботі були проведені

дослідження, щодо відстеження стану процесів апоптозу та некрозу в ММСК отриманих з досліджених джерел до та після кріоконсервування. Одночасне фарбування анексином V та 7AAD дозволяє виявити як некротичні клітини, так і клітини, які вступили на шлях апоптозу. На ранній стадії апоптозу цілісність клітинної мембрани зберігається, проте відбувається перебудова її фосфоліпідних компонентів і на поверхні клітини з'являється фосфатидилсерин. Анексин V – білок, який має високу спорідненість до фосфатидилсерину і зв'язується з клітинами, що експресують його тільки на зовнішній поверхні мембрани [20, 153].

Таблиця 3.1. Цитофлуориметричний аналіз нативних і кріоконсервованих ММСК ЖТ та ХТ (% , $M \pm \sigma$)

Група	Annexin V ⁻ / 7AAD ⁻	Annexin V ⁺ / 7AAD ⁻	Annexin V ⁺ /7AAD ⁺ +Annexin V ⁻ /7AAD ⁺
ММСК ЖТ	81,21 ± 12,90	4,39 ± 1,57	14,40 ± 4,27
КрММСК ЖТ	71,35 ± 6,73*	5,29 ± 1,25	23,36 ± 3,22*
ММСК ХТ	81,96 ± 4,32	5,32 ± 1,49	12,72 ± 4,12
КрММСК ХТ	74,08 ± 1,45*	5,80 ± 1,75	20,12 ± 8,12*

Примітка: * – різниця значуща відносно нативних клітин ($p < 0,05$; $n = 5$).

Досліджені нативні культури характеризувалися типовим для ММСК фенотипом із високим рівнем експресії ($\geq 90\%$) CD 44, CD 90, CD 73, CD 105 та низьким рівнем експресії ($\leq 1\%$) гемопоетичного маркера CD 45 (табл. 3.2).

Проте в зразках КрММСК ЖТ та ХТ спостерігали вірогідне зниження щодо нативних аналогів кількості CD 44⁺ клітин на 11,1 та 8,8% відповідно [22, 137]. Відомо, що маркер CD 44 відповідає за основні функції клітини, серед яких адгезія, хоумінг клітин у периферичні та лімфоїдні органи та вогнища

запалення, клітинна активація й збільшення продукції цитокінів і факторів росту [49].

Таблиця 3.2. Вплив кріоконсервування на фенотип ММСК ЖТ та ХТ ($M \pm \sigma$)

Зразок	Рівень експресії маркера, %				
	CD 44	CD 45	CD 73	CD 90	CD 105
ММСК ЖТ	93,4 $\pm$ 0,6	0,8 $\pm$ 0,3	90,7 $\pm$ 0,5	89,2 $\pm$ 0,9	95,1 $\pm$ 0,8
КрММСК ЖТ	82,3 $\pm$ 0,6*	0,6 $\pm$ 0,3	88,7 $\pm$ 0,7	85,4 $\pm$ 0,6	92,2 $\pm$ 0,3
ММСК ХТ	96,1 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,1	89,5 $\pm$ 1,1	92,1 $\pm$ 0,7	94,4 $\pm$ 0,6
КрММСК ХТ	87,3 $\pm$ 0,5*	0,4 $\pm$ 0,1	87,5 $\pm$ 1,5	92,5 $\pm$ 0,4	92,6 $\pm$ 0,3

Примітка: * – різниця значуща відносно культивованих клітин ($p < 0,05$; $n = 5$).

В роботах [49, 137] було показано, що клітинні культури, отримані з кісткового мозку та альтернативних джерел (сухожилля, жирова тканина та хрящ), мають фенотип клітин-попередників мезенхімального походження, зберігають здатність до проліферації, колонієутворення та міграції. КрММСК з цих досліджених джерел зберігали цілісність мембрани, здатність до адгезії, утворення колоній, проліферації, синтезу колагену типу I та спрямованої диференціації.

Міграційна здатність клітин оказує безпосередній вплив на ефективність, характер та швидкість регенерації ушкодженої тканини. Недостатня швидкість міграції клітин може викликати погану васкуляризацію тканини та, як наслідок, розвиток некрозу. Швидкість міграції залежить як від властивостей самих клітин, так і від мікрооточення, в якому вони знаходяться [20, 154-156]. Тому, наступним етапом роботи було дослідження міграційної активності – здатності до заповнення дефекту кріоконсервованих ММСК жирової та хрящової тканин.

Результати визначення міграційної активності ММСК ЖТ та ХТ (рис.3.6) свідчили про вірогідне збільшення щільності клітин в зоні дефекту при культивуванні ММСК ХТ стосовно ММСК ЖТ на всіх строках спостереження. На 4-у добу дослідження в КрММСК ЖТ та ХТ спостерігали зниження щільності клітин стосовно нативних аналогів у 1,3 та 1,2 рази відповідно. Однак, значущих відмінностей у дослідженому показнику на 7-у добу між нативними та кріоконсервованими ММСК із обох досліджених джерел не спостерігали.

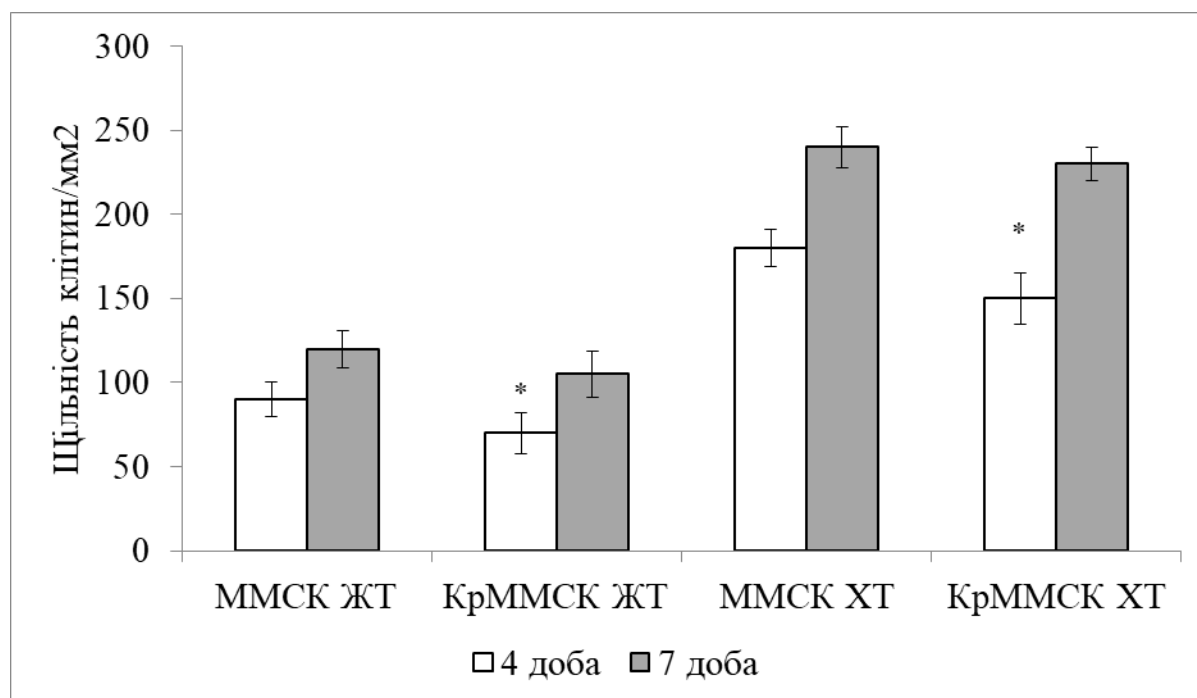


Рис. 3.6. Вплив кріоконсервування на міграційну активність ММСК ЖТ та ХТ;
* – різниця значуща відносно нативних клітин ($p < 0,05$; $n = 5$).

Таким чином, поряд із жировою тканиною, яка є одним з найбільш поширених джерел стовбурових клітин, альтернативним джерелом ММСК може бути хрящова тканина [5, 154-156]. Результати проведеного дослідження можуть бути використані для створення кріобанку перспективних ліній клітин стромального походження з можливістю їх наступного застосування для потреб біотехнології та клітинної терапії ушкоджень опорно-рухового апарату.

Це дослідження представляє порівняння морфо-функціональних характеристик кріоконсервованих ММСК з хрящової і жирової тканин з метою вибору кращого джерела клітин для терапії пошкоджених тканин опорно-рухового апарату. Для забезпечення бази наших подальших досліджень та вибору кращого джерела клітин для терапії ушкоджень тканин опорно-рухового апарату було проаналізовано і порівняно морфофункціональні характеристики нативних і кріоконсервованих ММСК щурів, отриманих з хрящової та жирової тканин. Хоча в більшості випадків механізми, за допомогою яких трансплантовані клітини стимулюють регенерацію тканин, на даний момент залишаються недостатньо вивченими, результати даного дослідження вносять певний внесок в їх розуміння і можуть бути корисні у розробці терапевтичних стратегій для цілого ряду захворювань опорно-рухового апарату.

Висновки за розділом:

1. Досліджено вплив низькотемпературного консервування на морфофункціональні характеристики культур ММСК, отриманих із жирової та хрящової тканин та показало, що їх кріоконсервування із застосуванням низької швидкості охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -80°C і середовища кріоконсервування (10% ДМСО та 20% ембріональної сироватки) не призводить до активізації процесів апоптозу, дозволяє зберегти фенотип і здатність до міграції.
2. Порівняльний аналіз досліджених характеристик показав, що як нативні, так і кріоконсервовані ММСК ЖТ характеризувалися більш низьким проліферативним та міграційним потенціалами відносно ММСК ХТ.
3. Результати проведеного дослідження можуть бути використані для створення кріобанку аутологічних стовбурових клітин стромального походження з можливістю їх подальшого раціонального застосування для потреб біотехнології та клітинної терапії ушкоджень опорно-рухового апарату.

Публікації за розділом [137, 154 -156].

РОЗДІЛ 4. ОЦІНКА ВПЛИВУ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ МУЛЬТИПАТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН НА СТАН ХРЯЩОВОЇ ТКАНИНИ У ЩУРІВ З АД'ЮВАНТНИМ АРТРИТОМ

Проблема лікування ревматичних захворювань актуальна в усьому світі. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, у розвинених країнах світу запальні захворювання суглобів і сполучної тканини посідають друге місце після серцево-судинної патології серед причин інвалідності та смертності. Ревматоїдний артрит (РА) характеризується аутоімунним хронічним запальним синовітом з прогресуючою деструкцією суглобів і широким спектром позасуглобових (системних) проявів [4].

Моделювання перебігу фаз ревматоїдного артрити є складною багатофакторною задачею. Слід зазначити, що розвиток РА у великій мірі зумовлено наявністю первинного імунодефіциту, який сприяє переходу гострого запального процесу в хронічну стадію. У той же час тривалий запальний процес призводить до зниження імунологічної реактивності організму. Експериментальні моделі запалення можуть використовуватися як для оцінки впливу різних етіологічних факторів, так і для дослідження ефективності його лікування [157, 158]. Тому на першому етапі досліджень *in vivo* було проведення гістологічного дослідження, щодо визначення оптимального часу для проведення клітинної терапії.

Через 7 діб після моделювання артрити під час гістологічного дослідження на суглобовій поверхні як великогомілкової, так і надп'яркової кісток виявляли суглобовий хрящ, у якому відмічено деструктивні зміни (рис. 3.2.1). Зокрема, у поверхневій зоні відмічено один шар витягнутих клітин з великими овальними гіперхромними ядрами та вузьким обідком цитоплазми. Довга вісь цих хондроцитів була орієнтована паралельно суглобовій поверхні. Проте

спостерігали території без клітин, нерівність поверхневої зони, еозинофільне забарвлення матриксу, розшарування поверхні.

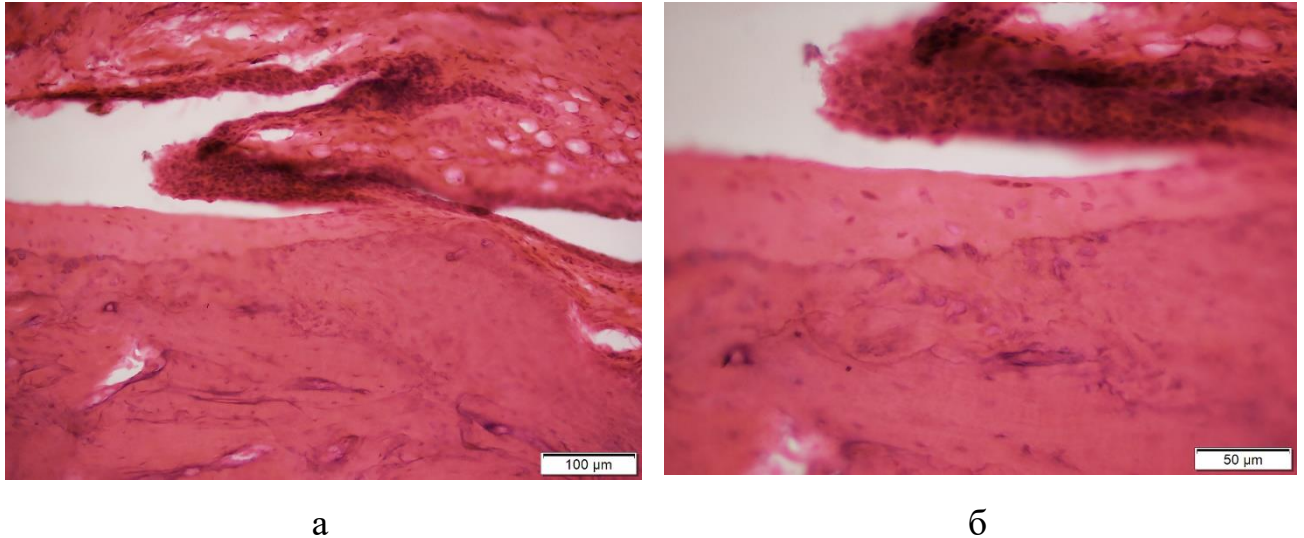


Рис. 4.1. Фрагмент надп'яtkово-гомiлкового суглоба щура через 7 дiб пiсля моделювання АА, без лiкування: а) деструктивнi порушення в суглобовому хрящi надп'яtkової кiстки – територiї без клітин, нерiвномiрне забарвлення матриксу, вiдсутнiсть колонкової структури розташування хондроцитiв; набряк синовiальної оболонки, дифузна iнфiльтрацiя круглоклітинними елементами; б) фрагмент рис. 1, а. Гематоксилiн та еозин.

Проміжною зоною вважали розташовану між поверхневою зоною до базифільної лінії згідно з рекомендаціями N. Gerwin [142] щодо аналізу стану суглобового хряща у щурів. У проміжній зоні, як і в поверхневій, виявлено деструктивні зміни. Майже не виявлено колонкової структури розташування хондроцитів, відмічено території, на яких містилися клітини-тіні, та такі, які не містили хондроцитів. Матрикс був забарвлений нерівномірно.

Базофільна лінія була нечіткою, на деяких ділянках не простежувалася, на деяких – була подвійною, або потрійною. По території зони кальцифікованого хряща, яка була нерівномірної ширини, хондроцити розташовувалися як окремо, так і в ізогенних групах від 2 до 4 клітин. Поодинокі хондроцити

містилися в розширених капсулах, мали пікнотичні ядра та слабо забарвлену цитоплазму з дрібнозернистим вмістом. Описані структурні особливості характерні для 2-3 ступеня ураження суглобового хряща за шкалою OARSI [141, 142]. Синовіальна оболонка була потовщеною за рахунок набряку та проліферації синовіоцитів. У ній визначали розширені повнокровні капіляри, дифузну лімфоїдно-лейкоцитарну інфільтрацію, що характерно для реактивного артрити (рис. 3.2.1).

У субхондральній кістці виявлено помірний субхондральний склероз і збільшення обсягу кістки (потовщення кісткових трабекул, зменшення міжтрабекулярних просторів, кістковий мозок яких безпосередньо контактує з глибокими відділами суглобового хряща) [158].

Через 21 добу після моделювання артрити в суглобовому хрящі, який вкривав великогомілкову та надп'яткову кістки, збільшувалися прояви деструктивних змін. Поверхнева зона була представлена шаром волокнистого хряща на окремих ділянках, подекуди була відсутньою (рис. 4.2).

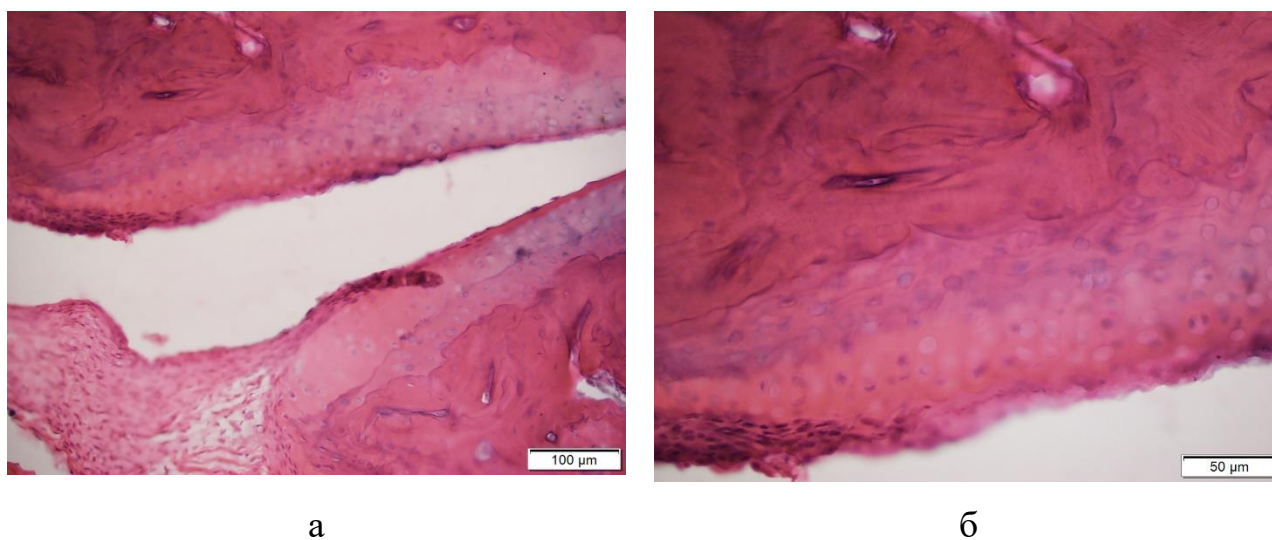


Рис. 4.2. Фрагмент надп'яtkово-гомiлкового суглоба щура через 21 дiб пiсля моделювання артрити, без лiкування: а) волокнистий хрящ, територiї без клiтин, нерiвномiрне забарвлення матриксу, хаотичне розташування хондроцитiв; фiбротизацiя синовiальної оболонки; б) фрагмент рис. 2, а. Гематоксилiн та еозин.

Поверхня суглобового хряща нерівномірна. У середній зоні виявлено нерівномірність розташування хондроцитів, території без клітин, запустілі лакуни, клітини в стані некробіозу. Екстрацелюлярний матрикс був забарвлений нерівномірно – від різко еозинофільного до слабо базofilного. Базофільна лінія, як і на попередній термін, була нечіткою, на деяких ділянках не простежувалася, на деяких – була подвійною, або потрійною. Зона кальцифікованого хряща була нерівномірною, в неї проростали судини, характерною була відсутність клітин у капсулах. Зафіксовані структурні порушення суглобового хряща можна класифікувати як 3-4 ступеня ураження суглобового хряща за шкалою OARSI [141, 142].

У синовіальній оболонці спостерігали поодинокі синовіоцити сплющеної форми, розташовані по краю. Загальна територія синовіальної оболонки була представлена сполучною тканиною різного ступеня зрілості, де між звивистими пучками колагенових волокон містилися видовжені фібробласти.

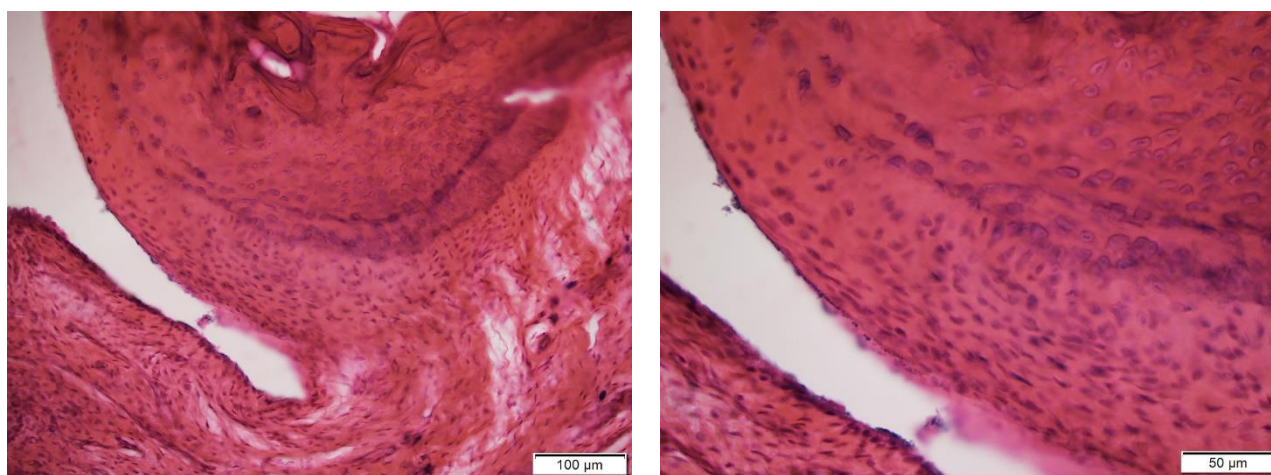
У субхондральній кістці відмічено подальше збільшення склерозу, утворення остеонних конструкцій із базофільними цементними лініями та вузькими центральними каналами. У них зафіксовано набряк ендотелію судин.

