in the field of oral oncology research.

In in vivo model of oral squamous cell carcinoma mesenchymal stem cells transplantation in combination with Cisplatin chemotherapy attenuates tumor growth and improves survival rates. Based on the results of our research we can recommend the start further research to evaluate results of mesenchymal stem cells transplantation in combination with conventional treatment methodology in humans.

Our study evaluated the use of only a combined approach in the management of oral cancer in animals: chemotherapy with concomitant stem cell transplantation. Therefore, for further studies, we recommend the use of stem cells in tumor microenvironment only in combination with chemotherapy.

Evaluation of the effectiveness of using mesenchymal stem cell monotherapy in the management of oral cancer requires further studies.

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო
უნივერსიტეტი
ხელნაწერის უფლებით

მ ა რ ი კ ა ზ უ რ მ უ ხ ტ ა შ ვ ი ლ ი

პირის ღრუს კიბოს მკურნალობა კომბინირებული - ქიმიოთერაპიული და მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების ტრანსპლანტაციის მეთოდებით

მედიცინის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად
წარმოდგენილი
დისერტაციის

ა ვ ტ ო რ ე ფ ე რ ა ტ ი

თბილისი
2020

პირის ღრუსა და ხახის კიბო მსოფლიოში გავრცელების მიხედვით მეთერთმეტე ადგილზეა. 2018 წელს მსოფლიოში პირის ღრუს კიბოს 354 864 ახალი შემთხვევა დაფიქსირდა, აქედან ¾ განვითარებად ქვეყნებში. პირის ღრუს ეპითელური კიბოს მკურნალობა ხდება ქირურგიული ჩარევით, ქიმიოთერაპიით, რადიოთერაპიით. აღნიშნულ მეთოდებს ბევრი უარყოფითი გვერდითი ეფექტი სდევს თან. რადიოთერაპიას შეუძლია გამოიწვიოს ძვლისა და სანერწყვე ჯირკვლების შეუქცევადი დაზიანება. კიბოს მკურნალობასთან დაკავშირებული გვერდითი მოვლენები ღრმა ფსიქოლოგიურ ზემოქმედებას ახდენს პაციენტზე. ამიტომ მუდმივად მიმდინარეობს მკურნალობის ალტერნატიული მიდგომების ძიება ქსოვილოვან, უჯრედულ და მოლეკულურ დონეებზე.

თანამედროვე კვლევებმა აჩვენა, რომ ორგანიზმში შეყვანილ ღეროვან უჯრედებს აქვთ უნარი დაგროვდნენ პირველადი და მეტასტაზური სიმსივნის ზრდის არეში. ბოლო წლებში მრავალი კვლევა ჩატარდა სიმსივნის ზრდის პროცესზე მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების როლის დასადგენად, მაგრამ გამოქვეყნებული შედეგები ძალიან წინააღმდეგობრივია. ზოგიერთი კვლევით დადგინდა რომ ლოკალურად შეყვანილი მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედები ურთიერთქმედებენ მასპინძელ უჯრედებთან, იმუნურ უჯრედებთან და ამცირებენ ანთებითი ციტოკინების რაოდენობას. სხვა კვლევის მიხედვით მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედები ახდენენ პირდაპირი ან არაპირდაპირი გზით სიმსივნური უჯრედების პროლიფერაციის, დიფერენციაცის, იმუნური ტოლერანტობის, ანგიოგენეზის და მეტასტაზირების რეგულირებას. თუმცაღა, ღეროვანი უჯრედების სიმსივნეზე ზემოქმედების კონკრეტული მექნიზმები ჯერ კიდევ

tumor tissue growth.

Conclusions

- New oral squamous cell carcinoma *in vivo* model established by us is technically easy feasible and acceptable. This model represents exact picture of specific tissue lesions as well as imitates the functional in vivo picture of disease.
- Locally injected mesenchymal stem cells accumulate in tumor tissues. While systemicallyadministrated mesenchymal stem cells, transfused in tail vein did not underwent homing in tumor tissues.
- Mesenchymal stem cells transplantation in combination with cisplatin chemotherapy, significantly attenuates tumor growth, which leads to increased survival rates and life expectancy of experimental animals.
- Mesenchymal stem cells implantation in tumor tissues increases angiogenesis, which leads to decreased tissue hypoxia.
- Mesenchymal stem cells transplantation with concurrent chemotherapy increases tumor cell apoptosis. This finding can be explained by better distribution of cisplatin due to increased vascularization.

Practical recommendations

Oral squamous cell carcinoma athymic mouse model established by us is significant and useful research method. This model can be used

One of the important aspects of mesenchymal stem cells and tumor cells interaction is the possible action of stem cells on tumor cell apoptosis. It is well known that in tumor cells, which already underwent DNA damage, apoptosis induction is suppressed. This increases cell viability. In malignant tumor cells cell cycle down regulatory agents are less active (or suppressed). In recent study was demonstrated that apoptotic death level in tumor cells was significantly increased after mesenchymal stem cells transplantation. Cell cycle analysis showed tumor cell accumulation mostly in G_0/G_1 phase. RT-PCR analysis also confirmed changes in cell cycle. Authors suggest that apoptosis is associated with p21 and caspase 3 gene expression. Other studies suggest that mesenchymal stem cells inhibitory effects can be associated with FasL-induced apoptosis and cell cycle arrest. Despite of published data further studies are still needed to clear mechanisms of proliferative and inhibitory activity of mesenchymal stem cells.

Cisplatin is used in cancer therapy to induce tumor cell death. Depending on cell type and concentration, cisplatin induces cyto-toxicity and in addition, it damages tumors via induction of apoptosis, mediated by the activation of various signal transduction pathways. The results of our investigation of apoptosis in different experimental groups demonstrated that in animals treated with cisplatin plus MSCs injection the apoptosis value in tumor tissues is significant higher than in the group treated only with Cisplatin. This finding can be explained by better distribution of Cisplatin due to increased vascularization.

In conclusion, our study demonstrates that intra-tumorally in-jected MSCs reduce inflammation, increase micro-vascularization, and minimize hypoxia of orthotopic OSCC tissues. Moreover, combined treatment with Cisplatin leads to higher apoptotic activity and reduced

ბოლომდე არაა ნათლად დადგენილი და დამატებითი კვლევების წარმოებას საჭიროებს.

კვლევის ჰიპოთეზა, მიზნები და ამოცანები

ყოველივე ზემოთქმულიდან გამომდინარე ჩამოვაყალიბეთ საკვლევი ჰიპოთეზა, რომ მეზენქიმურ ღეროვან უჯრედებს ცისპლატინთან კომბინაციაში შეუძლია პირის ღრუს კიბოს ზრდასა და გავრცელებაზე ზეგავლენის მოხდენა და გადავწყვიტეთ ექსპერიმენტში შეგვესწავლა მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების როლი პირის ღრუს კიბოს მიმდინარეობის პროცესში. გამოთქმული ჰიპოთეზის მიხედვით მიზნად დავისახეთ დაავადების ქსენოგრაფტული მოდელის შექმნა ლაბორატორიულ ცხოველებში და შექმნილ მოდელში მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების ტრანსპლანტაციის შეფასება, როგორც პოტენციური ალტერნატიული/დამხმარე თერაპიული მეთოდისა პირის ღრუს ლორწოვანის სიმსივნური პათოლოგიების დროს.

დასახული მიზნის მისაღწევად ჩამოვაყალიბეთ შემდეგი ამოცანები:

- დაავადების სტანდარტიზებული მოდელის შექმნა ლაბორატორიული ცხოველების პირის ღრუში, ადამიანის დაბალდიფერენცირებული ბრტყელეპითელური კიბოს უჯრედების იმპლანტირების გზით (ქსენოგრაფტული მოდელი).
- მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების (მღუ) იზოლაციისა და კულტივაციის სტანდარტიზაცია;

- ცხოველის ქიმიოთერაპია დაწყებული სიმსივნის აღმოცენებიდან, ცხოველის ექსპერიმენტიდან გამოყვანამდე პროტოკოლით გაწერილ ვადებში. ქიმიოთერაპიის პარალელურად მღუ-ს ტრანსპლანტაცია ინტრავენურად და კიბოს მომიჯნავე ჯანმრთელ ქსოვილში;
- ინტრავენურად და ლოკალურად შეყვანილი მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების მიგრაციისა და ლოკალიზაციის დადგენა ბიოლუმინესცენტური ანალიზის საშუალებით;
- ცხოველების კლინიკური პარამეტრებისა და სიცოცხლის ხანგრძლივობის შეფასება;
- მიღებული ქსოვილოვანი მასალების მორფოლოგიური და მოლეკულურ - ბიოლოგიური ანალიზი;
- შედეგების სტატისტიკური ანალიზი.

კვლევის მნიშვნელობა და სიახლე

- ჩატარებული კვლევის შედეგად შეიქმნა პირის ღრუს სქუამოზური კიბოს ეფექტური ქსენოგრაფტული მოდელი ცხოველში, რომელიც ტექნიკური შესაძლებლობის თვალსაზრისით იოლად განხორციელებადია და მისი გამოყენება წარმატებით შეიძლება ონკოლოგიური კვლევებისათვის.
- ექსპერიმენტში პირველად შესწავლილ იქნა ქიმიოთერაპიის და მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების ტრანსპლანტაციის კომბინაციის გავლენა პირის ღრუს კიბოს მიმდინარეობაზე. ასევე მოხდა მკურნალობის პროცესში ქიმიოთერაპიასთან კომბინაციაში მღუ-ს ტრასპლანტაციის, როგორც დამხმარე/დამატებითი

samples with TUNEL. Apoptotic cells are represented by a green color, while the nuclei of viable cells by blue. The observation demonstrated low or no apoptotic activity in the control group. In the Cisplatin + MSC-treated animals, tumor tissues more often presented with apoptotic cells. Viable cell communities in the tumor tissue mass presented as small isles whereas necrotic areas created “dark” areas, where neither apoptotic cell (green) nor viable cell (blue) fluorescent signals were detected.

Discussion

The results derived from some studies showed that MSCs affect tumor angiogenesis, by the ability to increase significantly the number of α-SMA-positive cells as well as by secreting proangiogenic factors and differentiation into endothelial cells.In contrast with these results, a recent study demonstrated that the MSCs under certain conditions can be capable of inhibiting capillary growth.We demonstrated that in cases of MSCs in- tra-tumoral injection there were strongly developed micro-vessel structures in contrast to the group without MSCs injection where no significant level of microangiogenesis was demonstrated. We have also studied the hypoxia status of tumor tissues, which is important in tumorigenesis since it has been reported that intra-tumoral hypoxia activates hypoxia-inducible factors (HIFs) and this way promotes the metastatic process. Our results of micro-vessel formation and hypoxia studies demonstrated the link between hypoxia and the status of angiogenesis: increased vascularization leaded to improvement of tissue oxygenation and a decrease of hypoxia status.

