

Державна установа “Інститут генетичної та регенеративної медицини
НАМН України”

Національна академія медичних наук України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ДЕМЧЕНКО ДАРІЯ ЛЕОНІДІВНА

УДК 576.54; 571.27. 612.119; 616-03.

ДИСЕРТАЦІЯ

**МІЖКЛІТИННА ВЗАЄМОДІЯ ЯК МЕХАНІЗМ ВПЛИВУ НА
ІМУНОБІОЛОГІЧНУ ТА РЕГЕНЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ
ГЕМОПОЕТИЧНИХ І МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН
ТИМУСА**

03.00.09 – імунологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

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

_____ Демченко Д.Л.

Науковий керівник Нікольський Ігор Сергійович доктор медичних наук,
професор.

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Демченко Дарія Леонідівна. Міжклітинна взаємодія як механізм впливу на імунобіологічну та регенеративну активність гемопоетичних і мультипотентних стромальних клітин тимуса. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.09 – імунологія. – ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київський національний університет імені Тараса Шевченка Міністерства освіти і науки України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню впливу міжклітинної взаємодії на імунобіологічну та регенеративну активність гемопоетичних клітин та мультипотентних стромальних клітин тимуса (МСКТ). Встановлено, що попередня контактна взаємодія надає клітинним трансплантатам нових імунорегулюючих властивостей.

Відновлення імунної системи після впливу деструктивних факторів залишається актуальною проблемою сучасної біології та медицини. Основна увага дослідників частіше зосереджена на вивченні гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК), їх нащадків різного ступеня зрілості і мультипотентних стромальних клітин (МСК) певного органного походження з огляду на те, що гемопоетичні клітини дають початок усім клітинам імунної системи, а МСК створюють необхідне для нормального функціонування ГСК оточення в тимусі і кістковому мозку (КМ), а також, ймовірно, і в периферичних лімфоїдних органах. При цьому переважна більшість робіт присвячена кістково-мозковим МСК, що формують найбільш значущі для функціонування гемопоетичних клітин структури, у вигляді так званих "ніш". Значно менше даних про роль МСК в тимусі. Постулюється також існування тимусних "ніш", в яких за участю МСК створюються умови для диференціювання попередників Т-клітин, що надходять в орган із КМ. Мезенхіма тимуса необхідна для його ембріонального морфогенезу та відіграє безпосередню

роль у лімфопоезі та міграції клітин в тимусі. Таким чином, очевидно, що в межах тканин центральних органів імунної системи взаємодія МСК і ГСК відіграє ключову роль. Проте МСК важливі при взаємодії з гемопоетичними клітинами і на периферії. Вони супресують трансплантаційні реакції і стимулюють синтез антитіл, а також пригнічують процеси, пов'язані з проліферацією Т-лімфоцитів в різних системах *in vitro*. Отже МСК впливають не тільки на ГСК, а і на різні популяції і субпопуляції лімфоцитів.

Відомо, що МСК різного походження досить гетерогенні і відрізняються своєю активністю, ймовірно за рахунок зв'язків з мікрооточенням. Таким чином, сукупність властивостей саме МСК тимуса (МСКТ), центрального органу імунітету, ймовірно, може відігравати ключову роль у відновленні імунної системи. Одним із нових підходів ефективною і направленою зміни властивостей ГСК може бути використання контактної взаємодії МСК і ГСК, яке призводить до суттєвої активації взаємодіючих клітин, що в подальшому може стати основою для розробки більш ефективних методів відновлення імунної системи.

Таким чином метою роботи було дослідити вплив міжклітинної взаємодії на імунобіологічну та регенеративну активність гемопоетичних клітин та МСКТ.

Було встановлено спорідненість мембранних рецепторів МСКТ та диференційованих з них остеобластів і адипоцитів з лімфоїдними клітинами різного походження, а саме тимоцитами, спленоцитами, клітинами лімфовузлів та кісткового мозку. У поєднанні «остеобласти – тимоцити» утворюється найбільша кількість асоціацій, а при взаємодії «адипоцити – клітини кісткового мозку (ККМ)» - найменша. Це свідчить про різну ступінь мембранної спорідненості досліджених клітин.

Отримано нові дані стосовно потенціувального впливу експозиції МСКТ з тимоцитами на ідукцію їх диференціювання за остеогенним напрямком у відповідних середовищах, що може бути наслідком формування міжклітинних синапсів, зумовлених мембранною рецепторною спорідненістю з реципрокним сигналінгом. Показано, що експозиція МСКТ з тимоцитами, що формують найбільшу кількість асоціацій при контакті, але не з ККМ, призводить до

потенціювання ідукції остеогенного диференціювання МСКт. Саме різна афінність мембранних рецепторів контактуючих клітин, імовірно, відіграє роль в такому ефекті.

З використанням оптимізованої моделі циклофосфанового (ЦФ) імунодефіциту розширено існуючі уявлення стосовно імуномодулюючого та регенеративного впливу МСКт та ГСК. Продемонстровано виражений стимулюючий ефект МСКт на відновлення лімфоїдних органів та формування імунологічних реакцій: нормалізацію підвищеної в 2,9 рази бактерицидної активності перитонеальних макрофагів, посилення нормальної фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів в 1,9 рази та цитотоксичної активності спленоцитів в 3 рази, стимуляцію формування антитілоутворювальних клітин (АУК) в селезінці до нормального рівня, що був знижений в 1,8 рази ($p < 0,05$) після дії ЦФ. Тоді як ККМ більшою мірою активуються на регенерацію еритропоезу, що проявляється нормалізацією показників гематокриту та гемоглобіну і підвищенням кількості ретикулоцитів в крові в 2,2 рази ($p < 0,05$) у порівнянні з групою мишей, що отримували ЦФ. У той час як МСКт знижують рівень ретикулоцитів в 3,5 рази ($p < 0,05$).

Показано, що, на відміну від інтактних ККМ, які не впливають на активність імунної системи, трансплантація ККМ, активованих контактною взаємодією з МСКт (ККМа), тваринам з імуносупресією спричинює нормалізацію кількості клітин у кістковому мозку, селезінці і лімфатичних вузлах, викликає підвищення проліферативної активності клітин лімфатичних вузлів (в 1,4 рази в G2/M+S фазах) порівняно з контролем, нормалізує бактерицидну активність перитонеальних макрофагів підвищену в 2,9 рази ($p < 0,05$) при дії ЦФ, знижує природну цитотоксичність спленоцитів в 2,9 рази ($p < 0,05$) та рівень РБТЛ спленоцитів в 10,4 рази ($p < 0,05$) порівняно з контролем. При трансплантації ККМа разом з підвищенням проліферативної активності в клітинах лімфатичних вузлів закономірно також зростає кількість клітин в апоптозі.

Котрансплантація ККМ і МСКт асоційована з відновленням кількості клітин кісткового мозку, тимуса, селезінки і лімфатичних вузлів з підвищенням індексу

проліферації клітин лімфатичних вузлів в 1,4 рази порівняно з контролем. Нормалізує знижену концентрацію гемоглобіну та гематокриту в крові, як і ККМ. Подібно дії ККМа, знижує рівень РБТЛ спленоцитів в 4,3 рази порівняно з контролем. На відміну від трансплантації інших клітинних препаратів, застосування ККМ сумісно з МСКт викликає посилення Т-клітинної імунної відповіді при формуванні реакції гіперчутливості сповільненого типу (РГСТ) в 1,6 рази порівняно з контролем.

Отже трансплантовані ККМ покращують еритропоез у мишей після введення циклофосфану, тоді як ККМа, попередньо культивовані з МСКт, цю здатність втрачають. Однак після співкультивування ККМа виражено активуються в напрямку дії на імунну систему, що може пояснюватись впливом контактної взаємодії з МСКт, які, як відомо, ефективно впливають на імунні клітини та володіють імуномодуючими властивостями.

Ефекти котрансплантації ККМ і МСКт реалізуються у вигляді кількох складових: стимуляції відновлення гематологічних показників (як при дії окремо ККМ), нормалізації клітинних показників лімфоїдних органів (як при дії МСКт), пригнічення активності РБТЛ (як при дії активованих ККМ) та стимуляції формування РГСТ, що є проявом впливу, притаманного саме котрансплантації.

Отже, показано, що попереднє співкультивування ККМ з МСКт вносить зміни у прояв імунорегенеративної активності цих клітин при трансплантації імунодефіцитним мишам. Отримано нові дані стосовно впливу котрансплантації МСКт та ККМ і з'ясовано, що відбувається не проста сумація ефективності цих клітин, а їх взаємодія надає нових властивостей такому клітинному трансплантату.

За результатами роботи розроблено спосіб потенціювання індукції остеогенного диференціювання МСКт попереднім контактом з тимоцитами. Він може бути використаний в лабораторіях клітинного та тканинного культивування та в майбутньому при лікуванні пошкоджень і захворювань опорно-рухового апарату, що супроводжуються порушенням остеорепації або формуванням дефектів кісткової тканини. Отримані дані з ефективності клітинних препаратів експериментально обґрунтовують можливість їх застосування при різних

імунопатології та можуть бути корисними у розробці нових підходів до трансплантації ГСК та МСК з метою клінічного використання.

Ключові слова: клітини кісткового мозку, котрансплантація клітин, міжклітинна взаємодія, мультипотентні стромальні клітини тимуса, регенерація імунної системи.

SUMMARY

Demchenko D.L. Intercellular interaction as a mechanism of influence on the immunobiological and regenerative activity of hematopoietic and thymic multipotent stromal cells. – Manuscript. The thesis on obtaining candidate of biological sciences degree in major 03.00.09 – immunology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to the study of the influence of intercellular interaction on the immunobiological and regenerative activity of hematopoietic cells and multipotent thymic stromal cells (tMSCs). It was identified that the former physical interaction conferred new immunocorrective properties to cell grafts.

Regeneration of the immune system caused by different insults remains a current issue of modern biology and medicine. Researchers often focus on the study of hematopoietic stem cells (HSCs), their progenitor cells and multipotent stromal cells (MSCs) of various organ origin. HSCs are the cells that produce all mature hematopoietic cells and MSCs provide necessary microenvironment in the thymus and bone marrow (BM) and probably in the peripheral lymphoid organs for normal functioning of HSCs. Meanwhile, most of the research papers are devoted to BM-derived MSCs, which shaping the most important for the functioning of hematopoietic cells structures called "niches". There are much fewer data on thymus-derived MSCs.

It is postulated that there exist the thymic niches in which, with an involvement of MSCs, the conditions are created for differentiation of the T-cell progenitors migrating

to the thymus from the bone marrow. Thymic mesenchyme is necessary for its embryonic morphogenesis and plays a direct role in the lymphopoiesis and cell migration in the thymus. Thus, it is obvious that the interaction between MSCs and HSCs plays a key role in the tissues of the central organs of the immune system. However, the MSCs are also important in the course of their interaction with the hematopoietic cells on the periphery. They suppress the post-transplant reactions and stimulate of antibodies synthesis, and also restrain the processes associated with the proliferation of T-lymphocytes in the different *in vitro* systems. Thus, the MSCs affect not only HSCs but also the various populations and subpopulations of the lymphocytes.

The MSCs of various origin are known to be rather heterogeneous and to differ in terms of their activeness, most apparently on account of their links with microenvironment. As a result, the set of properties of the MSC of the thymus, the central organ of immunity, is probably of significant importance for the recovery of the immune system. One of the new approaches to effective and focused changes in the properties of HSCs can be the use of physical interaction of tMSCs and HSCs, leading to significant activation of interacting cells, which in the future could be the basis for developing more effective methods to restore the immune system.

Thus, the objective of this research paper was to investigate the influence of intercellular interaction on the immunobiological and regenerative activity of hematopoietic cells and tMSCs.

All types of stromal cells had an ability to interact with the lymphoid cells derived from different sources (thymocytes, splenocytes, cells of the lymph nodes and bone marrow). The largest number of intercellular associations has been formed with the thymocytes, and the smallest one — with the lymphoid cells of bone marrow. Among differentiated forms osteogenic cells are capable of creating a higher number of intercellular associations, as compared to adipocytes. Thus, the possible intercellular physical interactions between the tMSCs and hematopoietic cells might be used as one of the new approaches for efficient and directed modification of the cell properties.

The potentiating effect of tMSCs exposure with thymocytes on the induction of their differentiation in the osteogenic direction in appropriate medium was shown, which

may be a consequence of the formation of intercellular synapses due to membrane receptor affinity with reciprocal signaling. The contact interaction of thymic stromal cells with thymocytes but not with bone marrow cells (BMCs) after 24 hours incubation potentiates the osteogenic differentiation and has no effect on the adipogenic cells maturation. It is the different affinity of the membrane receptors that probably played a role in this effect.

With an optimized model of cyclophosphamide (CP) immunodeficiency implementation, the existing ideas about the immunomodulatory and regenerative effects of tMSCs and HSCs were expanded. tMSCs transplantation had a stimulating effect on lymphoid organs and on the functional activity of innate and adaptive immunity in mice after cyclophosphamide treatment: normalization increased by 2,9-times ($p < 0,05$) bactericidal activity of peritoneal macrophages, stimulated the natural cytotoxicity of splenocytes by 2,7 times ($p < 0,05$) and stimulation of normal phagocytic activity of peritoneal macrophages by 1,9-times ($p < 0,05$) and cytotoxic activity of splenocyte by 3 times, increase in the number of antibody-producing cells in the spleen by 1,8 times ($p < 0,05$) compared with the group of mice receiving CP.

Transplanted BMCs improved erythropoiesis, which was manifested by the normalization of hematocrit and hemoglobin and an increase in the number of reticulocytes in the blood by 2,2 times ($p < 0,05$) compared with the group of mice treated with CP. Transplantation of BMCs did not affect the functional activity of the immune system. Meanwhile, tMSCs reduce the level of reticulocytes by 3,5 times ($p < 0,05$).

Furthermore, BMCs, having been previously activated by tMSCs (aBMCs), have lost this ability. After co-cultivation, BMCs are activated to impact the immune system, which is most likely due to the effect of contact interaction with tMSCs. It was shown that unlike intact BMCs, aBMCs provided increased spontaneous proliferative activity of lymph nodes lymphocytes (by 1,4 times in S+G2/M phase), as well as the recovery of number of cells of the bone marrow, lymph nodes and spleen. At the same time, the number of cells of lymph nodes in the apoptosis increased. aBMCs reduced rates of natural cytotoxicity by 2,9 times ($p < 0,05$) and of mitogen-induced blast transformation reaction of splenocytes by 10,4 times ($p < 0,05$) compared with the control.

Co-transplantation of BMCs and tMSCs is associated with the restoration of the number of bone marrow cells, thymus, spleen and lymph nodes with an increase in the proliferation index of lymph node cells by 1,4 times compared to control. It normalizes the previous reduced concentration of hemoglobin and hematocrit in the blood, as well as BMCs. Co-transplantation had suppressive effect on the blast transformation reaction induced by phytohemagglutinin by 4,3 times, but showed a stimulating effect on delayed type hypersensitivity reaction (DTHR) response by 1,6 times compared with the control.

Thus, transplanted BMCs improve mice's erythropoiesis after CP administration, whereas aBMCs previously cultured with tMSCs lose this ability. However, after co-cultivation, BMCs are being vividly activated in the direction of influencing on the immune system, which may be explained by the effect of contact interaction with tMSCs, which are known to have a productive impact on immune cells and possess immunomodulatory specifics.