Описані структурні зміни у надп'яtkово-гомiлковому суглобі відповідають реактивному артрити.

Через 28 дiб після моделювання артрити на гiстологiчних препаратах надп'яtkово-гомiлкового суглоба виявлено вiдсутнiсть структури суглобового хряща. Суглобовий кiнець великогомiлкової та надп'яtkової кiсток вкривав широкий шар волокнистого хряща. У ньому зi значною густиною розташовувалися клiтини, якi розрiзнялися за фенотипом. Бiльшiсть з них мала видовжену форму, мiстила овальнi гiпохромнi ядра й видовжену цитоплазму. Довга вiсь таких клiтин була спрямована паралельно суглобовiй поверхнi та вони займали всю територiю поверхневої зони та майже всю – глибокої. Їх класифiковано як фiброхондроцити. Крiм того, подекуди у бiльш глибоких вiддiлах волокнистого хряща траплялися поодинокi клiтини округлої форми з

гіперхромними ядрами, які не утворювали капсул, а за фенотипом класифіковано як хондроцити. На більшій території хряща базofilьну лінію не простежували. Міжклітинна речовина була забарвленою еозинofilьно (рис. 4.3). Описані структурні особливості характерні для 2-3 ступеня ураження суглобового хряща за шкалою OARSI [141, 142].

Синовіальна оболонка була потовщеною за рахунок розростання сполучної тканини та набряку. У ній виявлено високу щільність фібробластів, які розташовувалися хаотично, розширені кровоносні капіляри без еритроцитів. Як і на попередній термін дослідження визначено поодинокі сплюснені синовіоцити з гіперхромними ядрами. Субхондральна кістка була компактною за структурою, склерозованою, у ній спостерігали остеони з базofilьними цементними лініями та вузькими центральними каналами. У них зафіксовано набряк ендотелію судин. Описані структурні зміни у надп'ятково-гомільковому суглобі відповідають остеоартрозу.

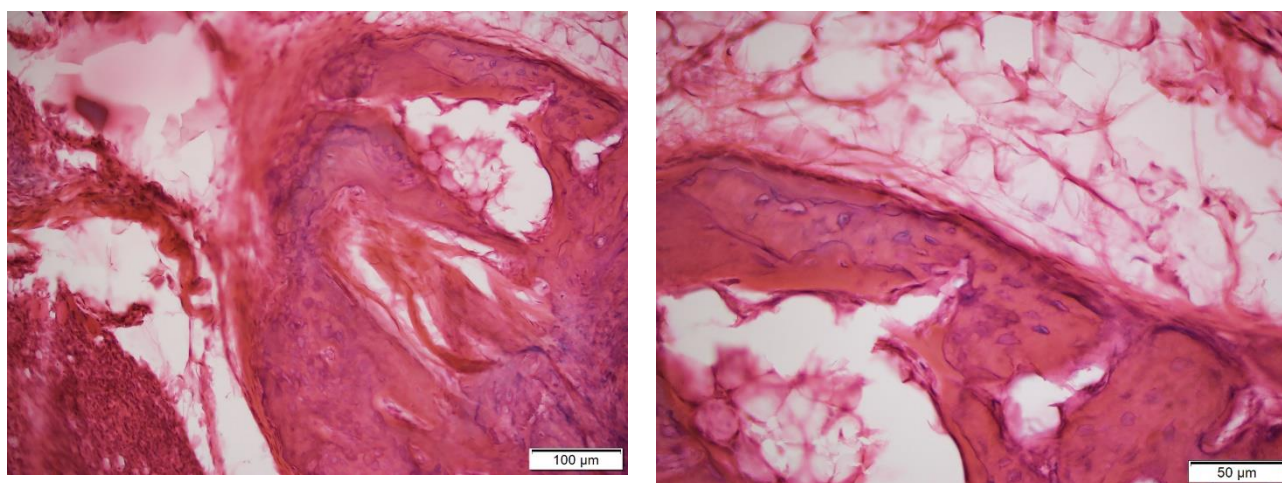


а

б

Рис. 4.3. Фрагмент надп'ятково-гомількового суглоба щура через 28 діб після моделювання артриту, без лікування: а) волокнистий хрящ із високою густиною клітин, еозинofilія матриксу, фіброз і потовщення синовіальної оболонки; б) фрагмент рис. 3, а. Гематоксилін та еозин.

Через 35 діб після моделювання конгруентність суглобових поверхонь була порушеною. На більшій частині суглобових кінців кісток, які утворюють надп'яtkово-гомiлковий суглоб, хрящове покриття було відсутнім. Острівці хряща, які залишилися, не містили клітин, були нерівномірно забарвленими, із розволокненням поверхні, що відповідає за шкалою OARSI [141, 142] 4-5 ступеню ураження суглобового хряща. Відмічено сплюснення субхондральної пластинки. Глибокі судинні щілини проникали з боку субхондральної кістки в товщу залишків хряща, подекуди відкривалися в порожнину суглоба та заміщувалися сполучною тканиною. Міжтрабекулярні простори були розширеними, заповненими жировою або сполучною тканиною (рис. 4.4). Капсула суглоба була товстою за рахунок розростання щільної сполучної тканини. Описані структурні зміни характерні для остеоартрозу.



а

б

Рис. 4.4. Фрагмент надп'яtkово-гомiлкового суглоба щура через 35 діб після моделювання артриту, без лікування: а) втрата хрящового покриття, глибокі судинні щілини, жирова та сполучна тканини в міжтрабекулярних просторах; б) фрагмент рис. 4 а. Гематоксилін та еозин.

Таким чином, у контрольній групі з модельованим артритом під час гістологічного дослідження на ранніх термінах спостереження (7-ма доба) виявлені зміни, що відповідають артрити. У подальшому відбувалося

прогресування змін у складових суглоба — суглобовому хрящі, субхондральній кістці та синовіальній оболонці, які на 28-му та 35-ту добу призвели до розвитку виражених артрозних порушень [159].

Сьогодні ММСК залишаються предметом особливої уваги, оскільки вони характеризуються мультипотентністю, трофічним та імуномодуючим потенціалом, здатні підтримувати кровотворення та продукувати цитокіни, хемокіни та фактори росту [64]. Загалом такі властивості роблять ММСК одними з головних кандидатів для розробок біотехнології та тканинної інженерії. І оскільки ці клітини можуть задіяти складні механізми, які організм природним чином використовує для модуляції та відновлення імунного дисбалансу, терапія ММСК має потенціал для лікування та корекції аутоімунних розладів, включаючи ревматоїдний артрит, у спосіб, яким звичайні ліки ще не доступні. В даний час в цій області проводиться багато досліджень, але в роботах використовувалися ММСК, отримані з різних джерел, а також дуже різні режими лікування і дозування. Зокрема, терміни клітинної терапії та спосіб введення ММСК залишаються нерегульованими [65].

За даними авторів, проведення лікування на ранніх стадіях виявлення хвороби, може уповільнити прогресування захворювання. Якщо призначення терапії запізнюється, то не всі базові препарати можуть «встигнути» проявити свою дію [3, 64,159]. Чим більше тривалість захворювання, тим гірша реакція на «базові» препарати в порівнянні з пацієнтами, які отримують цю терапію на ранній стадії захворювання, а саме відразу після постановки діагнозу. Базуючись на результатах отриманих в нашій роботі, ми обрали ранню фазу експериментального ад'ювантного артриту (7 доба) для подальшої оцінки ефективності проведення клітинної терапії.

Наступним завданням роботи було визначення змін перебігу гострої фази ад'ювантного артриту при місцевому та системному введенні кріоконсервованих ММСК з жирової та хрящової тканини. Застосування

клітинної терапії шляхом локального та системного введення передбачає корекцію як ураженого суглобового, так і імунного статусу реципієнта.

Оцінка загального стану показала, що у тварини при введенні фізіологічного розчину (контрольна група) на 14 добу моделювання спостерігали ознаки запального процесу в суглобі – набряк і гіперемія, а також збільшення індексу артриту в 1,58 рази відносно інтактних. Ця тенденція зберігалася протягом усього строку експерименту. У тварин дослідних груп 1 та 2 вираженість набряку суглобів на 14 добу зменшилась у 1,15 та 1,20 рази відповідно порівняно з контрольною групою. На 28 добу спостереження у тварин цих груп індекс артриту був відповідно в 1,26 і 1,28 рази нижчим, ніж у групі з введенням фізіологічного розчину. Системне введення призвело до менш вираженого зниження цього показника порівняно з місцевим, але тенденція до зниження зберігалась. Проте індекс артриту не досягав рівня інтактних тварин у жодній досліджуваній групі (табл. 3.2.1).

Таблиця 4.1

Вплив КрММСК з жирової та хрящової тканин на динаміку індексу артриту у щурів з АА ($x \pm SD$; $n = 5$)

Дослідні групи	Строк спостереження, доба		
	14	21	28
Інтакт	$1,02 \pm 0,085^{a;k}$	$1,02 \pm 0,085^{a;k}$	$1,02 \pm 0,085^{a;k}$
Контроль	$1,584 \pm 0,057^{b;k}$	$1,517 \pm 0,072^{b;k}$	$1,553 \pm 0,037^{b;k}$
Група 1	$1,371 \pm 0,064^{c;k}$	$1,263 \pm 0,079^{c;d;l}$	$1,239 \pm 0,031^{c;l}$
Група 2	$1,323 \pm 0,097^{c;k}$	$1,259 \pm 0,046^{c;l}$	$1,217 \pm 0,047^{c;l}$
Група 3	$1,450 \pm 0,030^{b;k}$	$1,355 \pm 0,058^{c;d;l}$	$1,314 \pm 0,023^{d;l}$
Група 4	$1,466 \pm 0,041^{b;k}$	$1,382 \pm 0,037^{d;l}$	$1,363 \pm 0,052^{d;l}$

Примітки: ^{a, b, c} вказують на значення, які значуще відрізнялися в одному стовпці таблиці ($p < 0,05$); ^{k, l} вказують на значення, які значуще відрізнялися в одному рядку таблиці ($p < 0,05$)

Мікрофотографії гістологічних зрізів, представлені на рис. 4.5, показали, що в той час як гомілковостопний суглоб інтактних тварин був нормальним, грубі структурні аномалії були виявлені в суглобах контрольних тварин (введення фізіологічного розчину). У цій групі хрящ був відсутній на більшості суглобових кінців кісток, а решта острівців фіброзного хряща мали ацелюлярні еозинофільні ділянки, що відповідало 4-5 ступеням ураження за адаптованою для щурів шкалою OARSI.

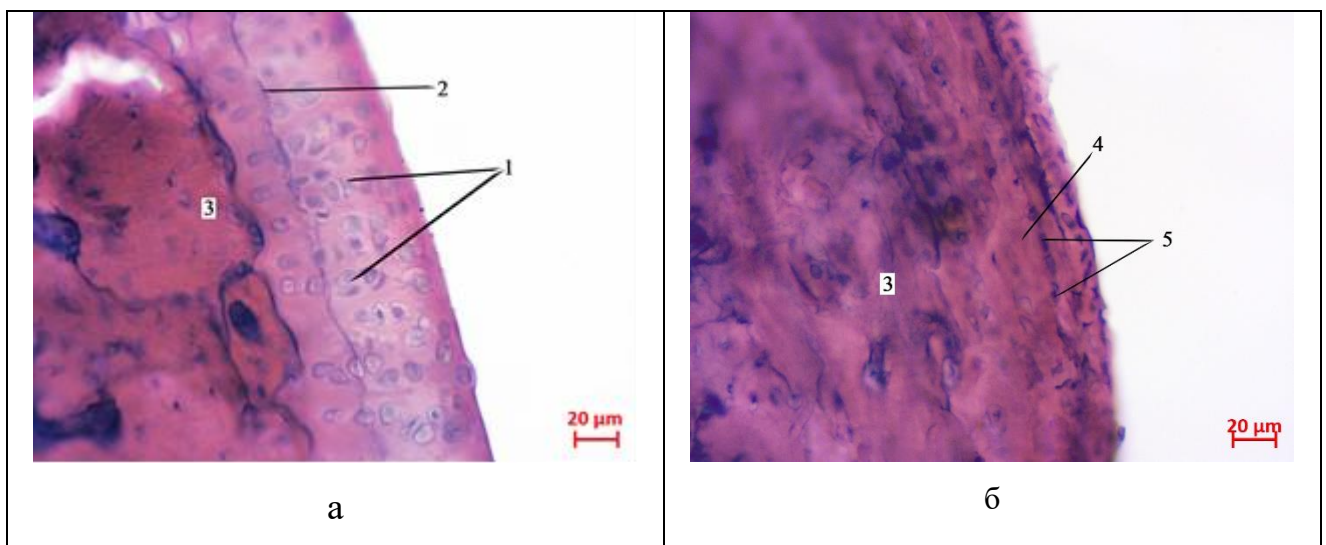


Рис. 4.5. Гістологічна структура суглобового хряща тварин інтактної групи та з ад'ювантним артритом (28 доба): Примітки: 1 – хондроцити; 2 – знак напливу; 3 – субхондральна кістка; 4 – ацелюлярні ділянки; 5 – фіброхондроцити.

У тварин із ад'ювантним артритом та локальним введенням КрММСК із жирової та хрящової тканин при гістологічному дослідженні виявлені незначні деструктивні зміни суглобового хряща (1–2 ступінь ураження за адаптованою шкалою OARSI), субхондральної кістки, синовіальної оболонки та капсули суглоба (рис. 4.6 а, б)

На суглобовій поверхні як великогомілкової, так і п'яtkової кісток виявлено суглобовий хрящ, поверхня якого нерівна, злегка волокниста, з еозинофільним забарвленням матриксу. У декілька шарів локалізовані подовжені хондроцити з овальними гіперхромними ядрами, вузьким обідком

цитоплазми та орієнтацією довгої осі паралельно суглобовій поверхні. У проміжній зоні хряща виявлені хондроцити в стані некробіозу. Феномени порушення впорядкованості клітин, порожні лакуни, нерівномірне забарвлення матриксу також виявлені при введенні КрММСК жирового походження. Ділянка кальцинованого хряща мала характерну структуру в обох дослідних групах.

У групах тварин при системному введенні КрММСК виявлені зміни в суглобовому хрящі (2-3 ступінь ураження за адаптованою шкалою OARSI), субхондральній кістці, синовіальній оболонці та суглобовій капсулі, що відображає хронізацію помірного запалення (рис. 4.6 в, г)

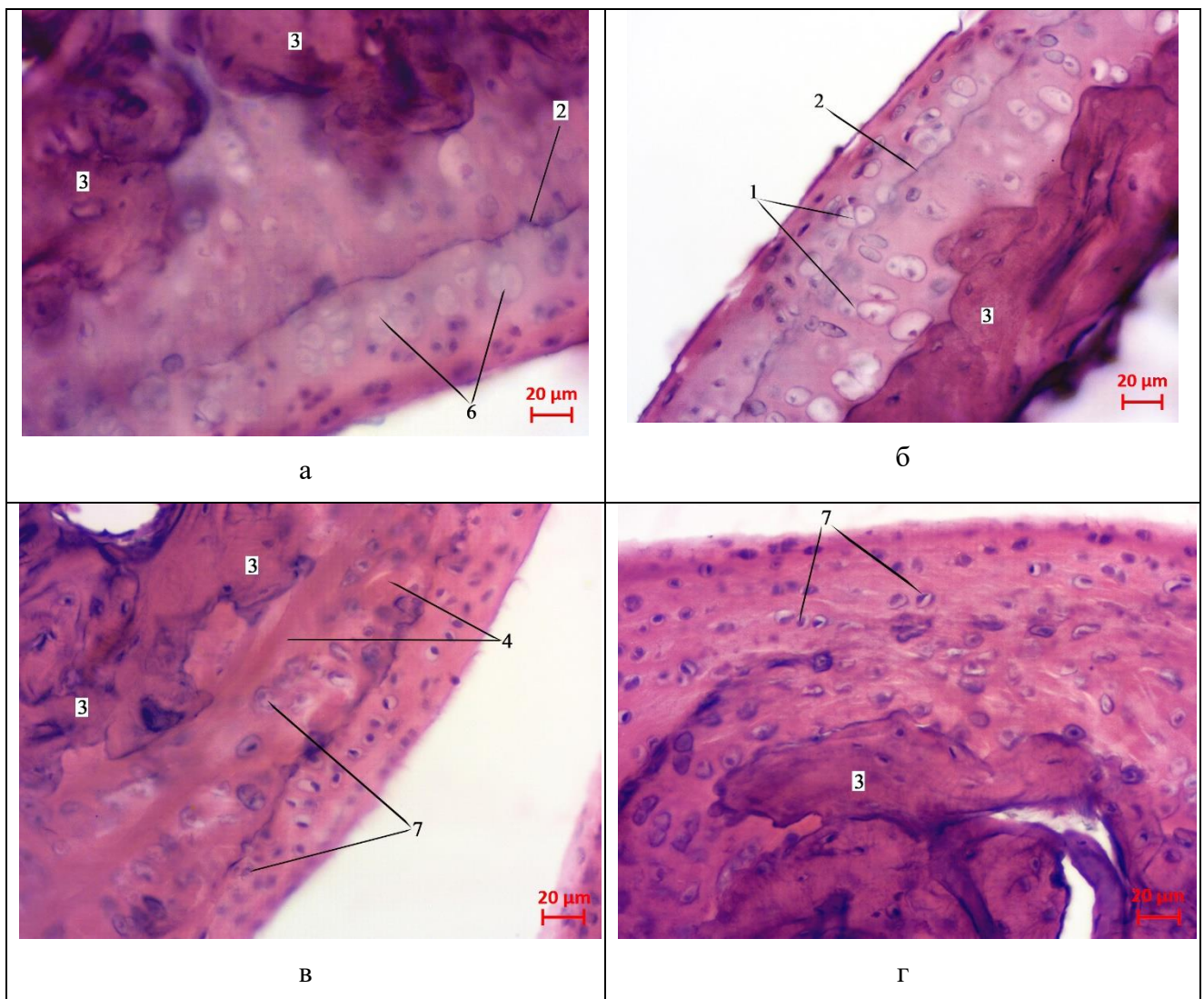


Рис. 4.6. Гістологічна структура суглобового хряща тварин з ад'ювантним артритом і терапією КрММСК (28 доба): а – група 1; б – група 2; в – група 3; г – група 4. Мікрофотографії, світлова мікроскопія, фарбування гематоксиліном та еозином. Примітки: 1 – хондроцити; 2 – знак напливу; 3 – субхондральна кістка; 4 – ацелюлярні ділянки; 5 – фіброхондроцити; 6 – порожні лакуни; 7 – дистрофія хондроцитів.

Порівняно з місцевим введенням зафіксовано більш виражене ураження капсули, яке проявлялося дифузним запальним інфільтратом. У суглобовому хрящі виявлено відсутність поверхневої зони, нерівномірність розташування хондроцитів і нерівномірне забарвлення позаклітинного матриксу в середній зоні. Крім того, візуалізувалися ацелюлярні ділянки, порожні лакуни, дистрофія та некроз хондроцитів. Крім того, у групі тварин із системним введенням КрММСК хрящового походження зазвичай не спостерігалось відливу, а зона кальцинованого хряща була різної ширини з пророслими судинами.

Наступним етапом дослідження було вивчення вмісту глікозаміногліканів у суглобовому хрящі тварин з ад'ювантним артритом та терапією КММСК із жирової та хрящової тканин за умови локального та системного введення клітин (рис. 4.7). Відомо, що однією з характерних ознак деструкції хряща є втрата матриксом глікозаміногліканів. Глікозаміноглікани - це лінійні негативно заряджені гетерополісахариди, які є обов'язковим компонентом міжклітинного матриксу та клітинних мембран. У матриксі хряща глікозаміноглікани завжди зв'язані з білком і входять до складу протеогліканів. Метаболізм протеогліканів і глікозаміногліканів змінюється на самих ранніх стадіях ураження суглобового хряща. Втрата протеогліканів призводить до розволокнення і розщеплення матриксу, зміни процесів дифузії в ньому метаболітів, дегідратації, дезорганізації і розриву колагенових волокон.

