

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc678802>

EDN: PHAGIA



Усиление регенеративных свойств мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток через модуляцию в них аутофагии на модели острой лучевой болезни

В.А. Иванов¹, Д.Ю. Гребнев^{1,2}, И.Ю. Маклакова^{1,2}, Л.Г. Полушина¹¹ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия;² Центр организации специализированных видов медицинской помощи Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Миелоидная ткань относится к числу радиочувствительных тканей и является одной из первичных структур, поражаемых при воздействии ионизирующего излучения. Повреждение миелоидной ткани проявляется угнетением кроветворения, истощением пула гемопоэтических стволовых клеток и нарушением стромальных компонентов костного мозга. Одним из перспективных подходов к восстановлению гемопоэза при острой лучевой болезни является использование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Благодаря своим свойствам формировать «нишу» для гемопоэтических стволовых клеток, секретировать гемопоэтические факторы, оказывать иммуносупрессивное действие ММСК рассматривают как эффективное средство клеточной терапии, особенно при аллогенной трансплантации. Однако эффективность применения ММСК ограничена их низкой жизнеспособностью и функциональной активностью после трансплантации. Таким образом, повышение регенераторного потенциала ММСК является ключевой задачей. Одним из возможных подходов к решению этой задачи может стать модуляция аутофагии в ММСК.

Цель. Изучить влияние модуляции аутофагии в ММСК на их функциональную активность и способность стимулировать регенерацию миелоидной ткани на модели острой лучевой болезни.

Методы. ММСК выделяли из хориона плаценты мышей линии ICR (CD1), культивировали с активатором аутофагии сиролимусом и ингибитором аутофагии 3-метиладенином. *In vitro* оценивали жизнеспособность клеток, концентрацию белков аутофагии: Beclin-1 и LC3B, а также секрецию гемопоэтических факторов роста: SCF (фактор роста стволовых клеток, stem cell factor), G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, granulocyte colony-stimulating factor), FLT3 ligand (лиганд fms-подобной тирозинкиназы 3, Fms-related tyrosine kinase 3 ligand). *In vivo* проводили моделирование острой лучевой болезни с последующей трансплантацией ММСК лабораторным животным. Далее выполняли анализ костного мозга и показателей крови на 7-е сутки после облучения.

Результаты. Активация аутофагии сиролимусом увеличивала концентрацию гемопоэтических факторов роста: SCF — на 70,5%, G-CSF — на 59,6% и FLT3 ligand — на 62,3% ($p \leq 0,0001$). Трансплантация ММСК с активированной аутофагией способствовала более выраженному увеличению клеточности в гранулоцитарном (+4,5%, $p=0,026$), лимфоцитарном (+18,8%, $p < 0,0001$), мегакариоцитарном (+30,5%, $p=0,011$) ростках. Ингибирование аутофагии снижало секрецию факторов роста и нивелировало терапевтический эффект ММСК.

Заключение. Активация аутофагии в ММСК представляет собой перспективный подход для восстановления гемопоэза на модели острой лучевой болезни.

Ключевые слова: мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки; миелоидная ткань; аутофагия; регенерация; гемопоэз; клеточная терапия; острая лучевая болезнь; сиролимус; 3-метиладенин.

Как цитировать:

Иванов В.А., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Полушина Л.Г. Усиление регенеративных свойств мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток через модуляцию в них аутофагии на модели острой лучевой болезни // Гены и клетки. 2025. Т. 20, № 3. С. 205–217. DOI: 10.17816/gc678802 EDN: PHAGIA

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc678802>

EDN: PHAGIA

Enhancement of Regenerative Properties of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Through Modulation of Autophagy in a Model of Acute Radiation Syndrome

Vladislav A. Ivanov¹, Dmitry Yu. Grebnev^{1,2}, Irina Yu. Maklakova^{1,2}, Larisa G. Polushina¹¹ Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia;² Center of specialized types of medical care Institute for Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Myeloid tissue is among the most radiosensitive tissues and represents one of the first structures to be affected by ionizing radiation exposure. Damage to myeloid tissue manifests as suppression of hematopoiesis, depletion of the hematopoietic stem cell pool, and impairment of bone marrow stromal components. One promising approach for hematopoietic recovery in acute radiation syndrome involves multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs). Their ability to form a “niche” for hematopoietic stem cells, secrete hematopoietic factors, and exert immunosuppressive effects allows MMSCs to be considered an effective tool of cellular therapy, particularly in allogeneic transplantation. However, the efficacy of MMSCs is limited by their low viability and functional activity post-transplantation. Therefore, enhancing the regenerative potential of MMSCs represents a key challenge. One potential approach to address this issue may involve modulation of autophagy in MMSCs.

AIM: To investigate the effects of autophagy modulation in MMSCs on their functional activity and ability to stimulate myeloid tissue regeneration in a model of acute radiation syndrome.

METHODS: MMSCs were isolated from the chorion of ICR (CD1) mouse placentas and cultured with autophagy activator sirolimus and autophagy inhibitor 3-methyladenine. *In vitro* assessments included cell viability, concentrations of autophagy proteins (Beclin-1 and LC3B), and secretion of hematopoietic growth factors: SCF (stem cell factor), G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), and FLT3 ligand (Fms-related tyrosine kinase 3 ligand). *In vivo* experiments involved modeling acute radiation syndrome followed by MMSCs transplantation into laboratory animals. Bone marrow analysis and blood parameters were evaluated on day 7 post-irradiation.

RESULTS: Autophagy activation with sirolimus increased concentrations of hematopoietic growth factors: SCF by 70.5%, G-CSF by 59.6%, and FLT3 ligand by 62.3% ($p \leq 0.0001$). Transplantation of MMSCs with activated autophagy promoted a more pronounced increase in cellularity within granulocytic (+4.5%, $p = 0.026$), lymphocytic (+18.8%, $p < 0.0001$), and megakaryocytic (+30.5%, $p = 0.011$) lineages. Autophagy inhibition reduced growth factor secretion and abolished the therapeutic effect of MMSCs.

CONCLUSION: Autophagy activation in MMSCs represents a promising approach for hematopoietic recovery in acute radiation syndrome models.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells; myeloid tissue; autophagy; regeneration; hematopoiesis; cell therapy; acute radiation syndrome; sirolimus; 3-methyladenine.

To cite this article:

Ivanov VA, Grebnev DYU, Maklakova IYu, Polushina LG. Enhancement of Regenerative Properties of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Through Modulation of Autophagy in a Model of Acute Radiation Syndrome. *Genes & cells*. 2025;20(3):205–217. DOI: 10.17816/gc678802 EDN: PHAGIA

ВВЕДЕНИЕ

Современная медицина сталкивается с проблемой эффективного восстановления повреждённых тканей и органов, что обуславливает необходимость развития новых терапевтических стратегий. Клеточная терапия представляет собой один из перспективных подходов для решения данной проблемы, обеспечивая возможность усиления регенерации тканей после действия повреждающего фактора. В особенности это характерно для быстрообновляющихся тканей, таких как миелоидная ткань [1].

Среди различных видов клеток, которые используются в регенеративной медицине [2], мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) занимают особое место благодаря своим уникальным биологическим свойствам. ММСК представляют собой особую группу стволовых клеток, локализирующихся в различных органах и тканях организма, включая костный мозг, жировую ткань, пуповинную кровь, плаценту и др. Характерной особенностью ММСК является способность к самообновлению и дифференцировке в различные клетки мезенхимального происхождения, такие как адипоциты, хондроциты, остециты. По своему потенциалу к дифференцировке ММСК являются мультипотентными, и это обуславливает их широкое применение в различных областях медицины [3]. ММСК участвуют в создании специфического микроокружения, или «ниши», способствующей росту и дифференцировке других клеток, в том числе и гемопоэтических стволовых клеток [4]. Важно отметить, что ММСК обладают и иммуномодулирующими свойствами. Они способны взаимодействовать с различными клетками иммунной системы, включая Т-лимфоциты, В-лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги. ММСК способны подавлять воспалительные реакции, снижать активность аутоиммунных процессов. Уникальные биологические свойства делают их перспективными для применения в лечении воспалительных процессов, аутоиммунных заболеваний, иммунологических конфликтов, в том числе при аллогенной трансплантации костного мозга [5, 6].

Секреторная активность ММСК — один из ключевых факторов их терапевтического потенциала. Они синтезируют и выделяют большое количество биологически активных веществ, играющих важную роль в регенерации тканей. К этим веществам относятся различные факторы роста, в том числе и гемопоэтические: G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, *granulocyte colony-stimulating factor*) и GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), SCF (фактор роста стволовых клеток, *stem cell factor*), FLT3 ligand (лиганд fms-подобной тирозинкиназы 3, *Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*), а также компоненты внеклеточного матрикса, такие как коллаген, эластин, фибронектин и ламинин [7, 8]. Данные молекулы стимулируют

ангиогенез, пролиферацию, миграцию клеток, а также ремоделирование тканей.