The effects of co-transplantation of BMCs and tMSCs are manifested in several ways: stimulation recovery of hematological parameters (as the effect of separate BMCs), normalization of cell number of lymphoid organs (as the impact of tMSCs); inhibition of blast transformation activity (as the impact of aBMCs) and stimulation of DTHR are the effects of co-transplantation.

Therefore, it has been shown that the previous co-cultivation of BMCs with tMSCs makes changes in the manifestation of the effect of these cells in transplantation to CP treated mice. New data about the effect of tMSCs and BMCs cotransplantation have been obtained and it has been revealed that it is not a simple summation of the efficiency of these cells, but their interaction confers new properties to such a cell graft.

In accordance with the research results, a method of potentiation of the induction of osteogenic differentiation of tMSCs by the previous contact with thymocytes was developed. It can be used in laboratories of cell and tissue culture and in the future for the treatment of injuries and diseases of the musculoskeletal system, accompanied by impaired osteoreparation or the formation of bone defects. The obtained data on the effectiveness of cellular grafts experimentally substantiate the possibility of their

implementation in various immunopathologies and may be useful in elaborating new approaches to transplantation of HSCs and MSCs for clinical practice.

Keywords: bone marrow cells, co-transplantation of cells, intercellular interaction, thymic multipotent stromal cells, regeneration of the immune system.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

1. **Demchenko DL**, Nikolskyi IS. The effects of co-transplantation of bone marrow hematopoietic stem cell and thymic multipotent stromal cells on the immune system of mice during its regeneration after cyclophosphamide treatment. *Cell and Organ Transplantology*. 2019; 7(1):54-9.

2. **Demchenko DL**. The effect of transplantation of bone marrow cells induced by the contact with thymus-derived multipotent stromal cells on the immune system of mice, regenerating after cyclophosphamide treatment. *Cell and Organ Transplantology*. 2018; 6(2):170-5.

3. **Demchenko DL**. Ability of thymic MSCs and their derivatives to interact with cells of lymphoid origin. *Biotechnologia Acta*. 2018; 11(6):67-72.

4. Nikolsky IS, Nikolskaya VV, **Demchenko DL**, Taranukha LI, Semenova Y-MA, Serebrovska TV. Effects of multipotent stromal cell transplantation on mice immune system under conditions of its regeneration. *Fiziol. Zh.* 2018; 64(4):3-11. (Особистий внесок здобувача: участь в обговоренні та аналізі літературних даних, їх систематизуванні, написанні статті).

5. Nikolskiy IS, Nikolskaya VV, **Demchenko DL**, Zubov DO. Potentiation of directed osteogenic differentiation of thymic multipotent stromal cells by prior co-cultivation with thymocytes. *Cell and Organ Transplantology*. 2016; 4(2):220-3. (Особистий внесок здобувача: участь в обговоренні та аналізі літературних даних, їх систематизуванні, написанні статті).

6. Нікольський ІС, Нікольська ВВ, **Демченко ДЛ**, Зубов ДО. ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України». Спосіб

потенціювання індукції диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин *in vitro* за остеогенним напрямком. Патент України UA 106592 U.2016 квіт. 26.

7. **Демченко ДЛ.** Мембранна спорідненість гемопоетичних і мультипотентних стромальних клітин як можливий фактор впливу на лінійне диференціювання стромальних клітин. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Іноваційні напрямки в генетичній та регенеративній медицині»; 2017 лист. 9–10; Київ, Україна. 2017, с. 255.

8. **Демченко ДЛ, Нікольська ВВ.** Прискорення регенерації ураженої циклофосфаном імунної системи при котрансплантації гемопоетичних стовбурових та мезенхімальних стромальних клітин тимусу. Матеріали V ювілейного Міжнародного медичного конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України», 2016 квіт. 19-21; Київ, Україна. 2016, с. 133.

9. **Demchenko D, Tymoshenko A.** The impact of thymic multipotent stromal cells transplantation to immune system regeneration after cyclophosphamide. Матеріали XIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2017 квіт.15-27; Львів, Україна. 2017, с. 203.

10. **Demchenko D, Borisyuk A.** Acceleration the immune system regeneration after cyclophosphamide by multipotent stromal cells and hematopoietic stem cells cotransplantation. Матеріали XII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2016 квіт.19-21; Львів, Україна. 2016,с. 137.

11. **Chekh D.** Osteogenic differentiation of thymic multipotent stromal cells stimulated by contact with thymocytes. Матеріали XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2015 квіт. 20-23; Львів, Україна. 2015, с. 388-9.

12. **Чех ДЛ, Никольский ИС, Никольская ВВ, Зубов ДА.** Влияние тимоцитов и клеток костного мозга на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток тимуса. Материалы XIII-Международного Конгресса "Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии", 2015 февр. 18-20; Москва, Россия. 2015, с. 92-3.

13. Чех ДЛ, Никольский ИС, Никольская ВВ, Тарануха ЛИ, Савинова ВО, Семенова М-ЯА. Динамические особенности индуцированного циклофосфаном гемоиммунодефицита. Материалы Международного форум “Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы”, 2014 май 14-17; Казань, Россия. 2014, с. 195-6

14. Чех ДЛ, Никольский ИС, Никольская ВВ, Савинова ВО, Тарануха ЛИ, Семенова Я-МА, Никольская ЕИ. Иммунобиологическая активность трансплантатов гемопоэтических и мультипотентных стромальных клеток тимуса Материалы I Евразийского конгресса «Трансплантация стволовых клеток», 2013 сент. 25-27; Мінськ, Беларусь. 2013, с.109-111.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	25
1.1. Гемопоетичні стовбурові клітини.....	25
1.1.1. Загальна характеристика гемопоетичних стовбурових клітин.....	25
1.1.2. Мікрооточення гемопоетичних стовбурових клітин.....	30
1.2. Мультипотентні стромальні клітини.....	33
1.2.1. Загальна характеристика мультипотентних стромальних клітин.....	33
1.2.2. Механізми різнонаправленого диференціювання мультипотентних стромальних клітин.....	35
1.3. Імуномодуляторні властивості мультипотентних стромальних клітин при взаємодії з гемопоетичними клітинами.....	39
1.4. Характеристика циклофосфану.....	43
1.4.1 Механізм дії циклофосфану.....	43
1.4.2. Вплив циклофосфану на імунітет.....	44
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	47
2.1. Обладнання.....	47
2.2. Експериментальні тварини.....	47
2.3. Методи.....	48
2.3.1. Культивування мезенхімальних клітин тимуса.....	48
2.3.2. Направлене остеогенне диференціювання клітинних культур.....	48
2.3.3. Направлене адипогенне диференціювання клітинних культур.....	49
2.3.4. Реакція утворення фібробласто-лімфоцитарних розеток.....	50

	14
2.3.5. Дослідження клітинності лімфоїдних органів	50
2.3.6. Отримання перитонеальних макрофагів	51
2.3.7. Визначення гематологічних показників	51
2.3.8. Визначення кількості антитілоутворювальних клітин методом локального гемолізу в гелі	51
2.3.9. Реакція гіперчутливості сповільненого типу	52
2.3.10. Визначення фаз клітинного циклу цитофлуориметричним методом...53	53
2.3.11. Визначення проліферативної активності лімфоцитів МТТ-методом ..54	54
2.3.12. Визначення функціональної активності природних кілерів цитофлуориметричним методом	55
2.3.13. Визначення функціональної активності природних кілерів МТТ- методом	56
2.3.14. Визначення спонтанного апоптозу цитофлуориметричним методом з додаванням пропідіума йодиду	57
2.3.15. Визначення поглинальної активності перитонеальних макрофагів цитофлуориметричним методом	58
2.3.16. Визначення бактерицидної активності перитонеальних макрофагів НСТ-методом.....	59
2.4. Схеми експериментів	60
2.4.1. Остеогенне та адипогенне диференціювання МСКт після контакту з гемопоетичними клітинами	60
2.4.2. Трансплантації різних клітинних препаратів мишам після одноразового введення циклофосфаміду	61
2.5. Статистичний аналіз	61
РОЗДІЛ 3 КОНТАКТНА ВЗАЄМОДІЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ І МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН <i>IN VITRO</i>	62

3.1. Дослідження здатності мультипотентних стромальних клітин тимуса та їх диференційованих форм до взаємодії з лімфоїдними клітинами різного походження	63
3.2. Вплив співкультивування мультипотентних стромальних клітин тимуса з гемопоетичними клітинами на диференціювальня стромальних клітин.....	65
3.3. Висновки до розділу 3	69
РОЗДІЛ 4 ОПТИМІЗАЦІЯ МОДЕЛІ ЦИКЛОФОСФАНОВОГО ІМУНОДЕФІЦИТУ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ КЛІТИННИХ ТРАНСПЛАНТАТІВ.....	71
4.1. Дослідження динаміки змін клітинних показників лімфоїдних органів мишей після дії циклофосфану.....	72
4.2. Дослідження динаміки змін кількості лейкоцитів у периферичній крові після дії циклофосфану	75
4.3. Дослідження динаміки змін показників еритропоезу мишей після застосування циклофосфану.	76
4.4. Дослідження динаміки змін імунологічних показників мишей після застосування циклофосфану.	77
4.5. Висновок до розділу 4	80
РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ ІМУННОЇ СИСТЕМИ МИШЕЙ, ЩО ОТРИМУВАЛИ ЦИКЛОФОСФАН ТРАНСПЛАНТАЦІЇ МУЛЬТПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ТИМУСА, КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ, ЇХ КОТРАНСПЛАНТАЦІЇ, ТА ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ АКТИВОВАНИХ КОНТАКТОМ З МУЛЬТПОТЕНТНИМИ СТРОМАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ ТИМУСА.	81
5.1. Дослідження впливу трансплантації клітинних препаратів на регенерацію клітинних показники органів мишей після введення циклофосфану	82
5.2. Дослідження впливу трансплантації клітинних препаратів на відновлення гематологічних показників мишей після введення циклофосфану	87

5.3. Дослідження впливу трансплантації клітинних препаратів на функціональну активність імунної системи мишей після введення циклофосфану.....	89
5.4. Висновки до розділу 5	92
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	Ошибка!
определена.	Закладка не
ВИСНОВКИ	110
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	112
ДОДАТОК 1	138

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДГН - альдегіддегідрогенази;

ККМа - активовані клітини кісткового мозку;

АУК - антитілоутворюючі клітини;

АЦ - адипоцити.

ГСК - гемопоетичні стовбурові клітини;

ДК - дендритні клітини;

ЕТС - ембріональна теляча сироватка;

ККМ - клітини кісткового мозку;

КМ - кістковий мозок;

КУО - колоніє-утворюючі одиниці;

МСК - мультипотентні стромальні клітини;

МСКт - мультипотентні стромальні клітини тимуса;

МФ - макрофаги;

НК - натуральні кілерні клітини;

НСТ - нітросиній тетразолій;

ОБ - остеобласти;

ОЩ - оптична щільність;

РТПГ - реакції трансплантат проти господаря;

Т-рег - регуляторні Т-клітини;

ФЛР - фібробласто-лімфоцитарних розеток;

ФП - фетальна печінка;

ФСБ - фосфатно-сольовий буфер;

ЦФ - циклофосфан;

ALDH (від англ. Aldehyde dehydrogenase) - фермент альдегіддегідрогеназа;

BMP (від англ. bone morphogenetic proteins) –кістковий морфогенетичний білок;

CAR (від англ. CXCL12-abundant reticular cells) - ретикулярні клітини, що продукують CXCL12;

CD (від англ. cluster of differentiation) - кластер диференціації;

CXCL12 (англ. C-X-C motif chemokine ligand 12)- хемокін підсімейства CXС, також відомий як SDF-1 (stromal cell-derived factor 1);

CXCR4 (англ. C-X-C chemokine receptor type 4) - CXС хемокіновий рецептор 4 типу;

FGF (від англ. fibroblast growth factors) - фактор росту фібробластів;

HLA (від англ. human leukocyte antigen) - головний комплекс гістосумісності;

IDO (від англ. indoleamine 2, 3-dioxygenase) - індолеамін 2,3-діоксигеназа;

IFN (від англ. interferon) - інтерферон;

IL (від англ. interleukin) - інтерлейкін;

iPSC (від англ. induced pluripotent stem cell) - індуковані плюрипотентні стовбурові клітини;

KSL - рання форма гемопоетичних стовбурових клітин, що характеризується Kit (+), Sca-1 (+) та Lin (-).

LT-HSC (від англ. Long-term hematopoietic stem cell) - тривало репопулюючі ГСК;

PGE-2 (від англ. Prostaglandin E2) - простагландин E2;

SLAM (від англ. Signaling lymphocytic activation molecule) - сигнальна молекула активації лімфоцитів

SP (від англ. Side population) - клітини “бічної популяції”;

ST-HSC (від англ. Short-term hematopoietic stem cell) - коротко репопулюючі ГСК;

TGF (від англ. Transforming growth factor)- трансформуючий фактор росту;

TLR (від англ. Toll-like receptors) - Toll-подібний рецептор;

TNF (від англ. Tumor necrosis factor) - фактор некрозу пухлини;

Wnts (від англ.– глікопротеїни Wnt) - глікопротеїни сигнального шляху.

ВСТУП

Актуальність теми. У світлі сучасних знань дослідження імунобіологічної та регенеративної активності стовбурових клітин, тобто їх ролі в становленні і функціонуванні імунної системи, сформувалося як актуальний, важливий для теорії і практики медицини науковий напрямок. Основна увага дослідників частіше зосереджена на вивченні ГСК, їх нащадків різного ступеня зрілості і МСК певного органного походження з огляду на те, що гемопоетичні клітини дають початок усім клітинам імунної системи, а МСК створюють необхідне для нормального функціонування ГСК оточення в тимусі і КМ, а також, ймовірно, і в периферичних лімфоїдних органах. При цьому переважна більшість робіт присвячена кістково-мозковим МСК, що формують найбільш значущі для функціонування гемопоетичних клітин структури, у вигляді так званих "ніш" [1, 2].

Значно менше даних про роль МСК в тимусі. Хоча вже відомо, що паренхіма тимуса практично необхідна для ембріонального морфогенезу органу [3]. Вважається, що в тимусі також є ніші, в котрих зосереджені кістково-мозкові клітини-попередники, предетерміновані прямувати по Т-лімфоїдному шляху розвитку, що певною мірою забезпечується МСК [4]. В долях тимусу 12-добових ембріонів мишей, що мають генетичний дефект мезенхіми, доволі помітно гальмується формування тимоцитів $-CD4^+CD8^+$, внаслідок блокування $CD4^+CD8^-$ стадії розвитку. Отже МСК беруть участь у дозріванні тимоцитів [5]. Також МСК впливають на міграцію Т-клітин [6, 7].

МСК діють на гемопоетичні клітини і на периферії, проявляючи перш за все імуносупресивну дію по відношенню до трансплантаційного імунітету [8, 9].

In vitro МСК пригнічують процеси, пов'язані з проліферацією Т-лімфоцитів в різних системах. Між тим МСКт стимулюють антитілогенез *in vivo* [10, 11]. Відомо, що МСК різного походження досить гетерогенні і відрізняються своєю активністю [12 – 14], ймовірно за рахунок зв'язків з мікрооточенням. Таким чином, сукупність властивостей саме МСКт, центрального органу імунітету, може

відігравати особливу та важливу роль у відновленні імунної системи. Вважається, що дія МСКт може бути опосередкована мембранною спорідненістю з гемопоетичними клітинами, що підтверджується формуванням ФЛР [15, 16]. Тому створення контакту між гемопоетичними стовбуровими клітинами та МСК *in vitro* може, мабуть, суттєво змінити властивості клітин, що обумовлює перспективність досліджень в цьому напрямку з метою розробки нових підходів в клітинній терапії.