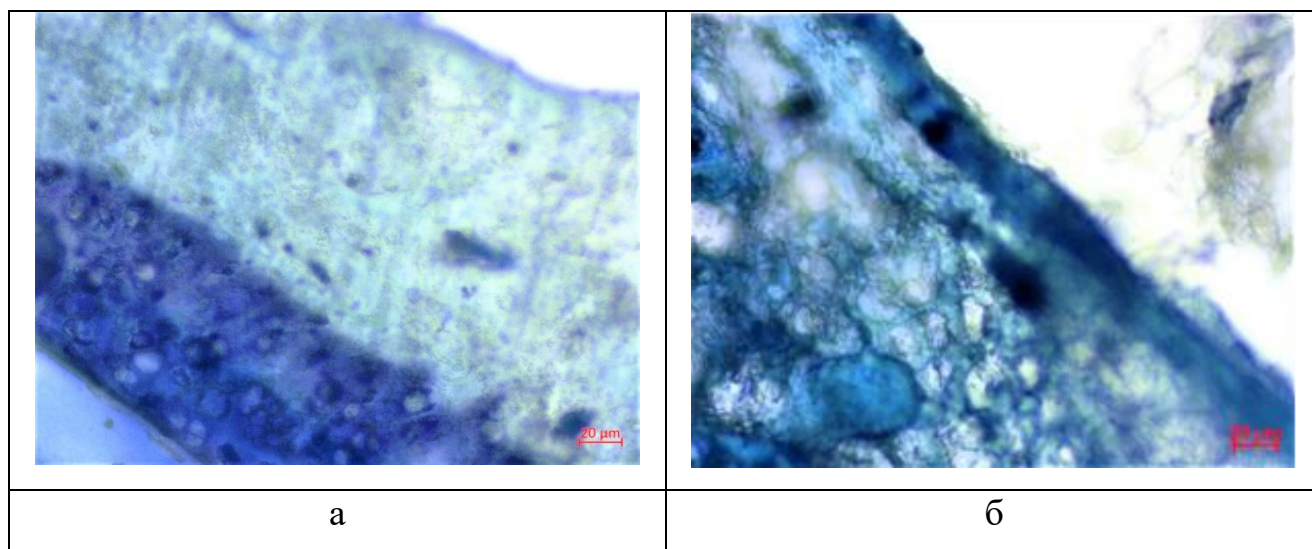
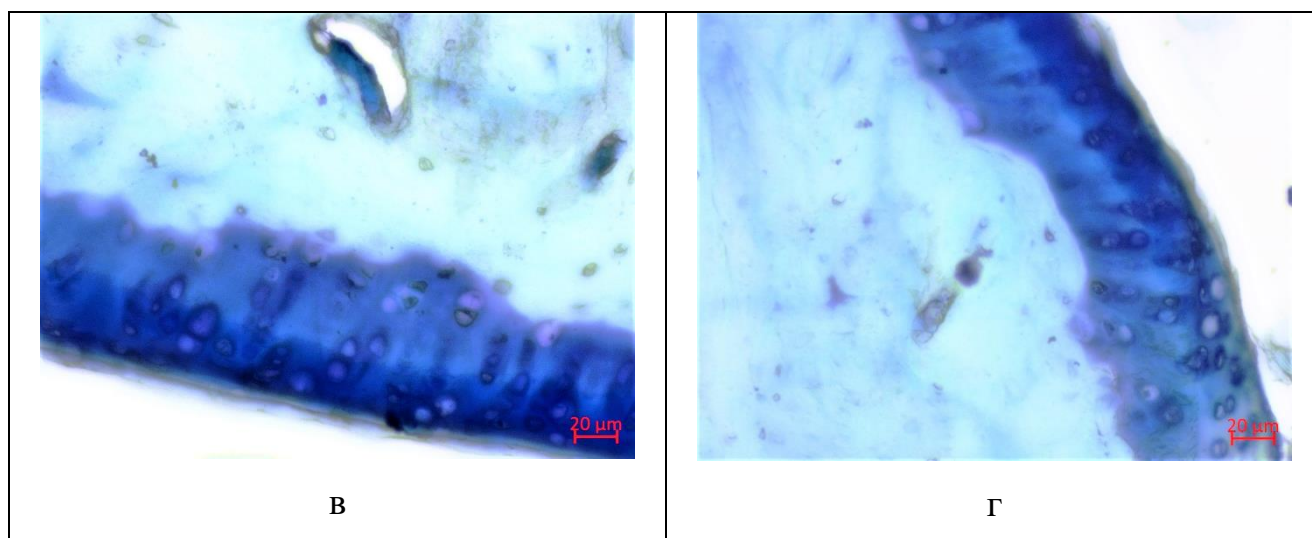


Рис. 4.7. Визначення глікозаміногліканів (фіолетове забарвлення) у хрящах тварин з ад'ювантним артритом та терапією КрММСК (28 доба): а – інтактні; б – контроль; Мікрофотографії, світлова мікроскопія, фарбування толуїдиновим синім.

У нашому дослідженні відносна площа позитивно забарвлених ділянок на глікозаміноглікани у суглобовому хрящі інтактних тварин становила $92,6 \pm 5,6$ %. У контрольній групі тварин із введенням фізіологічного розчину досліджуваний показник становив $26,4 \pm 5,1$ %, що у 3,51 рази нижче, ніж у інтактних.



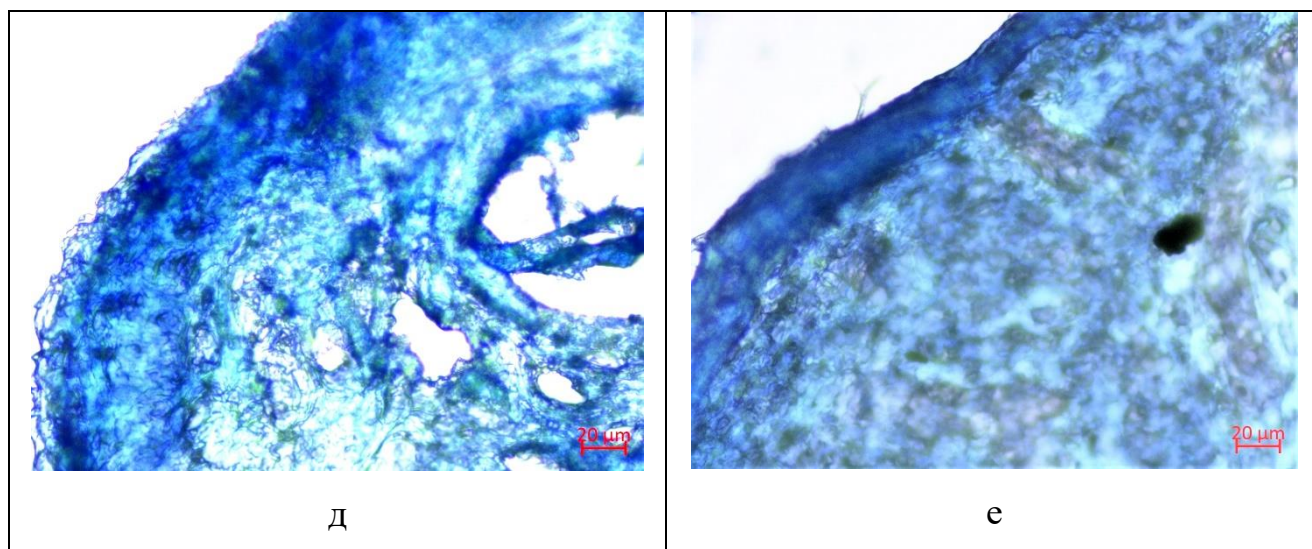


Рис. 4.8. Визначення глікозаміногліканів (фіолетове забарвлення) у хрящах тварин з ад'ювантним артритом та терапією КрММСК (28 добав – група 1; г – група 2; д – група 3; е – група 4. Мікрофотографії, світлова мікроскопія, фарбування толуїдиновим синім.

У тварин 1 та 2 груп відносна площа позитивно забарвлених на глікозаміноглікани сайтів становила $61,7 \pm 5,7 \%$ та $69,3 \pm 6,1 \%$, що відповідно у 2,34 та 2,63 рази перевищувало відповідні значення контрольної групи тварин.

У тварин із системним введенням (3 та 4 групи) досліджуваний показник становив відповідно $48,7 \pm 5,2 \%$ та $45,1 \pm 6,8 \%$, що у 1,84 та 1,71 рази перевищувало відповідні значення у групі тварин із введенням фізіологічного розчину. Проте слід зазначити, що в усіх досліджуваних групах вміст глікозаміногліканів не досягав інтактного значення.

З вищевикладеного випливає, що у тварин, які отримували КрММСК, спостерігалось збільшення відносної площі ділянок фарбування на глікозаміноглікани в суглобовому хрящі. Однак тяжкість цього процесу була різною в залежності від способу введення. Більш виражений процес відновлення синтезу глікозаміногліканів у суглобовому хрящі спостерігався за умови місцевого введення незалежно від джерела КрММСК.

Наступним етапом дослідження була оцінка вмісту ЦОГ-2-позитивних клітин у суглобовому хрящі тварин з ад'ювантним артритом та терапією КММСК із жирової та хрящової тканин за місцевого та системного введення (рис. 4.8).

Відомо, що ЦОГ-2 експресується макрофагами, синовіацитами, фібробластами, гладкою мускулатурою судин, хондроцитами та ендотеліальними клітинами за умови їх індукції цитокінами або факторами росту. Цілком ймовірно, що простагландини, що утворюються під дією ЦОГ-2, можуть прямо чи опосередковано посилювати вироблення самого ферменту за механізмом позитивного зворотного зв'язку. Подібний зв'язок був виявлений у сітківці ока на моделі індукованого конканаваліном запалення у щурів. Інгібування ЦОГ-2 вважається одним із основних механізмів протизапальної активності, оскільки селективне інгібування цієї циклооксигенази може мінімізувати багато побічних ефектів, що спостерігаються при інгібуванні циклооксигенази 1. ЦОГ-1 і ЦОГ-2 мають майже однакову молекулярна маса - 70 і 72 кДа відповідно, практично амінокислотні послідовності і практично повністю ідентичні каталітичні центри.

Результати, отримані в нашому дослідженні, показали, що відносна площа ЦОГ-2 позитивно забарвлених ділянок у суглобовому хрящі інтактних тварин становила $7,9 \pm 0,7$ %. У контрольній групі тварин із введенням фізіологічного розчину досліджуваний показник становив $56,3 \pm 2,8$ %, що у 7,13 рази вище, ніж в інтактній групі.

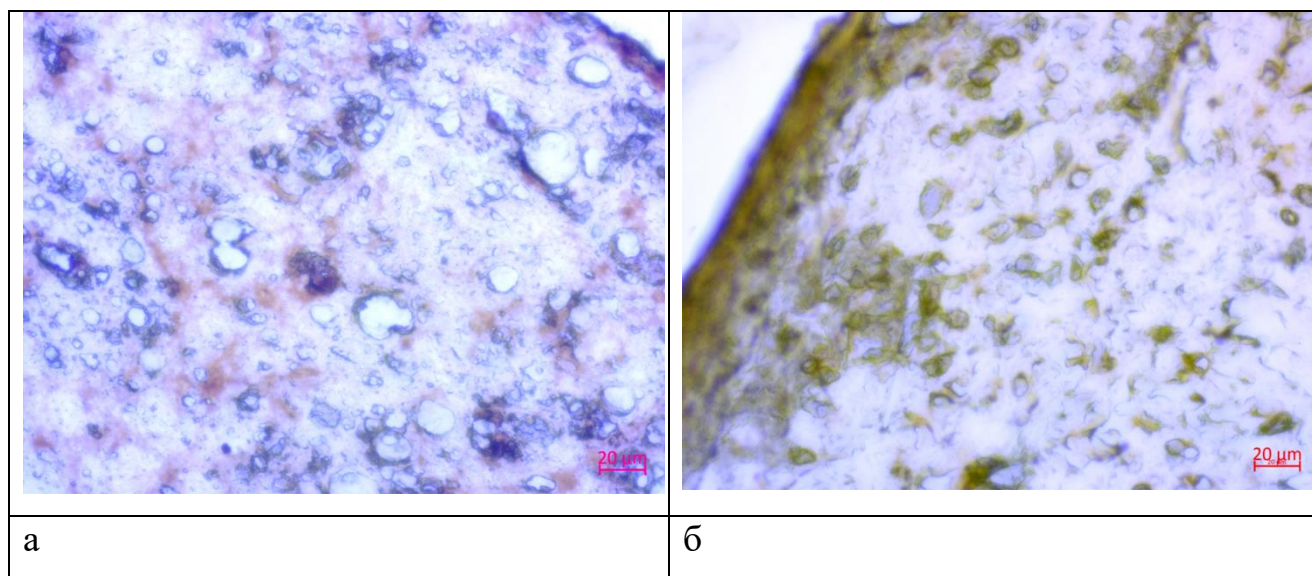


Рис. 4.9 Визначення ЦОГ-2 (коричневий колір) у хрящі тварин з ад'ювантним артритом (28 доба): а – інтактні; б – контроль. Мікрофотографії, світлова мікроскопія, імуногістохімічне фарбування.

У тварин із локальним введенням КрММСК із жирової та хрящової тканин відносна площа ділянок, позитивно забарвлених на ЦОГ-2, становила $21,7 \pm 5,1$ % та $29,4 \pm 6,5$ % відповідно, що було у 2,59 та 1,91 рази нижче відповідних значень у контролі. група тварин. У щурів при системному введенні (3 і 4 групи) досліджуваний показник становив $34,7 \pm 5,6$ % і $35,1 \pm 5,8$ % відповідно, що в 1,62 і 1,60 рази нижче відповідного значення в контролі. Однак слід зазначити, що в усіх досліджуваних групах ЦОГ-2 не досягав нормального рівня. Зниження вмісту ЦОГ-2 у суглобовому хрящі спостерігалось у всіх груп тварин, які отримували КрММСК. Однак тяжкість цього процесу була різною в залежності від способу введення. При місцевому застосуванні спостерігався більш виражений процес зменшення запалення в хрящовій тканині.

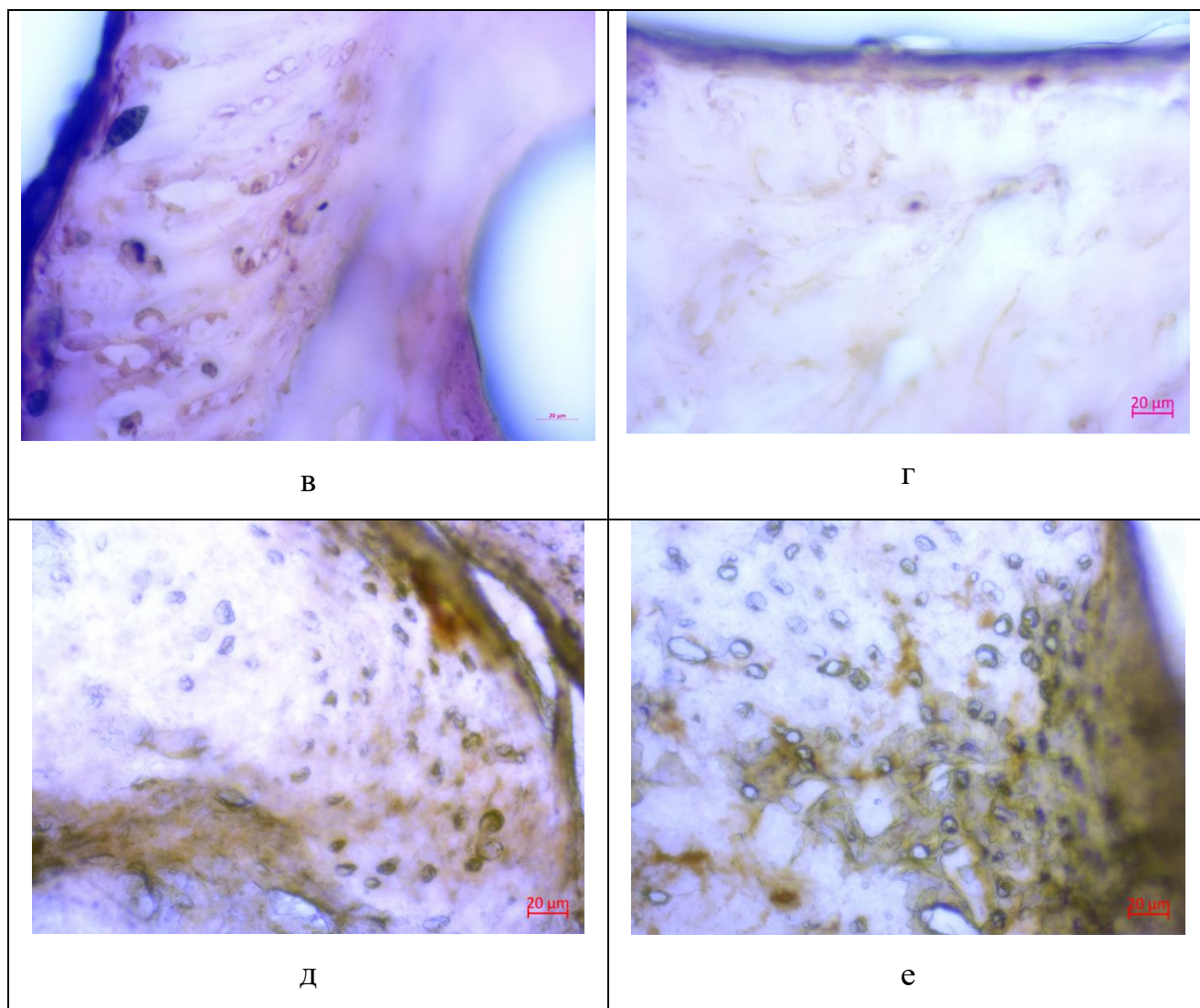


Рис. 4.10 Визначення ЦОГ-2 (коричневий колір) у хрящі тварин з ад'ювантним артритом та терапією КрММСК (28 доба): в – група 1; г – група 2; д – група 3; е – група 4. Мікрофотографії, світлова мікроскопія, імуногістохімічне фарбування.

Таким чином, отримані результати відновної дії КрММСК на хрящову тканину дозволяють зробити висновок про можливість використання в лікуванні ревматоїдного артриту досліджуваних клітинних культур як при місцевому, так і при системному введенні. Це основа для розгляду загального введення як альтернативи або доповнення до місцевої ін'єкції клітинного матеріалу в суглоб. Надзвичайно важливо, щоб метод внутрішньовенного введення був безпечним і малотравматичним. Виходячи з цього положення,

системне застосування ММСК може бути використане в лікуванні цієї патології. Проте відкритим залишається питання про більш віддалені ефекти клітинної терапії, зокрема про тривалість гальмування дегенеративно-дистрофічного процесу та можливу необхідність повторного використання клітин.

Висновки за розділом

1. Аналіз отриманих результатів свідчив, що на 7 добу моделювання ад'ювантного артриту спостерігалися ознаки дегенеративних змін у суглобовому хрящі, які відповідали гострому артриті. При збільшенні строку спостереження до 35 діб відбувалася хронізація процесу, що призводило до розвитку виражених артрозних порушень у суглобовому хрящі.

2. Локальне та системне введення КрММСК із жирової та хрящової тканин призвело до корекції перебігу експериментального ад'ювантного артриту у щурів: індекс артриту, гістоструктура пошкодженого суглоба мали позитивну відновну динаміку.

3. Застосування локального способу введення клітин порівняно з системним мало більш потужний вплив на відновлення гістоструктури, вмісту ГАГ і ЦОГ-2 хряща у щурів з ад'ювантним артритом. Ці дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки методів лікування артритів у клінічній практиці.

Публікації за розділом 66, 160-163.

РОЗДІЛ 5. РОЛЬ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ІЗ РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ В МОДУЛЯЦІЇ ДЕЯКИХ ПОКАЗНИКІВ КЛІТИННОГО ІМУНЕТЕТУ У ЩУРІВ 3 АА.

Відомо, що ревматоїдний артрит (РА) є хронічним аутоімунним захворюванням, що характеризується прогресуючою ерозивною деструкцією периферичних суглобів [165]. Важливим компонентом патогенезу РА є дисрегуляція імунної системи, що індукує порушення толерантності до аутоантигенів і розвиток аутоімунних реакцій. Схильність до розвитку РА визначається генетичними, віковими факторами та факторами мікросередовища. Встановлення функціонально різних Т-клітинних субпопуляцій (Th-1 і Th-2) дозволило з'ясувати різну роль вироблених ними про- і протизапальних цитокінів в ініціації та підтримці тривалих аутоімунних захворювань, включаючи РА [166]. Активація спеціалізованих синовіоцитоподібних фібробластів, які виробляють медіатори запалення, може мати вирішальне значення для зміни цитокінового профілю при РА, що призводить до порушення координованого зв'язку між певними імунокомпетентними клітинами та розвитку імунозапальних реакцій у цілому [167]. Основним принципом лікування цієї патології має бути корекція цитокінового профілю та взаємодій імунокомпетентних клітин.