Отмечены и ограничения, присущие терапии, основанной на использовании ММСК. Долговременное культивирование ММСК, как показано в некоторых исследованиях, приводит к уменьшению выработки ими трофических факторов, таких как VEGF (фактор роста эндотелия сосудов, *vascular endothelial growth factor*) и TGF- β 2 (трансформирующий фактор роста бета 2, *transforming growth factor-beta 2*) [9]. В работе С. Hu и соавт. отмечено, что культивирование клеток сопровождается увеличением содержания факторов, замедляющих ангиогенез, к которым относится тромбоспондин-1 и ингибитор активатора плазминогена [10].

Другой проблемой при использовании ММСК является низкая приживляемость трансплантируемых клеток в повреждённом органе [11]. Данный эффект связан с реакцией воспаления и развитием аноксиса [9]. Несмотря на существенные успехи и большой потенциал использования ММСК, перед их широким применением в клинике необходимо решить ряд задач, включая оптимизацию получения, культивирования и трансплантации клеток для повышения их приживляемости и функциональной активности.

Одним из способов, который может повысить уровень функциональной активности ММСК, является изменение активности аутофагии в этих клетках.

Аутофагия — это высококонсервативный процесс, направленный на переработку повреждённых белков и органелл внутри клетки [12, 13]. Эволюционная роль аутофагии заключается в адаптации клетки к изменяющимся метаболическим потребностям, особенно проявляющимся в условиях дефицита питательных веществ и кислорода [14]. Данная роль реализуется как за счёт утилизации повреждённых органелл, так и за счёт выработки факторов роста и образования новых белков с формированием третичной структуры «фолдинг» [15]. Модулирование аутофагии в клетках гемопоэзистимулирующего микроокружения может сопровождаться изменением активности гемопоэза. Этот эффект достигается благодаря изменению способности клеток к выработке факторов, стимулирующих гемопоэз. Примерами таких гемопоэтических факторов роста являются SCF, FLT3 ligand и G-CSF, обеспечивающие пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток [16].

Однако накапливающиеся научные данные о роли аутофагии противоречивы. В ряде работ отмечена стимуляция функции клеток в результате активации в них аутофагии при воздействии стрессовых факторов. Например, в работе J. Jakovljevic и соавт. активация аутофагии уменьшает уровень апоптоза и повышает выживаемость ММСК [17]. В то же время имеются данные, свидетельствующие об аналогичном результате при ингибировании аутофагии. В экспериментах S. Molaei и соавт. отмечается, что в условиях гипоксии или окислительного

стресса индукция аутофагии приводит к гибели клеток [18]. Аналогичные результаты получены и в других исследованиях, где активация аутофагии ассоциировалась со снижением жизнеспособности клеток, вплоть до их гибели [19].

Противоречивость имеющихся данных относительно роли аутофагии подчёркивает сложность и неоднозначность механизмов её влияния на функционирование клетки, а также необходимость дальнейших исследований с учётом возможных отличий результатов между экспериментами *in vitro* и *in vivo*.

В данном исследовании для угнетения гемопоэза была выбрана модель острой лучевой болезни, которая широко используется для изучения патогенеза радиационного поражения на клеточном и системном уровнях, а также для поиска биомаркёров и тестирования новых терапевтических подходов. К преимуществам этой модели относятся возможность точного контроля дозы облучения, детального изучения поражения различных органов и систем, а также высокая воспроизводимость результатов. Вместе с тем существуют определённые ограничения: межвидовые различия в радиочувствительности затрудняют прямую экстраполяцию полученных данных на человека. Кроме того, такие модели не всегда позволяют учитывать влияние сопутствующих факторов, присущих реальным радиационным авариям [20, 21].

ЦЕЛЬ

Изучить влияние модуляции аутофагии в ММСК на их функциональную активность и способность стимулировать регенерацию миелоидной ткани на модели острой лучевой болезни.

МЕТОДЫ

Получение и культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

С целью получения клеточной культуры плацентарных ММСК было использовано 6 беременных мышей-самок линии ICR (CD1) возрастом 10–12 нед в 18-дневном сроке гестации. ММСК выделяли из хориона плаценты лабораторных мышей. Хориальную часть плаценты механически отделяли скальпелем с трёхкратным промыванием раствором D-PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, фосфатно-солевой буфер) (STEMCELL Technologies, Канада) с добавлением 2 ммоль L-глутамин (STEMCELL Technologies, Канада), 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (STEMCELL Technologies, Канада). В дальнейшем проводили механическое измельчение ткани плаценты и последующую ферментативную обработку раствором аккутазы (Millipore, США). Для инактивации раствора аккутазы к полученной суспензии клеток добавляли

среду для культивирования MesenCult Expansion Kit Mouse (STEMCELL Technologies, Канада) с 10% FBS (fetal bovine serum, фетальная бычья сыворотка) и последующим центрифугированием в течение 10 мин.

Процесс культивирования клеток осуществлялся в условиях CO₂-инкубатора при температуре 37 °C, с содержанием CO₂ 5% и влажностью 90%. Среду для культивирования MesenCult Expansion Kit Mouse использовали в качестве культуральной. Дополнительно в среду было добавлено 2 ммоль L-глутамин (STEMCELL Technologies, Канада), 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (STEMCELL Technologies, Канада) [22]. Замену питательной среды осуществляли в первый раз через 24 ч. В дальнейшем смену среды производили каждые 72 ч. При достижении плотности монослоя клеток в 80% выполняли пересев с использованием 0,25% раствора трипсин-EDTA (STEMCELL Technologies, Канада). Для эксперимента брали клетки третьего пассажа.

Характеристика мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Методом проточной цитометрии в суспензии трансплантируемых клеток оценивали содержание клеток, позитивных по CD105 (эндоглин), CD29 (интегрин β 1), белку Sca-1 и негативных по CD45, с помощью набора Mouse Mesenchymal Stem Cell Multi-Color FlowCytometry Kit (R&D Systems, США) и в соответствии с протоколом производителя на цитометре FACSCalibur (BD Biosciences, США). Дифференцировку ММСК в остеогенном и адипоцитарном направлении производили в 24-луночном культуральном планшете с помощью набора Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R&D Systems, США) в соответствии с протоколом производителя [23]. ММСК были посеяны в концентрации $7,4 \times 10^3$ и $3,7 \times 10^5$ клеток на лунку соответственно 24-луночного планшета с добавлением Osteogenic Supplement и Adipogenic Supplement (R&D Systems, США). При достижении 70 и 100% конфлюэнтности монослоя культуральная среда заменялась эквивалентным объёмом среды для индуцирования остеогенной или адипоцитарной дифференцировки (Osteogenic Differentiation Media или Adipogenic Differentiation Media; R&D Systems, США). Обновление среды для дифференцировки производилось каждые 3 дня. В дальнейшем оценивали полученные клетки через 21 и 14 дней соответственно по экспрессии белка остеопонтина и белка, связывающего жирные кислоты. Для идентификации ММСК методом проточной цитометрии после остеогенной и адипоцитарной дифференцировки были использованы антитела: первичное антитело Rabbit Anti-Mouse OPN-R monoclonal antibody, clone 3516M4 (Creative Diagnostics, США) и Rabbit Anti-Mouse FABP4 monoclonal antibody, clone 314M3 (Creative Diagnostics, США), вторичное антитело Anti-Rabbit IgG polyclonal antibody (Creative Diagnostics, США) — согласно инструкции производителя.

Модуляция аутофагии

Модуляцию аутофагии проводили путём культивирования ММСК, высеванных во флаконы 25 см² (STEMCELL Technologies, Канада) в концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток на флакон со средой MesenCult™ Expansion Medium (STEMCELL Technologies, Канада) в течение 24 ч с активатором аутофагии сиролимузом¹ в дозе 3 мкмоль/л (Abcam, Великобритания) и ингибитором аутофагии 3-метиладенином (3-МА) в дозе 10 мкмоль/л (Abcam, Великобритания). В дальнейшем среда была заменена после промывания D-PBS трёхкратно [24].

Оценка жизнеспособности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Для оценки жизнеспособности ММСК высевали в 96-луночные планшеты (Corning® 96-Well High-Binding Flat-Bottom Microplate; STEMCELL Technologies, Канада) в количестве 3000 кл./лунку. Клетки культивировали при 37 °С в течение 24, 48, 72, 96 ч с каждым из модуляторов аутофагии (сиролимус, 3-МА), а также без добавления модулятора. При завершении культивирования производили замену среды с добавлением в лунку 10 мкл соли тетразолия (набор для подсчёта клеток Cell Counting Kit-8 (ССК-8); Servicebio, Китай) и последующей инкубацией при температуре 37 °С в течение 1 ч. После этого оптическую плотность поглощения измеряли при длине волны 450 нм с помощью иммуноферментного анализатора Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США).