Для вивчення впливу на регенерацію імунної системи різних типів гемопоетичних клітин і МСКт зручним є використання моделі циклофосфанового імунодефіциту, що характеризується не лише глибоким ураженням кровотворення, а й мобілізацією ГСК із КМ на периферію, що розглядається як необхідний для регенерації процес [17].

Таким чином вивчення особливостей контактної взаємодії МСКт і гемопоетичних клітин є перспективним та актуальним напрямком досліджень з метою розробки нових підходів до їх трансплантації для прискорення регенерації органів імунної системи та відновлення функцій.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана на базі ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» в лабораторії імунології відділу клітинних та тканинних технологій в рамках науково-дослідних тем «Вивчити механізми імунокорекції при спільному застосуванні гемопоетичних стовбурових і мультипотентних стромальних клітин» (2013-2015 рр, № д/р 0113U000102), в якій автор була співвиконавцем, та «Вивчення процесу індукованої мобілізації клітин кісткового мозку в регенерації імунної системи» (2016-2018 рр, № д/р 0116U000141), в якій дисертант брала участь як виконавець окремих розділів НДР.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити вплив міжклітинної взаємодії на імунобіологічну та регенеративну активність гемопоетичних та мультипотентних стромальних клітин тимуса.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Визначити особливості контактної взаємодії МСКт та їх диференційованих форм з гемопоетичними клітинами різного походження.

2. Вивчити вплив контактної взаємодії МСКт з гемопоетичними клітинами на лінійний диференціувальний потенціал стромальних клітин.

3. Оптимізувати модель постциклофосфанового імунодефіциту у мишей для вивчення регенеративної активності клітинних препаратів.

4. Дослідити вплив трансплантації клітин кісткового мозку (ККМ) на постциклофосфанову регенерацію органів та відновлення функцій імунної системи.

5. Провести порівняльну оцінку відновлення імунної системи після ураження ЦФ трансплантацією ККМ, активованих контактом з МСКт, у порівнянні з неактивованими.

6. Вивчити інтенсивність регенерації клітинного складу органів імунної системи, функціональної активності адаптивного і природного імунітету після введення циклофосфану в результаті трансплантації МСКт.

7. Визначити можливість регенерації імунної системи при циклофосфановому імунодефіциті котрансплантацією МСКт та ККМ.

Об'єкт дослідження: контактна взаємодія гемопоетичних клітин і МСКт та її вплив на імунобіологічну і регенеративну активність трансплантованих клітин.

Предмет дослідження: МСКт і гемопоетичні клітини, імунна система мишей.

Методи дослідження: імунологічні (імунізація тварин, визначення кількості антитілоутворювальних клітин (АУК) методом локального гемолізу в гелі, реакція гіперчутливості сповільненого типу (РГСТ), визначення проліферативної активності лімфоцитів в реакції бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) та функціональної активності природних кілерів МТТ-методом, бактерицидної активності перитонеальних макрофагів НСТ методом, реакція утворення ФЛР), культуральні (культивування МСКт, кокультивування мезенхімальних та гемопоетичних клітин, направлене остеогенне та адипогенне диференціювання клітинних культур), біохімічні (спектрофотометричні),

цитофлуориметричні (визначення спонтанного апоптозу, поглинальної активності перитонеальних макрофагів, функціональної активності природних кілерів) і статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше встановлено мембранну спорідненість МСКт та диференційованих з них остеобластів і адипоцитів з лімфоїдними клітинами різного походження з формуванням асоціацій у вигляді ФЛР. У поєднанні «остеобласти – тимоцити» утворюється найбільша кількість асоціацій, а при взаємодії «адипоцити – клітини кісткового мозку (ККМ)» - найменша, що свідчить про різну ступінь мембранної спорідненості у певних клітин, і що може відзначатися на результатах диференціювання стромальних клітин, яке має велике значення в процесах кровотворення і функціонуванні імунної системи.

Отримано нові дані стосовно потенціювального впливу експозиції МСКт з тимоцитами на ідукцію їх диференціювання за остеогенним напрямком у відповідних середовищах, що може бути наслідком формування міжклітинних синапсів, зумовлених мембранною рецепторною спорідненістю з реципрокним сигналінгом. Це визначає перспективний напрямок дослідження процесів, які проходять за участю контактної взаємодії МСКт і гемопоетичних клітин.

Розширено існуючі уявлення стосовно імуномодуляторного впливу МСКт та ГСК. Продемонстровано виражений стимулюючий ефект МСКт на імунологічні реакції та відновлення лімфоїдних органів, тоді як ККМ більшою мірою впливали на регенерацію еритропоезу.

Уперше показано, що попереднє співкультивування ККМ з МСКт вносить зміни у прояв ефекту цих клітин при трансплантації імунодефіцитним мишам спрямовуючи їх активність в напрямок дії на функціонування імунної системи. Отримано нові дані стосовно впливу співтрансплантації МСКт та ККМ і встановлено, що відбувається не проста сумація ефективності цих клітин, а їх взаємодія надає нових властивостей такому клітинному трансплантату.

Практичне значення одержаних результатів. За результатами роботи розроблено спосіб потенціювання індукції остеогенного диференціювання МСКт

попереднім контактом з тимоцитами. Він може бути використаний в лабораторіях клітинного та тканинного культивування та в майбутньому при лікуванні пошкоджень і захворювань опорно-рухового апарату, що супроводжуються порушенням остеорепарації або формуванням дефектів кісткової тканини. Отримані дані по ефективності клітинних препаратів експериментально обґрунтовують можливість їх застосування при різній імунопатології та можуть бути корисними у розробці нових підходів трансплантації ГСК та МСКт з метою клінічного використання.

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником розроблено концепцію дисертаційної роботи, сформульовано мету та завдання дисертаційного дослідження, проведено планування схем експериментів та розробка методичних підходів до виконання комплексу лабораторних досліджень, обговорення отриманих результатів, формулювання висновків. Автором самостійно проведений інформаційний пошук, аналіз та статистичне опрацювання результатів дослідження. Дисертантом виконані експериментальні дослідження *in vitro* та *in vivo*. Самостійно зібрані літературні дані, на основі яких проаналізовані власні результати.

Автор щиро вдячний усім співробітникам лабораторії імунології відділу клітинних та тканинних технологій ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини» за консультації та допомогу в роботі.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи були представлені на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Іноваційні напрямки в генетичній та регенеративній медицині» (Київ, 9–10 листопада 2017), V ювілейному міжнародному медичному конгресі «Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України» (Київ, 2016), XI, XII і XIII міжнародних наукових конференціях студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів 2015-2017), XIII-міжнародному конгресі «Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии» (Москва, 2015), міжнародному форумі «Клиническая

иммуноогия и аллергология – междисциплинарные проблемы” (Казань, 2014), I Евразійському конгресі «Транслантація стволових клеток» (Мінск, 2013).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 14 робіт, з них 5 статей у фахових наукових виданнях (з них 1 – у виданнях, що входять до міжнародної бази даних SCOPUS; 4 – у виданнях, що входять до міжнародної бази даних Copernicus), 1 – патент на корисну модель. 8 тез у матеріалах міжнародних та вітчизняних конгресів і конференцій.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, трьох розділів результатів дослідження та їх обговорення, висновків, списку використаних літературних джерел. Загальний обсяг дисертації складає 140 сторінок. Робота ілюстрована 2 таблицями та 21 рисунком. Перелік використаних літературних джерел включає 237 найменувань, з них кирилицею – 9, латиницею – 228.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Гемопоетичні стовбурові клітини

1.1.1. Загальна характеристика гемопоетичних стовбурових клітин

ГСК - це мультипотентні клітини, які можуть диференціюватися у всі типи клітин крові, включаючи міелоїдні та лімфоїдні клітини. Гематопоез - це процес, який передбачає вироблення всіх зрілих клітин крові зі ГСК, підтримуючи тонкий баланс між інтенсивною продукцією і необхідністю постачання та регулювання кількості еритроцитів, гранулоцитів, моноцитів, лімфоцитів та тромбоцитів крові протягом життя. Було підраховано, що в середньому доросла людина щодня виробляє понад 500 мільярдів клітин крові. Концепцію ГСК вперше запропонували Till і McCulloch. Їх дослідження виявили великий гемопоетичний потенціал поодиноких ККМ, таким чином встановивши існування поліпотентності ГСК [18]. ГСК - це єдині клітини гемопоетичної системи, які володіють як поліпотентністю, так і здатністю до самовідновлення. Тобто ці клітини здатні як диференціюватися у всі типи функціональних клітин крові, так і зберігати у процесі поділу дочірні ГСК [19]. Цей механізм асиметричного поділу клітин необхідний для збереження постійної кількості ГСК у кровотворних органах та запобігання їх виснаження. Обидві характеристики сприяють підтримці гомеостазу системи і дозволяють відновити кровотворення після травми, наприклад, інфекції чи крововтрати. Відновлення після летального опромінення залежить від третьої, важливої властивості ГСК - здатності мігрувати під впливом конкретних хемокинів.

ГСК були ідентифіковані і можуть бути виділені з ембріональних і дорослих тканин, включаючи жовтковий мішок, область аорто-гонадо-мезонефроса, фетальну печінку (ФП), КМ, периферичну та пуповинну кров [20]. Недавні дослідження пролили нове світло на розуміння ембріонального розвитку

гемопоезу від мезодерми та міграції ГСК під час ембріогенезу, що передбачає безліч анатомічних ділянок в ембріоні до того, як гематопоез буде встановлений у КМ мікросередовищі [21–23].

Миша є найбільш широко використовуваною моделлю тварин для вивчення хвороб ссавців, так як багато молекул демонструють високий ступінь спорідненості. Хоча не мало аспектів біології ГСК мають відмінності. Використовувані стратегії очищення дещо відрізняються для експериментальної ізоляції мишиних ГСК та виділення людських ГСК для терапевтичних застосувань. Існують також деякі відмінності в регуляції гемопоезу у людини та гризунів, особливо анатомічне розміщення центрів гемопоезу в ході життя. У людини селезінка не забезпечує гемопоез після народження, хоча екстремедулярний селезіночний гемопоез може виникати на період гемопоетичного стресу [24]. Тоді як селезінка гризунів гемопоетично активна впродовж всього життя, більш того, у всіх кістках гризунів відбувається гемопоез і довгі кістки є головним місцем його вивчення. Навпаки, гемопоез у довгих трубчастих кістках людини, за виключенням їх проксимальних відділів, припиняється у віці 5–7 років, а червоний КМ заміщується на гемопоетично неактивну жирову тканину.

Примітивні пре-ГСК були ідентифіковані у жовточному мішку та області аорто-гонадо-мезонефроса мишей. Ці клітини експресують антигени CD41 та CD34, але не мають експресії CD45 та Sca-1 (табл. 1.1) [25]. Подібні популяції пре-ГСК можуть також бути виявлені в плаценті мишей. З пре-ГСК формуються остаточні ГСК, які експресують антигени CD34, CD45 та Sca-1. Вони починають колонізувати ФП, яка стає головним кровотворним органом протягом другого триместру гестації, і кровотворна активність залишається виявленою в печінці мишей протягом декількох тижнів після народження [26]. ФП також є головним кровотворним органом у людини в період гестації. ГСК мігрують до ФП через пупкову артерію, плаценту та пупкову вену. Цей міграційний шлях ГСК може пояснити, чому плацента також збагачується ГСК [27].

Таблиця 1.1.

Маркери мишиних та людських ГСК на різних стадіях ембріональної та постнатального розвитку

ГСК	Миші	Людини
Гемангіобласт (жовточний мішок)	Flk-1 (Kdr)+	?
Пре-ГСК (область аорто- гонадо- мезонефроса)	CD34+ CD41+ Sca-1 ⁻ CD45 ⁻	?
ГСК (область аорти- гонад-мезонефроса, плацента)	CD34+ CD45+ CD41+/- Sca-1+/-	CD34+
ГСК (ФП)	Sca-1+ CD34+ CD45+ Mac1+ CXCR4+	CD34+ CD133+ CXCR4+ Lin ⁻
ГСК (КМ)	CD34 ^{lo/-} Sca-1+ Thy1.1+ ^{lo} CD38+ c- kit+ lin ⁻ c-kit+ Thy1.1(CD90) ^{lo} Lin ⁻ Scahi (KTLS) CD150+ CD48 ⁻ CD244 ⁻ (SLAM) Rh123 ^{low} , Hoe3342 ^{low} , pyroninY ^{low} 5-FU resistant, ALDH ^{hi} Fr25 (small cells) Lin ⁻ Side population (SP) – Cells LT-HSC: CD34 ⁻ CD38 ⁻ Sca-1+ Thy1.1+ ^{lo} c-kit+ lin ⁻ CD135 ⁻ Slamf1/ CD150+ ST-HSC: CD34+ CD38+ Sca-1+ Thy1.1+ ^{lo} c-kit+ lin ⁻ CD135 ⁻ Slamf1/ CD150+ Mac-1 (CD11b) ^{lo}	CD34+ CD59+ Thy1/CD90+ CD38 ^{lo/-} c-kit/CD117+ lin ⁻ CD34+CD38 ⁻ Lin ⁻ CD34+ CD133+ CXCR4+ Lin ⁻ Rh123 ^{low} , Hoe3342 ^{low} , pyroninY ^{low} ALDH ^{high} (ALDH ^{hi} CD133+Lin ⁻) CD150+ CD48 ⁻ CD244 ⁻ (SLAM) Side population (SP) – Cells

ГСК, присутні у другому триместрі гестації у ФП мишей, експресують антиген CD34, CD45, Sca-1, Mac-1 та CD150 [28]. У третьому триместрі вагітності у мишей ГСК починають заселяти КМ та селезінку [29]. У відповідь на SDF-1, ГСК, які експресують відповідний рецептор, CXCR4, переходять від ФП до КМ та поступово втрачають експресію антигену CD34 у мишей [30]. Людські ГСК експресують CD34 + CD38⁻, а деякі CD133 [31].

Колонізація КМ не припиняє шляху розвитку ГСК, оскільки ці клітини постійно циркулюють у периферичній крові та лімфі. Симетричний поділ призводить до двох ГСК, пов'язаних з нішею, а асиметричний поділ призводить до однієї дочірньої ГСК в стані спокою, а в іншій клітині включається програма диференціювання, і вона вступає в циркуляцію, щоб знайти нову нішу [32]. Цей механізм може бути відповідальним за підтримання гомеостазу між нішами ГСК в різних областях КМ, розподілених по різних кістках. Постулюється, що циркулюючі ГСК також “патрулюють” периферичні тканини на наявність потенційних патогенів або пошкоджень [33]. Це явище дозволяє їм швидко реагувати в боротьбі з інфекціями, забезпечуючи клони гранулоцитів, моноцитів або дендритних клітин.