To evaluate the influence of MSCs on angiogenesis, tumor tissues were tested for CD31 endothelial cell marker. IHC survey demonstrated no significant micro-vascularization values in the tumor tissues of both the control and Cisplatin-treated animal groups, while in the MSC injected group, IHC showed strongly developed micro-vessel structures in tumor tis- sues after three weeks of treatment. No expression of CD31 was detected in tumor tissues after four days of MSC intra- tumoral injection. To quantify the vascular density in tissues, the ImageJ software program was used. We have performed anti-CD31 staining without counterstaining (hematoxylin). Minimal staining color intensity was taken, and the areas of three stained slides were digitally calculated with software. According to this study, 4.5 ± 1.3% of MSC injected tissue area was positive to CD31 staining, whereas vascular density was 0.4 ± 0.3% and 0.4 ± 0.1% in control and Cisplatin-treated tissues, respectively.

We investigated the status of hypoxia in the same tissues. Tumor tissues testing for carbonic anhydrase with anti-carbonic anhydrase 9 showed sever hypoxia in the control and cisplatin- treated groups, while in the group of Cisplatin + MSC- treated animals, the hypoxia status of tumor tissues was minimal and presented as small isles of hypoxia. To quantify the hypoxia in tissues, the ImageJ software program was used. Minimal staining color intensity was taken, and the areas of three stained slides were digitally calculated with software. Analysis demonstrated significantly reduced (≈ 8 fold) reduction of tissue hypoxia in Cisplatin + MSC-treated animal tumors (11.2 ± 7.5% of tissue area), compared to control (83.6 ± 7.2%) and Cisplatin (70.8 ± 8.2%) treated tissues.

As the morphological analysis revealed necrotic areas in the tumor tissues, we decided to investigate the apoptotic activity in these

მეთოდის, გამოყენების ეფექტურობისა და მიზანშეწონილობის შეფასება.

დასაცავად გამოტანილი დებულებები

კვლევის შედეგების ანალიზის შედეგად გაკეთებული დასკვნების საფუძველზე ნაშრომში დასაცავად გამოტანილია შემდეგი დებულებები:

- ჩვენ მიერ შექმნილი ქსენოგრაფტული მოდელი ასახავს როგორც ქსოვილის სპეციფიკური დაზიანების მორფოლოგიურ სურათს, ასევე გარკვეულწილად, ქმნის დაავადების ფუნქციურ იმიტაციას. მოდელის გამოყენება შესაძლებელია პირის ღრუს კიბოს ექსპერიმენტული კვლევებისათვის.
- ლოკალურად ინექცირებული მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედები ლაგდებიან სიმსივნურ ქსოვილში. სისტემურად, კუდის ვენიდან ინფუზირებული ღეროვანი უჯრედების აღმოჩენა კი მოხდა მხოლოდ ფილტვებსა და თირკმელებში.
- მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების იმპლანტაცია პირის ღრუს სქუამოზური კიბოს ქსოვილში ცისპლატინით მკურნალობის ფონზე, მნიშვნელოვნად ამცირებს სიმსივნის ზომაში ზრდის პროცესს, რის შედეგადაც საგრძნობლად მატულობს ამ ცხოველების სიცოცხლის ხანგრძლივობა.
- მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების ტრანსპლანტაციისა და ქიმიოთერაპიის კომბინაციით სიმსივნის ზომაში ზრდის პროცესის დათრგუნვის უკეთესი მაჩვენებელი მხოლოდ ქიმიოთერაპიასთან შედარებით, განპირობებულია კიბოს ქსოვილის აპოპტოზური აქტივობის ზრდით.

კვლევის მეთოდოლოგია, მეთოდიკა, მეთოდები

კვლევა, მისი მიზნებიდან გამომდინარე, ორ ძირითად ეტაპს მოიცავდა: თავდაპირველად შეიქმნა პირის ღრუს კიბოს in vivo მოდელი ცხოველებში და შეფასდა მისი გამოყენებადობა. მომდევნო ეტაპზე კი ჩვენ მიერ შემუშავებული მოდელის შექმნის სტადარტიზებული მეთოდოლოგიით ცხოველებში გამოწვეული იქნა პირის ღრუს კიბო და ჩატარდა ქიმითერაპია და ექსპერიმენტული კომბინირებული მკურნალობა.

პირის ღრუს კიბოს in vivo ექსპერიმენტული მოდელის შექმნა

იმისათვის, რომ შეგვესწავლა პირის ღრუს კიბოს მახასიათებლები სხვადასხვა ფაქტორების ზემოქმედების ქვეშ, მიზნად დავისახეთ სტანდარტიზირებული ონკოლოგიური მოდელის შექმნა. იმის გათვალისწინებით, რომ პირის ღრუს ავთვისებიანი სიმსივნეების 90%-ს წარმოადგენს სქუამოზური უჯრედოვანი კიბო, ჩვენ შევეცადეთ ლაბორატორიულ თაგვებში შეგვექმნა სწორედ პირის ღრუს სქუამოზური კიბოს მოდელი. ონკოლოგიური მოდელის შესაქმნელად გამოვიყენეთ Nu/Nu ხაზის ათიმური (თიმუსის გარეშე) თაგვები (Nu/Nu Nude Mouse, Charles River, Wilmington, USA). ამ ხაზის თაგვებს არ აქვთ თიმუსი, არ ხდება მათი T-უჯრედების თიმუსდამოკიდებული მომწიფება, რაც იწვევს იმუნური სისტემის მოქმედების ნაწილობრივ შეზღუდვას. ასევე ამ ხაზის ცხოველებს არ აქვთ ბეწვი და ხშირად მოიხსენებენ როგორც "შიშველ" უბეწვო თაგვებს. ასეთი იმუნოდეფიციტური ცხოველები განსაკუთრებით მისაღებია ქსენოგრაფტული ონკოლოგიური მოდელების შესაქმენლად

value of tumor growth was with more than 30 mm^3 less compared to other groups) (*statistically not significant*), while no difference in size between tail vein and control group was revealed. In the group treated with Cisplatin (Cis+ MSC), the average size of tumors was 98.9 ± 7.65 mm^3, which was significantly different compared to Cisplatin only (148.6 ± 10.15) and control (171.4 ± 13.76) groups.

Morphological analysis

Morphological assessment in the control group showed the presence of invasive cancer that had developed in mucosal and submucosal layers, which had peripherally spread to other oral tissue structures. Squamous cell carcinoma presented as homogenous parenchyma consisting of low-differentiated, polymorphic cells. It was characterized by a sarcomatoid growth pattern and was out- lined with a connective tissue shell—"capsule". For better observation of cancer epithelium, we utilized immunohistochemical staining using anti-human epithelial cell antigen antibody, which positively stained OSCCs. Normal epithelium of mice was devoid of staining. The same morphological features as seen in the control group were found in the group that had MSCs injected into mouse tail veins. In the group of intra-tumoral injection of MSCs, the tumor tissues presented with a more organized architectural structure were poorly outlined and revealed the existence of connective tissue basal layers.

In the Cisplatin-treated group, the morphological picture of the tumors was like the ones in the control group, while in the Cisplatin-treated + MSCs intra-tumorally injected group the tumor tissues were less outlined and the presence of necrotic areas were detected.

concurrent with Cisplatin. The life expectancy of all 15 mice (100%) was 6 weeks.

Statistical analysis of survival rates in different groups was made using the GraphPad Prism™ 5 software (GraphPad Software) and survival curves were constructed by using the Kaplan–Meier method. Despite the fact that the results were not statistically significant (because of small number of data) clear tendency of better survival rates in animals injected in tumor tissues with MSCs was observed.

Bioluminescent analysis of mesenchymal stem cells transplanted in experimental animals

In order to investigate biodistribution of mesenchymal stemm cells transplanted in experimental animals, luminescent visualization of stem cells transduced by Luciferase was performed. Luminescent examination showed that in luminescent signal was not detectable in the tumor area in the animal group where stem cells were injected intravenously into the tail vein. A soft luminescent signal was detected in lungs and kidneys. In the case of locally injected MSCs, luminescent analysis showed concentrations of MSCs in the tumor area.

In vivo Tumor growth after mesenchymal stem cells transplantation

After the animals were sacrificed, tumor tissues were collected and their volume was calculated. The group with MSC inoculum in the tumor showed marked difference in the size of the tumor. The average

In vivo ონკოლოგიური მოდელის შესაქმნელად გამოყენებულ იქნა ადამიანის პირის ღრუს სქუამოზური (ბრტყელეპითელური) კიბოს (პსკ) უჯრედები, რომელთა კულტივაცია ჩატარდა სტანდარტული მეთოდით და იმპლანტირებული იქნა ცხოველის პირის ღრუში

სიმსივნური უჯრედების სუსპენზიის შეყვანა ლაბორატორიულ ცხოველებში (სულ 10 ცხოველი) განხორციელდა ინჰალაციური ზოგადი ანესთეზიის ქვეშ (პრეპარატი იზოფლურანი). გამოყენებული იქნა 26 G საინექციო ნემსი. პირის ღრუში უჯრედების ინექცია შესრულდა ლოყის არეში ლორწოვანი გარსის სუბმუკოზურ შრეში.

ექსპერიმენტი გაგრძელდა 3 კვირა. 21 დღის შემდეგ ცხოველები გამოყვანილი იქნა ექსპერიმენტიდან. შემდეგ მოხდა განვითარებული სიმსივნის ინსპექცია და წარმოქნილი სიმსივნის ფოტოდოკუმენტირება. გაკვეთის შედეგად ჩატარდა წარმოქმნილი სიმსივნის ამოკვეთა ჯანსაღ ქსოვილებამდე , მოცულობაში გაზომვა და ნიმუშების შენახვა ფორმალდეჰიდში შემდგომი კვლვებისათვის. ასევე დათვალიერდა მეზობელი და მოშორებული ორგანოები მეტასტაზური წარმონაქმნების აღმოსაჩენად, რომელთა რეზექცია და ქსოვილოვანი პრეზერვაცია ასევე განხორციელდა შემდგომი კვლევებისათვის.