Жизнеспособность клеток определяли по формуле:

$$\frac{\text{ОП (тест)} - \text{ОП (бланк)}}{\text{ОП (контроль)} - \text{ОП (бланк)}} \times 100,$$

где ОП (тест) — оптическая плотность в лунках: ММСК «+», ССК-8 «+», модулятор аутофагии «+»; ОП (контроль) — оптическая плотность в лунках: ММСК «+», ССК-8 «+», модулятор аутофагии «-»; ОП (бланк) — оптическая плотность в лунках: ММСК «-», ССК-8 «+», модулятор аутофагии «-».

Оценка концентрации белков аутофагии

В течение 20 мин ММСК инкубировали как без добавления, так и с добавлением модуляторов аутофагии, затем проводили центрифугирование при 1500×g в течение 10 мин. В дальнейшем для приготовления лизата ММСК использовали лизис-буфер (Cloud-Clone, КНР) согласно инструкции производителя. Для оценки активности аутофагии определяли концентрацию белков Beclin-1 и MAP1LC3B (белок, ассоциированный с микротрубочками, лёгкая цепь 1 3В, далее именуемый LC3В). Определение концентрации LC3В было проведено в надосадочной жидкости с использованием набора MAP1LC3B

(Cloud-Clone, США), для белка Beclin-1 использовали набор BECN1 (Cloud-Clone, США) согласно инструкции производителя.

Гемопоэтические факторы роста

На следующем этапе ММСК были посеяны в 6-луночные планшеты в концентрации $2,5 \times 10^5$ кл./лунку [25]. Проводили культивирование ММСК в 2,5 мл раствора MesenCult™ Expansion Medium в течение 24 ч с последующим центрифугированием 2000×g в течение 10 мин. Полученный супернатант использовали для анализа концентрации SCF, FLT3 ligand, G-CSF. Исследования проведены на иммуноферментном анализаторе Chem Well 2910 (Combi, США) с использованием наборов производства Abcam (Великобритания): Mouse FLT3 ligand ELISA Kit, Mouse G-CSF ELISA Kit, Mouse SCF ELISA Kit — согласно протоколу производителя.

Исследования *in vivo*

Экспериментальная часть исследования была проведена на 50 аутбредных мышах-самцах линии ICR (CD1) массой 22–24 г. Протокол экспериментов составлен в соответствии с Межгосударственным стандартом «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» (ГОСТ 33215 — 2014) и одобрен локальным этическим комитетом Уральского государственного медицинского университета (протокол № 7 от 27 октября 2023 г.). Животных содержали в условиях стандартного вивария (световой день продолжительностью 12 ч, температура 21–22 °С, со свободным доступом к воде и еде).

Распределение животных было проведено с помощью блочной рандомизации на пять групп: 1-я — интактные животные ($n=10$); 2-я — контрольная, в которой не проводилась трансплантация клеток ($n=10$); 3-я — сравнения, с трансплантацией ММСК ($n=10$); 4-я — трансплантация ММСК с активированной в них аутофагией ($n=10$); 5-я — трансплантация ММСК, в которых аутофагия была ингибирована ($n=10$). Животные 2–5-й групп были облучены с помощью гамма-терапевтической установки «Агат-С» (Россия) с Co-60 радионуклидным источником, в общей дозе 5,0 Гр и мощностью 0,6 Гр в минуту. Таким образом у животных 2–5-й групп стимулировали развитие острой лучевой болезни [26]. Для трансплантации использовали полученные по описанному ранее протоколу плацентарные ММСК третьего пассажа. Лабораторным животным через 1 час после воздействия ионизирующего излучения внутривенно в латеральную хвостовую вену были трансплантированы ММСК в количестве 1×10^6 кл./мышь [27, 28].

Выведение лабораторных животных из эксперимента осуществляли на 7-е сутки после облучения. Для получения образцов крови выполняли анестезию внутримышечным введением тилетамина¹ и золазепам¹ (Virbac, Италия) в дозе 12,5 мг/кг и ксилазина¹ (Bioveta, Чехия) в дозе 7,5 мг/кг [29]. После взятия анализов лабораторным животным, находящимся под наркозом, осуществляли

¹ Лекарственное средство не зарегистрировано в Российской Федерации.

цервикальную дислокацию. Забор крови для общего анализа выполняли путём пункции сердца лабораторного животного. Подсчёт форменных элементов крови производили на гематологическом анализаторе MEK-6400 (Nihon Kohden, Япония).

С целью извлечения внеклеточной фракции из костного мозга выполняли процедуру выделения бедренной кости с последующим отсечением эпифизов. Далее проводили вымывание костного мозга с использованием 0,5 мл D-PBS (STEMCELL Technologies, Канада). Полученная суспензия была пипетирована для достижения однородной консистенции и центрифугирована при 3000×g в течение 15 мин [30]. Для морфологического исследования костного мозга были подготовлены цитологические препараты. Фиксацию мазков осуществляли с использованием красителя-фиксатора «эозин метиленовый синий» («ЭКОлаб», Россия) в течение 2 мин, после чего мазки окрашивали красителем по Романовскому также в течение 2 мин. Подсчёт миелограммы проводили на 1000 клеток. Для определения количества миелокариоцитов осуществляли забор костного мозга из второй бедренной кости аналогичным способом. Подсчёт миелокариоцитов выполняли в камере Горяева.

Статистический анализ

Формирование базы данных осуществлялось с помощью пакета программ Excel (Microsoft Office 2013). Статистический анализ проводили с использованием программы SPSS Statistics 27 (IBM, США). Оценивали нормальность распределения с использованием W-критерия Шапиро-Уилка. Анализ параметрических групп выполнен с использованием t-критерия Стьюдента с представлением результата в виде среднего арифметического (M) ± стандартное отклонение (SD), непараметрических групп — с использованием U-критерия Манна-Уитни с представлением результата в виде медианы (Me) и значений нижнего и верхнего квартилей [Q25; Q75]. Использовали поправку Бонферрони при множественном сравнении. Отличия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Графическое представление результатов работы было проведено в программе Prism v. 10.3.0 (507) (GraphPad, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

В проведённом исследовании установлено, что полученные ММСК экспрессируют CD105 (эндоглин), CD29 (интегрин $\beta 1$), белок Sca-1 и негативны по CD45 на 98,6%. Установлена также способность ММСК дифференцироваться в адипоцитарном и остеогенном направлениях. Проведённые исследования позволили установить, что полученная культура по поверхностным кластерам

дифференцировки и по дифференцировочному потенциалу соответствует ММСК. Рисунки предоставлены в приложении 1 и приложении 2.

Оценка жизнеспособности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

При оценке жизнеспособности ММСК после культивирования с активатором и ингибитором аутофагии в течение 24, 48, 72, 96 ч отмечен высокий уровень жизнеспособных клеток — более 96% во всех наблюдениях. Статистически значимых изменений между исследуемыми группами не получено (рис. 1).

Оценка активности аутофагии

При культивировании ММСК в течение 24 ч с модуляторами аутофагии установлено изменение экспрессии белков Beclin-1 и LC3B, которые являются ключевыми маркерами данного процесса.

Добавление к культуре клеток сиролимуса, являющегося индуктором аутофагии, привело к увеличению концентрации LC3B и белка Beclin-1 в 3,2 и 3,6 раза соответственно относительно 3-й группы (сравнения). Культивирование ММСК в присутствии 3-МА приводило к снижению концентрации LC3B на 58,8% ($p < 0,001$) и Beclin-1 на 63,3% ($p < 0,001$) (рис. 2).

Оценка концентрации факторов роста

При активации аутофагии в ММСК отмечается повышение выработки ими гемопоэтических факторов роста: SCF +70,5% ($p < 0,0001$), G-CSF +59,6% ($p < 0,0001$), FLT3 ligand +62,3% ($p < 0,0001$). Применение ингибитора аутофагии в культуре клеток отражается в статистически значимом снижении выработки факторов роста в питательных средах: SCF -43,6% ($p < 0,0001$), G-CSF -22,4% ($p < 0,0001$), FLT3 -33,5% ($p < 0,0001$) соответственно (рис. 3).

Оценка клеточного состава костного мозга

На 7-е сутки эксперимента в костном мозге лабораторных животных отмечается угнетение всех ростков кроветворения. Наблюдаемые изменения характерны для выбранной дозы облучения и длительности наблюдения на модели острой лучевой болезни (рис. 4) [31, 32]. Установлено снижение количества миелокариоцитов на 55,4% ($p < 0,0001$), клеток моноцитарного ряда на 37,6% ($p < 0,0001$), мегакариоцитарного — на 65,4% ($p < 0,0001$), эритроидного — на 59,3% ($p < 0,0001$), нейтрофильного — на 52,4% ($p < 0,0001$) с преимущественным снижением в лимфоидном ростке на 64,7% ($p < 0,0001$).