ГСК перебувають в КМ з оціночною частотою 0,01% від загальної кількості ядерних клітин. Відділення ГСК від диференційованих ККМ, є центром інтенсивного дослідження, так як клітинний склад КМ є надзвичайно неоднорідним і включає різні популяції клітин-попередників, що можуть бути ієрархічно організовані відповідно до їх потенціалу самовідновлення та диференціювання. Тривало репопулюючі ГСК (long-term LT-HSC) являють собою фундаментальні стовпи кровотворення: їх здатність самостійно поновлюватися гарантує постійний обіг клітин крові, що потребує організм протягом усього життя. Нащадками LT-HSC також є коротко репопулюючі ГСК (short-term ST-HSC) з обмеженою здатністю до самооновлення. Вони мають високу проліферативну активність та дають початок мультипотентним попередникам та всім низхідним попередникам, що в кінцевому підсумку генерують диференційовані клітини крові [19]. ST-HSC та мультипотентні попередники при трансплантації

сприятимуть швидшому відновленню, однак можуть підтримувати гемопоез лише короткий термін та швидко виснажуються [34]. Крім того, подальші дослідження показали, що гемопоетична ієрархія може бути складнішою, ніж вважалося спочатку. Оцінюючи поодинокі ГСК за допомогою серійної трансплантації та класифікуючи їх на основі відновлення периферичної крові, було показано, що навіть виділені саме LT-HSC є неоднорідними і містять клітини, які частково зміщені до мієлоїдних або лімфоїдних фенотипів [35].

Ідентифікація ГСК заснована на виявленні експресії молекул на плазматичній мембрані характерних для цих клітин. Однак, незважаючи на численні зусилля, ще не знайдено єдиного унікального маркера, який можна використовувати окремо для ідентифікації та ізоляції ГСК. Для цього використовують комбінації різних маркерів та фізіологічних властивостей. Завдяки розвитку протокової цитометрії та технології на основі моноклональних антитіл, за останні два десятиліття було запропоновано різні схеми ізоляції певних популяцій ГСК [36, 37].

Серед найважливіших антигенів, що експресуються на поверхні клітини є CD34, CD133, CXCR4 та c-kit. Однак є деякі відмінності між маркерами для мишиних та людських ГСК [38]. Найбільш релевантні маркери поверхні клітин, пов'язані з мишиними ГСК, включають Sca-1, c-kit та Thy1.1 (CD90), а для ГСК людини: CD34, CD133, CXCR4 та CD150 [31]. Як мишачі, так і людські ГСК не мають лінійних маркерів диференціювання (Lin⁻). Вони також демонструють низьке накопичення/фарбування метаболічними фторхромами [39]. ГСК також мають *in vivo* стійкість до фторурацилу (5-FU), виражають високу активність ферменту альдегіддегідрогенази (ALDH), який надає стійкість до ЦФ.

Виділення однієї з найбільш ретельно охарактеризованих популяцій ГСК покладається саме на експресію рецептора тирозинкінази c-Kit (CD117) та мембранного глікопротеїну Sca-1 [40], одночасно з відсутністю лінійних маркерів диференціаціювання. Отримані в результаті c-Kit⁺ Sca-1⁺ популяції, які зазвичай називають клітинами KSL, значно збагачені клітинами з високою кровотворною активністю, але насправді лише приблизно 10% клітин KLS є дійсно LT-HSC і все

одно містять різноманітні потомки. Були розроблені схеми подальшого збагачення фракції KSL в ГСК. Ці стратегії ґрунтуються або на комбінації з іншими поверхневими маркерами, такими як Thy1.1 (KSL Thy^{low} або KTSL), CD34 (KSL CD34^{neg/low}) та Flk2 (KSL CD34⁻ Flk2⁻) [41], або на фізіологічних властивостях, наприклад, здатність до виведення барвника Hoechst 33342 спостерігається в клітинах “бічної популяції” (SP) (SP^{KSL}) [28].

Були описані й альтернативні методи ідентифікації ГСК, які не залежать від схеми KSL. Ці стратегії включають використання маркерів, таких як Tie-2 [42], Endoglin [43] або рецептор ендотеліального білка С (EPCR) [44]. Було запропоновано також поєднання маркерів сигнальної молекули активації лімфоцитів (SLAM) (CD150 + CD48-CD244⁻) для визначення та сортування LT-HSC. Маркер CD150 є членом родини родини SLAM і ще відомий як slamF1 [45]. Поверхневі маркери клітин, що використовуються для виділення ГСК, наприклад такий як антиген CD34, також експресуються на більш диференційованих кровотворних клітинах [46]. Аналогічно, CXCR4, рецептор для α -хемокіну SDF-1, який, як було сказано, є основним хемотрактантом ГСК, також експресується більш диференційованими гемопоетичними клітинами, наприклад, мегакаріоцитами, моноцитами, тромбоцитами та лімфоцитами [47]. Отже, стає зрозуміла необхідність багатопараметричного сортування клітин, орієнтованого як на маркери поверхні клітин, так і на метаболічні показники.

1.1.2. Мікрооточення гемопоетичних стовбурових клітин

У дорослих ссавців ГСК знаходяться переважно в КМ, що є головним і спеціалізованим органом гемопоезу. Локальні регуляторні механізми розвитку ГСК опосередковуються гемопоезіндукуючим мікрооточенням, у якому ключова роль належить МСК КМ і їх похідним. Раніше було показано, що крім опорної функції, яку виконує строма для кістковомозкової паренхіми, стромальні елементи відповідальні за міграцію, сортування, реплікацію, проліферацію і диференціювання ККМ. Крім того, МСК здатні відновлювати початкове

мікрооточення при пошкодженні органів, що містять строму. У всіх випадках спочатку відновлюється строма, а потім відбувається її репопуляції кровотворними клітинами. Таким чином, між паренхімою КМ і елементами строми, що створює мікрооточення, існує тісний взаємозв'язок. Строма різних органів індукує диференціювання специфічних ліній клітин крові з гемопоетичних клітин-попередників. В експериментах з трансплантацією тканин було показано, що усередині строми КМ колонії переважно гранулоцитарні за своєю природою, в той час як в стромі селезінки - головним чином еритроїдні, а в колоніях, що перекривають кордони стром двох типів, лінії були перемішані [48].

У 1978 р Schofield, ґрунтуючись на спостереженнях колег, припустив, що мікрооточення, яке індукує диференціювання, функціонує за принципом гемопоетичної ніші стовбурових клітин, що фіксує їх на місці завдяки взаємодії між лігандами α -хемокіну, SDF-1 і молекулами адгезії VCAM-1, що експресується клітинами, запобігає дозріванню, дозволяючи стовбуровим клітинам самооновлюватись, проліферувати і виходити у диференціювання [1]. У міру накопичення знань про роль мікрооточення в забезпеченні життєдіяльності ГСК і розумінні того факту, що його функціональний потенціал забезпечується тісною взаємодією багатьох елементів строми КМ, ставало очевидним, що роль окремих її утворень, які безпосередньо впливають на ГСК, нерівнозначна. Експериментальні дослідження структури і функцій мікрооточення ГСК дозволили виділити з широкого спектру формуючих його елементів конкретні кістковомозкові стромальні утворення, які безпосередньо контролюють життєдіяльність ГСК, визначають їх локалізацію і запускають генетично детерміновану програму проліферації і диференціювання родоначальних клітин гемопоезу. У формуванні ніші беруть участь багато типів клітин, включаючи МСК, остеобласти, клітини ендотелію, CAR клітини, симпатичні нервові волокна.

Тривалий час вважалось, що ніша КМ ділиться на два основні типи залежно від місця розташування ГСК: остеобластичну (ендостальну) та судинну (синусоїдальну) нішу. Остеобластична ніша підтримує мікросередовище, необхідне для спокою та підтримання ГСК, тоді як судинна ніша поблизу

синусоїдальних судин КМ забезпечують мікросередовище, яке контролює розповсюдження, мобілізацію та диференціацію ГСК [49, 50]. Коли сигнал диференціації передається в ендостальну нішу, ГСК можуть мігрувати і отримувати нове мікросередовище у судинній ніші, що бере участь у подальшій мобілізації ГСК. На цьому етапі 60% ГСК експресують SLAM (CD150 + CD244-CD48-). В минулому, більшість досліджень були зосереджені на впливі остеобластів на ГСК. Як результат, відомо, що остеобласти регулюють розмір пулу ГСК [51] і відіграють важливу роль у підтримці ГСК та остеобластичної ніші, продукуючи фактори росту, такі як CXCL12, ангіопоетин (Ang-1), BMP та ліганд Notch [52]. Навколо синусоїдальних кровоносних судин є стромальні клітини, що відіграють важливу роль у подальшому функціонуванні ГСК. У багатьох дослідженнях було зосереджено увагу саме на МСК. CD271 [53] та CD146 [54] були визначені як мезенхімальний маркер клітин у людини. Крім того, на генетично модифікованих лініях мишей, наприклад з делецією CXCL12, був виявлений взаємозв'язок між функціонуванням МСК в нішах та ГСК [55, 56]. Таким чином у 2013 році було введено розширену концепцію ніші, в яку була включена нова ніша - артеріолярна [57]. Аналіз тривимірної структури ніші ГСК виявив, що періартеріолярні стромальні клітини, що характеризуються експресією Nestin, а не тільки остеобласти, регулюють утримання ГСК в стані спокою. Коли ГСК отримують мобілізаційний сигнал, сильна взаємодія між остеобластами за участю гемофільної молекули Ncadherin, МСК та ГСК слабшає, що призводить до вивільнення ГСК в синусоїдальні судини КМ [58]. Для того, щоб кожна ніша коректно виконувала свою роль, найважливіше підтримувати нішевий гомеостаз. Крім того, важливо також відновлення ніші КМ після стресових станів, наприклад радіації, хіміотерапевтичного лікування або інфекції [59]. Існують докази того, що взаємодія між нішею і ГСК взаємна, однак цей процес недостатньо вивчений. Було виявлено *in vitro* і *in vivo*, що протягом 48 годин після стресу, викликаного гострою кровотечею, ГСК секретують білки BMP-2, BMP-6, що направляють розвиток МСК по остеобластній лінії [60]. Гомеостаз ніші КМ означає не тільки підтримку ГСК, але і регуляцію та підтримку

стромальних ККМ або клітин ендотелію, що складають нішу. Тобто компоненти ніші кісткового мозку контролюють один одного за допомогою різних факторів.

Регуляторний ефект стромального мікрооточення КМ здійснюється шляхом прямих контактів стромальних клітин з кровотворними попередниками, а також за допомогою напрацьованих стромой гуморальних факторів стимуляції і пригнічення процесів проліферації і диференціювання ГСК. Складна мережа сигнальних шляхів регуляції ГСК в даний час є предметом інтенсивних досліджень.

1.2. Мультипотентні стромальні клітини

1.2.1. Загальна характеристика мультипотентних стромальних клітин

МСК були описані у 1968 році в лабораторії Фріденштейна А.Я, як підтип дорослих фібробластних клітин, що мають здатність до проліферації, самовідновлення та трилінійного диференціювання. Перші дані, що свідчать про присутність в КМ не тільки гемопоетичних клітин, що дають початок всім клітинам крові, але і ще однієї популяції стовбурових клітин, були отримані за допомогою кількох підходів. В експериментальних моделях при інтраперитонеальній трансплантації культивованої на носії строми кісткового мозку виникали осередки остеогенеза [61]. Також, з КМ була виділена популяція клітин, відмінних від ГСК, але яка володіла властивостями стовбурових. Ці клітини утворювали клони (колонії фібробластів) при культивуванні [62], зберігаючи здатність до диференціювання в різні типи спеціалізованих клітин, включаючи остеобласти, хондроцити і адипоцити [63]. З часом стало зрозуміло, що зміни в процедурах виділення та культивування МСК сприяли породженню гетерогенних клітинних популяцій.

МСК можуть бути отримані з різних тканин дорослого організму. Описові назви для популяцій МСК в літературі включають мультипотентні стромальні клітини, мезенхімальні стовбурові клітини, мезенхімальні прогеніторні клітини,

мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, стромальні клітини кісткового мозку, мезенхімальні стромальні клітини, мезенхімальні клітини-попередники та інші.

Ідентифікувати МСК і аналізувати їх безпосередньо в тканинах дуже складно. Їх гетерогенність, анатомічна локалізація та функціональні ролі у гомеостазі тканин лише починають розкриватися. Тому більшість висновків про біологічні властивості цих клітин зроблено на підставі вивчення популяцій стромальних клітин виділених з різних тканин [64]. Міжнародне товариство клітинної терапії (ISCT, Ванкувер, Канада) розробило мінімальні критерії, згідно яких МСК повинні прикріплюватися до пластику при культивуванні в стандартних умовах; експресувати на поверхні маркерні антигени CD 105, CD 73 і CD 90, але при цьому не містити CD 45, CD 34, CD 14 або CD 11b, CD 79 α або CD 19 і HLA-Dr, а також диференціюватися в остеобласти, адипоцити і хондробласти *in vitro* [65].

МСК можуть бути виділені практично з будь-якої тканини тіла і відображати дуже схожі властивості та незначні відмінності, у тому числі і геномні [66]. Найбільш перспективними джерелами МСК для вивчення їх біологічних властивостей і застосування в регенеративній медицині зараз вважаються кістковий мозок і жирова тканина. Однак ці клітини можуть бути виділені і з інших тканин, включаючи шкіру, тимус, селезінку, ендометрій та інші [67]. Примітно, що МСК, отримані з різних постнатальних і ембріональних тканин, навіть при культивуванні в одних і тих же умовах відрізняються один від одного за здатністю формувати колонії, експресією генів і диференціувальним потенціалом [68]. Профілі протеом і транскриптом МСК демонструють специфічні маркери походження [66]. Крім того, існують відмінності у ефективності формування колоніє-утворюючих одиниць (КУО) фібробластів, поверхневих профілях, багатолінійному диференціюванні та паракринних функціях [69, 70] свідчать про можливість різного застосування клітин. Ці відмінності викликають необхідність дослідження МСК різного походження для розуміння біології клітин. Імовірно, спостережувані відмінності є наслідком

різних біологічних функцій МСК у відповідних тканинах. Останні повідомлення свідчать, що МСК з аллогенних джерел частіше використовуються у випробуваннях, ніж аутологічні МСК [71, 72], хоча обидва джерела клітин продемонстрували порівнянні клінічні ефекти [73, 74]. Ці клітини, як правило, називаються «універсальними донорськими клітинами», оскільки вони володіють імунною толерантністю. Тим не менш, як і з використанням клітинної терапії, надзвичайно важливо повністю оцінити безпеку та ефективність алогенних стратегій перед застосуванням [75], [76].

1.2.2. Механізми різнонаправленого диференціювання мультипотентних стромальних клітин

Як згадувалось вище, відповідно до міжнародної класифікації одним з основних критеріїв визначення клітин, що являють собою МСК, є саме їх здатність диференціюватися в класичні мезенхімальні клітинні лінії кістки, жиру і хрящ [77, 78]. Існує багато методичних підходів направлено диференціювання МСК. Такі фактори, як аскорбінова кислота і дексаметазон, при визначених концентраціях, здатні направляти МСК до остеогенне диференціаціювання. Подібним чином, BMPs, Wnts, FGFs та інші гепаран-сульфат-чутливі біологічно активні речовини і фактори росту також здатні стимулювати остеогенне диференціаціювання [79]–[81]. Аскорбат, інсулін, трансферин, селеновая кислота і TGF- β є усталеними індукторами хондрогенезу [82]. Для стимулювання адипогенезу до культур зазвичай додають дексаметазон, індометацин, інсулін та ізобутилметилксантин [83]. Загальноновизнано, що такі фактори, як антибіотики, добавки для росту, сироватка та лізат тромбоцитів, можуть впливати на фенотипічні властивості МСК та їх мультилінійний потенціал [84], [85].