ფორმალდეჰიდში ფიქსაციის შემდეგ განხორციელდა ქსოვილების დეჰიდტრაცაია აღმავალი კონცენტრაციის ეთილის სპირტის ხსნარებით და მათი ჩაყალიბება პარაფინში. მიღებული ნიმუშები დაიჭრა მიკროტომით და განთავსდა სასაგნე მინებზე. მომდევნო ეტაპზე მოხდა ნიმუშების დეპარაფინიზაცია და რეჰიდრატაცია ქსილოლის ხსნარში

და აღმავალი კონცენტრაციის ეთილის სპირტის ხსნარებში. ქსოვილთა ნიმუშები მორფოლოგიური კვლევისათვის შეღებილი იქნა ჰემატოქსილინ-ეოზინით. სხვადასხვა მოლეკულური მარკერების ექსპრესიის გამოსავლენად გამოყენებული იქნა იმუნოჰისტოქიმიური შეღებვის სტანდარტიზებული მეთოდი, სხვადასხვა ანტისხეულების გამოყენებით. თაგვის ანტი-Ki67 ანტისხეულები გამოყენებული იქნა პროლიფერაციული აქტი-ვობის დასადგენად, ბოცვრის ანტი-CD31 - ვასკულარიზაციის შესასწავლად და ბოცვრის ანტი-ადამიანის ეპითელური უჯრედის ანტიგენი კი - კიბოს უჯრედების ვიზუალიზაციისთვის. მეორეული ანტისხეულებით ინკუბაციის შემდეგ, ცილის სპეციფიკური გამოხატვა დაფიქსირდა პეროქსიდაზას რეაქციით. შედეგების რაოდენობრივი დაზუსტება (ქვანტიფიკაცია) განხორციელდა ImageJ პროგრამული უზრუნველყოფის გამოყენებით.

სტანდარტული (ქიმიოთერაპია) და ექსპერიმენტული (ქიმიოთერაპია მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების ტრანსპლანტაციასთან კომბინაციაში) მკურნალობის დიზაინი

ექსპერიმენტები განხორციელდა ჩვენ მიერ შემუშავებული პირის ღრუს სქუამოზური კიბოს მოდელში. კვლევისათვის გამოყენებულ იქნა Nu/Nu ხაზის ათიმური (თიმუსის გარეშე) „შიშველი“ (უბეწვო) ლაბორატორიული თაგვები (Nu/Nu Nude Mouse, Charles River, Wilmington, USA). ექსპერიმენტული ცხოველები დაიყო ერთ საკონტროლო და 2 საკვლევ ჯგუფად. საკონტროლო და პირველ საკვლევ ჯგუფში განაწილდა 15-15 ცხოველი, ხოლო მეორე საკვლევ ჯგუფში — 30 ცხოველი და ჯგუფი გაიყო 2 ქვეჯგუფად (ცხრილი #7). თაგვის პირის ღრუში კიბოს უჯრედების

Figure 2 analyze demonstrated positivity of stem cells absolute majority to mesenchymal markers and negativity to hematopoietic markers (data not shown).

Cisplatin in vitro effect on cancer cells

In order to assess the activity of chemotherapy agent cisplatin against cancer cells used in our experiments, in vitro vitality and growth assay was performed. Cell staining (trypan-blue) demonstrated that only 62% (±2.5%) of cells were viable 24 hours after 0.5 mcg/mL cisplatin administration. 24 hours after 0.25 mcg/mL cisplatin administration the viability of cells was 78.2 ± 1.8% (in both cases $P < .05$) (data not shown). Cell growth was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra- zolium bromide (MTT) chemical agent. Cell expressed formazan solubilization was performed by isopropyl alcohol. The optical ratio was measured with a microplate reader at 570 nm wavelength. 24 hours after 0.25 mcg/mL cisplatin administration cancer cells growth was 80% and after 48 hours - 65%. After 0.5 mcg/ mL Cisplatin action, cell growth was 68% (after 24 hours) and - 58% (after 48 hours) ($P < .05$) (data not shown).

Survival analysis

Only 40% of the population in the control group had a life expectancy of 6 weeks. Having learned about the physical condition of 2 animals, they were excluded from the experiment. In the group of experimental animals that were injected with cisplatin, one mouse died on the 3rd day after the start of chemotherapy, and the other - on the 6th week. Life expectancy of 60% of the animals was 6 weeks. Different picture was observed in the group of mice were MSC were injected

detect human cancer (epithelial) cells in mice organism. This experiment clearly revealed human origin of the invasive cancer and metastatic tissues.

Proliferation activity assessment

One of the main characteristics of cancer aggressiveness is a proliferation activity of tumor cells. To analyze proliferation of the *in vivo* grown tumors, we carried out immunohistochemistry experiments using anti-Ki67 antibody. This study revealed moderate proliferation activity of orthotopic OSCC cells. To identify proliferation rate of these tumors, quantification of imunohistochemical data for each specimen was performed. We have counted mitotic cells in three different random microscopic ocular fields (200x magnification) and calculated overall mean number of proliferative cells. Our analysis revealed proliferation rate of cancer cells with 55,7 ± 4,7 mitotic cells/microscopic field (mean ± standard error of the mean).

Vascularisation of oral squamous cell carcinoma

One of the most important pathophysiological factors in neoplasia is a vascular development of the malignant tissue. To analyze the micro vessel density of the *in vivo* grown OSCC tissues, we utilized immunohistochemistry assay using anti-CD31 antibody. With this marker of endothelial cells, we have identified week development of vascular architecture in these orthotopic tumors). As for comparison we can see healthy oral mucous vascular structure of the mouse.

Phenotype assay of stem cells

Phenotype assay was performed by FACS analyze. As shown on

იმპლანტაციიდან, წარმოქმნილი სიმსივნის ვიზუალიზაციის-თანავე, ორივე საკვლევი ჯგუფის ცხოველებში (n= 45) განხორციელდა ქიმიოთერაპიული საშუალება ცისპლატინის (დოზით: 5 მგ/კგ, ყოველი 10 დღის განმავლობაში) ინტრაპერიტონული ინექცია (სულ 3 ინექცია). კიბოს უჯრედების იმპლანტაციიდან 3 კვირის შემდეგ მესამე საკვლევ ჯგუფში, პირველ ქვეჯგუფში (n= 15) განხორციელდა კულტივირებული მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების ინფუზია თაგვის კუდის ვენაში (1 x 10^6 უჯრედი / 150 მკლ PBS სუსპენზია), ხოლო მეორე ქვეჯგუფში (n=15) სუსპეზიის ინექცია უშუალოდ სიმსივნურ უბანში (1 x 10^6 უჯრედი / 150 მკლ PBS სუსპენზია). საკონტროლო და პირველ საკვლევ ჯგუფში გამოყენებულ იქნა მხოლოდ PBS-ის ხსნარის ინექცია სიმსივნურ ქსოვილში, ღეროვანი უჯრედების გარეშე. ექსპერიმენტი გაგრძელდა 6 კვირა (ან ცხოველის დაღუპვამდე/მდგომარეობის უკიდურესად დამძიმებამდე), რის შემდეგაც ყველა ცხოველი გამოყვანილ იქნა ექსპერიმენტიდან. ჩატარდა ცხოველების სიცოცხლის ხანგრძლივობის სტატისტიკური ანალიზი. ცხოველთა ევთანაზიის შემდეგ, განხორციელდა სიმსივნური ქსოვილების ამოკვეთა და მოცულობითი მასის გამოთვლა (სიგრძე X სიგანე X სიმაღლე).

ფორმალდეჰიდში ფიქსაციის შემდეგ განხორციელდა ქსოვილების დეჰიდტრაცაია აღმავალი კონცენტრაციის ეთილის სპირტის ხსნარებით და მათი ჩაყალიბება პარაფინში. მიღებული ნიმუშები დაიჭრა მიკროტომით და განთავსდა სასაგნე მინებზე. მომდევნო ეტაპზე მოხდა ნიმუშების დეპარაფინიზაცია და რეჰიდრატაცია ქსილოლის ხსნარში და აღმავალი კონცენტრა-ციის ეთილის სპირტის ხსნარებში. ქსოვილთა ნიმუშები მორფოლოგიური კვლევისათვის შეღებილი იქნა ჰემატოქსილინ-

ეოზინით. სხვადასხვა მოლეკულური მარკერების ექსპრესიის გამოსავლენად გამოყენებული იქნა იმუნოჰისტოქიმიური შეღებვის სტანდარტიზებული მეთოდი, სხვადასხვა ანტისხეულების გამოყენებით.

მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების გამოყოფა და კულტივაცია

მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედები იზოლირებული იქნა C57BL / 6N ხაზის თაგვებისაგან (Charles River, USA) (n=30). გამოყენებული იქნა ბარძაყისა და წვივის ძვლების ძვლის ტვინი. აღნიშული კომპაქტური ძვლები გათავისუფლდა მფარავი რბილი ქსოვილებისაგან, მოხდა ძვლების ეპიფიზების მოკვეთა და ძვლის ტვინის გამორეცხვა PBS ხსნარით. მიღებული სუსპენზიიდან თაგვის ძვლის ტვინის მონონუკლეარული უჯრედები იზოლირებული იქნა Ficoll- ის გრადიენტის საშუალებით. შემდეგ უჯრედები მოთავსდა მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების საკულტივაციო სპეციალურ ნიადაგზე (α-MEM) და განხორციელდა უჯრედების კულტივაცია სტანდარტულ პირობებში (37 ° C ტემპერატურაზე ტენიან გარემოში 5% CO2 და 95% ჰაერის ატმოსფეროში). პირველი სამი დღის განმავლობაში არა-ადჰეზიური უჯრედების მოცილების მიზნით ყოველდღიურად იცვლებოდა კულტურის ნიადაგი. ექსპერიმენტებში გამოყენებული იქნა მხოლოდ ადჰეზიური უჯრედები, კულტივირებული არაუმეტეს ოთხი პასაჟისა. საბოლოოდ ტრასფუზიისათვის მომზადდა PBS ხსნარში მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების სუსპენზია (1 მლნ. უჯრედი / 150 მკლ PBS-ში), რომლის ინექცია განხორციელდა ლოკალურად სიმსივნის პარენქიმაში. საკონტროლო თაგვებში ჩატარდა მხოლოდ PBS-ის ინფუზია.

demonstrated different pattern of growth by the time. By the end, 8 from the 10 mice displayed orthotopic formation of the tumor (80%). In two animals there were no visual signs of tumor. After 3 weeks of growth, tumors have been resected and their volume calculated (LxWxH). The mean volume of these 8 studied tumors in 3 weeks was 146mm³. We have also studied dissemination of the cancer in nude mice. 5 from 8 animals (62%) displayed metastatic growth of cancer cells in neighbor and extended organs (including liver n=1, and lung n=1).