В группе животных с трансплантированными ММСК без модулирования в них аутофагии (3-я группа, сравнения) наблюдалось увеличение клеточности костного мозга по сравнению со 2-й группой (контроля). В частности, количество миелокариоцитов увеличилось на 14,7% ($p < 0,0001$), клеток нейтрофильного ряда — на 18,1% ($p < 0,0001$), лимфоидного ряда — на 26,1% ($p = 0,0002$). При этом изменения

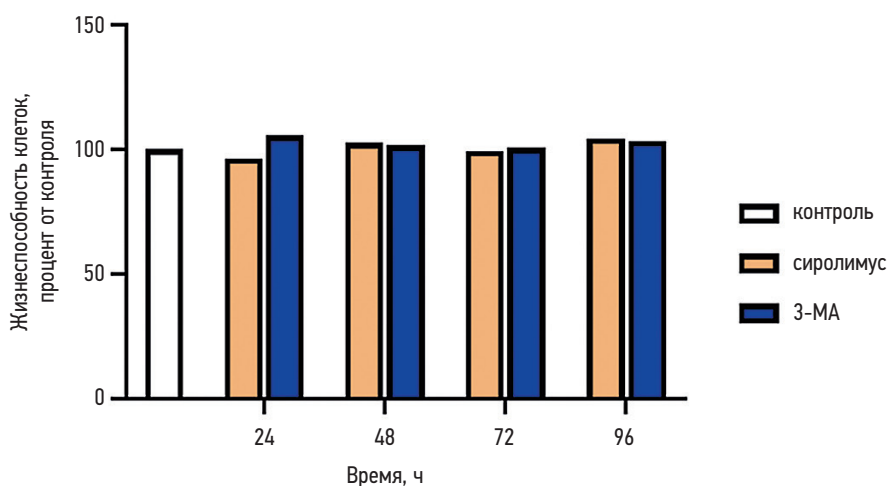


Рис. 1. Оценка жизнеспособности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) после культивирования с активатором и ингибитором аутофагии в течение 24, 48, 72, 96 ч. Контроль — ММСК, культивированные без добавления модулятора аутофагии; сиолимус — ММСК, культивированные с активатором аутофагии сиолимусом в концентрации 3 мкмоль/л; 3-МА — ММСК, культивированные с ингибитором аутофагии 3-метиладенином в концентрации 10 мкмоль/л.

Fig. 1. Viability assessment of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) after 24, 48, 72, and 96 hours of culture with autophagy activator or inhibitor. Control, MMSCs cultured without autophagy modulators; Sirolimus, MMSCs cultured with autophagy activator sirolimus (3 $\mu\text{mol/L}$); 3-MA, MMSCs cultured with autophagy inhibitor 3-methyladenine (10 $\mu\text{mol/L}$).

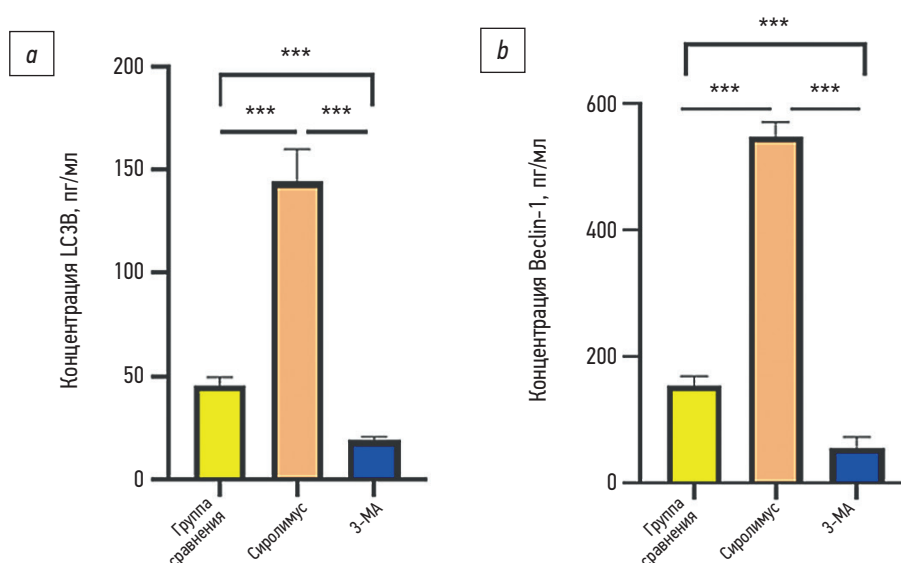


Рис. 2. Концентрация белков аутофагии при культивировании мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в течение 24 ч с модуляторами аутофагии: сиолимусом и 3-метиладенином: *a* — определение концентрации LC3B в надосадочной жидкости с использованием набора MAP1LC3b (Cloud-Clone, США); *b* — определение концентрации Beclin-1 в надосадочной жидкости с использованием набора BECN1 (Cloud-Clone, США); *** различия статистически значимы при $p < 0,001$. Группа сравнения — с трансплантацией ММСК; Сиолимус — ММСК, культивированные с активатором аутофагии сиолимусом в концентрации 3 мкмоль/л; 3-МА — ММСК, культивированные с ингибитором аутофагии 3-метиладенином в концентрации 10 мкмоль/л.

Fig. 2. Autophagy protein concentrations during 24-hour culture of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) with autophagy modulators sirolimus and 3-methyladenine: *a*, LC3B concentration measurement in supernatant using MAP1LC3b kit (Cloud-Clone, USA); *b*, Beclin-1 concentration measurement in supernatant using BECN1 kit (Cloud-Clone, USA); ***, statistically significant differences at $p < 0.001$. Comparison group, MMSCs transplantation; Sirolimus, MMSCs cultured with autophagy activator sirolimus (3 $\mu\text{mol/L}$); 3-MA, MMSCs cultured with autophagy inhibitor 3-methyladenine (10 $\mu\text{mol/L}$).

в моноцитарном, эритроидном и мегакариоцитарном ростках были статистически незначимыми.

Введение ММСК с предварительно активированной в них аутофагией с использованием сиолимуса (4-я группа) обеспечивало ещё более выраженное восстановление клеточного состава костного мозга по отношению к группе сравнения. Отмечено дополнительное

увеличение количества миелоцитов +8,3% ($p=0,0003$), клеток лимфоидного ряда +18,8% ($p < 0,0001$), нейтрофильного ряда +4,5% ($p=0,026$), мегакариоцитарного ряда +30,5% ($p=0,011$). В то же время не отмечено значимого влияния ММСК с индуцированной в них аутофагией сиолимусом на активность моноцитарного и эритроидного ростков. Однако при сравнении со 2-й группой (контроль)

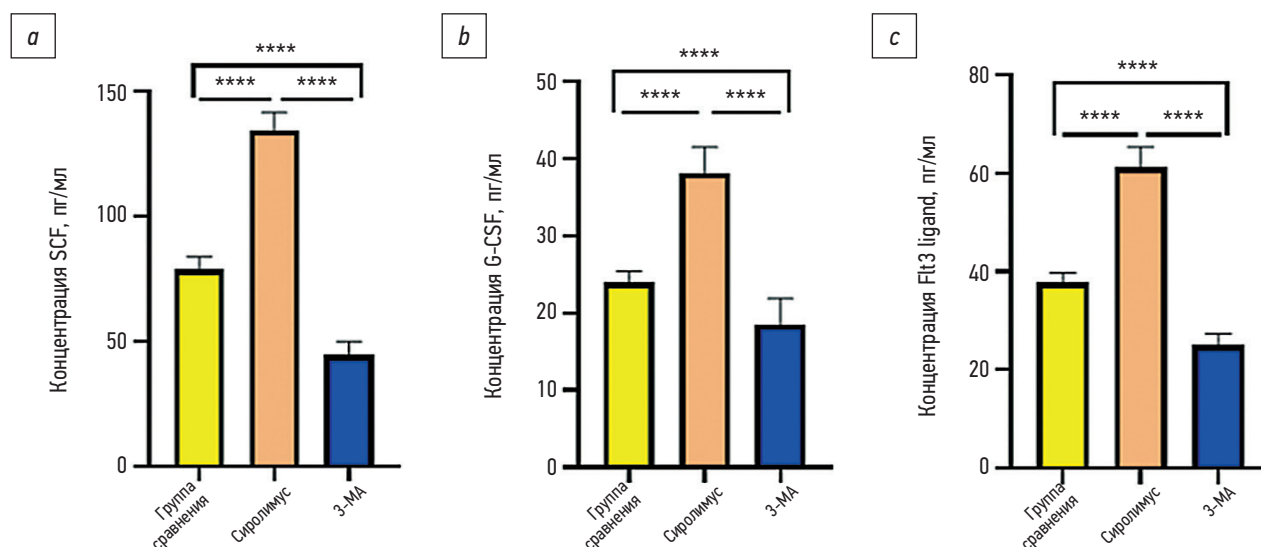


Рис. 3. Содержание факторов роста при культивировании мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в течение 24 ч с модуляторами аутофагии сиролимусом и 3-метиладенином: *а* — измерение концентрации фактора стволовых клеток (SCF) методом иммуноферментного анализа с помощью набора Mouse SCF ELISA Kit (Abcam, Великобритания); *б* — измерение концентрации колониестимулирующего фактора (G-CSF) методом иммуноферментного анализа с помощью набора Mouse G-CSF ELISA Kit (Abcam, Великобритания); *с* — измерение концентрации лиганд fms-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3 ligand) методом иммуноферментного анализа с помощью набора Mouse FLT3 ligand ELISA Kit (Abcam, Великобритания); **** различия статистически значимы при $p < 0,0001$. Группа сравнения — с трансплантацией ММСК; Сиролимус — ММСК, культивированные с активатором аутофагии сиролимусом в концентрации 3 мкмоль/л; 3-МА — ММСК, культивированные с ингибитором аутофагии 3-метиладенином в концентрации 10 мкмоль/л.