За сучасними уявленнями розвиток РА пов'язаний не лише з диференціюванням, проліферацією та активацією ефektorних Т-клітин, а й з порушенням супресорних механізмів, що контролюють толерантну чутливість Т- і В-лімфоцитів до аутоантигенів [168]. Ключову роль у механізмах імуносупресії відіграють регуляторні Т-клітини з фенотипом CD4+CD25+ [169]. У хворих на РА спостерігається різке зниження кількості та порушення функції цих клітин. Встановлено, що Т-клітини CD4+CD25+ відіграють певну роль у розумінні регуляторних механізмів аутоімунітету, що призводить до розвитку та прогресування РА [170].

Метою дослідження було визначення показників клітинного імунітету у тварин з ад'ювантним артритом та терапією КрММСК з жирової та хрящової тканин.

Найбільш явними проявами АА у мишей і щурів є набряк, деформація та порушення рухливості суглобів, спленомегалія, зниження Т-супресорного імунітету, зміни цитокінового профілю [171]. У місці введення повного ад'юванту Фрейнда спостерігалися ознаки запалення суглобу (почервоніння, припухлість), які були чітко виражені в контрольній групі протягом усього експерименту, а у тварин із клітинною терапією ці ознаки мали згасаючий характер.

Протягом усього періоду дослідження тварин щоденно спостерігали за станом здоров'я, побічних явищ не спостерігалось. У інтактних тварин протягом експерименту відзначалося поступове збільшення маси тіла, тоді як у тварин з АА ця динаміка була згладжена (рис. 2).

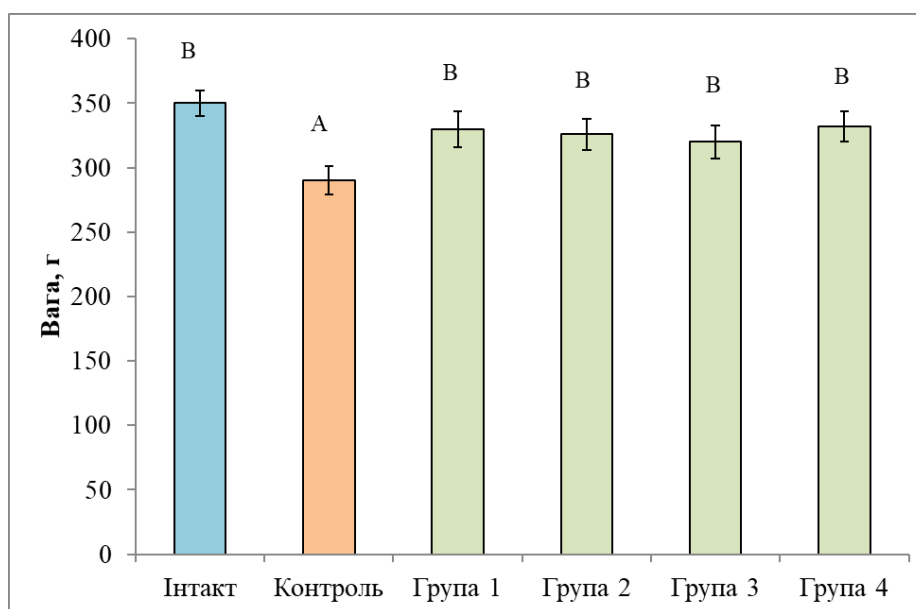


Рисунок 5.1. Вплив КрММСК з жирової та хрящової тканин на масу тіла щурів з АА ($x \pm SD$; $n = 5$); А – різниця суттєва відносно інтактної групи; В – різниця достовірна відносно контролю.

Контрольні тварини після індукції АА трохи втрачали масу тіла, внаслідок чого наприкінці експерименту вони відставали за масою від інтактних щурів (у 1,2 рази). На 28 добу спостереження маса тіла тварин дослідних груп досягала рівня інтактних щурів.

Спленомегалія є одним з характерних симптомів АА [172, 176, 177]. Вплив терапії КрММСК з жирової та хрящової тканин на індекс селезінки щурів з АА представлені на рисунку 5.2.

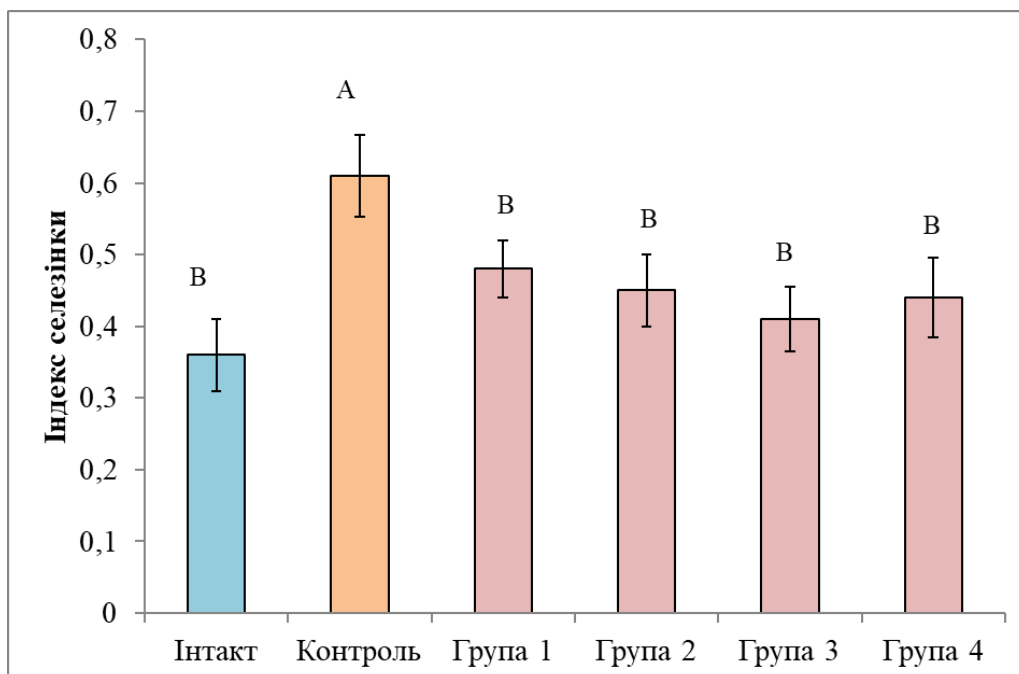


Рис. 5.2. Вплив КрММСК з жирової та хрящової тканин на індекс селезінки щурів з АА ($x \pm SD$; $n = 5$); А – різниця суттєва відносно інтактної групи; В – різниця достовірна відносно контролю.

У тварин контрольної групи встановлено підвищення індексу (1,7 рази) та клітинності (2,8 рази) селезінки відносно відповідного значення показника в інтактній групі. Ймовірно, це явище пов'язане з переважанням росту стромальних елементів селезінки при АА.

У тварин із локальним введенням КрММСК із жирової та хрящової тканин (1 та 2 групи) на 28 добу індекс селезінки був у 1,27 та 1,36 рази нижчим за відповідне значення в контрольній групі тварин (АА без терапії). Досліджуваний показник у 3 і 4 групах порівняно з контролем знизився відповідно в 1,49 і 1,38 рази.

Індекс клітинності селезінки наведений на рис. 5.3. Отримані результати свідчили, що у тварин усіх дослідних груп був нижчим за відповідні значення контрольної групи (в середньому в 2 рази). Проте слід зазначити, що в усіх досліджуваних групах індекс клітинності селезінки не досягав інтактного значення.

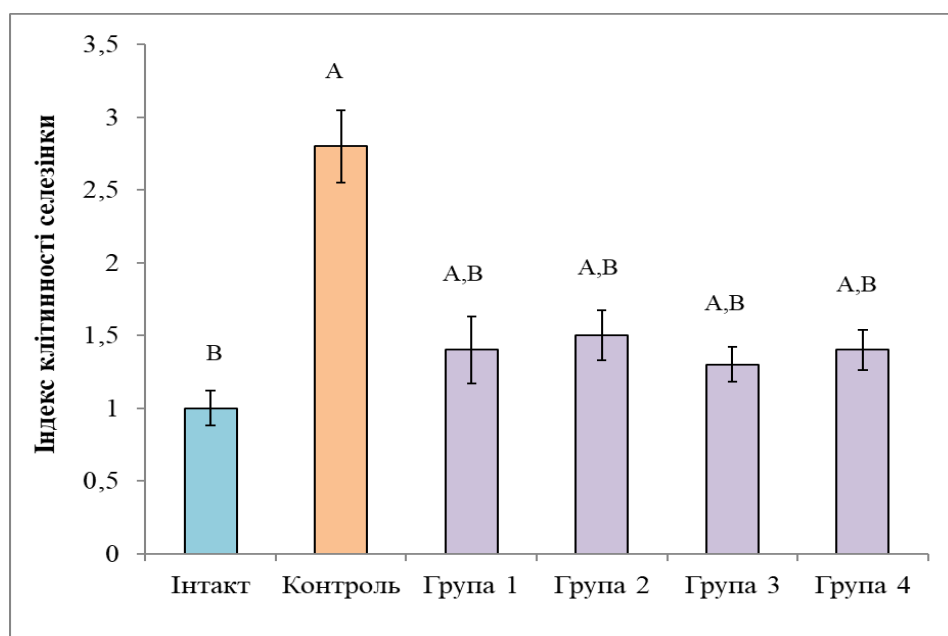


Рис 5.3. Вплив КрММСК з жирової та хрящової тканин на індекс клітинності селезінки щурів з АА ($x \pm SD$; $n = 5$); А – різниця суттєва відносно інтактної групи; В – різниця достовірна відносно контролю.

Т-клітини та макрофаги відіграють центральну роль у патогенезі та прогресуванні РА [172, 177]. У дослідженні встановлено, що у щурів спостерігалися зміни кількісних показників імунокомпетентних клітин селезінки (табл. 5.1 та рис. 5.4 та 5.5). У групі контрольних тварин (АА без

терапії) спостерігалось зниження кількості загальних CD3⁺ Т-лімфоцитів у 2,13 рази, а також субпопуляцій CD4⁺ (хелперів) у 2,12 рази, CD8⁺ (супресорів) у 1,77 рази та CD4⁺/CD8⁺ (ІРІ імунорегуляторний індекс) в 1,2 рази відносно групи інтактних тварин.

У тварин із локальним введенням КрММСК із жирової та хрящової тканин (1 та 2 групи) вміст Т-клітин був вищим за відповідні показники в контрольній групі (не лікований АА). А саме, відповідно було 1,79 і 1,85 рази для CD3⁺, 1,76 і 1,84 рази для CD4⁺, 1,44 і 1,5 рази для CD8⁺ і 1,22 і 1,23 рази для CD4⁺/CD8⁺. Однак у групах 1 і 2 вміст Т-клітин у селезінці не досягав значення в групі інтактних тварин. При дослідженні субпопуляційного складу лімфоцитів селезінки після клітинної терапії при системному введенні (групи 3 і 4) нормалізували вміст Т-клітин (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺).

Таблиця 5.1. Вплив КрММСК із жирової на показники клітинного імунітету в селезінці шурів з АА ($\bar{x} \pm SD$; n = 5)

Групи	CD3 ⁺ , %	CD4 ⁺ , %	CD8 ⁺ , %
Інтакт	42.9±0.4 ^b	36.5±0.5 ^b	23.7±0.3 ^b
Контроль	20.1±0.5 ^a	17.2±0.3 ^a	13.4±0.5 ^a
Група 1	35.9±0.2 ^{a,b}	30.3±0.7 ^{a,b}	19.3±0.6 ^{a,b}
Група 2	37.2±0.5 ^{a,b}	31.8±0.6 ^{a,b}	20.1±0.8 ^{a,b}
Група 3	39.5±0.4 ^b	35.1±0.2 ^b	22.7±0.2 ^b
Група 4	38.1±0.3 ^b	35.7±0.7 ^b	22.5±0.5 ^b

Примітка А – різниця суттєва відносно інтактної групи; В – різниця достовірна відносно контролю.

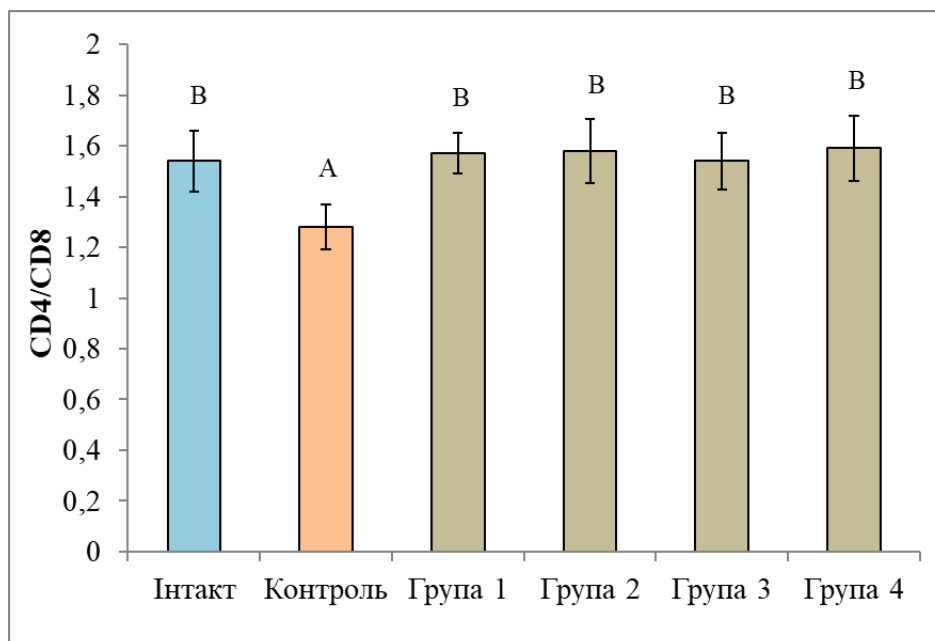


Рис. 5.4. Вплив КрММСК з жирової та хрящової тканин на вміст $CD4^+/CD8^+$ клітин у селезінці щурів з ад'ювантним артритом ($x \pm SD$; $n = 5$); А – різниця є значною відносно інтактної групи; В – різниця достовірна відносно контролю.

Наступним етапом дослідження було дослідження вмісту $CD4^+CD25^+$ (T-reg) у селезінці тварин з АА та терапії КММСК з жирової та хрящової тканин за локального та системного введення клітин (рис. 4).

У контрольній групі (не лікований АА) спостерігалось зниження кількості $CD4^+CD25^+$ клітин у 1,41 рази порівняно з групою інтактних. У тварин із локальним введенням КрММСК з жирової та хрящової тканин (1 та 2 групи) вміст Т-reg відповідно перевищував відповідні показники контрольної групи у 1,66 та 1,51 рази. У щурів із системним введенням (групи 3 та 4) досліджуваний показник був у 1,32 та 1,46 рази вищим за відповідні значення у групі не лікованих АА.

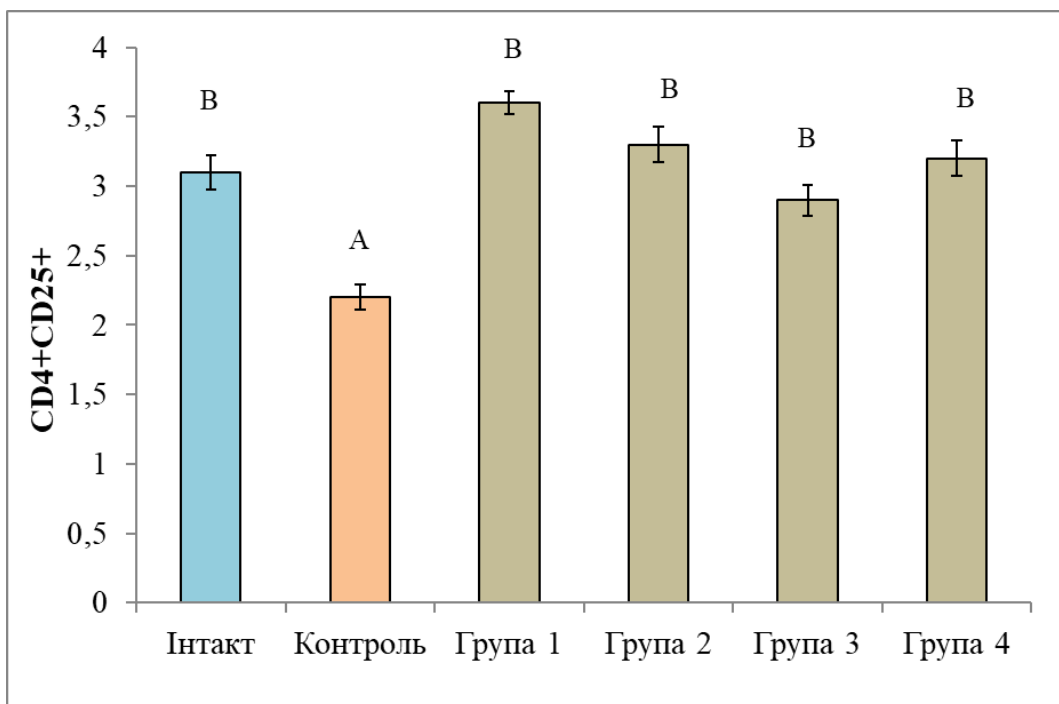


Рис. 5.5. Вплив КрММСК з жирової та хрящової тканин на вміст CD4+CD25+ клітин у селезінці щурів з ад'ювантним артритом ($x \pm SD$; $n = 5$); А – різниця є значною відносно інтактної групи; В – різниця достовірна відносно контролю.

Таким чином, було оцінено вплив терапії КрММСК на модуляцію кількох показників клітинного імунітету при ад'ювантному артриті. Показано, що АА, як експериментальний аналог РА, є системною патологією сполучнотканинних структур організму. Після клітинної терапії зменшилась спленомегалія, отже, виражений корекційний ефект КрММСК щодо селезінкового індексу та клітинності та пригнічення гіперактивного росту сполучнотканинних елементів. Слід зазначити, що в усіх дослідних групах вміст Т-reg досягав інтактного значення. Водночас підвищення вмісту Т-reg у щурів, яким місцево вводили КрММСК з жирової тканини, було найбільшим серед усіх досліджуваних груп. Цікаво, що зниження рівня Т-reg клітин у селезінці тварин з АА насправді є лише специфічним маркером патології, оскільки ці клітини не мають захисного потенціалу, що сприяє прояву патології в організмі.

Висновки за розділом

Системне та локальне введення КрММСК, отриманих із жирової та хрящової тканин, призвело до корекції перебігу ад'ювантного артриту, що проявилось у зменшенні вираженості клінічних проявів патології та відновленні кількості регуляторних клітин у селезінці (CD4+, CD8+, CD4+CD25+). Застосування системного способу введення клітин порівняно з локальним мало більш потужний вплив на відновлення вмісту Т-клітин у щурів з ад'ювантним артритом. Ці дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки методів лікування артритів у клінічній практиці.

Публікації за розділом [173 - 175].

РОЗДІЛ 6 ВПЛИВ КpММСК НА ДИНАМІКУ МАРКЕРІВ ЗАПАЛЕННЯ В КРОВІ ЩУРІВ З АД'ЮВАНТНИМ АРТРИТОМ

Проблема терапії ревматологічних захворювань актуальна у всьому світі. За даними ВООЗ запальні захворювання суглобів і сполучної тканини займають друге місце після серцево-судинної патології серед причин, що призводять до інвалідизації та смертності хворих [4, 5]. Слід зазначити, що розвиток ревматоїдного артриту у великій мірі зумовлено наявністю дисфункції імунної системи, яка сприяє переходу гострого запального процесу в хронічну стадію. У той же час тривалий запальний процес призводить до зниження імунологічної реактивності організму. Визначення гематологічних маркерів запалення є одним з головних напрямів при вивченні запальних процесів різного генезу, як до так і після терапії. Ефективність лікування артриту як правило не висока, у зв'язку з чим інтенсивно проводяться дослідження альтернативних методів [65], одним з яких є клітинна терапія.

На сьогодні мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) залишаються предметом особливої уваги, оскільки їм властиві здатність до диференціювання, трофічний та імуномодулюючий потенціали, вони здатні підтримувати гемопоез та продукувати цитокіни, хемокіни і фактори росту [177]. В цілому, такі властивості роблять ММСК одним з головних кандидатів для біотехнологічних та тканинно-інженерних розробок. А оскільки ці клітини можуть задіяти складні механізми, які організм природно використовує для модуляції та відновлення дисбалансу імунітету, терапія ММСК має потенціал для лікування та корегування аутоімунних розладів, у тому числі ревматоїдного артриту, засобами, які звичайним препаратами поки що недоступні. В цьому напрямку наразі проводиться багато досліджень, проте в роботах використовують ММСК, отримані з різних джерел, застосовують дуже різноманітні схеми лікування та дозування. Зокрема, терміни клітинної терапії та спосіб введення ММСК залишаються неврегульованими [5, 65, 177].