Morphology of the intact/healthy mouse oral cavity was exposed by normally arranged different tissue layers, with well-structured keratin nests and squamous cell islets. Hematoxylin-Eosin staining displayed invasive cancer cells developed in mucosa and submucosa layers of the oral cavity, which peripherally demonstrated growth into the mouth tissue structures. Orthotopic tumor tissues consisted with lowly differentiated, polymorphic cells, creating homogenic parenchymal which was characterized with sarcomatoid pattern of growth and was partly encapsulated with connective tissue. Remarkably we also observed strong local inflammatory cell infiltration at the peripheral parts of the cancer tissues. As it is known malignancies of oral cavity are used to invade in peripheral nerve fibers, which is followed by pain syndrome and several innervation related dysfunctions. Interestingly we revealed direct contact of HSCCs to the peripheral nerves of the mouth.

Orthotopic and metastatic tumor verification

To verify our morphological observation, we performed immunohistochemistry analysis of orthotopic cancer and metastatic (liver) tissues using anti-Human Epithelial Cell Antigen antibody. This antigen is only expressed in human epithelial cells. Thus with this marker we could

incubation with secondary antibodies, specific protein expression was observed by peroxidase reaction. Quantification of results was performed using ImageJ software (NIH). Immunofluorescent analysis (TUNEL assay, Abcam) was also performed to detect apoptotic cells in tissue sections.

Statistical analysis

The parametric and non-parametric statistical analyses were done by Student's and Mann-Whitney tests using the GraphPad PrismTM 5 software (GraphPad Software). Results are presented as mean ± SD. Each experiment represents a minimum of three performed. Statistical analysis of survival rates in different groups was made using the Kaplan-Meier method (GraphPad Software).

Ethical statement

All "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No. 86-23 revised 1985) were followed as well as all statements in regard to the national law on the Protection of Animals. All surgical interventions on animals were conducted under general anesthesia. All pricipals of aseptic and antiseptic were strictly followed.

Results and discussion

Results of *in vivo* oral squamous cell carcinoma model

Approximately 2 weeks after the HSCCs transplantation, tumors were visible from the external side of the mice “cheek”, which

გამდინარე ციტომეტრია (flow cytometry)

მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების მიერ სხვადასხვა მარკერების ექსპრესიის მიზნით ჩატარდა გამდინარე ციტომეტრია. გამოყენებული იქნა ისეთი მონოკლონური ანტისხეულები როგორიცაა: ანტი CD45 FITC, CD34 FITC, CD90 PE, CD105 FITC, CD44 FITC.

ინ ვიტრო სიცოცხლისუნარიანობის და ზრდის ექსპერიმენტი

იმისათვის, რომ შეგვეფასებინა ქიმიოთერაპიული მედიკამენტ, ცისპლატინის ზემოქმედება ჩვენს მიერ ექსპერიმენტში გამოყენებული კიბოს უჯრედებზე, განხორციელდა *in vitro* სიცოცხლისუნარიანობის და ზრდის კვლევა. გამოყენებული იქნა ცისპლატინის ორი სხვადასხვა დოზა (0,25 მკგ/მლ და 0,5 მკგ/მლ). უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა განისაზღვრა ტრიპან ბლუს-შეღებვის მეთოდით, ხოლო უჯრედების ზრდა MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ქიმიური აგენტის გამოყენებით.

***In vivo* ბიოლუმინესცენტური ანალიზი**

თავდაპირველად ჩატარდა თაგვის მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების ინკუბაცია ადენოვირუსული ვექტორით, რომელიც ახდენდა ლუციფერაზას ექსპრესიას 5000 ვპ / უჯრედში. ინკუბაცია გაგრძელდა 6 საათის განმავლობაში, შრატისგან

თავისუფალ გარემოში. შემდეგ კულტურას დაემატა შრატის შემცველი ნიადაგი. ვიზუალიზაციის დაწყებამდე ჩატარდა D-ლუციფერინის (Caliper Life Sciences, ქსენოგენი, ჰოპკინტონი, MA) ი.პ. ინექცია (3 მგ). D-ლუციფერინის ადმინისტრირებიდან 15 წუთის შემდეგ შესრულდა ბიოლუმინესცენციის დოკუმენტირება ულტრა დაბალი ხმაურის, მაღალი მგრძნობელობის, გაგრილებად CCD კამერით. სიგნალის მონიტორინგი ჩატარდა Living Image® პროგრამული უზრუნველყოფის პროგრამით (Caliper Life Sciences, Xenogen). ლუმინესცენციის სურათები გადაღებულია დორსალური და ვენტრალური ხედებიდან 2 წუთიანი ექსპოზიციით. ოპტიკური სიგნალის თაგვის სხეულში ლოკაციის გაადვილების მიზნით განხორციელდა მიღებული ფოტოგრაფიული და ფსევდოფერადი ლუმინესცენტური გამოსახულებების ზედდება. ოპტიკური სიგნალი გამოხატული იქნა როგორც ფოტონის ინტენსივობა, ფოტონების რაოდენობით ერთ წამში.

ქსოვილების მორფოლოგიური ანალიზი

ფორმალდეჰიდში ფიქსაციის შემდეგ განხორციელდა ქსოვილების დეჰიდტრაცაია აღმავალი კონცენტრაციის ეთილის სპირტის ხსნარებით და მათი ჩაყალიბება პარაფინში. მიღებული ნიმუშები დაიჭრა მიკროტომით და განთავსდა სასაგნე მინებზე. მომდევნო ეტაპზე მოხდა ნიმუშების დეპარაფინიზაცია და რეჰიდრატაცია ქსილოლის ხსნარში და აღმავალი კონცენტრაციის ეთილის სპირტის ხსნარებში. ქსოვილთა ნიმუშები მორფოლოგიური კვლევისათვის შეღებილი

method while cell growth by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) chemical agent (Sigma-Aldrich, Germany). Cell expressed formazan solubilization was performed by isopropyl alcohol. The optical ratio was measured with a microplate reader (Thermo Scientific) at 570 nm wavelength.

In vivo bioluminescent analysis

In order to assess the localization of mesenchymal stem cells, in vivo bioluminescent analysis of laboratory mice was performed utilizing stem cells infected with retroviral luciferase vector (Technische Universität München, Munich, Germany). Transient transpection with retroviral vector was performed by LipofectAMINE 2000. The retrovirus-containing supernatant was used to infect stem cells. After 48 hours, the transduced cells were selected by 1 g/ml G418 containing cell medium. In vivo bioluminescence documentation was performed with ultra low-noise, high sensitivity cooled CCD camera. Signal monitoring was done with Living Image ® software program. After MSC implantation, D-luciferin was administrated i.p. (3mg/mouse) to anesthetized mice. 15 minutes after D-luciferin administration, luminescence pictures were captured from both dorsal and ventral views.

Morphological analysis

Paraffin-embedded tissue sections (2-3 μm thick) were de-paraffinized in Xylene and rehydrated in progressively decreasing concentrations of ethanol. For tissue morphological assay, hematoxylin-eosin staining was utilized. For specific molecular expression assay, a standardized immunohistochemical staining method was used. As primary antibodies, rabbit anti-CD31 (1:100), rabbit anti-carbonic anhydrase 9 (1:100) (all from Abcam, Cambridge, UK) were used. After

incubation with secondary antibodies, specific protein expression was observed by peroxidase reaction.

Primary mesenchymal stem cells isolation and cultivation

Mesenchymal stem cells were isolated from the femoral and tibial bone marrow of C57BL/6N mice (Charles River, USA) (n = 8). Bone marrow mononuclear cells were isolated by Ficoll gradient and re-suspended in a MSC medium: alpha-minimum essential medium (α-MEM) (Gibco/Invitrogen). Cells were maintained at 37°C in a humid chamber with 5% CO2 and 95% air atmosphere. Culture medium was changed daily during the first three days to remove non-adherent cells. In the experiments, only adherent cells cultured for no more than four passages were used.

Flow cytometry

To verify phenotype of MSC, flow cytometry assessment method was applied (using "Human Mesenchymal Stem Cell Verification Flow Kit" (R&D), University Hospital TSU). According to this analysis, cultured cells were positive to CD90, CD73, CD105, CD44 and negative to CD45, CD34, CD11b, CD79A, HLA-DR surface molecules expression (data not shown). Utilizing these methods, we used two out of three standards of minimal criteria for MSC identification.

***In vitro* vitality and growth assay**

In order to test efficacy of chemotherapy agent Cisplatin on cancer cells used in our experiments we performed *in vitro* vitality and growth assay. Two different doses of Cisplatin (0.25 and 0.5 μg/mL) were utilized. Cell vitality was determined by the trypan-blue staining

იქნა ჰემატოქსილინ-ეოზინით. სხვადასხვა მოლეკულური მარკერების ექსპრესიის გამოსავლენად გამოყენებული იქნა იმუნოჰისტოქიმიური შეღებვის სტანდარტიზებული მეთოდი, სხვადასხვა ანტისხეულების გამოყენებით. ანგიოგენეზის შესასწავლად გამოყენებული იქნა თაგვის *Anti-CD31* ანტისხეულები; ჰიპოქსიის შესასწავლად - ანტი-კარბო ანჰიდზრაზა 9 ანტისხეულები; მეორეული ანტისხეულებით ინკუბაციის შემდეგ, ცილის სპეციფიკური გამოხატვა დაფიქსირდა პეროქსიდაზას რეაქციით. შედეგების რაოდენობრივი დაზუსტება (ქვანტიფიკაცია) განხორციელდა ImageJ პროგრამული უზრუნველყოფის გამოყენებით. ასევე ჩატარებულ იქნა იმუნოფლუორესცენტული გამოკვლევა ქსოვილში აპოპტოზური უჯრედების დასადგენად. აპოპტოზურ უჯრედებში დნმ-ის ფრაგმენტების 3'-OH დაბოლოებების ვიზუალიზაციისათვის გამოვიყენეთ ტერმინალ დეოქსინუკლეოტიდილ ტრასფერაზა (TdT) გაშუალებული დეოქსიურიდინ ტრიფოსფატ - ბიოტინის (dUTP) მარკირების მეთოდი (TUNEL-ის ექსპერიმენტი) აღწერილი პროტოკოლის მიხედვით

სტატისტიკური ანალიზი

მონაცემების სტატისტიკური დამუშავება მოიცავდა პარამეტრულ და არა პარამეტრულ სტატისტიკურ ანალიზს. ანალიზი ჩატარდა Student's t-test და Mann-Whitney ტესტების გამოყენებით. მონაცემების დამუშავება განხორციელდა კომპიუტერული უზრუნველყოფის პროგრამით GraphPad PrismTM 5 (GraphPad Software). ციფრობრივი მაჩვენებლები წარმოდგენილია როგორც საშუალო მაჩვენებელი და საშუალოს

სტანდარტული გადახრა.