Fig. 3. Content of growth factors during 24-hour culture of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) with autophagy modulators sirolimus and 3-methyladenine: *a*, measurement of stem cell factor (SCF) concentrations by enzyme-linked immunosorbent assay using Mouse SCF ELISA Kit (Abcam, UK); *b*, measurement of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) concentrations by enzyme-linked immunosorbent assay using Mouse G-CSF ELISA Kit (Abcam, UK); *c*, measurement of Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3 ligand) concentrations by enzyme-linked immunosorbent assay using Mouse FLT3 ligand ELISA Kit (Abcam, UK); ****, statistically significant differences at $p < 0.0001$. Comparison group, MMSCs transplantation; Sirolimus, MMSCs cultured with autophagy activator sirolimus (3 $\mu\text{mol/L}$); 3-MA, MMSCs cultured with autophagy inhibitor 3-methyladenine (10 $\mu\text{mol/L}$).

отмечается статистически значимое повышение клеточности в эритроидном ряду на 10,1% ($p=0,019$).

Введении ММСК с ингибированной в них аутофагией не приводило к статистически значимым изменениям клеточного состава костного мозга по сравнению с контрольной группой. В то же время отмечено, что трансплантация прекондиционированных ММСК с 3-МА приводит к статистически значимому снижению активности гранулоцитарного и лимфоцитарного ростков при сравнении с группой ММСК без модификации аутофагии (3-я группа) и группой ММСК с активированной аутофагией (4-я группа).

Оценка содержания форменных элементов крови

Анализ крови на 7-е сутки после воздействия ионизирующего излучения во многом отражает наблюдаемые изменения в показателях миелограмм. Лучевое повреждение сопровождалось снижением содержания эритроцитов на 38,4% ($p < 0,0001$), тромбоцитов на 57,0% ($p < 0,0001$) и лейкоцитов на 87,0% ($p < 0,0001$). Общее содержание лейкоцитов было снижено за счёт уменьшения нейтрофилов на 84,8% ($p < 0,0001$), лимфоцитов на 93,8% ($p < 0,0001$), моноцитов на 43,6% ($p < 0,0001$) соответственно (рис. 5).

Отмечен терапевтический эффект при использовании ММСК, проявляющийся в виде повышения содержания лейкоцитов на 31,8% ($p=0,001$), нейтрофилов на 42,1%

($p=0,0004$), лимфоцитов на 67,2% ($p=0,0002$) по сравнению со 2-й (контрольной) группой.

Активация аутофагии в ММСК с помощью сиролимуса усиливала их положительное влияние на восстановление клеточного состава крови после трансплантации. В 4-й группе отмечалось более выраженное повышение содержания лейкоцитов на 35,3% ($p=0,0003$), лимфоцитов на 60,5% ($p=0,001$), нейтрофилов на 25,0% ($p=0,028$) и тромбоцитов на 12,2% ($p=0,0002$) по сравнению с 3-й группой ММСК без активации аутофагии.

Введение ММСК с ингибированной аутофагией не вызвало значимых изменений в содержании форменных элементов крови по сравнению со 2-й группой (контроля), что согласуется с результатами анализа клеточного состава костного мозга. Более того, по сравнению с 3-й группой ММСК без модуляции аутофагии отмечалось статистически значимое снижение количества лимфоцитов — на 33,8% ($p=0,0004$) и нейтрофилов — на 17,7% ($p=0,013$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках настоящего исследования проведена комплексная оценка влияния модуляции аутофагии на функциональные свойства ММСК в условиях как *in vitro*, так и *in vivo*. Ранее авторским коллективом проводились

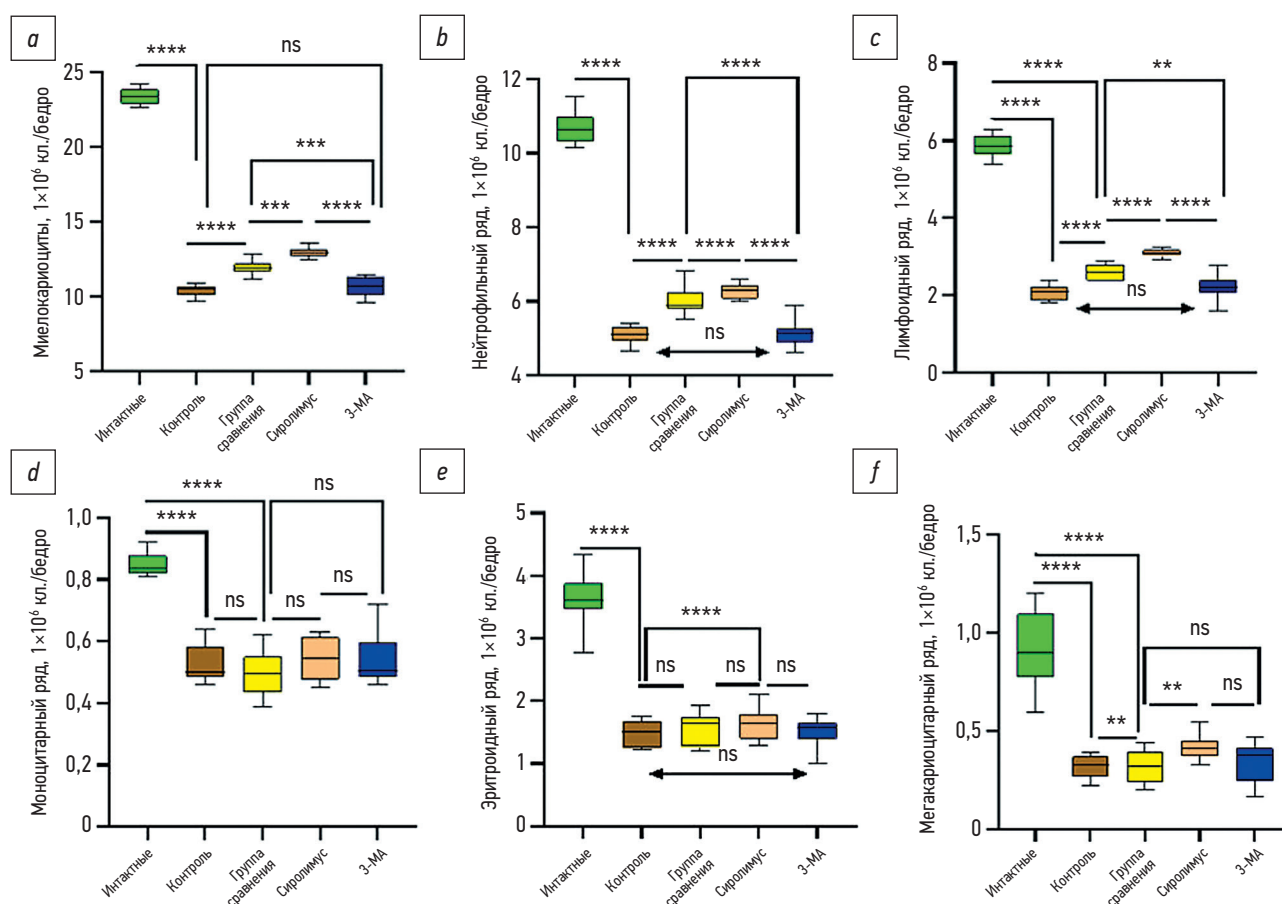


Рис. 4. Клеточный состав костного мозга лабораторных животных на 7-е сутки острой лучевой болезни: *a* — количество миелокариоцитов — общая популяция незрелых миелоидных предшественников, включая миелобласты, промиелоциты и миелоциты; *b* — количество клеток нейтрофильного ряда — метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов; *c* — количество клеток лимфоидного ряда — лимфоцитов, включая В- и Т-клеточных предшественников; *d* — количество клеток моноцитарного ряда — моноцитов и их предшественников (промоноцитов); *e* — количество клеток эритроидного ряда — нормобластов на разных стадиях созревания (базофильных, полихроматофильных, оксифильных); *f* — количество клеток мегакариоцитарного ряда — мегакариоцитов; ** различия статистически значимы при $p \leq 0,01$; *** при $p \leq 0,001$; **** при $p \leq 0,0001$; ns — нет статистически значимых различий. Интактные — группа лабораторных животных, не подвергшихся ионизирующему излучению; Контроль — не проводилась трансплантация клеток; Группа сравнения — с трансплантацией мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) без модулирования в них аутофагии; Сиrolimus — проведена трансплантация ММСК с активированной в них аутофагией сиrolимусом; 3-МА — проведена трансплантация ММСК с ингибированной в них аутофагией 3-метиладенином.