Метою роботи було дослідження динаміки маркерів запалення в крові щурів з ад'ювантним артритом за умов системного та локального введення кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової та хрящової тканин.

Відомо, що вміст загального білку в крові може наростати при розвитку запалення в результаті запуску каскаду імунних процесів [157]. Отримані в роботі результати свідчили, що у тварин контрольної групи показник вмісту загального білку перевищував значення інтактних тварин протягом усього строку експерименту (табл. 6.1). У тварин, які отримували клітинну терапію як за умов локального (група 1 та 2), так і системного введення (група 3 та 4), динаміка вмісту загального білку мала тенденцію до зниження з 14 доби спостереження та на 21 і 28 добу статистично не відрізнялася від відповідного показника в групі інтактних тварин.

Таблиця 6.1 – Вплив терапії КрММСК ЖТ та ХТ на динаміку вмісту загального білку (г/л) в сироватці крові щурів з АА ($x \pm SD$; $n = 5$)

Групи	Термін спостереження, доба		
	14	21	28
Інтакт	98,5±2,6 ^{a;k}	97,2±2,3 ^{a;k}	98,8±2,1 ^{a;k}
Контроль	123,6±2,5 ^{b;k}	120,2±3,2 ^{b;k}	111,6±2,5 ^{b;l}
Група 1	102,3±2,7 ^{c;k}	95,4±2,1 ^{a;l}	96,5±1,5 ^{a;l}
Група 2	108,9±2,1 ^{c;k}	97,8±2,5 ^{a;l}	99,2±2,1 ^{a;l}
Група 3	101,5±2,3 ^{c;k}	98,8±2,4 ^{a;l}	96,7±2,8 ^{a;l}
Група 4	100,1±2,1 ^{c;k}	99,5±2,3 ^{a;l}	95,4±2,3 ^{a;l}

Примітки: ^{a, b, c} вказують на значення, які значуще відрізнялися в одному стовпці таблиці ($P < 0,05$); ^{k, l} вказують на значення, які значуще відрізнялися в одному рядку таблиці ($P < 0,05$)

Показники периферичної крові важливі не лише для діагностичних і прогностичних критеріїв перебігу ревматоїдного артриту, а й як відображення ефективності лікування. Одним з показників, які реагують на наявність запального процесу в організмі, є ШОЕ, яка залежить як від властивостей еритроцитів, так і від ступеня їх агрегації. У крові щурів контрольної групи відзначалося підвищення показнику ШОЕ в порівнянні з інтактними тваринами протягом всього строку спостереження, а саме: на 14 добу в 4,9 рази, на 21 добу в 4,4 рази та на 28 добу в 2,4 рази (табл. 6.2). Слід зазначити, що в усіх експериментальних групах досліджений показник мав тенденцію до нормалізації починаючи з 14 доби. На 28 добу ШОЕ в групах 1 та 2 статистично не відрізнялась від інтактних тварин. В групах 3 та 4 досліджений показник був відповідно в 1,8 і 1,7 рази нижче порівняно з контролем, однак нормалізації цього показника на відміну від перших двох експериментальних груп не відбулося.

Таблиця 6.2 – Вплив терапії КрММСК ЖТ та ХТ на динаміку ШОЕ (мм/год) в крові щурів з АА ($\bar{x} \pm SD$; $n = 5$)

Групи	Термін спостереження, доба		
	14	21	28
Інтакт	3,37 $\pm$ 0,85 ^{a;k}	2,87 $\pm$ 0,45 ^{a;k}	3,87 $\pm$ 0,61 ^{a;k}
Контроль	16,58 $\pm$ 1,03 ^{b;k}	12,55 $\pm$ 0,94 ^{b;l}	9,27 $\pm$ 0,91 ^{b;m}
Група 1	7,55 $\pm$ 0,43 ^{c;k}	6,21 $\pm$ 0,49 ^{c;l}	4,08 $\pm$ 0,63 ^{a;m}
Група 2	7,12 $\pm$ 0,47 ^{c;k}	5,76 $\pm$ 0,54 ^{c;l}	3,97 $\pm$ 0,48 ^{a;m}
Група 3	8,45 $\pm$ 0,72 ^{c;k}	6,54 $\pm$ 0,41 ^{c;l}	5,27 $\pm$ 0,46 ^{c;m}
Група 4	8,21 $\pm$ 0,75 ^{c;k}	6,38 $\pm$ 0,44 ^{c;l}	5,56 $\pm$ 0,55 ^{c;m}

Примітки: ^{a, b, c} вказують на значення, які значуще відрізнялися в одному стовпці таблиці ($P < 0,05$); ^{k, l, m} вказують на значення, які значуще відрізнялися в одному рядку таблиці ($P < 0,05$)

Ще одним показником активності запального процесу в організмі є рівень «білків гострої фази запалення», і зокрема С-реактивного білка – класичного гострофазового білка плазми крові, який розглядається як найбільш чутливий лабораторний маркер інфекції, запалення і тканинного ушкодження. Отримані результати наведені в таблиці 6.3.

У тварин контрольної групи відзначалося підвищення показнику СРБ протягом всього строку експерименту, а саме: на 14 добу в 8,6 рази, на 21 добу в 6,6 рази та на 28 добу в 5,2 рази стосовно відповідних показників у інтактних тварин. У тварин з клітинною терапією досліджений показник мав тенденцію до нормалізації починаючи з 14 доби. Так, в сироватці крові тварин груп 1 та 2 вміст СРБ був нижчим відповідно в 1,8 та 1,7 рази стосовно контролю на 28 добу. Показник СРБ в групах 3 та 4 на 28 добу був нижчим в 2,2 рази стосовно контролю. В групі тварин з системним введенням КрММСК відновлення вмісту СРБ відбувалось швидше. Однак слід зазначити, що в усіх експериментальних групах досліджений показник не досягав рівня інтактних тварин.

Таблиця 6.3 – Вплив терапії КрММСК ЖТ та ХТ на динаміку вмісту СРБ (мг/л) в сироватці крові щурів з АА ($x \pm SD$; $n = 5$)

Групи	Термін спостереження, доба		
	14	21	28
Інтакт	$3,5 \pm 0,7^{a;k}$	$3,4 \pm 0,2^{a;k}$	$3,6 \pm 0,4^{a;k}$
Контроль	$30,2 \pm 3,5^{b;k}$	$22,5 \pm 2,3^{b;l}$	$18,7 \pm 1,4^{b;m}$
Група 1	$23,4 \pm 1,6^{c;k}$	$16,5 \pm 1,5^{c;l}$	$10,4 \pm 0,9^{c;m}$
Група 2	$25,8 \pm 1,7^{c;k}$	$15,7 \pm 1,2^{c;l}$	$11,2 \pm 1,0^{c;m}$
Група 3	$21,7 \pm 2,2^{d;k}$	$12,3 \pm 0,7^{d;l}$	$8,4 \pm 0,6^{d;m}$
Група 4	$23,1 \pm 1,9^{c,d;k}$	$11,7 \pm 0,9^{d;l}$	$8,6 \pm 0,6^{d;m}$

Примітки: ^{a, b, c, d} вказують на значення, які значуще відрізнялися в одному стовпці таблиці ($P < 0,05$); ^{k, l, m} вказують на значення, які значуще відрізнялися в одному рядку таблиці ($P < 0,05$)

Одним з основних серологічних маркерів ревматоїдного артриту є РФ. Тому наступним етапом роботи було визначення динаміки зміни цього фактору в сироватці крові тварин дослідних груп (табл. 6.4).

Підвищення показнику РФ у щурів контрольної групи спостерігали протягом всього строку експерименту, а саме: на 14 добу в 1,9 рази, на 21 добу в 2,9 рази та на 28 добу 3,6 рази стосовно відповідних показників у інтактних тварин. У тварин з клітинною терапією досліджений показник мав тенденцію до зниження починаючи з 14 доби. Так вміст РФ в сироватці крові тварин груп з локальним введенням (група 1 та 2) на 28 добу був відповідно в 2,6 та 2,5 рази нижче стосовно контролю. В групі тварин з системним введенням (групи 3 та 4) відновлення вмісту РФ в крові експериментальних тварин відбувалось більш інтенсивно, що на 21 та 28 добу призводило до його зниження відповідно в 2,1 та 2,7 рази стосовно групи контрольних тварин. Однак слід зазначити, що в усіх експериментальних групах досліджений показник не досягав рівня інтактних тварин.

Таблиця 6.4 – Динаміка вмісту РФ (МО/мл) в сироватці крові щурів з АА за умов терапії КрММСК ЖТ та ХТ ($x \pm SD$; $n = 5$)

Групи	Термін спостереження, доба		
	14	21	28
Інтакт	5,7 $\pm$ 0,3 ^{a;k}	5,2 $\pm$ 0,5 ^{a;k}	5,4 $\pm$ 0,6 ^{a;k}
Контроль	10,8 $\pm$ 0,5 ^{b;k}	15,2 $\pm$ 0,4 ^{b;l}	19,5 $\pm$ 0,5 ^{b;m}
Група 1	8,6 $\pm$ 0,3 ^{c;k}	8,9 $\pm$ 0,6 ^{c;k}	7,6 $\pm$ 0,4 ^{c;l}
Група 2	8,8 $\pm$ 0,6 ^{c;k}	8,7 $\pm$ 0,5 ^{c;k}	7,9 $\pm$ 0,3 ^{c;l}
Група 3	8,1 $\pm$ 0,2 ^{c;k}	7,3 $\pm$ 0,6 ^{d;l}	7,2 $\pm$ 0,5 ^{c;l}
Група 4	8,5 $\pm$ 0,4 ^{c;k}	7,4 $\pm$ 0,5 ^{d;l}	7,3 $\pm$ 0,6 ^{c;l}

Примітки: ^{a, b, c, d} вказують на значення, які значуще відрізнялися в одному стовпці таблиці ($P < 0,05$); ^{k, l, m} вказують на значення, які значуще відрізнялися в одному рядку таблиці ($P < 0,05$)

Загальна активність системи антиоксидантного захисту в сироватці крові тварин контрольної групи (введенні фізіологічного розчину) значно знижувалася порівняно з інтактними щурами протягом усього періоду спостереження. Слід зазначити, що у тварин усіх груп з клітинною терапією досліджуваний показник мав тенденцію до нормалізації з 21-ї доби. Так, на 28 добу досліджуваний показник у 1 та 2 групах був вищим у 1,92 та 2,12 рази відповідно у порівнянні з контрольною групою. Активність ТАС у 3 і 4 групах на 28 добу була в 1,67 і 1,6 рази відповідно вищою порівняно з групою тварин, яким вводили фізіологічний розчин. Таким чином, відновлення активності системи антиоксидантного захисту відбувалося більш інтенсивно в групі тварин із локальним введенням КрММСК із хрящової тканини (табл. 6.5).

Таблиця 6.5

Вплив КрММСК з ЖТ та ХТ на динаміку активності загальної системи антиоксидантного захисту у щурів з ад'ювантним артритом ($x \pm SD$; $n = 5$)

Групи	Термін спостереження, доба		
	14	21	28
Інтакт	$35,26 \pm 0,93^{a;k}$	$35,22 \pm 0,97^{a;k}$	$35,28 \pm 0,90^{a;k}$
Контроль	$17,55 \pm 0,68^{b;k}$	$16,83 \pm 0,60^{b;k}$	$16,46 \pm 0,32^{b;k}$
Група 1	$22,24 \pm 0,77^{b;k}$	$27,32 \pm 0,48^{c;d;l}$	$31,59 \pm 0,27^{c;m}$
Група 2	$21,62 \pm 0,47^{b;k}$	$29,19 \pm 0,53^{c;l}$	$34,72 \pm 0,65^{c;m}$
Група 3	$20,88 \pm 0,91^{b;k}$	$25,42 \pm 0,68^{c;d;l}$	$27,55 \pm 0,58^{d;m}$
Група 4	$20,46 \pm 0,37^{b;k}$	$23,31 \pm 0,38^{d;l}$	$26,36 \pm 0,73^{d;m}$

Примітки: a, b, c, d вказують на значення, які значуще відрізнялися в одному стовпці таблиці ($P < 0,05$); k, l, m вказують на значення, які значуще відрізнялися в одному рядку таблиці ($P < 0,05$)

Як відомо, показники периферичної крові важливі не тільки для діагностичних і прогностичних критеріїв перебігу ревматоїдного артриту, а й як

відображення ефективності лікування. Визначено, що кількість лейкоцитів у тварин при введенні фізіологічного розчину збільшувалася протягом усього експерименту. У тварин із локальним введенням спостерігалася тенденція до зниження вмісту лейкоцитів з 14-ї доби спостереження. А на 28 добу досліджуваний показник у 1 та 2 групах статистично не відрізнявся від інтактних тварин. Вміст лейкоцитів у 3 та 4 групах на 28 добу після терапії був відповідно у 1,22 та 1,19 рази нижчим порівняно з групою тварин із введенням фізіологічного розчину, але нормалізації цього показника на відміну від перших двох дослідних груп не відбулося (таблиця 6.6).

Таблиця 6.6

Вплив КрММСК з ЖТ та ХТ на динаміку лейкоцитів у щурів з ад'ювантним артритом ($x \pm SD$; $n = 5$)

Групи	Термін спостереження, доба		
	14	21	28
Інтакт	$16,62 \pm 2,12^{a;k}$	$16,54 \pm 2,02^{a;k}$	$16,46 \pm 2,10^{a;k}$
Контроль	$28,46 \pm 2,85^{b;k}$	$29,66 \pm 1,67^{b;k}$	$25,13 \pm 3,01^{b;k}$
Група 1	$23,48 \pm 3,07^{c;k}$	$20,96 \pm 2,35^{c;k,l}$	$18,56 \pm 1,27^{a;l}$
Група 2	$22,05 \pm 2,82^{c;k}$	$21,08 \pm 1,95^{c;k,l}$	$18,15 \pm 1,36^{a;l}$
Група 3	$26,51 \pm 2,19^{b;k}$	$28,55 \pm 2,56^{b;k}$	$20,52 \pm 1,70^{c;l}$
Група 4	$27,46 \pm 2,07^{b;k}$	$27,66 \pm 2,32^{b;k}$	$21,13 \pm 1,56^{c;l}$

Примітки: ^{a, b, c, d} вказують на значення, які значуще відрізнялися в одному стовпці таблиці ($P < 0,05$); ^{k, l, m} вказують на значення, які значуще відрізнялися в одному рядку таблиці ($P < 0,05$)

Отримані результати свідчили, що у тварин контрольної групи був наявний виражений запальний процес, про що свідчило різке збільшення у крові рівня СРБ, ШОЕ та РФ. На тлі клітинної терапії відзначалися більш

низькі показники досліджених маркерів відносно контролю. Ці результати дозволяють говорити про протизапальну дію КрММСК з досліджених джерел.

В попередніх дослідженнях було показано, що КрММСК здатні впливати на репаративно-регенеративні процеси в організмі тварин з запальним процесом як в гострій, так і в хронічній фазі [66, 178-180]. Локальне та системне введення КрММСК з жирової та хрящової тканин призводило до корекції перебігу експериментального АА у щурів. Застосування локального методу введення клітин порівняно з системним мало більш потужний вплив на відновлення гістоструктури, вмісту глікозаміногліканів та COX-2 в хрящовій тканині у щурів із АА.

За сукупністю проаналізованих маркерів можна стверджувати про наявність тенденції до нормалізації в перебігу запального процесу у експериментальних тварин з АА та введенням клітинних препаратів – КрММСК з жирової та хрящової тканин. Слід зазначити, що вірогідної різниці між зазначеними джерелами клітин в показниках запалення крові не було виявлено. Однак, більш виражений корегуючий вплив системного введення КрММСК на протікання запального процесу у тварин з АА ймовірно пов'язаний з імуномодуючими властивостями досліджених препаратів. За даними авторів [181, 182] для активації імуносупресивної функції ММСК в організмі відбувається запуск механізмів дії IFN- γ окремо або разом з TNF α , IL-1 α та IL-1 β . Важливими і найбільш вивченими об'єктами імуномодуючої дії ММСК в організмі ссавців є Т-лімфоцити. Великою кількістю робіт показано, що ММСК здатні пригнічувати проліферацію Т-лімфоцитів, активованих поліклональними мітогенами, алогенними клітинами або специфічними антигенами [183, 184]. Отже, отримані результати коригуючого впливу КрММСК на маркери запалення дозволяють зробити висновок про можливість використання в лікуванні ревматоїдного артрити досліджуваних культур клітин як при локальному, так і при системному введенні. Це є підставою для розгляду

внутрішньовенного введення як альтернативи або доповнення до локальної ін'єкції клітинного матеріалу в суглоб.

Висновки за розділом

1. Локальне та системне введення КрММСК з жирової та хрящової тканин чинить модулюючу дію на перебіг експериментального ад'ювантного артриту у щурів.
2. Вміст загального білку, С-реактивного білку, ревматоїдного фактору, а також швидкість осадження еритроцитів у крові тварин після клітинної терапії КрММСК мають позитивну відновлювальну динаміку як у випадку застосування клітин з жирової, так і з хрящової тканин.
3. Використання системного способу введення клітин порівняно з локальним призводить до більш вираженого ефекту відновлення маркерів запалення у щурів з ад'ювантним артритом.

Публікації за розділом [178-180].

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Ревматоїдний артрит (РА) – це хронічне системне аутоімунне захворювання, яке зазвичай характеризується синовіальним запаленням, руйнуванням хрящів і кісток та прогресуючою деформацією суглобів [1, 5, 159]. Пацієнти з прогресуючим РА частіше помирають передчасно, насамперед від серцево-судинних і легеневих ускладнень. На ранніх стадіях хвороба вражає переважно синовіальні суглоби, але з часом поширюється на легені, кровоносні судини та інші частини тіла. Таким чином, РА серйозно знижує довгострокову якість життя та вимагає тривалого клінічного лікування [2].

Основною метою лікування РА є повне або часткове зниження активності захворювання [3]. Раніше вважалося, що лікування протиревматичними препаратами «достатньо добре», а одужання вважалося настільки ж бажаним, наскільки недосяжним. На думку клініцистів, базова терапія може уповільнити прогресування захворювання та викликати стійку ремісію, особливо якщо вона розпочата з тривалістю симптомів менше 3 місяців. Слід зазначити, що розвиток РА у великій мірі зумовлено наявністю первинного імунodefіциту, який сприяє переходу гострого запального процесу в хронічну стадію. У той же час тривалий запальний процес призводить до зниження імунологічної реактивності організму. Експериментальні моделі запалення можуть використовуватися як для оцінки впливу різних етіологічних факторів, так і для дослідження ефективності його лікування [2-5]. Так на скринінговому етапі дослідження, пов'язаного з РА, рекомендується використовувати модель ад'ювантного артрититу [1, 2, 4-5]. Проте ця модель використовується на багатьох експериментальних тваринах різного віку та статі. Тому у багатьох випадках отримані експериментальні дані носять суперечливий характер, а показники маркерів розвитку запалення різняться [1-5]. Це обумовило необхідність визначення динаміки стану суглобового хряща та гематологічних маркерів запалення, як одних з головних показників при вивченні розвитку запального

процесу, з метою вибору найбільш оптимального строку для проведення клітинної терапії ад'ювантної моделі РА на щурах.

На першому етапі роботи було досліджено вплив низькотемпературного консервування на морфофункціональні характеристики культур ММСК, отриманих із жирової та хрящової тканин та показало, що їх кріоконсервування із застосуванням низької швидкості охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -80°C і середовища кріоконсервування (10% ДМСО та 20% ембріональної сироватки) не призводить до активізації процесів апоптозу, дозволяє зберегти фенотип і здатність до міграції. Порівняльний аналіз досліджених характеристик показав, що як нативні, так і кріоконсервовані ММСК ЖТ характеризувалися більш низьким проліферативним та міграційним потенціалами відносно ММСК ХТ.

Таким чином, поряд із жировою тканиною, яка є одним з найбільш поширених джерел стовбурових клітин, альтернативним джерелом ММСК може бути хрящова тканина [11, 20, 137]. Результати проведеного дослідження можуть бути використані для створення кріобанку перспективних ліній клітин стромального походження з можливістю їх наступного застосування для потреб біотехнології та клітинної терапії ушкоджень опорно-рухового апарату.

Це дослідження представляє порівняння морфо-функціональних характеристик кріоконсервованих ММСК з хрящової і жирової тканин з метою вибору кращого джерела клітин для терапії пошкоджених тканин опорно-рухового апарату. Для забезпечення бази подальших досліджень та вибору кращого джерела клітин для терапії ушкоджень тканин опорно-рухового апарату було проаналізовано і порівняно морфофункціональні характеристики нативних і кріоконсервованих ММСК щурів, отриманих з хрящової та жирової тканин. Хоча в більшості випадків механізми, за допомогою яких трансплантовані клітини стимулюють регенерацію тканин, на даний момент залишаються недостатньо вивченими, результати даного дослідження вносять певний внесок в їх розуміння і можуть бути корисні у розробці терапевтичних стратегій для цілого ряду захворювань опорно-рухового апарату.