კვლევის ეთიკის საკითხები

ექსპერიმენტები ცხოველებზე ჩატარდა ცხოველთა დაცვის კომიტეტის მიერ
დამტკიცებული პროტოკოლით, ლაბორატორიული ცხოველების მოპყრობის საერთაშორისო პრინციპების დაცვით (Workman et al. 2010). ქირურგიული მანიპულაციები ჩატარებულ იქნა ზოგადი გაუტკივარების პირობებში, ასეპტიკისა და ანტისეპტიკის ყველა წესის სრული დაცვით.

კვლევის შედეგები და მათი ანალიზი

პირის ღრუს სქუამოზური კიბოს in vivo მოდელის შედეგები

კიბოს უჯრედების პირის ღრუში ტრანსპლანტაციიდან საშუალოდ 2 კვირის შემდეგ, ცხოველებს ლოყის მიდამოში გამოუვლინდათ მცირე ზომის სიმსივნე, რომელმაც დინამიკაში განიცადა ზომაში მომატება. თაგვების ერთ ნაწილს აღენიშნა სიმსივნის უფრო მეტად დრუნჩის მიმართულებით განვითარება, ხოლო მეორე ნაწილში გამოხატული იყო სიმსივნის ზრდა ზედა ყბის მიმართულებით. უჯრედების ინექციიდან 3 კვირის შემდეგ ყველა ცხოველი გამოყვანილი იქნა ექსპერიმენტიდან. კვლევა თავდაპირველად ჩატარდა ათ ლაბორატორიულ თაგვზე, რომელთაგან რვა ინდივიდს 3 კვირის შემდეგ ვიზუალურად აღენიშნებოდა სიმსივნის არსებობა ლოყის მიდამოში (80%). დარჩენილი ორი თაგვის ორგანიზმში სიმსივნე არ განვითარდა, რაც დადასტურდა გაკვეთის შედეგად.

model established by us. We have used athymic Crl: NU-Foxn1nu (NU/NU) nude mice (Nu/Nu Nude Mouse, Charles River, Wilmington, USA). Animals were divided into one control and two experimental groups. In control and first experimental group 15-15 animals were placed; in second experimental group 30 animals were placed and group was divided into two subgroups.

As soon as the tumor was observed (9 to 13 days after injection), the chemotherapeutic agent cisplatin (5 mg/kg, in every 10 days, 3 injections) was injected i.p. in animals of first and second experimental groups (n = 45). Three weeks after tumor cell implantation, cultivated MSCs (1×10^6 cell/100 μL PBS suspension) were administered in second experimental group (n = 30) in two ways. In first subgroup (n=15) MSCs were administrated in tail vein. In second subgroup (n=15) MCSs were injected directly intra-tumorally. In the Cisplatin group, only PBS solution without MSCs intra-tumoral injections were performed (n = 15). In the control group, only PBS solution without Cisplatin treatment and MSCs intra-tumoral injections were performed (n = 15). Animals underwent surveillance for 3 weeks (or until they showed signs of extreme poor health/or died) and afterward were sacrificed. The size of grown orthotopic tumors was measured, and the volume was calculated ($L \times H \times W$).

Tumor tissues were preserved in formaldehyde for further analyses. Paraffin-embedded tissue sections (2-3 μm thick) were deparaffinized in Xylene and rehydrated in progressively decreasing concentrations of ethanol. For tissue morphological assay, hematoxylin-eosin staining was utilized. For specific molecular expression assay, a standardized immunohistochemical staining method was used. After

To establish *in vivo* mouse tumor model were performed in athymic Crl: NU-Foxn1nu (NU/NU) nude mice (Nu/Nu Nude Mouse, CharlesRiver, Wilmington, USA), which are the best laboratory animals in oncology research. Heterozygotes animals from this line do not undergo thymus depended maturation and their immune system is partially compromised. Oral Squamous Cancer Cell line (OSCC) was primarily isolated from human head and neck tumor tissue and were cultivated with standard methodology. Finally, transplantation suspension 1x106 cells in 50 µl PBS was prepared.

In Nu/Nu mice (N=10) under general anesthesia with Isoflurane cell suspension was injected into the buccal submucosal layer of the oral cavity of athymic nude mice using a 26-gauge needle. After 3 weeks, animals were sacrificed. Grown orthotopic tumors and metastasis were measured, photo documented and preserved in formaldehyde for further analyses.

Paraffin-embedded tissue sections (2-3 µm thick) were deparaffinized in Xylene and rehydrated in progressively decreasing concentrations of ethanol. For tissue morphological assay, hematoxylin-eosin staining was utilized. For specific molecular expression assay, a standardized immunohistochemical staining method was used. As primary antibodies, rabbit anti-human epithelial cell antigen, mouse anti-Ki67 (dilution 1:100), rabbit anti-CD31 (1:100), (all from Abcam, Cambridge, UK) were used. After incubation with secondary antibodies, specific protein expression was observed by peroxidase reaction.

Experimental design

Experiments were performed in the squamous cell carcinoma

ცხოველთა ევთანაზიის შემდეგ გამოანგარიშებული იქნა შექმნილი ექსპერიმენტული ქსენოგრაფტული მოდელისათვის პირის ღრუს კიბოს საშუალო მოცულობა (146 მმ³), რომელსაც მან მიაღწია ექსპერიმენტის მიმდინარეობისას 3 კვირიანი ზრდის განმავლობაში.

ცხოველების გაკვეთის შედეგად ასევე შესწავლილი იქნა ორთოტოპიული კიბოს გავრცელება სხვა ორგანოებზე. რვა ინდივიდიდან აღენიშნა კიბოს უჯრედების მაკროსკოპული გავრცელება როგორც მეზობელ ქსოვილებსა და ორგანოებში ასევე ფილტვის (n=1) და ღვიძლის (n=1) ქსოვილებში.

პირის ღრუში განვითარებული სიმსივნის მორფოლოგიური სურათის შესწავლისათვის ნიმუშების შეღებვა განხორციელდა ჰემატოქსილინ-ეოზინის საშუალებით და ჩატარდა მიკროსკოპული ანალიზი. თავდაპირველად შედარებისათვის შევისწავლეთ ჯანმრთელი თაგვის პირის ღრუს (სადაც პირის ღრუს სქუამოზური კიბოს უჯრედების ნაცვლად შეყვანილ იქნა ფიზიოლოგიური ხსნარი) მორფოლოგიური აგებულება. კარგად გამოიკვეთა ქსოვილების შრეობრივი შენების თავისებურებანი და ლორწოვანის და ლორწქვეშა შრეების სტრუქტურული აგებულება. კარგად ვიზუალიზირდა ე.წ. „კერატინული ბუდეები“ და სქუამოზური უჯრედების კუნძულები

სიმსივნური ქსოვილის მორფოლოგიური გამოკვლევისას ნანახი იქნა პირის ღრუს ლორწოვან და ლორწქვეშა შრეებში განვითარებული ინვაზიური კიბო, რომელიც პერიფერიულად ვრცელდებოდა პირის ღრუს ქსოვილის სტრუქტურებში. უშუალოდ სქუამოზური

კიბოს ქსოვილი წარმოდგენილი იყო დაბალ-დიფერენცირებული, პოლიმორფული უჯრედებისაგან შემდგარი ჰომოგენური სტრუქტურის პარენქიმით, რომელიც ხასიათდებოდა "სარკომატოიდური" ზრდის ფორმით და ღრმა ქსოვილების საზღვარზე წარმოქმნიდა შემაერთებელ ქსოვილოვან გარსს - "კაფსულას". ასევე აღსანიშნავია ძლიერი ლოკალური ანთებითი ინფილტრაციები კიბოს ქსოვილის პერიფერიულ ნაწილებში.

ორთოტოპიული და მეტასტაზური კიბოს ვერიფიკაცია

იმისათვის, რომ გადაგვემოწმებინა მორფოლოგიური კვლევით მიღებული შედეგები, განვახორციელეთ პირის ღრუს ორთოტოპიული და მეტასტაზური (ღვიძლი) ქსოვილის იმუნოჰისტოქიმიური (იჰქ) ანალიზი, *Anti-Human Epithelial Cell* ანტისხეულების გამოყენებით. ამ ანტისხეულის შესაბამისი ანტიგენის ექსპრესია აღინიშნება მხოლოდ ადამიანის ეპითელურ უჯრედებში; რადგან ჩვენ მოვახდინეთ ადამიანის ეპითელური (კიბოს) უჯრედების ჩანერგვა თაგვის ორგანიზმში, აღნიშნული ანტისხეულები შესაძლებელია გამოყენებულ იქნას როგორც მარკერი ამ უჯრედების აღმოსაჩენად.. ექსპერიმენტმა ნათლად აჩვენა, რომ ინვაზიური კიბოსა და მეტასტაზური ქსოვილის წარმომავლობა ადამიანის უჯრედებს უკავშირდება.

პროლიფერაციული აქტივობის შეფასება

ავთვისებიანი სიმსივნის აგრესიულობის ერთ-ერთ მთავარ მახასიათებელს წარმოადგენს მისი უჯრედების პროლიფერაციული აქტივობა, რაც

stem cell transplantation on the development of oral squamous cell carcinoma. Also the efficacy of mesenchymal cell transplantation as adjuvant method in combination with chemotherapy has been evaluated.

Main topics to be defended

Based on conclusion made after analysis and synthesis of research results following main statements are presented to be defended:

- Xenograft model established by us represents morphologic picture of specific tissue lesions as well as creates functional imitation of disease. Model can be used for experimental studies in the field of oral oncology.
- Transplantation of MSCs in oral squamous cell carcinoma tissues with concurrent chemotherapy with Cisplatin attenuates tumor growth. This leads to improved survival rates of experimental animals.
- Improved attenuation activity rate on tumor growth for combined chemotherapy with MSCs transplantation compared with monotherapy with Cisplatin can be explained with increases apoptotic activity in tumor tissues.

Research methodology, methods, materials

In vivo model of oral squamous cell carcinoma

maliginisation processes of oral lesions. According to our research hypothesis our goal was to establish xenograft animal model of oral squamous cell carcinoma and to evaluate in these model transplantation of mesenchymal stem cells as alternative/adjuvant treatment method for oral malignant pathologies.