У поновленні та підтримці диференціювання МСК в нішах значну роль відіграють нішові цитокіни та молекули адгезії ряду стромальних клітин з подібною або обмеженою функціями [86, 87]. Проте мало доказів, чи самі ГСК регулюють підтримку або розвиток ніші. Однак загальноприйнята думка полягає

в тому, що зв'язок між ГСК та клітинами ніши все ж перехресний і забезпечує функціонування один одного [88 - 90].

В даний час добре відомо, що остеобластні клітини, що диференціюються з МСК відіграють центральну роль у створенні ніші ГСК [91, 92]. Експресовані остеобластами рецептори (N-Cadherin, Jagged, VCAM-1), розчинні і поверхнево-зв'язані цитокіни і фактори росту регулюють функції ГСК. Кожен з цих факторів, у свою чергу, піддається впливу механічних, гормональних і локальних сигналів (наприклад, BMP, Ang-1). Однак, чи самі ГСК регулюють диференціювання остеобластів з мезенхімальних попередників залишається не до кінця з'ясованим.

Існує певна кількість прямих доказів участі ГСК у розвитку ніші. Так при спільному культивуванні ГСК з мезенхімальними попередниками диференціювання направляється в бік остеобластного походження. ГСК, виділені у тварин, підданих гострому стресу (наприклад, кровотеча або 5-флюороурацил), значно краще індукують остеобластне диференціювання *in vitro* та *in vivo*, ніж ГСК, отримані від контрольних тварин. Важливим є те, що відповідальними за цю діяльність були BMP-2 та BMP-6, отримані від ГСК. Здатність ГСК генерувати BMP змінювалась з часом та у тварин при моделюванні остеопорозу [93].

Також до факторів, модулюючих диференціювання МСК можна віднести епігенетичні механізми, котрі не так давно почали викликати інтерес для спрямування цього процесу Диференціювання стовбурових клітин у спеціалізовані клітини вимагає підвищеної регуляції генів, що беруть участь у створенні специфічного клітинного фенотипу та супресії генів, що відповідають за стовбуровість клітин [94]. Епігенетична регуляція диференціювання стовбурових клітин відноситься до функціонально значущих модифікацій геному, які не передбачають зміни нуклеотидної послідовності. Прикладами таких змін є метилювання ДНК і модифікації гістонів, які, у свою чергу, діють шляхом модифікації доступності генів до факторів транскрипції та інших модуляторів [95, 96]. Таким чином клітини можуть направлятися до певної лінії диференціювання шляхом супресії генів, пов'язаних з диференціюванням по альтернативній лінії [97]. На даний час вже є розроблені протоколи

диференціаціювання МСК з акцентом на остеогенне, хондрогенне або адипогенне диференціювання з урахуванням механізмів епігенетики [98].

Накопичувані дані свідчать про те, що МСК здатні трансдиференціюватися в інші типи клітин мезодермального, ектодермального і ентодермального походження, включаючи ендотеліальні клітини [99], кардіоміоцити [100], гепатоцити [101] і нейтральні клітини [102]. Не зрозуміло, чи цей процес являє собою індуковану культурою аберантне транс-диференціювання або, можливо, віддзеркалює природну здатність клітин дорослої строми до перепрограмування під конкретні умови. Примусове транс-диференціювання в культурі може бути аналогічне подіям розвитку (наприклад, утворення нервового гребеня, епітеліальний-мезенхімальний і ендотеліальний перехід). У ряді досліджень з використанням моделей трансдиференціювання МСК *in vivo* повідомляється, що вони приживляються та диференціюються, що призводить до функціонального поліпшення ендогенних тканин [103 - 105]. В цей час також було продемонстровано, що МСК після трансплантації інтегруються в тканини реципієнта швидше за рахунок злиття з резидентними клітинами, ніж шляхом диференціювання в клітини, характерні для даної тканини [106 - 108].

Враховуючи протиріччя даних деякі автори, визнають здатність МСК диференціюватися лише в трьох основних напрямках мезенхімального походження і ставлять під сумнів здатність МСК диференціюватися в клітини інших зародкових листків (ентодермального і ектодермального) як *in vitro*, так і *in vivo* [64].

Відмінності в оцінці диференціювально потенціалу культивованих МСК можуть пояснюватися неоднаковим кількісним і якісним складом прогеніторних клітин в тканинах, з яких вони були отримані. По-перше, виділена популяція МСК гетерогенна і містить клітини, що відрізняються проліферативними і диференціювальним потенціалом *in vitro* і *in vivo* [109, 110]. Крім того, мультипотентність МСК може поступово обмежуватись в ході їх культивування.

Різні групи вчених припустили, що тільки частина загального числа клонів може диференціюватися в усі три лінії. Більшість клонів виявляються

двопотентними і здатними розвиватися лише по остеогенному і хондрогенному напрямкам. Клони, що виявили підвищений адипогенний потенціал, мали знижений хондрогенний потенціал, і навпаки. Також спостерігали бімодальне диференціаціювання МСК, що чергуються між остеогенезом і адипогенезом [111]. Крім того, повідомлялося про монопотентні МСК [12, 109, 112]. Таким чином, були ідентифіковані три-, бі- і монопотентні колонії. Причини гетерогенності в потенціалі диференціаціювання не до кінця зрозумілі, але, швидше за все, відображають епігенетичні адаптації, які направляють клітини до різних ліній, залежно від вихідної тканини. Остання концепція залишається гіпотезою в даний час, але є логічним наслідком сучасних уявлень про фізіологічне мікросередовище стромальних клітин. Наприклад, стромальні клітини в жировій тканині або в кістковому мозку піддаються впливу різних факторів росту, цитокінів і хемокінів. Зрештою, такі позаклітинні сигнали відчуюються поверхневими клітинними рецепторами і трансдукуються в ядро для опосередкування епігенетичних змін хроматину. Останні зміни частіше гарантують, що стромальні клітини в жировій тканині диференціюються в пре-адипоцити, тоді як аналогічні стромальні клітини в кістковому мозку можуть більш легко перетворюватися в скелетні прогеніторні клітини. Також, свіжевиділені популяції МСК можуть вже містити прогеніторні клітини, комітовані в певних напрямках диференціаціювання залежно від їх походження.

Беручи до уваги неоднорідність різних препаратів МСК, характеристика лінійно-диференціаційно потенціалу є важливою, хоча й не доцільно базувати вибір МСК виключно на цій біологічній властивості. Диференціаціювання МСК важливе для підтримки і репарації тканин, а також для інженерних стратегій на клітинній основі, що потребують саме приживлення диференційованих клітин в тканинах господаря. Проте, потенціал трофічних функцій МСК останнім часом набуває значно більшого значення в клітинній терапії.

1.3. Імуномодуляторні властивості мультипотентних стромальних клітин при взаємодії з гемопоетичними клітинами

Здатність МСК модулювати імунну відповідь була виявлена через десятки років після перших повідомлень про ці клітини. Наразі МСК можна відрестити до регуляторних клітин [113 - 120]. Було помічено можливість пригнічуючи проліферацію Т-клітин *in vitro* та продовження виживання алогенних шкірних трансплантатів *in vivo* [76, 77]. З того часу розуміння того, як МСК опосередковують свої імунодепресивні ефекти, значно просунулося. Велика кількість досліджень *in vitro* дозволила зрозуміти вплив МСК на реакції як вродженої, так адаптивної ланки імунної системи. Зокрема, МСК мають здатність втручатися у роботу комплементу, сигналізацію ТЛР рецепторів [78–82]. МСК мають здатність взаємодіяти з багатьма видами імунних клітин, включаючи В-клітини, Т-клітини, дендритні клітини (ДК), клітини природних кілерів (НК), нейтрофіли та макрофаги [128]. Було показано, що механізми взаємодії покладаються на контакт клітина-клітина, що працює у співпраці з секрецією розчинних імунних факторів, щоб викликати регульовану МСК імуносупресію [114]. Ці специфічні модулятори, включаючи безліч імуномодуючих факторів, цитокінів та факторів росту, модулюють запальні реакції та врівноважують імунні профілі [129]. А саме, розчинні імунні фактори МСК, такі як PGE-2, 2,3-IDO або NO, активують імунні клітини модулюючи регуляцію [130]. Наразі є дані, що найбільшою імуносупресивною активністю володіють МСК, які продукують ІЛ-35 [131]. Одним із паракринних факторів, які секретуються МСК, є позаклітинні везикули і інкапсульовані у них мікро-РНК [132] та інші біологічно активні молекули [133 - 135].

МСК мають, щонайменше дві характеристики, які важливі для їх позитивного ефекту при лікуванні захворювань, опосередкованих імунітетом: міграція до місця пошкодження тканин та модуляція імунної відповіді [136]. Запальні цитокіни TNF- α , IL-1, IFN- γ , що виділяються після пошкодження тканин та під час запалення, індукують експресію на поверхні клітин молекул адгезії, що

опосередковують трансміграцію МСК у позаклітинний матрикс. Цей процес в основному залежить від взаємодії CXCL12, індукованої прозапальними стимулами, з відповідним рецептором CXCR4, вираженими на поверхні МСК. Вплив на імунну систему реалізується як прямим міжклітинним контактом, так і паракринно шляхом секреції широкого спектру різних ростових та імуномодуляторних розчинних факторів, зокрема TGF- β , фактора росту гепатоцитів, NO, 2,3-IDO, IL-10, IL-6, інгібуючого фактора лейкоцитів, IL1R α , галектинів, TSG-6, HLA-G, гемоксигенази та PGE-2 [137].

Вроджена імунна система відіграє ключову роль не тільки в пристосувальних реакціях імунітету, але і в елімінації патогенних мікроорганізмів, націлених на адаптивну імунну відповідь. ДК, НК та МФ становлять вроджену імунну систему, і їх взаємодія з МСК сприяє регенераційним процесам та пригнічує запальні реакції. Дослідження продемонстрували, що МСК мають імунодепресивні функції на ДК у формі стримування диференціації ДК від моноцитів та зменшення експресії на клітинній поверхні CD1- α , CD40, CD80, CD83, CD86 та МНСII [138]. Після інкубації з МСК, ДК втрачають здатність активувати лімфоцити, знижуючи регулювання експресії IFN- γ та TNF- α , а також прискорюючи вивільнення IL-10. Крім того, МСК мають здатність пошкоджувати міграцію ДК, пригнічуючи презентацію антигенів ДК для активації Т-клітин [139].

НК продукують прозапальні цитокини та мають цитолітичну активність. МСК можуть інгібувати дозрівання НК і змінювати їх профіль секреції, що призводить до зменшення вироблення прозапальних IFN- γ , та IL-12 та збільшення продукції протизапального IL-10 [140], [141], що ослаблює активацію Т-клітин. Ця інгібуюча дія завершується пригніченням активуючої експресії рецепторів НК, яка опосередковується IDO та PGE-2 [142]. Прямий контакт клітина-клітина також відіграє певну роль у пригніченні НК, що пов'язано з експресією TLR- 4 на МСК [143]. МСК пригнічують секрецію NKp30 і NKG2D, які є поверхневими рецепторами, пов'язаними з активацією НК [144]. Крім того, було продемонстровано, що активовані НК мають здатність до лізису МСК, коли на НК

достатньо активуючих рецепторів. Разом ці дані вказують на те, що взаємодія між МСК і ДК залежить від співвідношення обох клітин, а також їх мікросередовища.

Загальновідомо, що макрофаги (МФ) є важливими клітинами вродженої імунної системи зі значною пластичністю. Виходячи із специфічного мікросередовища, МФ можуть бути поляризовані за участю МСК в класично активовані макрофаги М1 або альтернативно активовані макрофаги М2 [145], [146]. Як правило, М1 мають антимікробні властивості, виділяючи різноманітні хемокіни та запальні цитокіни, тоді як М2 здатні полегшити запалення та пришвидшити відновлення тканин за допомогою секреції ІЛ-10 та трофічних факторів. Крім того, кокультура макрофагів з МСК індукує вироблення макрофагів М2, які підвищують фагоцитарну активність та секрецію ІЛ-10, і знижують рівень запальних цитокінів, таких як ІFN γ , TNF- α , ІЛ-1 β та ІЛ-12 [147].

Що стосується адаптивної імунної відповіді, МСК можуть безпосередньо пригнічувати функцію Т-клітин, зміщувати баланс Т-лімфоцитів та індукувати регуляторні Т-клітини (Т-рег.) [148 - 150]. Крім того, МСК можуть інгібувати проліферацію клітин Th1 і Th17 і збільшувати кількість Т-рег, які пригнічують імунну відповідь та запалення [151]. Також МСК можуть безпосередньо змінювати цитокіновий профіль CD41 Т-клітин за рахунок зниження продукції Th1 та Th17 цитокінів (ІFN- γ та ІЛ-17) та за рахунок збільшення секреції цитокінів Th2 ІЛ-4 та ІЛ-10 [150], [152]. МСК здатні пригнічувати проліферацію Т-клітин за допомогою клітинних або неспецифічних мітогенних подразників та сприяти апоптозу активованих Т-клітин через лігандний шлях Fas / Fas [153]. МСК конститутивно секретують супутню молекулу В7-Н4 та HLA-G, які надають імунодепресивну дію на Т-клітини та впливають на їх проліферацію, а також цитотоксичність. Однак імунодепресивна здатність МСК не активується постійно і залежить від сили та типу стимуляції запалення. МСК не стримують проліферацію Т-клітин у присутності асоційованих з патогенами молекул та TLR, таких як TLR3 та TLR4, які пошкоджують сигналізацію Notch, тим самим відновлюючи ефективну Т-клітинну реакцію на патогени [154].

Менше відомо про вплив МСК на В-клітини, але деякі дослідження припускають, що МСК також модулюють їх проліферацію та функціонування [155]. І мишачі, і людські МСК мають здатність інгібувати проліферацію та активацію В-клітин *in vitro* [156]. Крім того, МСК також пригнічують диференціацію В-клітин, а також експресію хемокинових рецепторів внаслідок контакту клітина-клітина та секреції розчинних молекул [157]. Оброблений металопротеїназою CCL2, що виділяється МСК, пригнічує STAT3, що призводить до інгібування синтезу імуноглобуліну [158]. У сукупності МСК пригнічують вироблення антитіл В-клітинами, і цей ефект залежить від сили запальної стимуляції, а також відношення МСК до В-клітин [159].

Однак, МСК не є конститутивно імуносупресивними. МСК або пригнічують, або сприяють запаленню в залежності від середовища, в якому перебувають. Подібно до поділу макрофагів, у МСК теж було виділено 2 субпопуляції: МСК1 і МСК2. При запаленні за наявності низьких рівнів медіаторів запалення (IFN- γ , TNF- α та IL-1b) МСК приймають прозапальний фенотип (МСК1), виробляють велику кількість прозапальних цитокінів та хемокинів, що стимулюють активацію та міграцію нейтрофілів, посилюють їх здатності до фагоцитозу та кліренсу бактерій. Навпаки, коли МСК потрапляють у тканини з високим рівнем запальних цитокінів, що відбувається під час пізньої фази запалення, МСК отримують антизапальний фенотип (МСК2) і пригнічують активацію та ефекторну функцію ДК, макрофагів, Т-лімфоцитів, НК клітин, що призводять до відновлення тканин та гомеостазу [160]. Перехід до прозапального або протизапального фенотипу МСК головним чином залежить від активації TLR рецепторів, виражених на їх поверхні [161]. Ліпополісахарид (LPS) -залежна активація TLR4 впливає на поляризацію МСК до прозапального фенотипу, в той час як дволанцюгова РНК (dsRNA) - залежна активація TLR3 може індукувати поляризацію МСК в імуносупресивний фенотип. Баланс між цими протилежними шляхами сприяє захисту господаря та запобігає надмірному пошкодженню тканин під час запалення [160].