Наступним етапом роботи було оцінено вплив кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин на стан хрящової тканини у щурів з ад'ювантним артритом. Було показано, що КрММСК можуть впливати на репаративні та регенеративні процеси у тварин як із гострою, так і з хронічною фазами запалення [66, 159]. Місцеве та системне введення КрММСК із жирової та хрящової тканин призводило до корекції перебігу експериментальної АА у щурів. Застосування локального методу введення клітин порівняно з системним сильніше впливало на відновлення гістоструктури, вмісту глікозаміногліканів і ЦОГ-2 у хрящовій тканині щурів з АА.

За результатами авторів [3, 66, 159], ММСК можуть сприяти регенерації не тільки шляхом прямої диференціації клітин, але й шляхом секреції біологічно активних речовин, відомих як фактори росту. . Останні є однією з найважливіших молекулярних родин, які беруть участь у регенерації. За допомогою білкових рецепторів фактори росту зв'язуються з клітинами-мішенями. Рецепторні зв'язки викликають внутрішньоклітинні реакції, які, однак, до кінця не вивчені. Слід зазначити, що регуляторами прохондрогенних клітин і прямої хондрогенної диференціації є низка внутрішньоклітинних сигнальних молекул і факторів росту, до яких належать фактор росту фібробластів (FGF), кістковий морфогенетичний білок (BMP), тромбоцитарний фактор росту (PDGF-подібний).), інсуліноподібний фактор росту (IGF), епідермальний фактор [185, 186].

Гістологічні та гістохімічні дослідження ефективності локального та системного введення КрММСК з жирової та хрящової тканин у корекції гострої фази ад'ювантного артриту показали, що у тварин контрольної групи при введенні фізіологічного розчину протягом усього періоду спостереження розвивався запальний процес. , що проявлялося у поширенні зон, вільних від хондроцитів, ослабленні фарбування, втраті чіткості контурів хряща, зниженні вмісту глікозаміногліканів, а також зниженні активності антиоксидантної

системи в сироватці крові та збільшенні відносної площі ЦОГ-2 позитивно забарвлених ділянок у хрящі. Водночас місцеве та системне застосування КрММСК у гострій фазі ад'ювантного артриту сприяло нормалізації структурно-функціональної організації тканин і мало тенденцію до зменшення запалення з повним відновленням показників крові, що узгоджується з раніше опублікованими роботами. на здатність КрММСК впливати на інтенсивність регенеративних процесів у хрящовій тканині. Ці дані узгоджуються з результатами, отриманими щодо використання нативних ММСК [185, 186], де рекомендується створення кріобанків клітин стромального походження. Проведене дослідження також свідчить про те, що зміни, які відбувалися в хрящовій тканині в умовах локального введення КрММСК з жирової та хрящової тканин, охоплювали необмежені зони дегенеративного процесу і мали більш виражений регенеративний ефект порівняно з системним методом. Порівняльна оцінка застосування КрММСК з жирової та хрящової тканин показала відсутність вірогідних змін досліджуваних показників як при місцевому, так і при системному застосуванні.

Зараз відомо, що ММСК, як клітини з високим рівнем експресії рецептора CXCR4 до SDF-1 (фактор, отриманий зі стромальних клітин), характеризуються тропністю до ділянок пошкодження тканини, де збільшується вміст SDF-1 [187]. Наведені в роботі результати системного введення КрММСК підтверджують гіпотезу про те, що стовбурові клітини не тільки пасивно розподіляються по організму кровотоком, але й здійснюють цілеспрямовану міграцію в зоні пошкодження тканин. Крім того, коригувальний ефект системного введення КрММСК із досліджуваних джерел на перебіг експериментального ад'ювантного артриту також може бути пов'язаний з їх імуномодуючими властивостями. За даними авторів [58, 60], для активації імуносупресивної функції ММСК в організмі запускаються механізми дії IFN- γ окремо або разом із TNF α , IL-1 α та IL-1 β .

Таким чином, отримані результати відновної дії КрММСК на хрящову тканину дозволяють зробити висновок про можливість використання в лікуванні ревматоїдного артриту досліджуваних клітинних культур як при місцевому, так і при системному введенні. Це основа для розгляду загального введення як альтернативи або доповнення до місцевої ін'єкції клітинного матеріалу в суглоб. Надзвичайно важливо, щоб метод внутрішньовенного введення був безпечним і малотравматичним. Виходячи з цього положення, системне застосування ММСК може бути використане в лікуванні цієї патології. Проте відкритим залишається питання про більш віддалені ефекти клітинної терапії, зокрема про тривалість гальмування дегенеративно-дистрофічного процесу та можливу необхідність повторного використання клітин.

Таким чином, аналіз отриманих результатів свідчив, що на 7 добу моделювання ад'ювантного артриту спостерігалися ознаки дегенеративних змін у суглобовому хрящі, які відповідали гострому артриту та корелювали з дослідженими гематологічними показниками запалення. При збільшенні строку спостереження до 35 діб відбувалася хронізація процесу, що призводило до розвитку виражених артрозних порушень у суглобовому хрящі. Локальне та системне введення КрММСК із жирової та хрящової тканин призвело до корекції перебігу експериментального ад'ювантного артриту у щурів: індекс артриту, гістоструктура пошкодженого суглоба мали позитивну відновну динаміку. Застосування локального способу введення клітин порівняно з системним мало більш потужний вплив на відновлення гістоструктури, вмісту ГАГ і ЦОГ-2 хряща у щурів з ад'ювантним артритом.

Наступним етапом роботи було з'ясування ролі кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин із різних джерел в модуляції деяких показників клітинного імунетету у щурів з ад'ювантним артритом. Аналіз клінічних результатів показує, що у хворих на РА спостерігається зсув балансу між аутореактивними Т-клітинами, що відображає

порушення механізмів патологічного аутореактивного пригнічення [165-167, 173]. Терапевтичні підходи, спрямовані на відновлення та нормалізацію порушеної функції імунної системи при експериментальному АА, дозволяють зменшити вираженість запальних реакцій та клінічних проявів захворювання. Таким чином, отримані результати свідчать про факт високого коригувального впливу на основні патогенетичні ланки імунної системи у тварин, що викликають прояв АА. Після терапії КрММСК у щурів з АА відмічено збільшення всіх досліджених субпопуляцій лімфоцитів, що супроводжувалося наближенням до контрольних значень ІРІ.

Т-клітини активуються під час запалення через кілька клітинних сигнальних процесів. Початковий сигнал, який активує лімфоцити, опосередковується антигенспецифічними Т-клітинними рецепторами, тоді як друга фаза, відома як ко-стимуляція, не залежить від цих рецепторів, але є критичною для забезпечення повної активації імунної відповіді. КрММСК можуть пригнічувати Т-клітини як на первинній, так і на вторинній фазах активації шляхом передачі сигналів через розчинні речовини, такі як цитокіни та фактори росту, а також через механізми, що включають пряму взаємодію між клітинами [131, 132].

Ідея роботи базувалася на терапії КрММСК яка б контролювала активність захворювання у щурів АА не тільки через протизапальну та імуносупресивну функції при загальному введенні, але також через сприяння відновленню тканини суглоба при місцевій ін'єкції та, як наслідок, запобігання хрящу. пошкодження. У клінічній практиці терапевтичні методи ММСК для відновлення хрящової тканини суглобів апробовані у пацієнтів з артритом/остеоартрозом з високими результатами (залучення ММСК до формування тканини, що призводить до відновлення хряща) [189, 190]. Отже, можливі механізми, за допомогою яких ММСК можуть впливати на процеси захворювання суглобів, різноманітні та включають паракринний, протизапальний, імуносупресивний, трофічний ефекти. Достовірне зниження

вираженості запалення при застосуванні КрММСК з обох досліджуваних джерел для тварин з АА свідчить про універсальність механізмів їх дії щодо прояву імуномодуючої дії на організм, що призводить до нормалізації показників імунітету з адекватне співвідношення його основних ланок. Однак важливим питанням, яке ще належить дослідити, є визначення клітинного імунітету у тварин з АА та терапія жирових і хрящових КрММСК із поєднанням місцевого та системного введення.

Таким чином, системне та місцеве введення КрММСК, отриманих із жирової та хрящової тканин, призвело до корекції перебігу ад'ювантного артриту, що проявилось у зменшенні вираженості клінічних проявів патології та відновленні кількості регуляторних клітин у селезінці (CD4+, CD8+, CD4+CD25+). Застосування системного способу введення клітин порівняно з локальним мало більш потужний вплив на відновлення вмісту Т-клітин у щурів з ад'ювантним артритом. Ці дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки методів лікування артритів у клінічній практиці.

Наступним етапом роботи було визначення впливу кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин із різних джерел на динаміку маркерів запалення в крові щурів з ад'ювантним артритом. За сукупністю проаналізованих маркерів можна стверджувати про наявність тенденції до нормалізації в перебігу запального процесу у експериментальних тварин з АА та введенням клітинних препаратів – КрММСК з жирової та хрящової тканин. Слід зазначити, що вірогідної різниці між зазначеними джерелами клітин в показниках запалення крові не було виявлено. Однак, більш виражений корегуючий вплив системного введення КрММСК на протікання запального процесу у тварин з АА ймовірно пов'язаний з імуномодуючими властивостями досліджених препаратів. За даними авторів [100, 113] для активації імуносупресивної функції ММСК в організмі відбувається запуск механізмів дії IFN- γ окремо або разом з TNF α , IL-1 α та IL-1 β . Важливими і найбільш вивченими об'єктами імуномодуючої дії ММСК в

організмі ссавців є Т-лімфоцити. Великою кількістю робіт показано, що ММСК здатні пригнічувати проліферацію Т-лімфоцитів, активованих поліклональними мітогенами, алогенними клітинами або специфічними антигенами [183, 184]. Отже, отримані результати коригуючого впливу КрММСК на маркери запалення дозволяють зробити висновок про можливість використання в лікуванні ревматоїдного артриту досліджуваних культур клітин як при локальному, так і при системному введенні. Це є підставою для розгляду внутрішньовенного введення як альтернативи або доповнення до локальної ін'єкції клітинного матеріалу в суглоб.

Таким чином, локальне та системне введення КрММСК з жирової та хрящової тканин чинить модулюючу дію на перебіг експериментального ад'ювантного артриту у щурів. Вміст загального білку, С-реактивного білку, ревматоїдного фактору, а також швидкість осадження еритроцитів у крові тварин після клітинної терапії КрММСК мають позитивну відновлювальну динаміку як у випадку застосування клітин з жирової, так і з хрящової тканин. Використання системного способу введення клітин порівняно з локальним призводить до більш вираженого ефекту відновлення маркерів запалення у щурів з ад'ювантним артритом.

Таким чином, у роботі представлено теоретичне узагальнення і нове вирішення на доклінічному етапі актуальної наукової проблеми медицини, а саме кріомедицини і ортопедії – подолання та корекція наслідків артриту в експерименті шляхом використання кріоконсервованих ММСК з хрящової і жирової тканин. Встановлено позитивний вплив клітинної терапії за умов як локального так і системного введення КрММСК із жирової та хрящової тканин на перебіг експериментального артриту у щурів: індекс артриту, гістоструктура, вміст ГАГ та ЦОГ-2 в пошкодженому суглобі мали позитивну відновну динаміку. Доведено, корегувальний вплив як системного та локального введення КрММСК, отриманих із жирової та хрящової тканин, на ланки клітинного імунитету у щирів з ад'ювантним артритом, що мало прояв у

зменшенні вираженості клінічних проявів патології та відновленні кількості регуляторних клітин у селезінці (CD4+, CD8+, CD4+CD25+). Застосування системного способу введення клітин порівняно з локальним мало більш потужний вплив на відновлення вмісту Т-клітин у щурів з ад'ювантним артритом. Локальне та системне введення КрММСК з жирової та хрящової тканин чинить модулюючу дію на гуморальні ланки системи гомеостазу у щурів з ад'ювантним артритом. Вміст загального білку, С-реактивного білку, ревматоїдного фактору, активності системи АОЗ, а також швидкість осадження еритроцитів у крові тварин після клітинної терапії КрММСК мають позитивну відновлювальну динаміку як у випадку застосування клітин з жирової, так і з хрящової тканин. Використання системного способу введення КрММСК порівняно з локальним призводить до більш вираженого ефекту відновлення маркерів запалення у крові щурів з ад'ювантним артритом. Ці дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки новітніх біомедичних технологій з застосуванням стовбурових клітин та без посередньо методів лікування артритів у клінічній практиці.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення та нове експериментальне вирішення наукового завдання, спрямованого на корекцію наслідків артриту та активацію процесів, які сприяють відновленню системи гомеостазу та структурно-функціональних властивостей ушкодженого суглобового хряща за рахунок локального та системного введення кріоконсервованих ММСК, отриманих з жирової та хрящової тканин.

1. Досліджено вплив низькотемпературного консервування на морфофункціональні характеристики культур ММСК, отриманих із жирової та хрящової тканин та показало, що їх кріоконсервування із застосуванням низької швидкості охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -80°C і середовища кріоконсервування (10% ДМСО та 20% ембріональної сироватки) не призводить до активізації процесів апоптозу, дозволяє зберегти фенотип і здатність до міграції. Порівняльний аналіз досліджених характеристик показав, що як нативні, так і кріоконсервовані ММСК ЖТ характеризувалися більш низьким проліферативним та міграційним потенціалами відносно ММСК ХТ.

2. Аналіз отриманих результатів свідчив, що на 7 добу моделювання ад'ювантного артриту спостерігалися ознаки дегенеративних змін у суглобовому хрящі, які відповідали гострому артриту. При збільшенні строку спостереження до 35 діб відбувалася хронізація процесу, що призводило до розвитку виражених артрозних порушень у суглобовому хрящі.

3. Локальне та системне введення КрММСК із жирової та хрящової тканин призводило до корекції перебігу експериментального ад'ювантного артриту у щурів: індекс артриту, гістоструктура пошкодженого суглоба мали позитивну відновну динаміку.

4. Застосування локального способу введення клітин порівняно з системним мало більш потужний вплив на відновлення гістоструктури, вмісту ГАГ і ЦОГ-2 хряща у щурів з ад'ювантним артритом.

5. Доведено, корегувальний вплив як системного та локального введення КрММСК, отриманих із жирової та хрящової тканин, на ланки клітинного імунитету у щірів з ад'ювантним артритом, що мало прояв у зменшенні вираженості клінічних проявів патології та відновленні кількості регуляторних клітин у селезінці (CD4+, CD8+, CD4+CD25+). Застосування системного способу введення клітин порівняно з локальним мало більш потужний вплив на відновлення вмісту Т-клітин у щурів з ад'ювантним артритом.
6. Локальне та системне введення КрММСК з жирової та хрящової тканин чинить модулюючу дію на гуморальні ланки системи гомеостазу у щурів з ад'ювантним артритом. Вміст загального білку, С-реактивного білку, ревматоїдного фактору, активності системи АОЗ, а також швидкість осадження еритроцитів у крові тварин після клітинної терапії КрММСК мають позитивну відновлювальну динаміку як у випадку застосування клітин з жирової, так і з хрящової тканин. Використання системного способу введення КрММСК порівняно з локальним призводить до більш вираженого ефекту відновлення маркерів запалення у щурів з ад'ювантним артритом.
7. Отримані в роботі результати можуть бути використані для обґрунтування та розробки методів лікування артриту у клінічній практиці.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and cartilage*. 2002; 10(6): 432-63. doi: 10.1053/joca.2002.0801
2. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. 2015; 71(2): 181-97. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.07.003.
3. Volkova N, Yukhta M, Goltsev A. Cryopreserved mesenchymal stem cells stimulate regeneration in an intervertebral disc. *Biomedicines*. 2015; 3(3): 237-247. doi:10.3390/biomedicines3030237.
4. Rana AK, Li Y, Dang Q, Yang F. (2018). Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis. *International Immunopharmacology*, 65, 348-359. doi: 10.1016/j.intimp.2018.10.016
5. Bullock, J., Rizvi, S., Saleh, A. M., Ahmed, S. S., Do, D. P., Ansari, R. A., & Ahmed, J. (2018). Rheumatoid arthritis: A brief overview of the treatment. *Medical Principles and Practice*, 27(6), 501–507. doi: 10.1159/000493390
6. Burmester, G. R., & Pope, J. E. (2017). Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 389(10086), 2338–2348. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31491-5
7. Scott DL; Wolfe F, Huizinga TW Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010;376:1094–1108. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60826-4
8. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000; 8(5): 309-34. doi: 10.1053/joca.1999.0306.
9. Chinnadurai R, Garcia MA, Sakurai Y, Lam WA, Kirk AD, Galipeau J, et al. Actin cytoskeletal disruption following cryopreservation alters the biodistribution of

- human mesenchymal stromal cells in vivo. *Stem Cell Rep.* 2014;3:60–72 DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.05.003
10. Kou, M., Huang, L., Yang, J., Chiang, Z., Chen, S., Liu, J., ... & Lian, Q. (2022). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool?. *Cell Death & Disease*, 13(7), 580. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05034-x>
 11. Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, Ma K, Zhou C. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 2008; 17(4): 761-73. doi: 10.1089/scd.2007.0217.
 12. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem.* 2004; 14(4-6): 311-24. doi: 10.1159/000080341
 13. Du M, Zhu T, Duan X, Ge S, Li N, Sun Q et al. Acellular dermal matrix loading with bFGF achieves similar acceleration of bone regeneration to BMP-2 via differential effects on recruitment, proliferation and sustained osteodifferentiation of mesenchymal stem cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;70(Pt 1):62-70. doi: 10.1016/j.msec.2016.08.049.
 14. Bocelli-Tyndall C, Zajac P, Di Maggio N, Trella E, Benvenuto F, Iezzi G et al. Fibroblast growth factor 2 and platelet-derived growth factor, but not platelet lysate, induce proliferation-dependent, functional class II major histocompatibility complex antigen in human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(12): 3815-25. doi: 10.1002/art.27736.
 15. Moll G, Hoogduijn MJ, Ankrum JA. Editorial: Safety, Efficacy and Mechanisms of Action of Mesenchymal Stem Cell Therapies. *Front Immunol.* 2020;11:243 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00243>,
 16. Caplan H, Olson SD, Kumar A, George M, Prabhakara KS, Wenzel P, et al. Mesenchymal Stromal Cell Therapeutic Delivery: Translational Challenges to

Clinical Application. Front Immunol. 2019;10:1645
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01645>

17. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. Dis Colon Rectum. 2005; 48(7): 1416-23. doi: 10.1007/s10350-005-0052-6.

18. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006; 8(4): 315-7. doi: 10.1080/14653240600855905

19. Bobick BE, Chen FH, Le AM, Tuan RS. Regulation of the chondrogenic phenotype in culture. Birth Defects Res C Embryo Today. 2009; 87(4): 351-71. doi: 10.1002/bdrc.20167

20. Volkova NA, Yukhta MS, Goltsev AN. Morphological and functional characteristics of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow, adipose tissue and tendons. Cell and Organ Transplantation. 2016; 4 (2): 200-5. doi:10.22494/cot.v4i2.64.

21. Volkova NA, Yukhta MS, Goltsev AN. Comparative study of the effect of bFGF and plasma rich in growth factors on cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow and tendon of rats. Cell and Organ Transplantation. 2017; 5(2): 170-5. doi:10.22494/cot.v5i2.75.

22. Волкова, Н. О., Юхта, М. С., & Гольцев, А. М. (2019). Вплив факторів росту на кріоконсервовані мезенхімальні стромальні клітини. *Fiziologichnyi Zhurnal (Physiological Journal)*, 65(2) <https://doi.org/10.15407/fz65.02.012>

23. Кирик В.М., Бутенко Г.М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине (обзор литературы) Ж. Акад. мед. наук України. – 2010. – Т.16, №16. – С.576-604.