To achieve the goals of our research we set following objectives:

- To establish standardized model of disease by means of transplantation in laboratory animals human squamous cell carcinoma cells (xenograft animal model).
- Chemotherapy of experimental animals beginning from tumor visualization till euthanasia of animals according to timeframe of experimental protocol. Transplantation of MSCs adjuvant to chemotherapy in tissues adjacent to tumor.
- Evaluation of clinical parameters and life expectancy of experimental animals.
- Morphological and molecular evaluation of obtained tissue specimens.
- Statistical analysis of results.

Importance and novelty of research

- As a result of our research effective xenograft animal model of oral squamous cell carcinoma is established, which is technically feasible and can be successfully used for oncology research.
- For the first time in experiments has been evaluated effect of combination of conventional chemotherapy with mesenchymal

პირდაპირპროპორციულად განსაზღვრავს სიმსივნის ზრდა-გავრცელებას. იმისათვის რომ დაგვედგინა ჩვენს მიერ მოდელირებული პირის ღრუს სქუამოზური კიბოს პროლიფრაციული აქტივობა, იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდით შევისწავლეთ Ki67-ის ექსპრესია სიმსივნის ქსოვილში. ცილა Ki67 წარმოადგენს პროლიფერაციულ მარკერს და მისი ექსპრესია წარმოებს მხოლოდ უჯრედის მიტოზურ ფაზაში. აღნიშნულმა ექსპერიმენტმა აჩვენა პირის ღრუს სქუამოზური კიბოს ზომიერი პროლიფერაციული აქტივობა, რაც გამოიხატა მიტოზური უჯრედების ბირთვების ყავისფრად შეღებვით.

პროლიფერაციული აქტივობის ხარისხის შესაფასებლად ჩატარდა იმუნოჰისტოქიმიური მონაცემების კვანტიფიკაცია. თითოეულ ჰისტოლოგიურ პრეპარატზე. მიკროსკოპის ობიექტივის ხედვის არეალში. დათვლილი იქნა შეღებილი უჯრედები ქსოვილის სამი სხვადასხვა შემთხვევითი ადგილიდან, რის შემდეგაც გამოანგარიშებულ იქნა თითოეულ ქსოვილში, შეღებილი უჯრედების საშუალო რაოდენობა ობიექტივის ხედვის ერთ არეალში. საბოლოოდ გამოთვლით მივიღეთ ჩვენი ონკოლოგიური მოდელის ზოგადი პროლიფერაციული სტატუსი რაც საშუალოდ შეადგენს 55,7 ± 4,7 პროლიფერაციულ უჯრედს ობიექტივის ერთ ოპტიკურ არეალში.

პირის ღრუს სქუამოზური კიბოს ვასკულარიზაცია

ნეოვასკულარიზაციის შესაფასებლად გამოვიყენეთ იმუნოჰისტოქიმიური ანალიზი CD 31 საწინააღმდეგო ანტისხეულების მეშვეობით. CD31 წარმოადგენს ენდოთელური უჯრედის მარკერს და შესაბამისად მისი ექსპრესია

აღინიშნება ყველა ტიპის სისხლძარღვებში. ამ კვლევამ აჩვენა სუსტი CD31-ის ექსპრესია უშუალოდ სიმსივნური ქსოვილის პარენქიმაში, რაც მიუთითებს სისხლძარღვოვანი ქსელის სუსტ განვითარებაზე ჩვენს მიერ მოდელირებულ პირის ღრუს სქუამოზური კიბოს ქსოვილში. შედარებისთვის შეგვიძლია ვნახოთ თაგვის პირის ღრუს ჯანმრთელი ლორწოვანის სისხლძარღვოვანი სტრუქტურა

მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების ფენოტიპური ტესტირება

ტრანსპლანტაციამდე განხორციელდა C57BL/6N ხაზის თაგვებიდან მიღებული მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების კულტურის ფენოტიპური ანალიზი ღეროვანი უჯრედების რამდენიმე მნიშნელოვანი მარკერის მიხედვით. გამდინარე ციტომეტრიის, უფრო ზუსტად კი FACS (Fluorescence-activated cell sorting) ანალიზის მეშვეობით ნაჩვენები იქნა რომ უჯრედების აბსოლიტური უმრავლესობა პოზიტიური იყო მეზენქიმური მარკერების მიმართ. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ იმავე კულტურაში არ გამოვლენილა ჰემოტოპოეტური მარკერების ექსპრესია**ცისპლატინის in vitro**

ზემოქმედება პირის ღრუს კიბოს უჯრედებზე

იმისათვის, რომ განგვესაზღვრა ქიმიოთერაპიული საშუალება ცისპლატინის ეფექტურობა ჩვენს მიერ გამოყენებული კიბოს უჯრედების მიმართ, ჩატარდა in vitro ექსპერიმენტი უჯრედების ვიტალობის და ზრდის დასადგენად. უჯრედების შეღებვამ უჩვენა, რომ უჯრედების მხოლოდ 62% (±2,5%) იყო სიცოცხლისუნარიანი 0,5მკგ/მლ ცისპლატინის ზემოქმედებიდან 24 საათის შემდეგ. 0,25მკგ/მლ ცისპლატინის ინკუბაციიდან 24 საათის შემდეგ პირის

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) accounts for 90% of all oral malignancies. It is the 11th most frequent cancers worldwide. In 2018 354 864 new cases were registrated and ¾ of these cases are in developing countries. Conventional treatment for Oral squamous cell carcinoma consists of surgical excision, chemotherapy and radiotherapy. These methods have many adverse effects. Radiotherapy for instance, can cause irreversible damage of salivary glands and jaw bones. Oncotherapy has huge psychological impact on patient. That is why new and improved treatment strategies are required to be developed at tissue, cell, and molecular levels.

Recent studies on animal models have demonstrated MSC migration toward primary and metastatic tumor locations. In recent years, numerous studies have been conducted to investigate the role of MSCs on tumor growth, but reported results are very discrepant. Some studies demonstrated that, when applied locally MSCs interact with the residing host cells. MSCs interplay with immune cells and reduce inflammatory cytokines. According to another studies MSCs directly or indirectly regulate cell proliferation, differentiation, immune tolerance, angiogenesis and metastasis formation. Thus the exact mechanisms of stem cells interaction on tumor tissues is not yet clear and further research is needed.

Research hypothesis, goals and objectives

The aim of our research was to test the hypothesis that mesenchymal stem cells in combination with Cisplatin can affect tumor growth and can improve patients overall condition and life expectancy. We decided to study in experimental animals the role of stem cells in

- პირის ღრუს სქუამოზური კიბოს *in vivo* მოდელში ცისპლატინით თერაპიის ფონზე მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების ინექცია ანელებს სიმსივნის ზრდის პროცესს და ზრდის სიცოცხლის ხანგრძლივობას. მიღებული შედეგების საფუძველზე შესაძლებელია რეკომენდაცია გაეწიოს ადამიანებში დამატებითი კვლევების ჩატარებას მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების გამოყენებით კომბინირებული მკურნალობის შედეგების შესაფასებლად.

- ჩვენი კვლევის შედეგებით შეფასებულია ცხოველებში პირის ღრუს კიბოს მართვის პროცესში მხოლოდ კომბინირებული მიდგომის გამოყენება: ქიმიოთერაპია თანმხლები ღეროვანი უჯრედების ტრანსპლანტაცით. აქედან გამომდინარე შემდგომი კვლევებისათვის რეკომენდაციას ვუწევთ ღეროვანი უჯრედების გამოყენებას სიმსივნურ მიკროგარემოში მხოლოდ ქიმიოთერაპიასთან კომბინაციაში.

მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების მონოთერაპიის სახით პირის ღრუს კიბოს მართვაში გამოყენების ეფექტურობის შეფასება დამატებითი კვლევების ჩატარებას საჭიროებს

ღრუს კიბოს უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა განისაზღვრა 78,2±1,8%-ით (ორივე შემთხვევაში P<0,05).

In vitro უჯრედების ზრდის კვლევა განხორციელდა MTT-ექსპერიმენტის მეშვეობით. უჯრედების მიერ გამომუშავებული ფორმაზანის სოლუბილიზაცია განხორციელდა იზოპროპანოლის მეშვეობით. ოპტიკური ხვედრი გაიზომა Elisa reader-ის მეშვეობით. 0,25მკგ/მლ ცისპლატინის ზემოქმედების შედეგად კიბოს უჯრედების ზრდამ 24 საათის შემდეგ შეადგინა 80%, ხოლო 48 საათის შემდეგ 65% 0,5 მკგ/მლ ცისპლატინის ზემოქმედების შედეგად უჯრედების ზრდა განისაზღვრა 68% (24 საათის შემდეგ) და 58% (48 საათის შემდეგ) (P<0,05) .

ექსპერიმენტულ ცხოველთა სიცოცხლის ხანგრძლივობის ანალიზი

საკონტროლო ჯგუფში თაგვების მხოლოდ 40% -ს აღენიშნათ 6 კვირიანი სიცოცხლის ხანგრძლივობა. 2 ცხოველის ფიზიკური მდგომარეობის გათვალისწინებით, მოხდა მათი ექსპერიმენტიდან უფრო ადრე გამოყვანა. ექსპერიმენტული ცხოველების იმ ჯგუფში სადაც განხორციელდა ცისპლატინის ინექციები, ერთი თაგვი დაიღუპა ქიმიოთერაპიის დაწყებიდან მე-3-ე დღეს, ერთი კი მე-6 კვირას. ცხოველების 60% -მა იცოცხლა 6 კვირის განმავლობაში განსხვავებული სურათი აღინიშნა ქიმიოთერაპიის პარალელურად მღუ-ს სიმსივნურ უბანში შეყვანილი თაგვების ჯგუფში. თხუთმეტივე თაგვის (100%) სიცოცხლის ხანგრძლივობა განისაზღვრა 6 კვირით.

აღნიშნული მონაცემები სტატისტიკურად გაანალიზდა GraphPad Prizm 5- პროგრამის მეშვეობით, კაპლან-მაიერის მეთოდით. მიუხედავად იმისა, რომ შედეგები არ აღმოჩნდა სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი (შედარებით მცირე მონაცემების გამო), აშკარად გამოიკვეთა ტენდენცია, უკეთესი სიცოცხლის ხანგრძლივობისა იმ ცხოველებში, რომელთა სიმსივნურ ქსოვილშიც მოხდა მღუ-ის ინექცია.