1.4. Характеристика циклофосфану

1.4.1 Механізм дії циклофосфану

ЦФ – один з найбільш широко використовуваних протипухлинних та імунодепресивних засобів [162].

В основу створення ЦФ була покладена ідея, використовувати сполуку з високою реакційною здатністю в якості латентних ліків у вигляді хімічно замаскованої "транспортної форми", яка перетворюється за допомогою специфічних ферментів в активну форму всередині пухлинної клітини [163]. ЦФ - це алкілюючий засіб, що володіє характерною хімічною будовою; синтез проведений з таким розрахунком, щоб препарат мав виборчу протипухлинну активність, тобто щоб він був не активний, перебуваючи в крові. При введенні ЦФ в організм він метаболізується з утворенням 7 основних метаболітів, з яких функціонально активні 4 з'єднання: гідроксіциклофосфамід, альдофосфамід, азотний іприт, фосфамід іприту [164]. Вони утворюються в процесі гідроксилування цитохрому Р-450-оксидазою печінки. Ці активні метаболіти кров'ю переносяться в пухлинні і нормальні тканини, де і проявляють свою пошкоджуючу дію шляхом алкілування ДНК. ЦФ відщеплює іон хлору з утворенням електрофільного карбонієвого іона, взаємодіє з нуклеофільними структурами ДНК. В результаті утворення ковалентного зв'язку (алкілування) імідазольне кільце розкривається і по звільненому зв'язку утворюється з'єднання гуаніну з тиміном ДНК. У місці утворення такого зв'язку не функціонує ДНК-залежна-ДНК-полімераза, відбувається порушення правильної реплікації і зупинка поділу клітини. А у більш високих концентраціях, розрив ланцюга ДНК призводить до апоптозу уражених активованих лімфоцитів [165]. Відповідно до цього механізму циклофосфан зупиняє проліферацію будь-яких клітин, що швидко діляться, в тому числі імунокомпетентних. Печінка "рятується" від цитотоксичного пошкодження тим, що ці метаболіти в ній гідроксилуються в неактивні продукти, зокрема, 4-гідроксициклофосфамід у 4 - кетоциклофосфамід,

а альдофосфамід – у карбоксифосфамід. При порушенні метаболічної активації (захворювання печінки і т.д.) ЦФ втрачає свою фармакологічну активність [134]. В інших тканинах альдофосфамід перетворюється знову в активні акролеїн і фосфамід [167]. Фосфамід іприт утворюється лише в клітинах з низьким вмістом детоксуючого ферменту альдегіддегідрогенази (АДГН). Дві ізоформи, АДГН1А1 та АДГН3А1, є важливими при детоксикації ЦФ та його похідних. Лімфоцити мають низько виражені рівні відповідних ізоформ АДГН. З іншого боку, ГСК експресують високий рівень АДГН та протистоять цитотоксичності, опосередкованій ЦФ [168]. Низька мієлотоксичність забезпечує швидку репопуляцію лімфоїдних відділів ГСК після хіміотерапії. Ця "фаза відскоку" супроводжується вивільненням фактора росту та проліферацією кістково мозкових попередників настільки, що ЦФ використовують для їх мобілізації з подальшою трансплантацією [169]. Незважаючи на свою селективну цитотоксичність лімфоцитів, лікування ЦФ пов'язане із значним числом потенційно важких побічних ефектів.

1.4.2. Вплив циклофосфану на імунітет

Для пояснення імунодепресивного ефекту хіміотерапевтичних агентів були запропоновані два механізми. Перший - класичний мієлотоксичний ефект цитостатичних препаратів на гемопоетичні клітини-попередники кісткового мозку. Другий механізм імунодепресії, викликаній цитостатиками, обумовлений загибеллю не тільки клітин-попередників, але і руйнуванням зрілих форм лімфоцитів. Було показано, що тимоцити і активовані лімфоцити піддаються апоптозу при впливі цитостатиків [170].

При вивченні дії ЦФ був встановлений його виражений мієло- і лімфосупресивний ефект. У той же час клітини - попередники гранулоцитів менше схильні до дії циклофосфану, ніж еритроїдні ядерні клітини і клітини - попередники лімфоцитів [171]. Встановлено, що вплив циклофосфану на імунну

систему залежить від концентрації препарату, а також від часу його введення щодо антигенної стимуляції. Найбільш чутливі до ЦФ клітини на стадії проліферації.

Клітинами - мішенями для ЦФ є В - лімфоцити, Т - хелперні лімфоцити, попередники Т - супресорних лімфоцитів, зрілі Т - супресорні лімфоцити, попередники ефекторних клітин, хоча всі вони розрізняються по чутливості. У дозах 2-5 мг/кг/добу препарат є цитотоксичним для В-лімфоцитів і пригнічує їх стимульовану проліферацію, виснажуються В-клітинозалежні пули в селезінці та лімфовузлах без порушення Т - клітинозалежних регіонів. Нормалізація функції В-клітин в ході імунної відповіді після застосування ЦФ відбувається більш повільно, ніж відновлення Т-клітинних функцій. ЦФ має супресивну дію на Т - хелперні лімфоцити в дозах 7-12 мг/кг/добу, тобто хелперні лімфоцити набагато менш чутливі до препарату, ніж В - клітини. ЦФ пригнічує вироблення Т-клітинами ІЛ-2, таким чином побічно через Т - хелперні лімфоцити викликає супресію зрілих форм цитотоксичних Т - кілерів. Тому для вираженого ефекту на зрілі форми цитотоксичних Т - клітин та їх попередників потрібні набагато більші дози, ніж для супресії Т - хелперних клітин.

Високі терапевтичні дози ЦФ викликають зниження числа і ослаблення функції макрофагів і моноцитів. Причому різні субпопуляції макрофагів мають різну чутливість до циклофосфану. Інгібування ефекторних функцій клітинного імунітету є результатом прямого пошкодження ЦФ незрілих компонентів кістковомозкової тканини, що призводить до зменшення числа і активності зрілих ефекторних клітин.

ЦФ в малих дозах володіє здатністю селективної імуномодуляції регуляторних Т-клітин [172]. Препарат знижує секрецію ІNF- γ та ІЛ-12, збільшуючи при цьому секрецію Th2 цитокінів, таких як ІЛ-4 та ІЛ-10, у ЦНС та периферичній крові [173, 174]. Пригнічення регуляторних Т-клітин може бути використано для протидії імуносупресії при раку. Хоча точний механізм за яким ЦФ чинить свої імуномодулюючі ефекти не зовсім зрозумілий, кілька досліджень припустили можливі способи дії. До них відносяться елімінація регуляторних Т-клітин у наївних або злякисних клітинах господарях, індукція факторів росту Т-

клітин, таких як інтерферон I типу, та попереднє кондиціонування клітин-господаря для донорських Т-клітин, таким чином знижуючи алореактивність. [173, 174].

Побічні ефекти ЦФ на систему кровотворення такі ж, як і для інших цитостатиків. Токсична мієлодепресія проявляється певної черговістю змін периферичної крові: спочатку реєструється лейкопенія, потім - тромбоцитопенія і лише в останню чергу - анемія, що пов'язано з тривалим терміном життя еритроцита [54]. Явище дезорганізації клітинного складу кісткового мозку після одноразового введення циклофосфану в максимально переносимій дозі зберігаються тривало, що пов'язано з виснаженням пулу стовбурових кровотворних клітин, а також зі змінами в гемопоезіндукуючому мікрооточенні, що відіграє важливу роль у регуляції проліферації і диференціювання ГСК [57].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Обладнання

Дослідження проводились в лабораторії імунології відділу клітинних та тканинних технологій ДУ "ІГРМ НАМН України". Для визначення маси біоптатів тканин використовували ваги електронні KERN EMB 500-1 (Німеччина). Для підрахунку кількості клітин використовували дозатори одноканальні (10 мкл - 10 мл) Eppendorf (Німеччина) та камеру Горяєва (Росія). Культури вирощували в CO₂-інкубаторі Jouan IGO150 (Франція). Маніпуляції з клітинами проводили в боксі біологічної безпеки II класу з ламінарною течією MSC9 (Франція). Культури клітин візуалізували за допомогою інвертованого мікроскопу Axiovert 40C (Zeiss, Німеччина).

Для приготування розчинів використовували комплект рН-метра "SX-620pH", дозатори піпеточні Eppendorf (0,1-2,5 мкл, 2-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл), пробірки мірні, циліндри мірні.

2.2. Експериментальні тварини

Експерименти було проведено на самцях мишей лінії C57BL віком 6-8 тижнів і масою 18-20 г з розплідника Інституту патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, які отримували збалансоване харчування та мали вільний доступ до води. Всі роботи з експериментальними тваринами проводились з дотриманням вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.) та «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986 р.).

Для вивчення впливу клітинних препаратів на регенерацію імунної системи сингенних мишей було сформовано чотири групи: I (контрольна) нормальні тварини (n=10), II- миші, що отримували ЦФ (n=9), III - тварини, що отримували ЦФ і ККМ (n=7), IV - тварини, що отримували ЦФ і активовані попереднім 2 годинним контактом з МСК ККМ (ККМа) (n=8), V - тварини, що отримували ЦФ і через 2 години МСК (n=7), VI - тварини, що отримували ЦФ і послідоуючу котрансплантацію ККМ разом з МСК (n=7).

2.3. Методи

2.3.1. Культивування мезенхімальних клітин тимуса

МСКт мишей лінії C57BL отримували методом експлантатів за стандартною методикою [175, 176] після евтаназії тварин методом цервікальної дислокації. Долі тимуса сікли скальпелем на мікрофрагменти розміром близько 1-2 мм³, 2-3 рази відмивали від тимоцитів розчином Хенксу, і потім засівали в чашки Петрі з розрахунку 3 тимуси на чашку. Культивування проводили в поживному середовищі DMEM/F12, 1:1, (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (ETC; Sigma, США), 10 мМL-глутаміну (Sigma, США) та по 100 МО/мл пеніциліну та стрептоміцину (Дарниця, Україна), в CO₂-інкубаторі (Jouan, Франція) при 37°C і 5% CO₂. Пасування клітин проводили при досягненні культурами конфлуентного моношару з використанням суміші розчинів трипсину / ЕДТА (Біотестмед, Україна) у співвідношенні 0,05%:0,02% у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ), рН 7,4 (Sigma, США). Коефіцієнт пасування становив 1:2 - 1:3. Зміну поживного середовища проводили кожну 3-4 добу.

2.3.2. Направлене остеогенне диференціювання клітинних культур

МСКт мишей лінії C57BL 8-10-го пасажів сіяли в 24-лункові плашки (Costar, США) в концентрації 4×10⁴/лунку або в культуральні флакони (25 см²) в

концентрації 2×10^5 /флаконт. Через добу після посіву їх інкубували в остеогенному диференціовальному середовищі, що містило DMEM/F12 з додаванням 15% ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 10 мМ L-глутаміну (Sigma, США), 50 мкг/мл L-аскорбінової кислоти (Sigma, США), 10 мМ β -гліцерофосфату (Sigma, США), 0,1 мкМ дексаметазону (Sigma, США) та по 100 МО/мл пеніциліну та стрептоміцину (Дарниця, Україна) в CO₂-інкубаторі (Jouan, Франція) при 37°C і 5 % CO₂. Зміну середовища проводили кожен 3-4-ту добу культивування.

Фарбування остеоіндукованих культур на мінеральні відкладення (солі кальцію) проводили 1% розчином алізаринового червоного S (Sigma, США) [177]. Клітини, культивовані в 24-лункових планшетах, промивали сольовим розчином, вільним від кальцію і фосфатів, фіксували 10% розчином формаліну протягом 30 хвилин і двічі промивали дистильованою водою. Мінеральні відкладення фарбували 40 мМ розчином алізаринового червоного (рН 4,2) при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Клітини промивали п'ять разів дистильованою водою і використовували для отримання мікрофотографій. Для кількісної оцінки алізариновий червоний елюювали з фіксованих клітин 10% розчином оцтової кислоти (800 мкл), нейтралізували розчином гідроксиду амонію (200 мкл) і вимірювали оптичну щільність розчину екстрагованого барвника за допомогою спектрофотометра при 520 нм.

2.3.3. Направлене адипогенне диференціювання клітинних культур

МСК тимусу мишей лінії C57BL 8-10 пасажів сіяли в 24-лункові плашки (Costar, США) в концентрації 4×10^4 /лунку або в культуральні флакони (25 см²) в концентрації 2×10^5 /флаконт. Через добу після посіву їх інкубували в адипогенному диференціовальному середовищі, що містило DMEM-HG з високим вмістом глюкози – 4,5 г/л (РАА, Німеччина) з додаванням 10% конячої донорської сироватки (РАА, Німеччина), 10 мМ L-глутаміну (Sigma, США), 0,5 мкМ дексаметазону (Sigma, США), 6 мкг/мл інсуліну (Sigma, США) та по 100 МО/мл пеніциліну та стрептоміцину (Дарниця, Україна) в CO₂-інкубаторі (Jouan,

Франція) при 37°C і 5 % CO₂. Зміну середовища проводили кожну 3-4-ту добу культивування.

Фарбування адипоіндукованих культур на ліпідні вакуолі проводили 0,2% розчином масляного червоного O (Sigma, США) [178]. Клітини, культивовані в 24-лункових планшетах, промивали ФСБ, фіксували 10% розчином формаліну протягом 30 хвилин і двічі промивали дистильованою водою. Ліпідні краплі всередині клітин фарбували протягом 30 хвилин, використовуючи профільтрований 0,3% розчин масляного червоного в 60% ізопропанолі. Потім клітини двічі промивали дистильованою водою і використовували для отримання мікрофотографій. Для кількісної оцінки масляний червоний елюювали з фіксованих клітин абсолютним ізопропанолом (300-400 мкл) і вимірювали оптичну щільність розчину екстрагованого барвника за допомогою спектрофотометра при 520 нм.

2.3.4. Реакція утворення фібробласто-лімфоцитарних розеток

Для визначення мембранної спорідненості суспензію з сумішшю МСКт (10⁵/мл, 50 мкл) і лімфоцитів (10⁷/мл, 50 мкл) із різних лімфоїдних органів у співвідношенні 1:100 центрифугували при 250g, осад тут же ресуспендували енергійним піпетуванням і далі здійснювали мікроскопування в камері Горяєва. Проводили підрахунок поодиноких фібробластоподібних клітин і таких, що приєднали кілька лімфоцитів. ФЛР вважали асоціацію, що складається з центрально розташованої фібробластоподібної клітини з приєднаними до неї трьома і більше лімфоцитами [15].

2.3.5. Дослідження клітинності лімфоїдних органів

Для визначення клітинності лімфоїдних органів після евтаназії методом цервікальної дислокації виділяли тимус, селезінку, лімфатичні вузли брижі, важили їх та диспергували. Клітини кісткового мозку отримували шляхом його

вимивання із кістковомозкового каналу діафізу стегнової кістки поживним середовищем. Кількість каріоцитів підраховували в 3% розчині оцтової кислоти в камері Горяєва.