24. Rybachuk O.A. Kyryk VM, Poberezhny PA et.al Effect of the bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells to the neural tissue after ischemic injury in vitro Rybachuk OA, Cell and Organ Transplantation. – 2014. - Vol. 2, №1. – P. 74-78
25. Volkova N.A. Yukhta M.S., Yurchuk T.A. et. al Multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow in therapy of chronic inflammation of murine ovaries Biotechnologia Acta. – 2014. – Vol. 7, №5. – P. 35–42
26. Ra J. Kang S., Shin S. Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of cultureexpanded autologous adipose tissue derived mesenchymalstem cells J. Transl. Med. – 2011. – Vol.9, №1. – P.181–198
27. Hegyi B. Sagi1 B., Kovacs J. Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall Int. Immunology. – 2010. – Vol. 22, № 7. – P.551-559.
28. Graham R. Tendinopathy – from basic science to treatment Nature Clinical Practice Rheumatology. – 2008. - Vol. 4., №2 – P.82-89.
29. Jin, S., Yang, C., Huang, J. *et al.* Conditioned medium derived from FGF-2-modified GMSCs enhances migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells. *Stem Cell Res Ther* **11**, 68 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13287-020-1584-3>
30. Zhou, Wenyan, et al. "Single-cell profiles and clinically useful properties of human mesenchymal stem cells of adipose and bone marrow origin." *The American journal of sports medicine* 47.7 (2019): 1722-1733. DOI: 10.1177/0363546519848678
31. Thomopoulos, S., Parks, W. C., Rifkin, D. B., & Derwin, K. A. (2015). Mechanisms of tendon injury and repair. *Journal of Orthopaedic Research*, 33(6), 832-839. <https://doi.org/10.1002/jor.22806>
32. Freedman, B. R., Mooney, D. J., & Weber, E. (2022). Advances toward transformative therapies for tendon diseases. *Science translational medicine*, 14(661), eabl8814. DOI: 10.1126/scitranslmed.abl881

33. Duan, Wei, Mandi J. Lopez, and Kevin Hicok. "Adult multipotent stromal cell cryopreservation: pluses and pitfalls." *Veterinary Surgery* 47.1 (2018): 19-29.. <https://doi.org/10.1111/vsu.12730>
34. Thirumala S., Goebel W.S. and Woods E.J. Clinical grade adult stem cell banking. // *Organogenesis*. – 2009. –V. 5. P. 143–154
35. Thirumala S., Gimble J.M. and Devireddy R.V. Cryopreservation of stromal vascular fraction of adipose tissue in a serum-free freezing medium. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2010. –V. 4. – P. 224–232.
36. Thirumala S., Wu X., Gimble J.M. and Devireddy R.V. Evaluation of polyvinylpyrrolidone as a cryoprotectant for adipose tissue-derived adult stem cells. *Tissue Eng. Part C*. – 2010. – 16. P. 783–92
37. Fuller B.J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo. Lett.* – 2004. – V.25. P. 375–388
38. Windrum P., Morris T.C., Drake M.B., et al Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. *Bone Marrow Transplant* – 2005. V. 36. - P. 601–603
39. Rajan, R., Matsumura, K. (2018). Development and Application of Cryoprotectants. In: Iwaya-Inoue, M., Sakurai, M., Uemura, M. (eds) *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1081. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1244-1_18
40. Shaik, S.; Wu, X.; Gimble, J.; Devireddy, R. Effects of Decade Long Freezing Storage on Adipose Derived Stem Cells Functionality. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 8162
41. Bárcia, R.N.; Santos, J.M.; Teixeira, M.; Filipe, M.; Pereira, A.R.S.; Ministro, A.; Água-Doce, A.; Carvalheiro, M.; Gaspar, M.M.; Miranda, J.P.; et al. Umbilical Cord Tissue–Derived Mesenchymal Stromal Cells Maintain Immunomodulatory and Angiogenic Potencies after Cryopreservation and Subsequent Thawing. *Cytotherapy* **2017**, 19, 360–370

42. Chabot, D.; Tremblay, T.; Paré, I.; Bazin, R.; Loubaki, L. Transient Warming Events Occurring after Freezing Impairs Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells Functionality. *Cytotherapy* **2017**, *19*, 978–989. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.04.005>
43. Cottle, C., Porter, A.P., Lipat, A. *et al.* Impact of Cryopreservation and Freeze-Thawing on Therapeutic Properties of Mesenchymal Stromal/Stem Cells and Other Common Cellular Therapeutics. *Curr Stem Cell Rep* **8**, 72–92 (2022). <https://doi.org/10.1007/s40778-022-00212-1>
44. Oja, S.; Laitinen, A.; Kaartinen, T.; Ahti, M.; Korhonen, M.; Nystedt, J. The Utilization of Freezing Steps in Mesenchymal Stromal Cell (MSC) Manufacturing: Potential Impact on Quality and Cell Functionality Attributes. *Cytotherapy* **2017**, *19*, S189. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.02.267>
45. Rodriguez, L. Velasco, B., Garcia J. and Martin-Henao G.A. Evaluation of an automated cell processing device to reduce the dimethyl sulfoxide from hematopoietic grafts after thawing. // *Transfusion*. – 2005. – V.45. - P. 1391–1397
46. Park B.W., Jang S.J., Byun J.H., et al Cryopreservation of human dental follicle tissue for use as a resource of autologous mesenchymal stem cells. *J. Tissue Eng. Regen Med.* – 2014. - doi: 10.1002/term.1945
47. Thirumala S., Zvonic S., Floyd E., Gimble J.M. and Devireddy R.V. Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells. *Biotechnol. Prog.* – 2005. – 21. - P. 1511–1524
48. Shu Z., Kang X., Chen H., Zhou X., Purttelman J., Yadock D., Heimfeld S. and Gao, D. Development of a reliable low-cost controlled cooling rate instrument for the cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Cytotherapy*. - 2010. –V.12, P. 161–169
49. Haack-Sørensen M., Ekblond A., Kastrup J. Cryopreservation and Revival of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Methods Mol. Biol.* – 2016. – Vol.1416. – P.357-374

50. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – К.: Наукова думка, 1994. – 430 с
51. Mutsenko, V.; Knaack, S.; Lauterboeck, L.; Tarusin, D.; Sydykov, B.; Cabiscol, R.; Ivnev, D.; Belikan, J.; Beck, A.; Dipresa, D.; et al. Effect of ‘in Air’ Freezing on Post-Thaw Recovery of Callithrix Jacchus Mesenchymal Stromal Cells and Properties of 3D Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds. *Cryobiology* **2020**, 92, 215–230. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2020.01.015](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.01.015)
52. Savvidou, O., Milonaki, M., Goumenos, S., Flevas, D., Papagelopoulos, P., & Moutsatsou, P. (2019). Glucocorticoid signaling and osteoarthritis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 480, 153–166. doi: [10.1016/j.mce.2018.11.001](https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.11.001)
53. Zhang, F., & Ma, C. (2018). Comparison of the effectiveness on intra-articular and subcutaneous TNF inhibitor in rheumatoid arthritis patients. *Clinical Rheumatology*, 37(1), 199–204. doi: [10.1007/s10067-017-3806-3](https://doi.org/10.1007/s10067-017-3806-3)
54. Chen, K., Bao, Z., Tang, P., Gong, W., Yoshimura, T., & Wang, J. M. (2018). Chemokines in homeostasis and diseases. *Cellular & Molecular Immunology*, 15(4), 324–334. doi: [10.1038/cmi.2017.134](https://doi.org/10.1038/cmi.2017.134)
55. Phull, A. R., Nasir, B., ul Haq, I., & Kim, S. J. (2018). Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis. *Chemico-Biological Interactions*, 281, 121–136. doi: [10.1016/j.cbi.2017.12.024](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.024)
56. Gao F, Chiu SM, Motan DAL, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis* 2016;7(1):e2062–e2062, DOI:[10.1038/cddis.2015.327](https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327)
57. Lin YJ, Anzaghe M, Schülke S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis. *Cells* 2020;9(4):880, DOI:[10.3390/cells9040880](https://doi.org/10.3390/cells9040880)
58. Wassmer CH, Berishvili E. Immunomodulatory properties of amniotic membrane derivatives and their potential in regenerative medicine. *Curr Diab Rep* 2020;20(8):31, DOI:[10.1007/s11892-020-01316-w](https://doi.org/10.1007/s11892-020-01316-w)

59. MacDonald GI, Augello A, De Bari C. Role of mesenchymal stem cells in reestablishing immunologic tolerance in autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2011;63:2547–2557, DOI:10.1002/art.30474
60. Kim, Y. K., Na, K. S., Myint, A. M., & Leonard, B. E. (2016). The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64, 277–284. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.06.008
61. Conigliaro, P., Triggianese, P., De Martino, E., Fonti, G. L., Chimenti, M. S., Sunzini, F., Viola, A., Canofari, C., & Perricone, R. (2019). Challenges in the treatment of Rheumatoid Arthritis. *Autoimmunity Reviews*, 18(7), 706–713 doi: 10.1016/j.autrev.2019.05.007
62. Ingawale, D. K., & Patel, S. S. (2018). Hecogenin exhibits anti-arthritic activity in rats through suppression of pro-inflammatory cytokines in Complete Freund's adjuvant-induced arthritis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 40(1), 59–71. doi: 10.1080/08923973.2017.1405439
63. Fitzsimmons, R., Mazurek, M. S., Soos, A., & Simmons, C. A. (2018). Mesenchymal stromal/stem cells in regenerative medicine and tissue engineering. *Stem Cells International*, 2018, 8031718. doi: 10.1155/2018/8031718
64. Fan, X. L., Zhang, Y., Li, X., & Fu, Q. L. (2020). Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(14), 2771–2794. doi: 10.1007/s00018-020-03454-6
65. To, K., & Khan, W. (2019). Mesenchymal Stem cell transplantation in Rheumatoid Arthritis. In: Pham, P. (eds) *Stem cells in clinical applications*. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-030-23421-8_4
66. Vvedenskyi DB, Volkova NO, Yukhta MS, Ashukina NO, Goltsev AM Course correction of adjuvant arthritis with cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021; 12(3):545–553. <https://doi:10.15421/022175>

67. Volkova, N. A., Yukhta, M. S., & Goltsev, A. N. (2019). Influence of growth factors on cryopreserved mesenchymal stromal cells. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 65(2), 12–21 (in Ukrainian). doi: 10.15407/fz65.02.012
68. Firestein, G.S.; McInnes, I.B. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity* 2017, 46, 183–196 <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.006>
69. Smolen, J.S.; Aletaha, D.; McInnes, I.N. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2016, 388, 2023–2038 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8)
70. Berthelot, J.M.; Le Goff, B.; Maugars, Y. Bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, and ankylosing spondylitis: Problems rather than solutions? *Arthritis Res. Ther.* 2019, 21, 239 <https://doi.org/10.1186/s13075-019-2014-8>
71. Bolandi, Z.; Mokhberian, N.; Eftekhary, M.; Sharifi, K.; Soudi, S.; Ghanbarian, H.; Hashemi, S.M. Adipose derived mesenchymal stem cell exosomes loaded with miR-10a promote the differentiation of Th17 and Treg from naive CD4⁺ T cell. *Life Sci.* 2020, 259, 118218 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118218>
72. Cao, D.; van Vollenhoven, R.; Klareskog, L.; Trollmo, C.; Malmström, V. CD25^{bright}CD4⁺ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res. Ther.* 2004, 6, 335–346 <https://doi.org/10.1186/ar1192>
73. Lopez-Santalla, M.; Fernandez-Perez, R.; Garin, M.I. Mesenchymal Stem/Stromal Cells for Rheumatoid Arthritis Treatment: An Update on Clinical Applications. *Cells* 2020, 9, 1852 <https://doi.org/10.3390/cells9081852>
74. Pan S, Wang L, Wu B, Xing H. Effect and Mechanism of siRNAs Targeting IL-1 β /TNF- α Combined with BMSCs Transplantation in Ameliorating Rheumatoid Arthritis in Rats. *Veterinary Sciences.* 2022; 9(10):531. <https://doi.org/10.3390/vetsci9100531>
75. Kuca-Warnawin E, Skalska U, Janicka I, Musiałowicz U, Bonek K, Głuszko P, Szczesny P, Olesińska M, Kontny E. The Phenotype and Secretory Activity of

Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (ASCs) of Patients with Rheumatic Diseases. *Cells*. 2019; 8(12):1659. <https://doi.org/10.3390/cells8121659>

76. Zhu, Y.; Wang, Y.; Zhao, B.; Niu, X.; Hu, B.; Li, Q.; Zhang, J.; Ding, J.; Chen, Y.; Wang, Y. Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *Stem Cell Res. Ther.* 2017, 8, 64 <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0510-9>

77. Zavatti, M.; Beretti, F.; Casciaro, F.; Bertucci, E.; Maraldi, T. Comparison of the therapeutic effect of amniotic fluid stem cells and their exosomes on monoiodoacetate-induced animal model of osteoarthritis. *Biofactors* 2020, 46, 106–117

78. He, L.; He, T.; Xing, J.; Zhou, Q.; Fan, L.; Liu, C.; Chen, Y.; Wu, D.; Tian, Z.; Liu, B.; et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis. *Stem Cell Res. Ther.* 2020, 11, 276

79. Tatara, R.; Ozaki, K.; Kikuchi, Y.; Hatanaka, K.; Oh, I.; Meguro, A.; Matsu, H.; Sato, K.; Ozawa, K. Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation. *Cytotherapy* 2011, 13, 686–694 <https://doi.org/10.3109/14653249.2010.542456>

80. Galland, S.; Stamenkovic, I. Mesenchymal stromal cells in cancer: A review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *J. Pathol.* 2020, 250, 555–572. <https://doi.org/10.1002/path.5357>

81. Szydlak, R. Biological, chemical and mechanical factors regulating migration and homing of mesenchymal stem cells. *World J. Stem Cells* 2021, 13, 619–631 doi: 10.4252/wjsc.v13.i6.619

82. Szydlak R. Biological, chemical and mechanical factors regulating migration and homing of mesenchymal stem cells . *World J Stem Cells* 2021; 13(6): 619-631 DOI: 10.4252/wjsc.v13.i6.619

83. Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F. et al. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 1, 2 (2010). <https://doi.org/10.1186/scrt2>
84. Wu, X., Jiang, J., Gu, Z. et al. Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress. *Stem Cell Res Ther* **11**, 345 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01855-9>
85. Liesveld, J. L., Sharma, N., & Aljitawi, O. S. (2020). Stem cell homing: From physiology to therapeutics. *Stem Cells*, 38(10), 1241-1253. <https://doi.org/10.1002/stem.3242>
86. Yin, J.Q., Zhu, J. & Ankrum, J.A. Manufacturing of primed mesenchymal stromal cells for therapy. *Nat Biomed Eng* **3**, 90–104 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0325-8>
87. Kou, M., Huang, L., Yang, J., Chiang, Z., Chen, S., Liu, J., ... & Lian, Q. (2022). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool?. *Cell Death & Disease*, 13(7), 580. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05034-x>
88. Nourissat G., Diop A., Maurel N. Mesenchymal stem cell therapy regenerates the native bone-tendon junction after surgical repair in a degenerative rat model // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5. – P.122-131.
89. 6 Pacini S., Spinabella S., Trombi L. et. al. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses // Tissue Eng. – 2007. – Vol.13. - P. 2949-2955.
90. 7 Zhao Ch., Chieh H., Bakri K. et.al The effects of bone marrow stromal cell transplants on tendon healing in vitro // Med. Eng. & Physics. - 2009.- Vol. 31. - P.1271–1275
91. Le Blanc K., Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. // Nat Rev Immunol – 2012. – Vol. 12. – P. 383–396.

92. 9. Lee J.S., Hong J.M., Moon G.J. et al. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke // *Stem Cells* – 2010. – Vol.28. – P.1099–1106.
93. Medina-Gómez, G., & Vidal-Puig, A. (2009). Adipose tissue as a therapeutic target in obesity. *Endocrinologia y nutricion: organo de la Sociedad Espanola de Endocrinologia y Nutricion*, 56(8), 404-411. [https://doi.org/10.1016/s1575-0922\(09\)72710-x](https://doi.org/10.1016/s1575-0922(09)72710-x)
94. Singh, M., Thakur, M., Mishra, M., Yadav, M., Vibhuti, R., Menon, A. M., ... & Yadav, V. (2021). Gene regulation of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1): A molecule with multiple functions. *Immunology letters*, 240, 123-136. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2021.10.007>
95. Rennert R.C., Sorkin M., Garg R.K., Gurtner G.C. Stem cell recruitment after injury: lessons for regenerative medicine. // *Regen Med.* – 2012. - V.7. - P. 833-50.
96. 13. Askari A.T., Unzek S., Popovic Z.B. et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. // *Lancet.* – 2003. – V.362. – P. 697-703.
97. 14. Chavakis E., Urbich C., Dimmeler S. Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy. // *J Mol Cell Cardiol.* – 2008. – V45. - P. 514-22.
98. . Liu J., Zhang H., Zhang Y. et al. Homing and restorative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats. // *Mol Cells.* – 2014. – V. 37. - P. 865-72. 47.
99. Sohni A., Verfaillie C.M. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. // *Stem Cells Int.* - 2013; 2013: 130763
100. Hackel, A., Aksamit, A., Bruderek, K., Lang, S., & Brandau, S. (2021). TNF- α and IL-1 β sensitize human MSC for IFN- γ signaling and enhance neutrophil recruitment. *European Journal of Immunology*, 51(2), 319-330.<https://doi.org/10.1002/eji.201948336>

101. Xie, A. W., Zacharias, N. A., Binder, B. Y., & Murphy, W. L. (2021). Controlled aggregation enhances immunomodulatory potential of mesenchymal stromal cell aggregates. *Stem Cells Translational Medicine*, 10(8), 1184-1201.
102. 19 Humbert, P., Brennan, M. Á., Davison, N., Rosset, P., Trichet, V., Blanchard, F., & Layrolle, P. (2019). Immune modulation by transplanted calcium phosphate biomaterials and human mesenchymal stromal cells in bone regeneration. *Frontiers in immunology*, 10, 663
103. Zong, C., Meng, Y., Ye, F., Yang, X., Li, R., Jiang, J., ... & Wei, L. (2022). AIF1⁺ CSF1R⁺ MSCs, induced by TNF- α , act to generate an inflammatory microenvironment and promote hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.32738>
104. Hoogduijn M.J. Are mesenchymal stromal cells immune cells? // *Arthritis Res Ther.* – 2015. – V.17(1): 88. doi: 10.1186/s13075-015-0596-3.
105. Najar M., Raicevic G., Fayyad-Kazan H., Bron D., Tounouz M, et al. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. // *Cytotherapy.* – 2016 – V.18. - P.160-171.
106. Glennie S., Soeiro I., Dyson P.J., Lam E.W., Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* // 2005. – V.105. - P. 2821-2827.
107. Selmani Z., Naji A., Zidi I. et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. // *Stem Cells.* – 2008. – V.26. - P.212-222.
108. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* – 2006. – V.107. - P. 367-72
109. Burchell J.T., Strickland D.H., Stumbles P.A. The role of dendritic cells and regulatory T cells in the regulation of allergic asthma. // *Pharmacol Ther.* – 2010. – V.125. - P.1-10

110. Spaggiari G.M., Capobianco A., Becchetti S., Mingari M.C., Moretta L.. Mesenchymal stem cell natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. // *Blood*. – 2006.- V.107. - P.1484-1490.
111. Gao F., Chiu S.M., Motan D.A., Zhang Z., Chen L., et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. // *Cell Death and Disease*. – 2016. – V. 7: e2062. doi:10.1038/cddis.2015.327
112. Bruno S., Deregibus M.C., Camussi G. The secretome of mesenchymal stromal cells: role of extracellular vesicles in immunomodulation. // *Immunol Lett*. – 2015. – V.168(2). P.154-158.
113. Prasanna S.J., Gopalakrishnan D., Shankar S.R., Vasandan A.B. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. // *PLoS ONE*. – 2010. – V.5(2). – P.e9016. doi: 10.1371/journal.pone.0009016.
114. Galland, Sabine, and Ivan Stamenkovic. "Mesenchymal stromal cells in cancer: a review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression." *The Journal of pathology* 250.5 (2020): 555-572.<https://doi.org/10.1002/path.5357>
115. Volarevic, V., Al-Qahtani, A., Arsenijevic, N., Pajovic, S., & Lukic, M. L. (2010). Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-1Ra producing mesenchymal stem cells as modulators of diabetogenesis. *Autoimmunity*, 43(4), 255-263. <https://doi.org/10.3109/08916930903305641>
116. Maier, Elisabeth, Albert Duschl, and Jutta Horejs-Hoeck. "STAT6-dependent and-independent mechanisms in T_H2 polarization." *European journal of immunology* 42.11 (2012): 2827-2833.<https://doi.org/10.1002/eji.201242433>
117. Liu, F., Qiu, H., Xue, M. et al. MSC-secreted TGF- β regulates lipopolysaccharide-stimulated macrophage M2-like polarization via the Akt/FoxO1 pathway. *Stem Cell Res Ther* 10, 345 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1447-y>