Fig. 4. Bone marrow cellular composition in laboratory animals on day 7 of acute radiation syndrome: *a*, myelokaryocyte count (total population of immature myeloid precursors including myeloblasts, promyelocytes, and myelocytes); *b*, neutrophil lineage cell count (metamyelocytes, band neutrophils, and segmented neutrophils); *c*, lymphoid lineage cell count (lymphocytes including B- and T-cell precursors); *d*, monocytic lineage cell count (monocytes and their precursors/promonocytes); *e*, erythroid lineage cell count (normoblasts at various maturation stages, including basophilic, polychromatophilic, and oxyphilic normoblasts); *f*, megakaryocytic lineage cell count (megakaryocytes); **, statistically significant differences at $p \leq 0.01$; ***, at $p \leq 0.001$; ****, at $p \leq 0.0001$; ns, no statistically significant differences. Intact, animals not exposed to ionizing radiation; Control, no cell transplantation; Comparison group, transplantation of MMSCs without autophagy modulation; Sirolimus, transplantation of MMSCs with sirolimus-activated autophagy; 3-MA, transplantation of MMSCs with 3-methyladenine-inhibited autophagy.

исследования по применению ММСК для повышения регенераторного потенциала на различных моделях, но без изменения функциональной активности самих стволовых клеток [33, 34]. В данной работе мы впервые демонстрируем изменение функциональной активности ММСК путём модулирования уровня аутофагии в них после воздействия ионизирующего излучения. Аутофагия, являясь важнейшим внутриклеточным механизмом поддержания гомеостаза и удаления повреждённых компонентов клетки через образование аутофагосом и фаголизосом, рассматривалась как потенциальная мишень для повышения терапевтической эффективности ММСК [35].

В экспериментах *in vitro* показано, что модуляция аутофагии с помощью сиrolимуса (индуктора) и 3-МА (ингибитора) приводит к статистически значимым изменениям ключевых белков аутофагии (Beclin-1 и LC3B), что подтверждает эффективность выбранных подходов для управления данным процессом в ММСК [36]. Beclin-1 — центральный регулятор инициации аутофагии. Он входит в состав PI3K-комплекса класса III, который отвечает за формирование фосфатидилинозитол-3-фосфата — молекулы, необходимой для начала образования аутофагосом. Концентрация Beclin-1 отражает активность ранних стадий аутофагии и позволяет

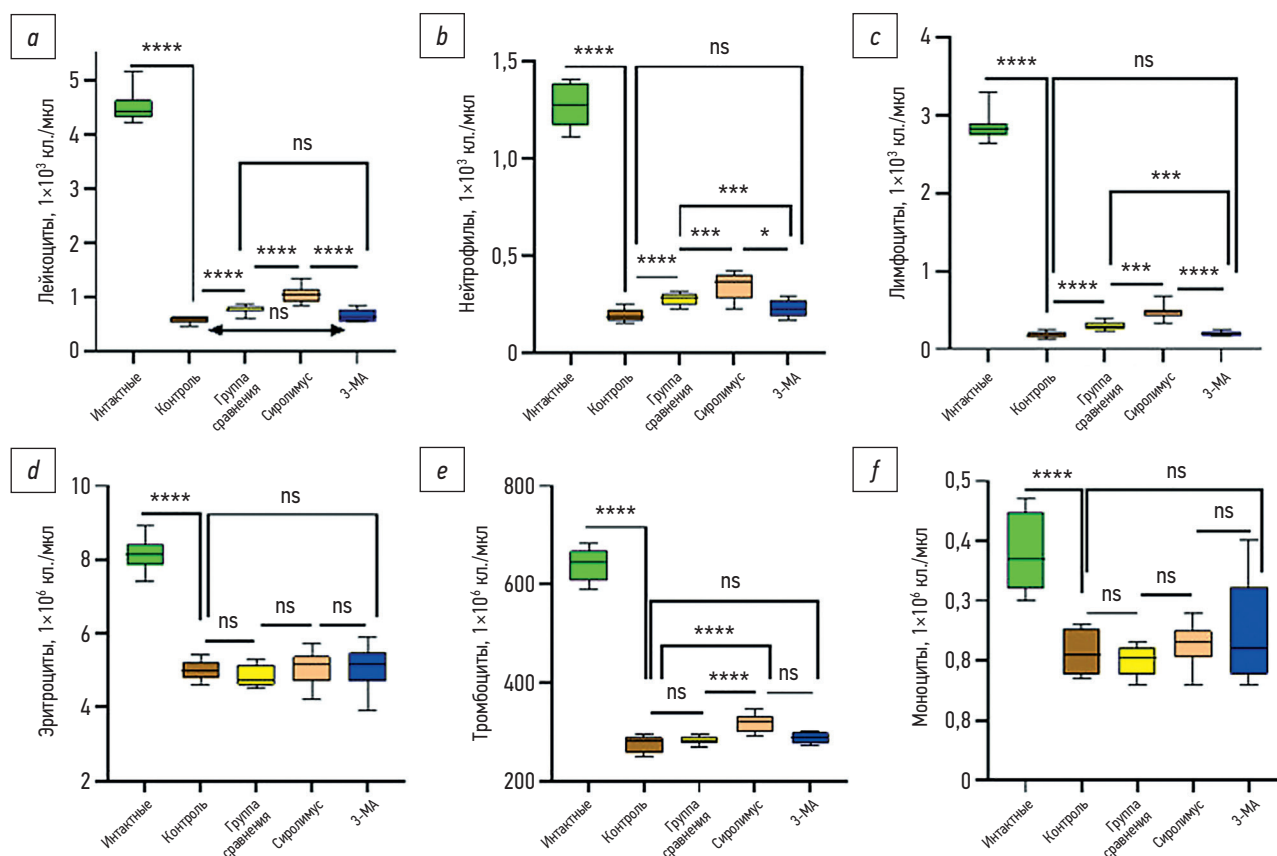


Рис. 5. Содержание форменных элементов крови лабораторных животных на 7-е сутки острой лучевой болезни: *a* — общее количество клеток лейкоцитов; *b* — количество клеток нейтрофилов; *c* — количество клеток лимфоцитов; *d* — количество эритроцитов; *e* — количество тромбоцитов; *f* — количество клеток моноцитов; * различия статистически значимы при $p \leq 0,05$; *** различия статистически значимы при $p \leq 0,001$; **** различия статистически значимы при $p < 0,0001$; ns — нет статистически значимых различий. Интактные — группа лабораторных животных, не подвергшихся ионизирующему излучению; Контроль — не проводилась трансплантация клеток; Группа сравнения — с трансплантацией мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) без модулирования в них аутофагии; Сиrolimus — проведена трансплантация ММСК с активированной в них аутофагией сиrolимусом; 3-МА — проведена трансплантация ММСК с ингибированной в них аутофагией 3-метиладенином.

Fig. 5. Blood cell counts in laboratory animals on day 7 of acute radiation syndrome: *a*, total leukocyte count; *b*, neutrophil count; *c*, lymphocyte count; *d*, erythrocyte count; *e*, platelet count; *f*, monocyte count; *, statistically significant differences at $p \leq 0.05$; ***, at $p \leq 0.001$; ****, at $p < 0.0001$; ns, no statistically significant differences. Intact, animals not exposed to ionizing radiation; Control, no cell transplantation; Comparison group, transplantation of MMSCs without autophagy modulation; Sirolimus, transplantation of MMSCs with sirolimus-activated autophagy; 3-MA, transplantation of MMSCs with 3-methyladenine-inhibited autophagy.

оценить её индукцию. LC3B — это маркёр аутофагосом и один из ключевых белков, участвующих в расширении и завершении формирования мембраны аутофагосом. Концентрация LC3B коррелирует с числом аутофагосом и служит прямым показателем интенсивности процесса. Полученные данные согласуются с результатами исследования L. Gao с соавт., где также показано изменение уровня аутофагии в ММСК при использовании указанных веществ в контексте иммуносупрессивной активности ММСК [24].

На следующем этапе оценивали жизнеспособность ММСК после модуляции аутофагии. Существует мнение, что базальная активность аутофагии может ограничивать пролиферативную активность некоторых типов клеток, однако её влияние на жизнеспособность ММСК остаётся недостаточно изученным [37]. Статистически значимые различия в жизнеспособности ММСК, предварительно культивированных с модуляторами

аутофагии и без предварительной культивации, не были зафиксированы в ходе эксперимента. Это свидетельствует о безопасности применяемых концентраций модуляторов для ММСК и согласуется с данными других исследователей [20].