2.3.6. Отримання перитонеальних макрофагів

В черевну порожнину мишей вводили 5 мл розчину Хенкса з гепарином (5 од/мл). Протягом 10 хвилин проводили масаж передньої стінки черевної порожнини. Потім вибирали суспензію клітин, що утворилася, ще двічі промивали черевну порожнину свіжими порціями розчину Хенкса. Отримані клітини двічі відмивали від гепарина (1500 об/хв., 10 хв.). Осад ресуспендували в 1 мл середовища RPMI-1640 з 10% ETC. Підраховували кількість життєздатних клітин. Кінцеву концентрацію клітин доводили до 4×10^6 /мл.

2.3.7. Визначення гематологічних показників

Кількість лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів, еритроцитів, тромбоцитів, концентрацію гемоглобіну та гематокрит в периферичній крові визначали на автоматичному гематологічному аналізаторі PARTICLE COUNTER (модель PCE-210) (ERMA INC, Токіо).

2.3.8. Визначення кількості антитілоутворювальних клітин методом локального гемолізу в гелі

Метод ґрунтується на здатності антиеритроцитарних антитіл, що продукуються антитілоутворювальними клітинами імунізованих тварин, руйнувати в присутності комплементу еритроцити барана, які вміщено разом з клітинами до агарозного гелю [179].

Мишей імунізували еритроцитами барана внутрішньоочередно в дозі 10^8 клітин на мишу. На 5 добу після ін'єкції, виділяли селезінку, гомогенізували її у

4 мл розчину Хенксу та підраховували концентрацію клітин у камері Горяєва. Готували 1% розчин агарози (210 мг сухої агарози на 21 мл розчину Хенкса). Для утворення однорідної суміші, агарозу тримали на водяній бані до повного розчинення. Суміш фільтрували через прошарок вати. Розставляли чашки Петрі (40 мм) на столику для підігріву, заливали в кожену чашку 0,7 мл розплавленого розчину 1% агарози, розрівнювали круговими рухами та переставляли на горизонтальний столик для застигання. $0,5 \times 10^6$ клітин селезінки (у відповідному об'ємі) додавали до 0,4 мл суміші розплавленої агарози з 3% суспензією еритроцитів барана (5:1). Агарозу з еритроцитами тримали на водяній бані при температурі 48°C. Отриману суміш спленоцитів з антигеном обережно розмішували та виливали на підігріту чашку Петрі поверх першого шару агарози, давали застигнути на горизонтальному столику та поміщали до термостату. Чашки інкубували 1 годину при 37°C. В кінці інкубації поверх другого шару (суміші спленоцитів з антигеном) додавали по 0,45 мл розведеного 1:10 розчину комплементу (ліофілізованої сироватки мурчаків). Чашки інкубували з комплементом при 37°C ще 1,5 години. Підраховували кількість видимих зон гемолізу на чашку. Результати представляли у вигляді кількості антитілоутворювальних клітин (АУК) на 10^6 клітин селезінки або абсолютної кількості АУК в перерахунку на загальну кількість клітин в органі.

2.3.9. Реакція гіперчутливості сповільненого типу

Реакція гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ) є моделлю для визначення активності клітинного імунітету [180]. Мишей сенсibilізували одноразовим внутрішньочеревним введенням 10^8 еритроцитів барана в 0,2 мл фізіологічного розчину. Через 4 доби після імунізації в подушечку задньої лівої (дослідної) лапи вводили 10^8 еритроцитів барана в 0,05 мл фізіологічного розчину (повторна ін'єкція), а в праву (контрольну) лапу вводили фізіологічний розчин в такому ж об'ємі.

Оцінку реакції проводили через 24 години. Евтаназію мишей проводили під ефірним наркозом шляхом декапітації. Після евтаназії у тварин визначали різницю мас дослідної і контрольної кінцівок. Індекс реакції обчислювали для кожної тварини за формулою:

$$IP = \frac{D - K}{K} \times 100\%$$

де IP – індекс реакції;

D – маса дослідної лапи;

K – маса контрольної лапи.

2.3.10. Визначення фаз клітинного циклу цитофлуориметричним методом

Умовою нормальної реалізації мітозу є реплікація ДНК. У зв'язку з цим проходження клітиною мітозу пов'язане зі зміною вмісту ДНК: впродовж фази G1 воно залишається диплоїдним, в фазу S змінюється від диплоїдного до тетраплоїдного, а в фазу G2 є тетраплоїдним. Після мітозу вміст ДНК повертається до диплоїдного. Ці зміни вдається вловити за допомогою проточної цитометрії за умови забарвлення пермеабілізованих клітин флуорохромами, тропними до ДНК. В якості такого флуорохрома найчастіше використовується пропідія йодид, який дає помаранчеве світіння (поглинання при 560-640 нм). Результатом аналізу є гістограми, на яких оцінюється частка клітин в області, що відповідає гіпердиплоїдному набору хромосом. На гістограмі клітин, забарвлених пропідія йодидом, цим клітинам відповідає пік, що знаходиться справа від основного диплоїдного піку. При використанні спеціально розробленої програми (ModFit LT) вдається більш детально проаналізувати цю область і розрахувати частку клітин, що знаходяться в різних стадіях циклу. Досить визначити сумарний відсоток тетраплоїдних і «біятетраплоїдних» клітин, який характеризує залучення в мітогенез клітин досліджуваної популяції [181].

Суспензію клітини лімфатичних вузлів брижі двічі відмивали розчином Хенкса шляхом центрифугування при 250g. Клітини в концентрації 2×10^6 /мл переносили в цитометричні пробірки і фіксували шляхом додавання до 1 мл суспензії 3 мл охолодженого 95% етанолу по краплям, струшуючи пробірку. Фіксували при 4 °C не менше 1 години. Відмивали розчином Хенкса шляхом центрифугування при 250g. До осаду додавали розчин пропідія йодиду в дистильованій воді в концентрації 50 мкг/мл з додаванням цитрату натрію (0,1%). Клітини піддавали проточній цитометрії. Підраховували 25×10^3 клітин. Для оцінки розподілу клітин за фазами клітинного циклу використовували програму ModFit LT. Сумарну оцінку вмісту клітин в мітозі здійснювали шляхом оцінки відсотка клітин у піку, що розташований на гістограмі правіше диплоїдного піку.

2.3.11. Визначення проліферативної активності лімфоцитів МТТ-методом

Індуковану фітогемаглютиніном (ФГА) проліферативну активність лімфоцитів визначали МТТ-методом [182]. Бласттрансформацією називається перехід малих лімфоцитів із спокійного стану в бластні форми, здатні до проліферації і подальшого диференціювання. Цей процес супроводжується морфологічними змінами лімфоцитів: збільшенням розмірів, кількості мітохондрій, рибосом, лізосом. В лімфоцитах індукуються біохімічні процеси, які збільшують синтез білка, РНК, ДНК, в результаті чого відбувається мітотичний поділ клітини. Суть реакції - в проліферації Т-лімфоцитів при культивуванні *in vitro* з деякими мітогенами.

Клітини селезінки отримували з гомогенізованих органів. Доводили концентрацію до $2,5 \times 10^6$ /мл. В лунки 96-лункового планшету вносили:

- 100 мкл суспензії спленоцитів і 100 мкл поживного середовища RPMI-1640 з 10% ЕТС (контроль);
- 100 мкл суспензії спленоцитів і 100 мкл розчину ФГА в поживному середовищі RPMI-1640 з 10% ЕТС (дослід).

Кінцева концентрація ФГА становила 5, 10 та 20 мкг/мл.

Планшет інкубували 72 год. при 37°C та 5% CO₂ у вологій камері. Потім в кожную лунку додавали по 20 мкл розчину МТТ (5 мкг/мл). Далі планшет інкубували при тих самих умовах 3 години. Потім супернатант видаляли і в кожную лунку додавали по 150 мкл розчинника кристалів ДМСО. Через 30 хв. інкубації при кімнатній температурі відбувалося повне розчинення кристалів. Оптичну щільність (ОЩ) вмісту лунок визначали за допомогою мультилункового спектрофотометру, враховуючи різницю оптичної щільності при довжині хвилі 540 нм та фонового значення 690 нм.

Проліферативну реакцію лімфоцитів під впливом ФГА визначали як індекс реакції за формулою:

$$IP = \frac{D - K}{K} \times 100\%$$

де IP – індекс реакції;

D – ОЩ дослідної лунки;

K – ОЩ контрольної лунки.

2.3.12. Визначення функціональної активності природних кілерів цитофлуориметричним методом

Метод заснований на здатності пропідія йодиду проникати в загиблі клітини та взаємодіяти з ДНК [181]. В якості клітин-ефекторів використовували клітини лімфатичних вузлів брижі мишей. В якості мішеней використовували клітини еритробластоїдної лінії K-562, які чутливі до дії природних кілерів, в концентрації 1×10⁵/мл. Клітини селезінки доводили до концентрації 5×10⁶/мл.

В 96-лунковий планшет з плоским дном вносили клітини-мішені та клітини-ефектори у співвідношенні 1:50. Планшети залишали при 37°C та 5% CO₂ у вологій камері на інкубацію протягом 16-18 годин. Після інкубації суспензію клітин переносили у цитометричні пробірки та додавали пропідій йодид в

концентрації 2,5 мг/мл. Аналіз зразків проводили на проточному цитофлюориметрі в програмі CellQuest-PRO.

2.3.13. Визначення функціональної активності природних кілерів МТТ-методом

МТТ-метод заснований на здатності мітохондріальних ферментів в життєздатних клітинах переводити доданий в культуру клітин субстрат – МТТ-тетразолієву сіль жовтого кольору в кристалічний МТТ-формазан лілового кольору [182].

Селезінку гомогенізували. Кількість каріоцитів підраховували в 3% розчині оцтової кислоти в камері Горяєва, доводили до концентрації $2,5 \times 10^6$ /мл.

В якості мішеней використовували клітини еритробластоїдної лінії К-562 в концентрації 1×10^5 /мл. Співвідношення клітин-мішеней до клітин-ефекторів - 1:25.

В 96-лунковий планшет з пласким дном вносили:

- контроль клітин-мішеней:
 - суспензія клітин К-562 - 100 мкл
 - RPMI-1640 з 10% ЕТС - 100 мкл
- контроль клітин-ефекторів (мононуклеарів):
 - суспензія спленоцитів - 100 мкл
 - RPMI-1640 з 10% ЕТС - 100 мкл
- дослід:
 - суспензія клітин К-562 - 100 мкл
 - суспензія спленоцитів - 100 мкл

Планшети залишали на 16-18 годин інкубації при 37°C та 5% CO₂ у вологій камері. Потім в кожну лунку додавали 20 мкл розчину МТТ (5 мкг/мл). Далі планшет інкубували при тих самих умовах 3 години. Супернатант видаляли і в кожну лунку додавали по 150 мкл розчинника кристалів ДМСО. Через 30 хв.

інкубації при кімнатній температурі відбувалося повне розчинення кристалів. ОЩ вмісту лунок, яке мало забарвлення від світло-лілового (при максимальному лізісі) до яскраво-лілового (при мінімальному лізісі), визначали за допомогою мультилункового спектрофотометру, враховуючи різницю оптичної щільності при довжині хвилі 540 нм та фонового значення при 690 нм.

Цитотоксичність визначали як цитотоксичний індекс у відсотках:

$$ЦИ = (100 - \frac{Д - КЕ}{КМ} \times 100)\%$$

де ЦІ – цитотоксичний індекс;

Д – ОЩ дослідної лунки;

КЕ – ОЩ лунки з контролем ефекторів;

КМ – ОЩ лунки з контролем мішеней.

2.3.14. Визначення спонтанного апоптозу цитофлуориметричним методом з додаванням пропідіума йодиду

Апоптоз - програмована загибель клітин і відіграє важливу роль в тканинному гомеостазі. При активації лімфоцитів апоптоз виступає в ролі процесу, альтернативного проліферації. Апоптоз зрілих лімфоцитів здійснюється при їх відповіді на антигенну стимуляцію. Сигнал до апоптозу передається через поверхневі рецептори всередину клітини, що призводить до активації каспаз, які розщеплюють ряд молекул - мішеней в ядрі, мітохондріях і цитоплазмі. У підсумку це призводить до активації ендонуклеаз, що розщеплюють ДНК на фрагменти, а потім до конденсації хроматину і фрагментації ядра. Додавання пропідіума йодиду, який зв'язується з ДНК, до попередньо фіксованих і пермеабілізованих клітин дозволяє визначити відсоток апоптотичних, тобто гіподиплоїдних лімфоцитів [181].

Суспензію клітин лімфатичних вузлів брижі переносили і двічі відмивали розчином Хенкса шляхом центрифугування при 250g. Клітини в концентрації 2×10^6 /мл переносили в цитометричні пробірки і фіксували шляхом додавання до

1 мл суспензії 3 мл охолодженого 95% етанолу по краплям, струшуючи пробірку. Фіксували при 4°C не менше 1 години. Відмивали розчином Хенкса шляхом центрифугування при 250g. До осаду додавали пропідіума йодид в концентрації 5 мкг/мл в 200 мкл ФСБ, що містив 0,1% тритона X100 і 0,1% цитрату натрію. Після струшування проби інкубували в темноті протягом 1 години. На проточном цитофлуориметрі на цитограмі за прямим і бічним світлорозсіюванням визначали локалізацію клітин і оцінювали червону флуоресценцію пропідіума йодиду при 640 нм для 10 000 клітин, серед яких визначали відсоток гіподиплоїдних клітин.

2.3.15. Визначення поглинальної активності перитонеальних макрофагів цитофлуориметричним методом

Принцип методу оснований на тому, що фагоцит, який захватив мікроорганізми (*St.aureus*) мічені ФІТЦ, сам починає інтенсивно флуорисціювати. При цьому він чітко відрізняється від фагоцита, який не поглинув мікроби, що реєструється проточним цитофлуориметром [181].

Клітини стафілокока в концентрації 2×10^8 /мл фарбували флюорохромом ФІТЦ з розрахунку 0,1 мг/мл протягом 12 год при +4°C в карбонатно-бікарбонатному буфері, рН 9,5. ФІТЦ, не пов'язаний з мікробом, видаляли відмиванням при 1000 g.

У лунки 96-лункового планшета поміщали суспензію ФІТЦ-міченого стафілокока і суспензію перитонеальних макрофагів в співвідношенні макрофаг/мікроб 1:10. Інкубували 20 хв при 37°C. Макрофаги осаджували центрифугуванням при 200 g 1,5 хв при +4°C. Одноразово відмивали охолодженим ФСБ з 0,02% ЕДТА, який сприяє припиненню поглинальної активності клітин і видаленню незв'язаного стафілокока. Зразки фіксували охолодженим розчином ФСБ з 2% параформальдегіду і 0,02% ЕДТА. Приготовлені таким чином проби можна зберігати до 2 діб при +4°C.

Приготовлені проби аналізували на проточному цитофлуориметрі. Налаштування встановлювали таким чином, щоб у вікні Dot Plot розміщувалися

три хмари клітин - нейтрофіли, моноцити і лімфоцити. На екран виводили гістограми по FL1 для нейтрофілів і відповідні статистики. Відсоток флуоресціюючих (фагоцитуючих) клітин вираховувався автоматично. Цей параметр виводився у відповідних гістограмах таблицях статистики. Також оцінюють Geo Mean клітин (середню геометричну інтенсивність світіння клітини), який використовують для розрахунку фагоцитарного числа клітин - середньої кількості частинок (*St aureus*).