118. Fu, Y., Ni, J., Chen, J., Ma, G., Zhao, M., Zhu, S., ... & Chen, J. (2020). Dual-functionalized MSCs that express CX3CR1 and IL-25 exhibit enhanced therapeutic effects on inflammatory bowel disease. *Molecular Therapy*, 28(4), 1214-1228. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.020>
119. Tan, C. K., Tan, E. H., Luo, B., Huang, C. L., Loo, J. S., Choong, C., & Tan, N. S. (2013). SMAD3 deficiency promotes inflammatory aortic aneurysms in angiotensin II–infused mice via activation of iNOS. *Journal of the American Heart Association*, 2(3), e000269. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000269>
120. Tong, D., Liu, Q., Wang, La. et al. The roles of the COX2/PGE2/EP axis in therapeutic resistance. *Cancer Metastasis Rev* 37, 355–368 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9752-y>
121. Xu, Y., Liu, Y., Li, K. et al. COX-2/PGE2 Pathway Inhibits the Ferroptosis Induced by Cerebral Ischemia Reperfusion. *Mol Neurobiol* 59, 1619–1631 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02706-1>
122. Zhang, X., Hou, H., Wan, J., Yang, J., Tang, D., Zhao, D., ... & Shang, K. (2023). Inhibiting COX-2/PGE2 pathway with biodegradable NIR-II fluorescent polymeric nanoparticles for enhanced photodynamic immunotherapy. *Nano Today*, 48, 101759. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2023.101759>
123. Luo, Yongsheng, et al. "Mesenchymal stem cell protects injured renal tubular epithelial cells by regulating mTOR-mediated Th17/Treg axis." *Frontiers in Immunology* 12 (2021): 684197. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.684197>
124. Chen, J., Crawford, R., Chen, C., & Xiao, Y. (2013). The key regulatory roles of the PI3K/Akt signaling pathway in the functionalities of mesenchymal stem cells and applications in tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(6), 516-528. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0672>
125. Schett, Georg, Iain B. McInnes, and Markus F. Neurath. "Reframing immune-mediated inflammatory diseases through signature cytokine hubs." *New England Journal of Medicine* 385.7 (2021): 628-639. DOI: 10.1056/NEJMra1909094

126. Kulesza, Agnieszka, Leszek Paczek, and Anna Burdzinska. "The role of COX-2 and PGE2 in the regulation of immunomodulation and other functions of mesenchymal stromal cells." *Biomedicines* 11.2 (2023): 445. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020445>
127. Коструб, О. О., Блонський, Р. І., Волкова, Н. О., & Гольцев, А. М. (2017). Застосування локального та системного введення кріоконсервованих аутологічних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин у терапії експериментальної тендопатії. *Вісник ортопедії, травматології та протезування*, (2), 10-16.
128. Коструб О.О., Блонський Р.І., Лазарев І.А. и др. Міцність сухожилля на розтягування після клітинної терапії його дегенеративного пошкодження в експерименті // *Вісн. ортопед. травматол. та протезув.* – 2011. – № 3. – С. 23–26.
129. Волкова Н.О., Коструб О.О., Блонський Р.І. та інші Клітинні культури стромального походження в терапії експериментальної тендопатії // *Ортопедія, травматологія та протезування* .- 2012.- №4.- С.40 -44.
130. Коструб, О. О., Блонський, Р. І., Волкова, Н. О., & Гольцев, А. М. (2017). Застосування локального та системного введення кріоконсервованих аутологічних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин у терапії експериментальної тендопатії. *Вісник ортопедії, травматології та протезування*, (2), 10-16.
131. Zheng, Z. H., Li, X. Y., Ding, J., Jia, J. F., & Zhu, P. (2008). Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 47(1), 22-30. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kem284>
132. Chanda, D., Kumar, S., & Ponnazhagan, S. (2010). Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton. *Journal of cellular biochemistry*, 111(2), 249-257. <https://doi.org/10.1002/jcb.22701>

133. Ichim, T. E., Harman, R. J., Min, W. P., Minev, B., Solano, F., Rodriguez, J. P., ... & Riordan, N. H. (2010). Autologous stromal vascular fraction cells: a tool for facilitating tolerance in rheumatic disease. *Cellular immunology*, 264(1), 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.04.002>
134. Vij, R., Stebbings, K.A., Kim, H. et al. Safety and efficacy of autologous, adipose-derived mesenchymal stem cells in patients with rheumatoid arthritis: a phase I/IIa, open-label, non-randomized pilot trial. *Stem Cell Res Ther* 13, 88 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02763-w>
135. Bouffi, C., Djouad, F., Mathieu, M., Noel, D., & Jorgensen, C. (2009). Multipotent mesenchymal stromal cells and rheumatoid arthritis: risk or benefit?. *Rheumatology*, 48(10), 1185-1189. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep162>
136. Hwang, J. J., Rim, Y. A., Nam, Y., & Ju, J. H. (2021). Recent developments in clinical applications of mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Frontiers in Immunology*, 12, 631291. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631291>
137. Волкова НО, Введенський ДБ, Юхта МС, Гольцев АМ Вплив кріоконсервування на фенотип і функціональні властивості мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин із різних джерел. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2021; 31(3):268–272. <https://doi.org/10.15407/cryo31.03.268>
138. Volkova N.A., Goltsev A.N. Cryopreservation effect on proliferation and differentiation potential of cultured chorion cells *CryoLetters*. – 2015. – Vol.36, №1. – P.25-29.
139. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays *J. Immunol. Methods*.1983. 65: 55-63.
140. Dey P. Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and cytology. Springer, Singapore. 2018: 275. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8>

141. Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging Osteoarthritis and Cartilage. 2006;14:13-29. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.07.014>
142. Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, Carlson CS. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. Osteoarthritis and cartilage. 2010;18 Suppl 3:24-34. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2010.05.030>
143. Піонтковська, М. Б. Інформативність визначення швидкості осідання еритроцитів крові у хворих на високодиференційовані форми раку навколоносових пазух *Bulletin of the World Health Organization* 80.6 (2002): 489-500.
144. Chinnadurai R, Copland IB, Garcia MA. Cryopreserved mesenchymal stromal cells are susceptible to T-cell mediated apoptosis which is partly rescued by IFN γ licensing. Stem Cells. 2016; 34(9): 2429-42. doi.org/10.1002/stem.2415
145. Haack-Sorensen M, Kastrup J. Cryopreservation and revival of mesenchymal stromal cells. Methods Mol Biol. 2011; 698(1): 161-74. doi: 10.1007/978-1-60761-999-4_13
146. Jang TH, Park SC, Yang JH et al. Cryopreservation and its clinical applications. Integrative medicine research. 2017; 6(1): 12-8. doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.001
147. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. Cryobiology. 2015; 71(2): 181-97. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.07.003
148. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. Cryobiology. 2015; 71(2): 181-97. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.07.003

149. Volkova NA, Yukhta MS, Goltsev AN. Morphological and functional characteristics of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow, adipose tissue and tendons. *Cell and Organ Transplantology*. 2016; 4(2): 200-5. doi:10.22494/cot.v4i2.64
150. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*. 2007. 2(2): 329-33. doi:10.1038/nprot.2007.30
151. Volkova NA, Yukhta MS, Goltsev AN. Comparative study of the effect of bFGF and plasma rich in growth factors on cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow and tendon of rats. *Cell and Organ Transplantology*. 2017; 5(2): 170-5. doi:10.22494/cot.v5i2.75.
152. Волкова Н.О. Дослідження морфофункціональних характеристик кріоконсервованих культур клітин стромального походження / Волкова Н.О. // Проблеми криобіології. – 2012. – Т.22, №2. – С.118-125.
153. Irioda, A. C., Cassilha, R., Zocche, L., Francisco, J. C., Cunha, R. C., Ferreira, P. E., ... & de Carvalho, K. A. T. (2016). Human adipose-derived mesenchymal stem cells cryopreservation and thawing decrease $\alpha 4$ -Integrin expression. *Stem cells international*, 2016.
154. Vvedenskyi DB, Volkova NO, Goltsev AM Comparative evaluation of morpho-functional characteristics of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from different sources. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2019; 29(2): 175.
155. Введенський ДБ, Волкова НО, Гольцев АМ Вплив кріоконсервування на морфофункціональні характеристики мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової та хрящової тканин. *Фізіологічний журнал*. 2019; 65(3): 9.
156. Введенський ДБ Морфологічні параметри кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової та хрящової тканин. «Актуальні питання сучасної медицини». 2019, Харків, Україна, с.52.

157. Perez L. Acute phase protein response to viral infection and vaccination. Arch Biochem Biophys. 2019;671:196-202. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.07.013>
158. Aho OM, Finnilä M, Thevenot J, Saarakkala S, Lehenkari P. Subchondral bone histology and grading in osteoarthritis. PloS one. 2017;12(3):e0173726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173726>
159. Введенський Д. Б., Волкова Н. О., Ашукіна Н. О., Юхта М. С., Гольцев А. М. Динаміка гістобудови хрящової тканини та гематологічних показників у щурів з ад'ювантним артритом Вісник проблем біології та медицини. 2023; 170(3): 386-394 <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-3-170-386-394>
160. Введенський ДБ, Волкова НО, Гольцев АМ Дослідження впливу кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини на динаміку показників загального стану щурів з ад'ювантним артритом «Актуальні питання сучасної медицини». 2020, Харків, Україна, с.54-55.
161. Vvedenskyi DB, Volkova NO, Goltsev AM Assessment of effectiveness of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from adipose tissue in adjuvant arthritis treatment Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2020; 30(3): 292.
162. Введенський ДБ, Н. О. Волкова 1, А. М. Гольцев Корегування гострої фази ад'ювантного артриту кріоконсервованими мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами Матеріали 45-ої щорічної міжнародної конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині: актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» 2021 (19–20 травня), Харків, Україна, с.25.
163. Введенський Д. Б., Волкова Н. О., Юхта М. С., Гольцев А. М. Досвід застосування кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини для репарації ушкоджень суглобового хряща щурів з ад'ювантним артритом. «Актуальні питання сучасної медицини». 2021, Харків, Україна, с.32-33.

164. Vvedenskyi D, Yukhta M, Volkova N, Stepanyuk L, Goltsev A Cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells for correction of adjuvant arthritis Cryobiology. 2022; V109: 63.
165. Eggenhuizen PJ, Ng BH, Ooi JD. Treg enhancing therapies to treat autoimmune diseases. Int J Mol Sci 2020;21(19):7015, DOI:10.3390/ijms21197015
166. Chen Z, Bozec A, Ramming A, Schett G. Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol 2019;15(1):9–17, DOI:10.1038/s41584-018-0109-2
167. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T cell development, localization, and function throughout life. Immunity 2018;48(2):202–213, DOI:10.1016/j.immuni.2018.01.007
168. Boissier MC, Assier E, Biton J, et al. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. Joint Bone Spine 2009;76(1):10–14, DOI:10.1016/j.jbspin.2008.08.002
169. Boissier MC. Cell and cytokine imbalances in rheumatoid synovitis. Joint Bone Spine 2011;78(3):230–234, DOI:10.1016/j.jbspin.2010.08.017
170. Scott DL; Wolfe F, Huizinga TW Rheumatoid arthritis. Lancet 2010;376:1094–1108. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60826-4
171. Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. Pathophysiology 2005;12(3):167–181, DOI:10.1016/j.pathophys.2005.07.011
172. Rathod JD. Ameliorative effect of Bambusa arundinacea against adjuvant arthritis-with special reference to bone erosion and tropical splenomegaly. JDDT 2012;2(3):141–145, DOI:10.22270/jddt.v2i3.150
173. **Vvedenskyi D**, Volkova N, Babenko N, Gaevska Y, Yukhta M, Goltsev A. Role of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells in modulation of some indices of cell immunity in adjuvant arthritis. Reumatologia/Rheumatology. 2022; 60(3): 213-219. <https://doi.org/10.5114/reum.2022.117842>
174. **Введенський ДБ**, Волкова НО, Степанюк ЛВ, Сокіл ЛВ, Чернищенко ЛГ, Гольцев АМ Роль кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних

стромальних клітин в терапії ад'ювантного артриту. Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» 6-7 жовтня 2022, Львів, Україна, с.120-121.

175. **Vvedenskyi, D.**, Volkova, N., Yukhta, M., & Goltsev, A. (2022). Influence of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells on regulation of immune inflammation in adjuvant arthritis. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 32(4), 305-305.

176. Rathod JD. Ameliorative effect of Bambusa arundinacea against adjuvant arthritis-with special reference to bone erosion and tropical splenomegaly. *JDDT* 2012;2(3):141–145, DOI:10.22270/jddt.v2i3.150

177. Freitag J, Bates D, Boyd R, Shah K, Barnard A, Huguenin L, et al. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy - a review. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016;17(1):1-13. PMID: 27229856. PMCID: PMC4880954. doi: 10.1186/s12891-016-1085-9

178. **Введенський ДБ**, Волкова НО, Юхта МС, Сокіл ЛВ, Гольцев АМ Вплив клітинної терапії на динаміку маркерів запалення в крові щурів з ад'ювантним артритом. Український журнал медицини, біології та спорту. 2022; 7(1): 62-67. [https://doi: 10.26693/jmbs07.01.062](https://doi.org/10.26693/jmbs07.01.062)

179. **Введенський ДБ**, Волкова НО, Останкова ЛВ, Гольцев АМ. Вплив кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини на систему антиоксидантного захисту у щурів з ад'ювантним артритом «VIII національний конгрес патофізіологів України». 2020, Одеса, Україна, с.47-48.

180. **Введенський ДБ**, Волкова НО, Гольцев АМ Дослідження впливу кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини на динаміку показників загального стану щурів з ад'ювантним артритом «Актуальні питання сучасної медицини». 2020, Харків, Україна, с.54-55.

181. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):386-398. PMID: 16123384. doi: [10.1634/stemcells.2005-0008](https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0008)
182. Tabera S, Perez-Simon JA, Diez-Campelo M. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes *Haematologica*. 2008;93(9):1301-1309. PMID: 18641017. doi: [10.3324/haematol.12857](https://doi.org/10.3324/haematol.12857)
183. Zhou Y, Yamamoto Y, Xiao Z, Ochiya T. The immunomodulatory functions of mesenchymal stromal/stem cells mediated via paracrine activity. *J Clin Med*. 2019;8(7):1025. PMID: 31336889. PMCID: PMC6678920. doi: [10.3390/jcm8071025](https://doi.org/10.3390/jcm8071025)
184. Fan XL, Zhang Y, Li X, Fu QL. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(14):2771-2794. PMID: 31965214. PMCID: PMC7223321. doi: 10.1007/s00018-020-03454-6
185. Jafri, M. A., Kalamegam, G., Abbas, M., Al-Kaff, M., Ahmed, F., Bakhshab, S., Rasool, M., Naseer, M. I., Sinnadurai, V., & Pushparaj, P. N. Deciphering the association of cytokines, chemokines, and growth factors in chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells using an *ex vivo* osteochondral culture system. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020. 7, 380. doi: 10.3389/fcell.2019.00380
186. Jimenez-Puerta, G. J., Marchal, J. A., López-Ruiz, E., & Gálvez-Martín, P. Role of mesenchymal stromal cells as therapeutic agents: potential mechanisms of action and implications in their clinical use. *Journal of Clinical Medicine*, (2020). 9(2), 445. doi: 10.3390/jcm9020445
187. Kangari, P., Talaei-Khozani, T., Razeghian-Jahromi, I., & Razmkhah, M. Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects. *Stem Cell Research & Therapy*, 2020. 11(1), 492. doi: 10.1186/s13287-020-02001-1

188. Bhakta, S., Hong, P., & Koc, O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation. *Cardiovascular Revascularization Medicine*, 2006. 7(1), 19–24. doi: 10.1016/j.carrev.2005.10.008
189. Orozco L, Munar A, Soler R, et al. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: two-year follow-up results. *Transplantation* 2014;97(11):e66–e68, DOI:10.1097/TP.0000000000000167
190. Jo CH, Lee YG, Shin WH, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells* 2014;32(5):1254–1266, DOI:10.1002/stem.1634

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у фахових журналах, внесених у міжнародні бази Scopus та Web of Science

1. Волкова НО, **Введенський ДБ**, Юхта МС, Гольцев АМ Вплив кріоконсервування на фенотип і функціональні властивості мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин із різних джерел. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2021; 31(3):268–272. <https://doi.org/10.15407/cryo31.03.268>
2. **Vvedenskyi DB**, Volkova NO, Yukhta MS, Ashukina NO, Goltsev AM Course correction of adjuvant arthritis with cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2021; 12(3):545–553. <https://doi:10.15421/022175>
3. **Vvedenskyi D**, Volkova N, Babenko N, Gaevska Y, Yukhta M, Goltsev A. Role of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells in modulation of some indices of cell immunity in adjuvant arthritis. Reumatologia/Rheumatology. 2022; 60(3): 213-219. <https://doi.org/10.5114/reum.2022.117842>

Статті в українських фахових журналах:

4. **Введенський ДБ**, Волкова НО, Юхта МС, Сокіл ЛВ, Гольцев АМ Вплив клітинної терапії на динаміку маркерів запалення в крові щурів з ад'ювантним артритом. Український журнал медицини, біології та спорту. 2022; 7(1): 62-67. <https://doi: 10.26693/jmbs07.01.062>
5. **Введенський Д. Б.**, Волкова Н. О., Ашукіна Н. О., Юхта М. С., Гольцев А. М. Динаміка гістобудови хрящової тканини та гематологічних показників у щурів з ад'ювантним артритом Вісник проблем біології та медицини. 2023; 170(3): 386-394 <https://doi: 10.29254/2077-4214-2023-3-170-386-394>

Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

6. **Vvedenskyi DB**, Volkova NO, Goltsev AM Comparative evaluation of morpho-functional characteristics of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from different sources. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2019; 29(2): 175.
7. **Введенський ДБ**, Волкова НО, Гольцев АМ Вплив кріоконсервування на морфофункціональні характеристики мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової та хрящової тканин. Фізіологічний журнал. 2019; 65(3): 9.
8. **Введенський ДБ** Морфологічні параметри кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової та хрящової тканин. «Актуальні питання сучасної медицини». 2019, Харків, Україна, с.52.
9. **Введенський ДБ**, Волкова НО, Останкова ЛВ, Гольцев АМ. Вплив кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини на систему антиоксидантного захисту у щурів з ад'ювантним артритом «VIII національний конгрес патофізіологів України». 2020, Одеса, Україна, с.47-48.
10. **Введенський ДБ**, Волкова НО, Гольцев АМ Дослідження впливу кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини на динаміку показників загального стану щурів з ад'ювантним артритом «Актуальні питання сучасної медицини». 2020, Харків, Україна, с.54-55.
11. **Vvedenskyi DB**, Volkova NO, Goltsev AM Assessment of effectiveness of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from adipose tissue in adjuvant arthritis treatment Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2020; 30(3): 292.
12. **Введенський ДБ**, Волкова Н. О, Гольцев А. М. Корегування гострої фази ад'ювантного артриту кріоконсервованими мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами Матеріали 45-ої щорічної міжнародної конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині:

актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» 2021 (19–20 травня), Харків, Україна, с.25.

13. **Введенський Д. Б.,** Волкова Н. О., Юхта М. С., Гольцев А. М. Досвід застосування кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини для репарації ушкоджень суглобового хряща щурів з ад'ювантним артритом. «Актуальні питання сучасної медицини». 2021, Харків, Україна, с.32-33.

14. **Vvedenskyi D,** Yukhta M, Volkova N, Stepanyuk L, Goltsev A Cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells for correction of adjuvant arthritis Cryobiology. 2022; V109: 63. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.11.201>

15. **Введенський ДБ,** Волкова НО, Степанюк ЛВ, Сокіл ЛВ, Чернишенко ЛГ, Гольцев АМ Роль кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин в терапії ад'ювантного артриту. Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» 6-7 жовтня 2022, Львів, Україна, с.120-121.

16. **Введенський ДБ,** Волкова НО, Степанюк ЛВ, Сокіл ЛВ, Чернишенко ЛГ, Гольцев АМ Вплив клітинної терапії на маркери запалення хрящової тканини у щурів з ад'ювантним артритом» науково-практичній internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» 17 листопада 2022 року, Харків, Україна, с. 99-100.

17. **Vvedenskyi, D.,** Volkova, N., Yukhta, M., & Goltsev, A. (2022). Influence of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells on regulation of immune inflammation in adjuvant arthritis. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 32(4), 305-305. <https://doi.org/10.15407/cryo32.04.305a>

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації

Результати дисертаційної роботи були представлені на наступних конференціях:

- На 43 щорічної міжнародної конференції молодих вчених конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології (Харків, 2019);
- XX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім.П.Г. Костюка з міжнародною участю (Київ, 2019);
- XVI міжнародній конференції студентів молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2019);
- VIII національному конгресі патофізіологів України» (Одеса, 2020);
- XVII міжнародній конференції студентів молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2020);
- 44 щорічної міжнародної конференції молодих вчених конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології (Харків, 2020);
- XVIII міжнародній конференції студентів молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2021);
- 45 щорічної міжнародної конференції молодих вчених конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології (Харків, 2021);
- конференції CRYO 2022 Joint Meeting of the Society for Cryobiology and the Society for Low Temperature Biology (Дублін, 2022);
- міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2022);
- науково-практичній конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (Харків, 2022);

- 46 щорічної міжнародної конференції молодих вчених конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології (Харків, 2022).