ცხოველის ორგანიზმში ტრანსპლანტირებული ღეროვანი უჯრედების ლოკალიზაციის ბიოლუმინესცენტური ანალიზი

სხვადასხვა გზებით თაგვის ორგანიზმში მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების ტრანსპლანტაციის შემდეგ ინფუზირებული უჯრედების ბიოდისტრიბუციის დადგენის მიზნით ჩატარდა *in vivo* ბიოლუმინესცენტურ ანალიზი. პირის ღრუს კიბოს მქონე თაგვებში, კუდის ვენიდან ტრანსპლანტაციის შემთხვევაში ღეროვანი უჯრედების ლოკალიზაცია სიმსივნის მიდამოში არ გამოვლინდა. სუსტი ლუმინესცენტური სიგნალი აღინიშნა მხოლოდ თირკმელებისა და ფილტვების ლოკალიზაციის ადგილას. ადგილობრივად, სიმსივნური ქსოვილების მიდამოში ინექციის შემდეგ კი ღეროვანი უჯრედები მაღალი კონცენტრაციით ვიზუალიზირდა დაზიანების ადგილას ბიოლუმინესცენტურის ანალიზის შედეგებით დადგინდა, რომ კუდის ვენიდან შეყვანილი ღეროვანი უჯრედების მიზიდვა და თავმოყრა არ აღინიშნა ჩვენი კვლევისათვის საინტერესო მიდამოში, არ მოხდა მათი ჩართვა სიმსივნურ ქსოვილში. აქედან გამომდინარე, გადავწყვიტეთ კვლევა გაგვეგრძელებინა იმ ჯგუფში, სადაც ღეროვანი უჯრედების ინექცია უშუალოდ სიმსივნურ ქსოვილებში განხორციელდა და ბიოლუმინესცენტური

განიცდიან ე.წ. ჰოუმინგს სიმსივნურ ქსოვილში.

- მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების იმპლანტაცია პირის ღრუს სქუამოზური კიბოს ქსოვილში ცისპლატინით მკურნალობის ფონზე, მნიშვნელოვნად ამცირებს სიმსივნის ზომაში ზრდის პროცესს, რის შედეგადაც საგრძნობლად მატულობს ამ ცხოველების სიცოცხლის ხანგრძლივობა.
- მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების იმპლანტაცია სიმსივნურ ქსოვილში მკვეთრად აძლიერებს ანგიოგენეზს, რის შედეგადაც კლებულობს სიმსივნური ქსოვილის ჰიპოქსია.
- ქიმიოთერაპიის და მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების იმპლანტაციის კომბინაციის შედეგად მატულობს კიბოს ქსოვილის აპოპტოზი, რაც განპირობებულია მომატებული ანგიოგენეზის ფონზე ქსოვილში ცისპლატინის უკეთესი დისტრიბუციით.

პრაქტიკული რეკომენდაციები

- ჩვენ მიერ შემუშავებული პირის ღრუს სქუამოზური კიბოს ათიმური თაგვის მოდელი წარმოადგენს აქტუალურ და გამოსადეგ კვლევით მეთოდს. ეს მოდელი შესაძლებელია გამოყენებულ იქნეს პირის ღრუს ონკოლოგიის მიმართულების კვლევებში.

უჯრედული ციკლის შეჩერებასთან (Krammer P.H., 2000). მიუხედავად გამოქვეყნებული მონაცემებისა, აუცილებლად მიგვაჩნია მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების პროლიფერაციული ინჰიბიტორული ეფექტების მექანიზმების შემდგომი კვლევების ჩატარება.

ჩვენ კვლევაში სხვადასხვა ექსპერიმენტულ ჯგუფებში აპოპტოზის გამოკვლევის შედეგებმა აჩვენა, რომ ცხოველებში, რომლებსაც მკურნალობა ჩაუტარდათ ცისპლატინი + მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების ინექციით, სიმსივნის ქსოვილებში აპოპტოზის მაჩვენებელი მნიშვნელოვნად აღემატებოდა მხოლოდ ცისპლატინით მკურნალობის დროს მიღებულ მაჩვენებლებს. ეს აღმოჩენა ჩვენი მოსაზრებით აიხსნება ცისპლატინის უკეთესად განაწილებით სისხლძარღვთა რაოდენობის გაზრდის გამო.

დასკვნები

- ჩვენ მიერ შექმნილი ქსენოგრაფტული მოდელი ასახავს ქსოვილებში განვითარებული პათოლოგიის მორფოლოგიურ სურათს. ასევე, მისი საშუალებით იქმნება დაავადების ფუნქციური იმიტაცია. მოდელის შექმნის პროცესი ადვილი განსახორციელებელია. მოდელის გამოყენება შესაძლებელია პირის ღრუს კიბოს ექსპერიმენტული კვლევებისათვის.
- თაგვის პირის ღრუში კიბოს არსებობისას, ლოკალურად ინექცირებული მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედები ლაგდებიან პათოლოგიურ ქსოვილში. სისტემურად, კუდის ვენიდან ინფუზირებული ღეროვანი უჯრედები კი არ

ანალიზით დადასტურდა მათი ლოკალიზაცია სიმსივნურ ქსოვილში.

კიბოს ქსოვილის ზრდა და გავრცელება ღეროვანი უჯრედების ტრანსპლანტაციის შემდეგ

ცხოველებზე ექსპერიმენტული დაკვირვება გაგრძელდა 6 კვირა. ცხოველთა ექსპერიმენტიდან გამოყვანის შემდეგ, ჩატარდა სიმსივნური ქსოვილების ამოკვეთა და მათი გაზომვა. საკონტროლო ჯგუფის თაგვებში ექსპერიმენტის ბოლოს სიმსივნის საშუალო მოცულობამ შეადგინა 172,7±9,03 მმ³. მხოლოდ ცისპლატინით მკურნალობის ჯგუფში ცისპლატინის ინექციის შედეგად სიმსივნის საშუალო მოცულობამ შეადგინა 149,5±12,25 მმ³, ხოლო იმ ჯგუფში სადაც ჩავატარეთ კომბინირებული მკურნალობა ცისპლატინით და მეზენქიმური ღეროვანი უჯრდებით ქიმიოთერაპიის შემდეგ სიმსივნის ქსოვილში ტრანსპლანტირებული მღუ-ს შემდეგ კიბოს ქსოვილის საშუალო მოცულობამ შეადგინა 98,9±7,65 მმ³. ეს მონაცემები სტატისტიკურად მნიშვნელოვანია.

ცხოველების გაკვეთის შემდეგ ასევე შესწავლილი იქნა ორთოტოპიული კიბოს გავრცელება სხვა ორგანოებზე. საკონტროლო ჯგუფიდან ცხრა თაგვს აღენიშნა კიბოს მეტასტაზური განვითარება ახლო ან/და მოშორებულ ორგანოებზე (60%). ცისპლატინით ნამკურნალებ 6 ლაბორატორიულ ცხოველს დაუდგინდა მაკრომეტასტაზების არსებობა (40%). ხოლო ცისპლატინთან ერთად კიბოს ქსოვილში ინექცირებული მღუ-ის ჯგუფში, ასევე 6 ცხოველში აღინიშნა კიბოს გავრცელებული ზრდა (40%).

ქსოვილების მორფოლოგიური კვლევის შედეგები

სიმსივნური ქსოვილის მორფოლოგიური გამოკვლევისას ნანახი იქნა პირის ღრუს ლორწოვან და ლორწქვეშა შრეებში განვითარებული ინვაზიური კიბო, რომელიც პერიფერიულად ვრცელდებოდა პირის ღრუს ქსოვილის სტრუქტურებში. უშუალოდ სქუამოზური კიბოს ქსოვილი წარმოდგენილი იყო დაბალ-დიფერენცირებული, პოლიმორფულ უჯრედებისგან შემდგარი ჰომოგენური სტრუქტურის პარენქიმით, რომელიც ხასიათდებოდა "სარკომატოიდური" ზრდის ფორმით და ღრმა ქსოვილების საზღვარზე წარმოქმნიდა შემაერთებელ ქსოვილოვან გარსს - "კაფსულას" .

ქიმიოთერაპიული საშუალება ცისპლატინის გამოყენების შედეგად კიბოს ქსოვილის მორფოლოგიური სურათი იყო მსგავსი საკონტროლო ჯგუფის სიმსივნურ სურათთან. რაც შეეხება ცისპლატინით თერაპიის შემდეგ ტრანსპლანტირებული მღუ-ის ჯგუფში, კიბოს ქსოვილის მორფოლოგიური სურათი წარმოდგენილი იყო ნაკლები შემოფარგვლით, ნეკროზული კერების არსებობით და შემაერთებელქსოვილოვანი ბაზალური შრეების არსებობით.

იმისათვის რომ შეგვეფასებინა სიმსივნური ქსოვილის ანგიოგენეზი, ჩატარდა იმუნოჰისტოქიმიური კვლევა ანტი-CD31 ანტისხეულების მეშვეობით. CD31-წარმოადგენს ენდოთელური უჯრედების მარკერს, შესაბამისად შეღებვის ამ მეთოდით დავადგინეთ მიკროსისხლძარღვების არსებობა ქსოვილებში. ამ ექსპერიმენტმა უჩვენა მიკროსისხლძარღვების თითქმის არ არსებობა საკონტროლო და ცისპლატინით ნამკურნალებ ცხოველთა კიბოს ქსოვილებში. მეზენქიმური ღეროვანი

ჩვენ ასევე შევისწავლეთ სიმსივნური ქსოვილების ჰიპოქსიის სტატუსი, რაც მნიშვნელოვანია ტუმოროგენეზში. ინტრა-სიმსივნური ჰიპოქსია ააქტიურებს ჰიპოქსიის ინდუქციურ ფაქტორებს (HIFs) და ამ გზით ხელს უწყობს მეტასტაზურ პროცესს. ჰიპოქსიის კვლევების შედეგებმა აჩვენა კავშირი ჰიპოქსიასა და ანგიოგენეზის სტატუსს შორის: სისხლძარღვთა გაზრდამ გამოიწვია ქსოვილების ჟანგბადით მომარაგების გაუმჯობესება და ჰიპოქსიის სტატუსის დაქვეითება.

მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედებისა და სიმსივნური უჯრედების ინტერაქციის კიდევ ერთი მნიშვნელოვანი მომენტია ზემოქმედება სიმსივნური უჯრდების აპოპტოზზე. ცნობილია, რომ ნეოპლაზიურ უჯრედებში, რომლებმაც უკვე განიცადეს დნმ-ის დამაზიანებელი ზემოქმედება ადგილი აქვს აპოპტოზის ინდუქციის დათრგუნვას, რაც ზრდის უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობას და წარმოქნილი გენეტიკური ცვლილების შენარჩუნების ალბათობას. ავთვისებიან უჯრედებში ციკლის უარყოფითი მარეგულირებლები შედარებით დაბალაქტიურია (ან საერთოდ გამორთული). ერთ-ერთ ბოლო კვლევაში ნაჩვენები იყო, რომ სიმსივნური უჯრედების აპოპტოზური სიკვდილის მაჩვენებელი მკვეთრად გაიზარდა მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების ტრანსპლანტაციის შემდეგ (Chen, A., 2015). უჯრედული ციკლის ანალიზმა აჩვენა სიმსივნის უჯრედების აკუმულაცია უპირატესად G_0 / G_1 ფაზაში და S ფაზის დაქვეითება. RT-PCR ანალიზმა დაადასტურა უჯრედული ციკლის ცვლილებები. ავტორების მოსაზრებით აპოპტოზი ასოცირდება p21 და კასპაზა 3 გენის ექსპრესიასთან. სხვა ექსპერიმენტული კვლევის შედეგების თანახმად, მღუ-ების ინჰიბიტორული მოქმედება სიმსივნის უჯრედზე შეიძლება ასოცირებული იყოს FasL-ით გამოწვეულ აპოპტოზთან და

შორის ურთიერთქმედებამ შეიძლება გამოიწვიოს არა მხოლოდ სიმსივნური უჯრედების გამრავლების გაზრდა, არამედ ღეროვანი უჯრედების ფენოტიპური ცვლილება და გარდაქმნა უჯრედებად, რომლებიც ხელს უწყობენ ნეოპლასტიკურ უჯრედების ზრდას. ამასთანავე, ამ მოსაზრებების საპირისპიროდ არსებობს მონაცემები რომ ღეროვანი უჯრედების გადანერგვის საპასუხოდ სიმსივნის ზრდა შეიძლება შეფერხდეს უჯრედის ციკლის შეჩერებისა და სიმსივნური უჯრედების აპოპტოზის გააქტივების საშუალებით.

ამ მოსაზრებებიდან გამომდინარე, მნიშვნელოვანი იყო შეგვესწავლა მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების მიერ სხვადასხვა პროცესების მასტიმულირებელი ფაქტორების სეკრეციის ხარისხი სიმსივნის მიკროგარემოში.

სხვადასხვა კვლების შედეგები გვაძლევს საფუძველს ვიფიქროთ რომ მეზენქიმურ ღეროვან უჯრედებს შეუძლიათ გამოყონ სხვადასხვა ფაქტორები, რომლებიც ანგიოგენეზს უწყობენ ხელს. ასევე მათ აქვთ უნარი სპეციფიური ცილების ექსპრესიის გზით ოახდინონ ენდოთელური უჯრედების მობილიზაცია და მათი მიგრაცია დაზიანებული უბნისაკენ. ჩვენი კვლევის შედეგების მიხედვით შეგვიძლია გამოვთქვათ ვარაუდი, რომ საკვლევ ჯგუფში მიკროანგიოგენეზის მნიშვნელოვანი დონე განაპირობებს ამავე ჯგუფში გამოვლენილ მეტასტაზურ აქტივობას. თუმცა ისიც უნდა აღინიშნოს, რომ ცისპლატინისა და ცისპლატინს + მღუ ჯგუფებს შორის მეტასტაზურ აქტივობებს შორის სტატისტიკურად მნიშნელოვანი სხვაობა არ გამოვლენილა. მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების ზემოქმედება სიმსივნის მეტასტაზურ აქტივობაზე ჩვენი მოსაზრებით დამატებითი კვლევების ჩატარებას და შესწავლას საჭიროებს.

უჯრედებით ინექცირებულ ცხოველებში იმუნოჰისტოქიმიურმა კვლევამ დადგინდა სიმსივნურ ქსოვილში ძლიერად განვითარებული სისხლძარღვოვანი სტრუქტურები. ჩატარდა ასევე ვასკულარიზაციის ხარისხის შეფასება და სტატისტიკურად შედარება სხვადასხვა ჯგუფებს შორის.

კიბოს ქსოვილის ვასკულარიზაციის შესწავლის შემდეგ, შევეცადეთ დაგვედგინა იმავე ქსოვილის ჰიპოქსიური სტატუსი. ანტი-კარბონიკ ანჰიდრაზა-9 ანტისხეულების გამოყენებით იმუნოჰისტოქიმიურმა კვლევამ დაადგინა კიბოს ქსოვილის ძლიერი ჰიპოქსიური მდგომარეობა საკონტროლო ჯგუფში. ანალოგიური სურათი იქნა ნანახი ცისპლატინით ნამკურნალები ცხოველების კიბოს ქსოვილში, სადაც ასევე ძლიერი ჰიპოქსია იყო გამოხატული. რაც შეეხება კიბოს ქსოვილს მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების ტრანსპლანტაციის შემდეგ, გამოვლინდა სიმსივნური პარენქიმის მინიმალური ჰიპოქსიურობა, რომელიც წარმოდგენილი იყო ქსოვილში მცირე კუნძულების სახით. ჩატარდა ასევე ჰიპოქსიის სტატუსის საშუალო მაჩვენებლების შედარება ჯგუფებს შორის. აღნიშნული კვლევებით შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ კიბოს ქსოვილის ჰიპოქსიურობა შეუღლებულია ამავე ქსოვილების ანგიოგენეზურ სტატუსთან.

Tunnel -ის კვლევის შედეგად გამოვლინდა კიბოს ქსოვილის უჯრედების დაბალი (ან არ არსებობდა) აპოპტოზური აქტივობა საკონტროლო ჯგუფში ქიმიოთერაპიის შედეგად (ცისპლატინი) ლაბორატორიულ თაგვებში განვითარებულ კიბოს ქსოვილში, აპოპტოზური უჯრედები მეტად იყვნენ წარმოდგენილნი ვიდრე

საკონტროლო ჯგუფში. საინტერესოა, რომ კომბინირებული: მღუ-ს ტრანსპლანტაციის და ცისპლატინის ინექციის შემდეგ, ცხოველის პირის ღრუში განვითარებული კიბოს ქსოვილის უდიდესი ნაწილი წარმოდგენილი იყო აპოპტოზური უჯრედებით. სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების ერთობლიობა ქსოვილის მასაში გამოსახული იყო მცირე უბნების/"კუნძულების" სახით. ნეკროზული უბნები ქმნიდნენ „ბნელ" მიდამოს, სადაც არ ვლინდებოდა არც აპოპტოზური უჯრედის (მწვანე) და არც სიცოცხლისუნარიანი უჯრედის (ლურჯი) ფლუორესცენციული სიგნალი.

თანამედროვე ტრანსლაციურ მედიცინაში, სულ უფრო და უფრო მნიშვნელოვანი ხდება კვლევები მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების გავლენის შესახებ *in vitro* და *in vivo* სიმსივნის ზრდაზე მღუ–ების გამოყენების გრძელვადიანი უსაფრთხოების უზრუნველსაყოფად. ონკოლოგიური კვლევებისთვის კრიტიკულად მნიშვნელოვანია მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების ზეგავლენის დადგენა სიმსივნის ზრდის პროცესზე. ლიტერატურაში აღწერილია უამრავი *in vivo* კვლევა, რომელთა მიზანი იყო მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედების მოქმედების ეფექტურობის დადგენა სხვადასხვა დაავადების მიმდინარეობაზე როგორც ექსპერიმენტულ ცხოველებში, ისე ადამიანებში. სხვადასხვა კვლევებში მიღებული შედეგები წინააღმდეგობრივია.

სხვადასხვა კვლევებმა ურთიერთსაპირისპირო შედეგები აჩვენა მღუ-ების გავლენის შესახებ სიმსივნის ზრდაზე. ზოგიერთი ბოლოდროინდელი ექსპერიმენტის შედეგების თანახმად, მღუ–ები უფრო მეტად ხელს უწყობენ სიმსივნის

პროგრესირებას და მეტასტაზირებას. ამის საპირისპიროდ, ცხოველებში ჩატარებულმა სხვა კვლევებმა აჩვენა, რომ მღუ-ების ინექციის შემდეგ, სიმსივნის წარმოქმნის დრო გახანგრძლივდა და სიმსივნის ზომა უფრო მცირე იყო, შემცირდა უჯრედების გამრავლება, გაიზარდა აპოპტოზი. ექსპერიმენტების შედეგებთან შედარებით, ჩვენმა კვლევამ აჩვენა, რომ ექსპერიმენტულ ჯგუფებში, სადაც მღუ ინექცია განხორციელდა პირის ღრუს კიბოს ქსოვილებში ცისპლატინით თერაპიასთან ერთად, სიმსივნის ზრდის სიჩქარის დაქვეითება და მისი სისტემური გავრცელების შემცირება დაფიქსირდა. ამ მოვლენამ გამოიწვია ექსპერიმენტული ცხოველების საშუალო სიცოცხლის ხანგრძლივობის მაჩვენებლის გაუმჯობესება.

ღეროვანი უჯრედები აქტიურად ზემოქმედებენ მიკროგარემოშზე ციტოკინების, ზრდის ფაქტორების და უჯრედუჯრედული მატრიქსის (ECM) მოლეკულების გამოყოფის გზით, რომლებიც მოქმედებენ ან თვითონ ღეროვან უჯრედებზე (აუტოკრინული მოქმედებები), ან მეზობელ უჯრედებზე (პარაკრინული მოქმედებები). ამიტომ, ღეროვანი და პროგენიტორული უჯრედების ბიომოლეკულების წარმოების უფრო ნათლად გააზრებამ შეიძლება ახალი შეხედულებები ჩამოაყალიბოს უჯრედის ფენოტიპების რეგულირების შესახებ, უკეთ განსაზღვროს ღეროვანი უჯრედების ფუნქციური როლი ქსოვილებში მიმდინარე პათოლოგიურ პროცესებში და საბოლოოდ განსაზღვროს შესაბამისი უჯრედის წყაროები სპეციფიკური ქსოვილის რეგენერაციისთვის. დღეისათვის გაჩნდა ურთიერთსაწინააღმდეგო ცნობები, რომლებიც მღუ-სა და ხსნადი ფაქტორების არსებობისას აჩვენებს ინ ვიტრო და ინ ვივო სიმსივნის უჯრედების პროლიფერაციის გაზრდას, შემცირებას და უცვლელობას. ღეროვან უჯრედებსა და ავთვისებიან უჯრედებს