Особое значение имеют результаты анализа секреторной активности ММСК. Активация аутофагии сопровождалась увеличением продукции основных гемопоэтических факторов роста (G-CSF, SCF и FLT3 ligand), тогда как ингибирование аутофагии, напротив, вызывало снижение их секреции. Это позволяет сделать вывод о том, что именно функциональная активность, а не жизнеспособность ММСК, определяет их терапевтический эффект при трансплантации в условиях радиационного повреждения.

В эксперименте *in vivo* показано, что трансплантация ММСК способствует восстановлению клеточного состава костного мозга и периферической крови, прежде всего за счёт лимфоцитарного и гранулоцитарного ростков

кроветворения, однако не было замечено значимых изменений показателей в отношении эритроидного и мегакариоцитарного дифферонов.

Наиболее выраженный регенераторный эффект наблюдался при использовании ММСК с активированной аутофагией: отмечено увеличение клеточности по всем основным росткам гемопоэза, включая эритроидный и мегакариоцитарный.

Следует отметить, что повышение клеточности костного мозга и количества форменных элементов крови в группах с трансплантацией ММСК, особенно с активированной аутофагией, может быть обусловлено не только стимуляцией гемопоэза, но и снижением пострадиационной гибели клеток. Повышенная устойчивость стромальных и гемопоэтических клеток к действию ионизирующего излучения вследствие активации аутофагии может способствовать сохранению пулов жизнеспособных клеток, тем самым увеличивая общий объём клеточного состава. Эта возможность требует дальнейшей экспериментальной проверки, включая оценку маркёров апоптоза и некроза, а также исследования динамики клеточной пролиферации и выживаемости в условиях радиационного повреждения.

Кроме того, усиление регенераторного эффекта может быть также связано с оптимизацией белоксинтетической функции ММСК, обусловленной улучшением внутриклеточного гомеостаза и удалением повреждённых органелл. Повышение продукции гемопоэтических факторов роста ММСК с помощью активированной в них аутофагии также свидетельствует о важной роли этих молекул в стимуляции пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток [38].

Процесс активации гемопоэза в эритроидном и мегакариоцитарном дифферонах также связан с особенностями рецепторного аппарата гемопоэтических клеток-предшественников. В частности, известно, что мегакариоцит-эритроидные прогениторные клетки характеризуются низким уровнем экспрессии рецепторов к SCF. Это объясняет, почему трансплантация ММСК без активации аутофагии не приводит к выраженной стимуляции мегакариотопоза и эритропоэза: выработка необходимых факторов роста в данном случае оказывается недостаточной для эффективной активации этих ростков кроветворения.

В то же время активация аутофагии в ММСК сопровождается значительным увеличением продукции гемопоэтических факторов роста, включая G-CSF, SCF и FLT3 ligand. Это, вероятно, обеспечивает дополнительную стимуляцию мегакариоцитарного и эритроидного дифферонов, что проявляется в более выраженном восстановлении соответствующих клеточных популяций после трансплантации таких ММСК. Таким образом, можно предположить, что повышение секреции гемопоэтических факторов роста при активации аутофагии позволяет преодолеть ограничения, связанные с низкой чувствительностью клеток-предшественников к отдельным цитокинам [39].

С другой стороны, ингибирование аутофагии значительно снижает терапевтический потенциал ММСК. Во-первых, наблюдается уменьшение секреции ключевых гемопоэтических факторов роста, что ограничивает способность клеток поддерживать и стимулировать процессы кроветворения. Во-вторых, блокировка аутофагии препятствует эффективному удалению повреждённых белков и органелл, что может привести к их накоплению и снижению функциональной активности ММСК. Эти выводы согласуются с результатами работы S. Ghanta и соавт., где показано, что нарушение аутофагии в ММСК приводит к снижению их цитопротективной активности в условиях окислительного стресса [40]. Важно отметить, что, несмотря на сохранение жизнеспособности ММСК при ингибировании аутофагии, их функциональная активность, в частности продукция биологически активных молекул, существенно снижается. В условиях *in vivo* такие клетки демонстрируют низкую эффективность в восстановлении миелоидной ткани, а показатели гемопоэза в этих группах сопоставимы с показателями контрольных животных, не получавших клеточной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные подчёркивают важность аутофагии как ключевого механизма, определяющего регенераторный потенциал ММСК. Результаты нашего исследования подтверждают потенциальную эффективность использования ММСК с индуцированной аутофагией для стимуляции регенерации миелоидной ткани на модели острой лучевой болезни. Однако, прежде чем эти данные можно будет использовать в клинической практике, необходимо провести дополнительные экспериментальные исследования: для определения оптимальных условий модуляции аутофагии; разработки стандартизованных протоколов индукции; комплексной оценки эффективности и безопасности данного подхода; изучения долгосрочных эффектов; анализа механизмов действия, включая специфическое влияние на восстановление эритропоэза и тромбоцитопоэза.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. В.А. Иванов — осуществление научно-исследовательского процесса, включая выполнение экспериментов и сбор данных, подготовку и написание текста статьи; Д.Ю. Гребнев — осуществление научно-исследовательского процесса, включая выполнение экспериментов, написание рукописи — рецензирование и редактирование, научное руководство; И.Ю. Маклакова — написание рукописи — рецензирование и редактирование; Л.Г. Полушина — осуществление научно-исследовательского процесса, включая выполнение экспериментов и сбор данных. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Благодарности. Неприменимо.

Этическая экспертиза. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» (протокол № 7 от 27.10.2023).

Согласие на публикацию. Неприменимо.

Источники финансирования. Отсутствуют.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье и в приложениях к ней.



Приложение 1. Идентификация кластеров дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток методом проточной цитометрии. DOI: 10.17816/gc678802-4348516



Приложение 2. Определение дифференцировочного потенциала мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток методом проточной цитометрии. DOI: 10.17816/gc678802-4348519

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента, один член редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: V.A. Ivanov: data curation, investigation, writing—original draft; D.Yu. Grebnev: investigation, supervision, writing—original

draft, writing—review & editing; I.Yu. Maklakova: writing—original draft, writing—review & editing; L.G. Polushina: data curation, investigation. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Acknowledgments: Not applicable.

Ethics approval: The study was approved by the Local Ethics Committee of the Ural State Medical University (Protocol No. 7 dated October 27, 2023).

Consent for publication: Not applicable.

Funding sources: No funding.

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously published material (text, images, or data) was used in this work.

Data availability statement: All data generated during this study are available in the article and its supplementary material.



Supplement 1: Identification of differentiation clusters in multipotent mesenchymal stromal cells by flow cytometry. DOI: 10.17816/gc678802-4348516



Supplement 2: Assessment of differentiation potential of multipotent mesenchymal stromal cells by flow cytometry. DOI: 10.17816/gc678802-4348519

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer review: This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The review process involved two external reviewers, one member of the editorial board, and the in-house scientific editor.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Banjac I, Maimets M, Jensen KB. Maintenance of high-turnover tissues during and beyond homeostasis. *Cell Stem Cell*. 2023;30(4):348–361. doi: 10.1016/j.stem.2023.03.008 EDN: XEKHAM
2. Bahari M, Mokhtari H, Yeganeh F. Stem cell therapy, the market, the opportunities and the threat. *Int J Mol Cell Med*. 2023;12(3):310–319. doi: 10.22088/IJCMC.BUMS.12.3.310
3. Larrick JW, Mendelsohn AR. Mesenchymal stem cells for frailty? *Rejuvenation Res*. 2017;20(6):525–529. doi: 10.1089/rej.2017.2042 EDN: YFHPFZ
4. Semenova NYu, Bessmeltsev SS, Rugal SS. Biology of hematopoietic stem cell niche. *Klinicheskaja onkogematologija. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaja praktika*. 2014;7(4):501–510. EDN: TIINZB
5. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, et al. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*. 2018;93(1):19–31. doi: 10.1002/cyto.a.23242 EDN: YDFKHB
6. Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebé L, Papadaki HA. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Rev Rep*. 2011;7(3):569–589. doi: 10.1007/s12015-011-9228-8 EDN: PNYTPN
7. El-Naseery NI, Elewa YHA, El-Beheery EI, Dessouky AA. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells restored hematopoiesis by improving radiation induced bone marrow niche remodeling in rats. *Ann Anat*. 2023;250:152131. doi: 10.1016/j.aanat.2023.152131 EDN: YVOESZ
8. Park SR, Kim JW, Jun HS, et al. Stem cell secretome and its effect on cellular mechanisms relevant to wound healing. *Mol Ther*. 2018;26(2):606–617. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.09.023
9. De Barros S, Dehez S, Arnaud E, et al. Aging-related decrease of human ASC angiogenic potential is reversed by hypoxia preconditioning through ROS production. *Mol Ther*. 2013;21(2):399–408. doi: 10.1038/mt.2012.213 EDN: RHRYMR
10. Hu C, Li L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med*. 2018;22(3):1428–1442. doi: 10.1111/jcmm.13492 EDN: YEGSGD
11. Song L, Yang YJ, Dong QT, et al. Atorvastatin enhance efficacy of mesenchymal stem cells treatment for swine myocardial infarction via activation of nitric oxide synthase. *PLoS One*. 2013;8(5):e65702. doi: 10.1371/journal.pone.0065702
12. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(3):460–473. doi: 10.1089/ars.2013.5371 EDN: SPXVKH
13. Pavlova JA, Guseva EA, Dontsova OA, Sergiev PV. Natural activators of autophagy. *Biochemistry (Mosc)*. 2024;89(1):1–26. doi: 10.1134/S0006297924010012 EDN: DCILXQ
14. Mizushima N, Levine B. Autophagy in human diseases. *N Engl J Med*. 2020;383(16):1564–1576. doi: 10.1056/NEJMra2022774 EDN: NXP NAT
15. Maksimovich NYe, Bon EI. Heat shock proteins. Properties. Role in adaptation. Methodological approaches to definition. *Journal Biomed*. 2020;16(2):60–67. doi: 10.33647/2074-5982-16-2-60-67 EDN: JDHMCW
16. Wei W, Xu C, Ye ZY, et al. Biological characteristics of mesenchymal stem cell and hematopoietic stem cell in the co-culture system. *Sheng Li Xue Bao*. 2016;68(5):691–698. (In Chinese).

17. Jakovljevic J, Harrell CR, Fellabaum C, et al. Modulation of autophagy as new approach in mesenchymal stem cell-based therapy. *Biomed Pharmacother*. 2018;104:404–410. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.061
18. Molaei S, Roudkenar MH, Amiri F, et al. Down-regulation of the autophagy gene, ATG7, protects bone marrow-derived mesenchymal stem cells from stressful conditions. *Blood Res*. 2015;50(2):80–86. doi: 10.5045/br.2015.50.2.80
19. Liu S, Yao S, Yang H, et al. Autophagy: Regulator of cell death. *Cell Death Dis*. 2023;14(10):648. doi: 10.1038/s41419-023-06154-8 EDN: WKJYDD
20. Ossetrova NI, Ney PH, Condliffe DP, et al. Acute radiation syndrome severity score system in mouse total-body irradiation model. *Health Phys*. 2016;111(2):134–144. doi: 10.1097/HP.0000000000000499
21. Singh VK, Newman VL, Berg AN, MacVittie TJ. Animal models for acute radiation syndrome drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2015;10(5):497–517. doi: 10.1517/17460441.2015.1023290
22. Li T, Zhou X, Wang J, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells and extracellular vesicles confer antitumor activity in preclinical treatment of breast cancer. *Pharmacol Res*. 2020;157:104843. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104843 EDN: UIWHSF
23. Pervin B, Gizer M, Şeker ME, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells support regeneration of intestinal damage in a colitis mouse model, independent of their CXCR4 expression. *Clin Transl Sci*. 2024;17(5):e13821. doi: 10.1111/cts.13821 EDN: AYIELI
24. Gao L, Cen S, Wang P, et al. Autophagy improves the immunosuppression of CD4+ T cells by mesenchymal stem cells through transforming growth factor-β1. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(11):1496–1505. doi: 10.5966/sctm.2015-0420
25. Kögler G, Radke TF, Lefort A, et al. Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol*. 2005;33(5):573–583. doi: 10.1016/j.exphem.2005.01.012 EDN: MFPGIX
26. Kim JS, Jang WS, Lee S, et al. A study of the effect of sequential injection of 5-androstenediol on irradiation-induced myelosuppression in mice. *Arch Pharm Res*. 2015;38(6):1213–1222. doi: 10.1007/s12272-014-0483-5 EDN: JQLIZD
27. de Mayo T, Conget P, Becerra-Bayona S, et al. The role of bone marrow mesenchymal stromal cell derivatives in skin wound healing in diabetic mice. *PLoS One*. 2017;12(6):e0177533. doi: 10.1371/journal.pone.0177533
28. Grebnev DJu, Slautin VN, Maklakova IJu, et al. Mechanisms of antifibrotic action of placental multipotent mesenchymal stromal cells. *Journal of Ural Medical Academic Science*. 2022;19(4):355–364. doi: 10.22138/2500-0918-2022-19-4-355-364 EDN: NSEYMU
29. Khokhlova ON, Borozdina NA, Sadovnikova ES, et al. Comparative study of the aftereffect of CO₂ inhalation or tiletamine-zolazepam-xylazine anesthesia on laboratory outbred rats and mice. *Biomedicines*. 2022;10(2):512. doi: 10.3390/biomedicines10020512 EDN: NVFUDA
30. Yu H, Zhang T, Lu H, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mediates bone resorption in periodontitis. *BMC Oral Health*. 2021;21(1):299. doi: 10.1186/s12903-021-01658-1 EDN: PQNMTI
31. Julie PG, Hong Wang PhD, Michael WE, et al. Effects of sublethal irradiation on murine bone marrow. *Blood*. 2010;116(21):2243. doi: 10.1182/blood.V116.21.2243.2243
32. Peslak SA, Wenger J, Bemis JC, et al. EPO-mediated expansion of late-stage erythroid progenitors in the bone marrow initiates recovery from sublethal radiation stress. *Blood*. 2012;120(12):2501–2511. doi: 10.1182/blood-2011-11-394304
33. Grebnev DYU, Maklakova IYu, Titova DI, Permyakov NS. Geroprotective properties of Fucoxanthin. *Ural'skij medicinskij zhurnal*. 2022;21(5):94–101. doi: 10.52420/2071-5943-2022-21-5-94-101 EDN: AAUPKU
34. Maklakova IYu, Yastrebov AP, Grebnev DYU. Changing of the morphometric and cytological indexes of the spleen in the condition of acute blood loss on the background of stem cells insertion. *Advances in Gerontology*. 2015;28(2):218–221. (In Russ.) EDN: UDENCH
35. Ullio C, Brunk UT, Urani C, et al. Autophagy of metallothioneins prevents TNF-induced oxidative stress and toxicity in hepatoma cells. *Autophagy*. 2015;11(12):2184–2198. doi: 10.1080/15548627.2015.1106662 EDN: WSDMTF
36. Jung CH, Jun CB, Ro SH, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*. 2009;20(7):1992–2003. doi: 10.1091/mbc.e08-12-1249
37. Watson AS, Riffelmacher T, Stranks A, et al. Autophagy limits proliferation and glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia. *Cell Death Discov*. 2015;1:15008-. doi: 10.1038/cddiscovery.2015.8 EDN: BJFFGY
38. Kim KW, Moon SJ, Park MJ, et al. Optimization of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by rapamycin in a murine model of acute graft-versus-host disease. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:202. doi: 10.1186/s13287-015-0197-8 EDN: VFDPAZ
39. Crippa S, Bernardo ME. Mesenchymal stromal cells: Role in the BM niche and in the support of hematopoietic stem cell transplantation. *Hemasphere*. 2018;2(6):e151. doi: 10.1097/HS9.0000000000000151 EDN: CEFCRW
40. Ghanta S, Tsoyi K, Liu X, et al. Mesenchymal stromal cells deficient in autophagy proteins are susceptible to oxidative injury and mitochondrial dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;56(3):300–309. doi: 10.1165/rcmb.2016-00610C

ОБ АВТОРАХ

* Иванов Владислав Александрович;

адрес: Россия, 620028, Екатеринбург, ул. Репина, д. 3;
ORCID: 0000-0002-7475-9517;
eLibrary SPIN: 2915-7500;
e-mail: vianov123@yandex.ru

Гребнев Дмитрий Юрьевич, д-р мед. наук, доцент;

ORCID: 0000-0002-5698-8404;
eLibrary SPIN: 5761-9324;
e-mail: dr-grebnev77@mail.ru

Маклакова Ирина Юрьевна, д-р мед. наук, доцент;

ORCID: 0000-0002-6895-7947;
eLibrary SPIN: 7335-7294;
e-mail: makliu@mail.ru

Полушина Лариса Георгиевна, канд. мед. наук;

ORCID: 0000-0002-4921-7222;
eLibrary SPIN: 4391-5873;
e-mail: polushina-larisa@bk.ru

AUTHORS' INFO

* Vladislav A. Ivanov;

address: 3 Repina st, Ekaterinburg, Russia, 620028;
ORCID: 0000-0002-7475-9517;
eLibrary SPIN: 2915-7500;
e-mail: vianov123@yandex.ru

Dmitry Yu. Grebnev, MD, Dr. Sci. (Medicine), Associate Professor;

ORCID: 0000-0002-5698-8404;
eLibrary SPIN: 5761-9324;
e-mail: dr-grebnev77@mail.ru

Irina Yu. Maklakova, MD, Dr. Sci. (Medicine), Associate Professor;

ORCID: 0000-0002-6895-7947;
eLibrary SPIN: 7335-7294;
e-mail: makliu@mail.ru

Larisa G. Polushina, MD, Cand. Sci. (Medicine);

ORCID: 0000-0002-4921-7222;
eLibrary SPIN: 4391-5873;
e-mail: polushina-larisa@bk.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author