2.3.16. Визначення бактерицидної активності перитонеальних макрофагів НСТ-методом

Рівень функціональної активності перитонеальних макрофагів (дихальний вибух) визначали за їхню здатністю відновлювати нітросиній тетразолій (НСТ) [183].

Для визначення бактерицидної активності в НСТ-тесті отримані перитонеальні макрофаги вносили в планшет у кількості 5×10^5 у лунку. Інкубували 1 годину при 37°C та 5% CO_2 . Потім забирали надосадову рідину, промивали розчмном Хенкса. У дослідні проби для визначення спонтанної активності клітин вносили 20 мкл 0,1% НСТ і 80 мкл середовища RPMI з 1% ЕТС, для визначення індукованої активності - 20 мкл 0,1% НСТ, 20 мкл зимозану (3мг/мл) як додатковий стимул при стандартних умовах і 60 мкл середовища. Клітини інкубували 30 хвилин при 37°C та 5% CO_2 .

Після інкубації планшет центрифугували 10 хвилин при 1000 об/хв. Надосадову рідину видалляли і до осаду додавали 100 мкл 0,1н NaOH і 100 мкл ДМСО. Вміст проб акуратно піпетували і проводили облік результатів спектрофотометричним методом при довжині хвилі 540 нм та фонового значення при 690 нм.

Стимуляцію активності перитонельних макрофагів розраховували за формулою:

$$IC = \frac{I_{нд} - C_{п}}{C_{п}} \times 100\%$$

де IC - індекс стимуляції;

I_{нд} – оптична щільність лунки з індукованою пробою;

C_п - оптична щільність лунки із спонтанною пробою.

2.4. Схеми експериментів

2.4.1. Остеогенне та адипогенне диференціювання МСКт після контакту з гемопоетичними клітинами

В лунки 24-лункового планшету вносили по 4×10^4 МСКт 8-12 пасажів, в яких не спостерігали ознаки старіння. Через 1 добу клітини утворювали моношар, до якого додавали тимоцити або клітини кісткового мозку (10^6 на лунку). Через 24 год. їх видаляли шляхом промивання культури та продовжували культивувати МСКт в звичайному поживному середовищі. Ще через 1 добу у відповідних групах лунок середовище замінювали або на звичайне, або на остеогенне чи адипогенне для направлено диференціювання. У контролі в лунки 24-лункового планшету вносили по 4×10^4 МСК тимусу (8-12 пасажі). Контролем були культури з поживним, остеогенним або адипогенним середовищем, до якого тимоцити або ККМ не вносили. Через 10 днів культури МСКт фарбували та оцінювали інтенсивність забарвлення спектрофотометрично.

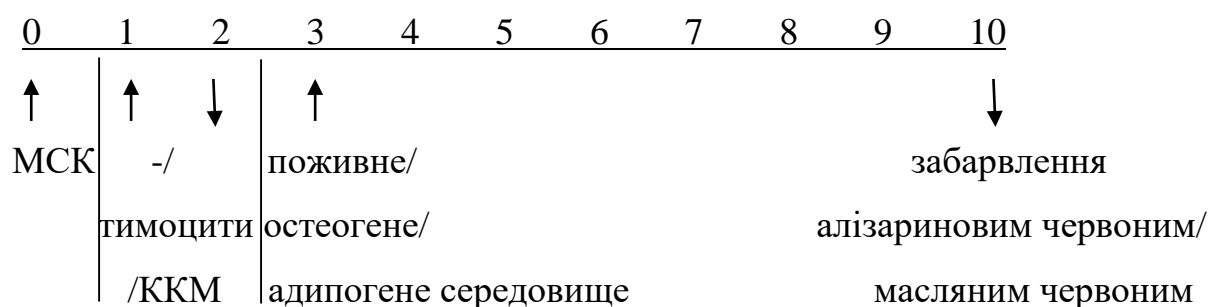


Рисунок 2.1. Схема остеогенного та адипогенного диференціювання МСКт після контакту з гемопоетичними клітинами

2.4.2. Трансплантації різних клітинних препаратів мишам після одноразового введення циклофосфану

Мишам лінії C57BL масою 18-20 г внутрішньочеревно вводили водний розчин циклофосфану (200 мг/кг). Через 2 години вводили в ретроорбітальний синус досліджувані клітинні препарати в об'ємі 0,1 мл. Через тиждень імунізували тварин внутрішньочеревно еритроцитами барана (10^8), через 4 дні проводили повторну інекцію в подушечку лапи (10^8) і ще через добу оцінювали стан імунної системи.

Для вивчення регенеративної активності різних клітинних трансплантатів використовували ККМ (10^6) або МСКт (5×10^4). При котрансплантації ККМ вводили в один ретроорбітальний синус, МСКт - в іншій одночасно. ККМа отримували після 2 годин інкубації ККМ на моношарі МСКт. Після ресуспедування збирали клітини КМ, що слабо приєдналися до МСКт.

2.5. Статистичний аналіз

Статистичну обробку результатів за допомогою програмного забезпечення MS Office Excel (*Microsoft*, США), використовуючи критерій Шовене [184] для виявлення аномальних результатів вимірювань, критерій Стьюдента (t) та непараметричний критерій Вілкоксона–Мана–Уїтні (U) для виявлення достовірності відмінностей.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

РОЗДІЛ 3

КОНТАКТНА ВЗАЄМОДІЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ І МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН *IN VITRO*

Взаємодія МСК з гемопоетичними клітинами інтенсивно вивчається. В 1978 році вперше була сформульована гіпотеза про існування мікрооточення для ГСК в КМ, що складається з різних клітинних та тканинних компонентів, які формують “ніші” [1]. Наразі наявність таких функціональних елементів не викликає сумнівів. В КМ виділяють ендостальні та судинні ніші, в яких завдяки складним міжклітинним взаємодіям, молекулам адгезії, цитокінам та позаклітинному матриксу забезпечується збереження ГСК у стані спокою, їх самопідтримка та реалізація поліпотентності. В композиції ендостальних ніш одним із головних учасників є МСК та їх нащадки: SNO⁺-, LepR⁺-, nestin⁺- клітини, в судинних нішах - CAR-клітини та ендотеліальні клітини. Вони можуть активно впливати на ГСК як шляхом прямого контакту, так і гуморального [185]. Постулюється також існування тимусних ніш, в яких за участю МСК створюються умови для диференціювання попередників Т-клітин, які надходять в орган із КМ [3]. Мезенхіма тимуса необхідна для його ембріонального морфогенезу та відіграє безпосередню роль у лімфопоезі та міграції клітин [186].

Таким чином очевидно, що в межах центральних органів імунної системи взаємодія МСК і ГСК відіграє ключову роль. Проте, МСК важливі при взаємодії з гемопоетичними клітинами і на периферії. Вони супресують трансплантаційні реакції і стимулюють продуктивну фазу синтезу антитіл *in vivo* [10] і *in vitro* [187], а також пригнічують процеси, пов’язані з проліферацією Т-лімфоцитів в різних системах *in vitro* [5]. Отже МСК впливають не тільки на ГСК, а і на різні популяції і субпопуляції лімфоцитів [20–23]. Тобто, процес взаємодії МСК-ГСК в організмі є необхідним і, мабуть, має місце як у фізіологічних умовах, так і при розвитку

патологічних процесів. Тому, вивчення взаємодії цих клітин є перспективним і вимагає подальших досліджень.

3.1. Дослідження здатності мультипотентних стромальних клітин тимуса та їх диференційованих форм до взаємодії з лімфоїдними клітинами різного походження

Для підтвердження диференціовального потенціалу МСКт і в свою чергу виділення диференційованих нащадків (остеобластів (ОБ) і адипоцитів (АД)) проводили культивування культур у відповідних середовищах до появи ознак диференціовання. Ця здатність дає підстави вважати виділені нами клітини тимуса дійсно МСК, так як диференціовання є однією з основних характеристик, затверджених Міжнародним товариством клітинної терапії.

В літературі є свідчення того, що МСКт мають мембранну спорідненість до тимоцитів, клітин лімфатичних вузлів та фетальної печінки. Це обумовлює їх здатність до контактної взаємодії з формуванням асоціацій у вигляді ФЛР [16]. Однак такої інформації щодо диференційованих форм МСКт немає.

Оскільки в процесі того чи іншого диференціовання здатність клітин до контактної взаємодії може змінюватись і тим самим характеризувати результати цієї взаємодії, завданням цієї частини роботи було вивчити здатність МСКт та їх диференційованих нащадків до утворення ФЛР з лімфоїдними клітинами різного походження (тимоцити, клітини КМ, лімфатичних вузлів та селезінки). Були використані МСКт 8 пасажу і диференційовані з них ОБ та АД.

Всі типи диференційованих стромальних клітин і всі типи лімфоїдних клітин взаємодіяли з утворенням значної кількості ФЛР (Рис. 3.1).

Дещо більшу, але не достовірну, здібність до утворення ФЛР проявляли тимоцити, МСКт і ОБ. Реакція утворення ФЛР спленоцитів, ККМ і клітини лімфатичних вузлів з усіма трьома типами стромальних клітин була менш інтенсивною [192].

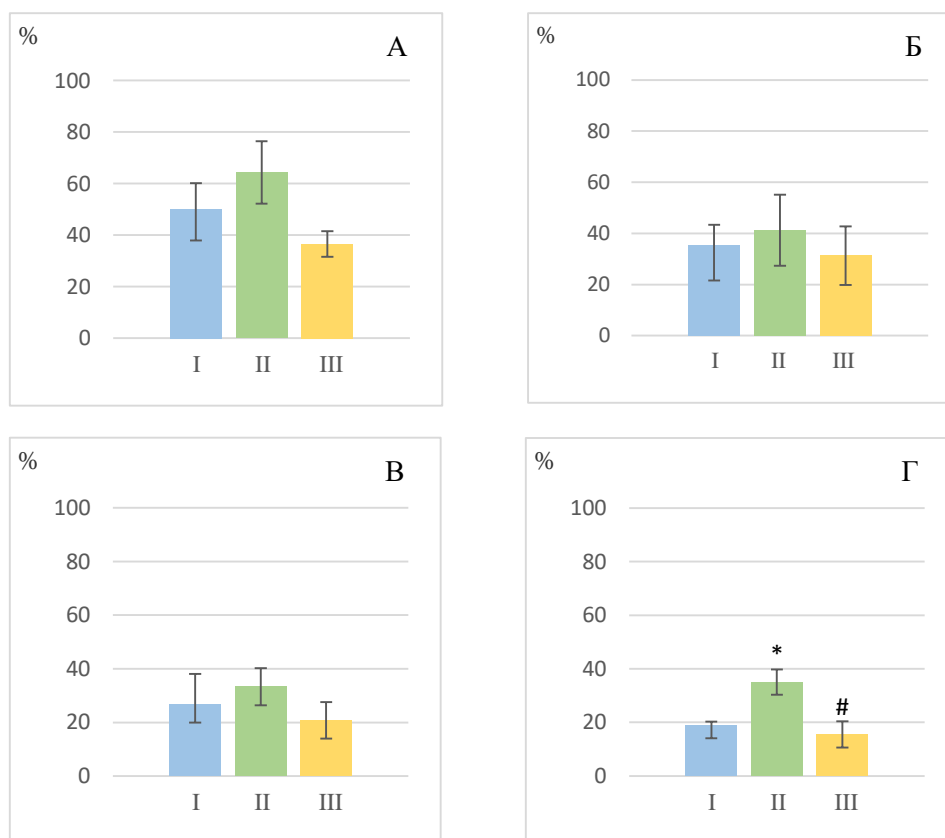


Рис. 3.1. Формування клітинних асоціацій мультипотентних стромальних клітин тимуса (I), остеобластів (II) та адипоцитів (III) з ≥ 3 тимоцитами (А), спленоцитами (Б), клітинами лімфатичних вузлів (В) та кісткового мозку (Г). Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n=6$). * $p < 0,05$ – порівняно з кількістю ФЛР з МСК; # $p < 0,05$ – порівняно з кількістю ФЛР з остеобластами.

Принципово відмінною є різна активність тимоцитів і ККМ. Так кількість ФЛР тимоцитів з адипоцитами була в 2,3 рази ($p < 0,05$) вище ніж ККМ з адипоцитами, а з МСКт тимоцити формували в 2,7 разів ($p < 0,05$) більше ФЛР ніж ККМ. Тому для подальших досліджень було обрано саме ці типи клітин. Імовірно продемонстрований виразний міжклітинний контакт може відігравати важливу роль при диференціюванні МСК, тому для наступного етапу роботи було обрано саме тимоцити та ККМ, що проявили протилежні результати при формуванні ФЛР.

3.2. Вплив співкультивування мультипотентних стромальних клітин тимуса з гемопоетичними клітинами на диференціювальння стромальних клітин

Взаємодія МСК та ГСК широко описана в літературі, однак увага дослідників головним чином зосереджена на підтримці ГСК з боку МСК. Однак виникає питання: в парі «МСК – гемопоетичні клітини» вплив здійснюється тільки у напрямку останніх, чи дія розповсюджується і на стромальні клітини? Міжнародне товариство клітинної терапії (ISCT) визначало МСК за рахунок їх адгезивності до пластика, експресії специфічних поверхневих антигенів та лінійного диференціювального потенціалу [65]. Здатність диференціюватися за остеогенним, хондрогенним та адипогенним напрямком *in vitro* є однією з найважливіших характеристик МСК [65].

Виходячи з того, що лінійне диференціювання знаходиться серед головних властивостей МСК, можна припустити, що взаємодія з гемопоетичними клітинами перш за все впливатиме саме на цей процес.

Щодо МСКт є лише поодинокі роботи, що ці клітини здатні до лінійного диференціювання [193], але вплив на цей процес гемопоетичних клітин не досліджений.

Було припущено, що виразний міжклітинний контакт, який був продемонстрований у попередньому розділі, відіграє важливу роль у реалізації функцій МСКт. З урахування викладеного завданням цієї частини роботи було вивчити можливість диференціювання МСКт за остеогенним і адипогенним напрямками *in vitro* та вплив на ці процеси контактної взаємодії МСКт саме з тимоцитами та ККМ.

Для реалізації цього завдання в лунки 24-лункового планшету вносили по 4×10^4 МСКт 8 пасажу, в яких не спостерігали ознаки старіння. Через 1 добу клітини утворювали моношар, до якого додавали тимоцити або ККМ (10^6 на лунку). Через 24 год. їх видаляли шляхом промивання культури та продовжували культивувати МСКт в звичайному поживному середовищі. Ще через 1 добу у відповідних групах лунок середовище замінювали або на звичайне, або на

остеогенне чи адипогенне для направленої диференціації. Контролем були культури з поживним середовищем, до яких клітини не вносили. Через 10 днів культури МСКт фарбували та оцінювали інтенсивність забарвлення спектрофотометрично.

Клітини строми тимуса, культивовані в остеогенному чи адипогенному середовищі, добре забарвлювались алізариним червоним та масляним червоним відповідно, на відміну від клітин, культивованих у поживному середовищі без додавання факторів диференціації, що свідчить про ефективні процеси остеогенного та адипогенного диференціювання культивованих клітин (рис. 3.2, А-Б; 3.3, А-Б).

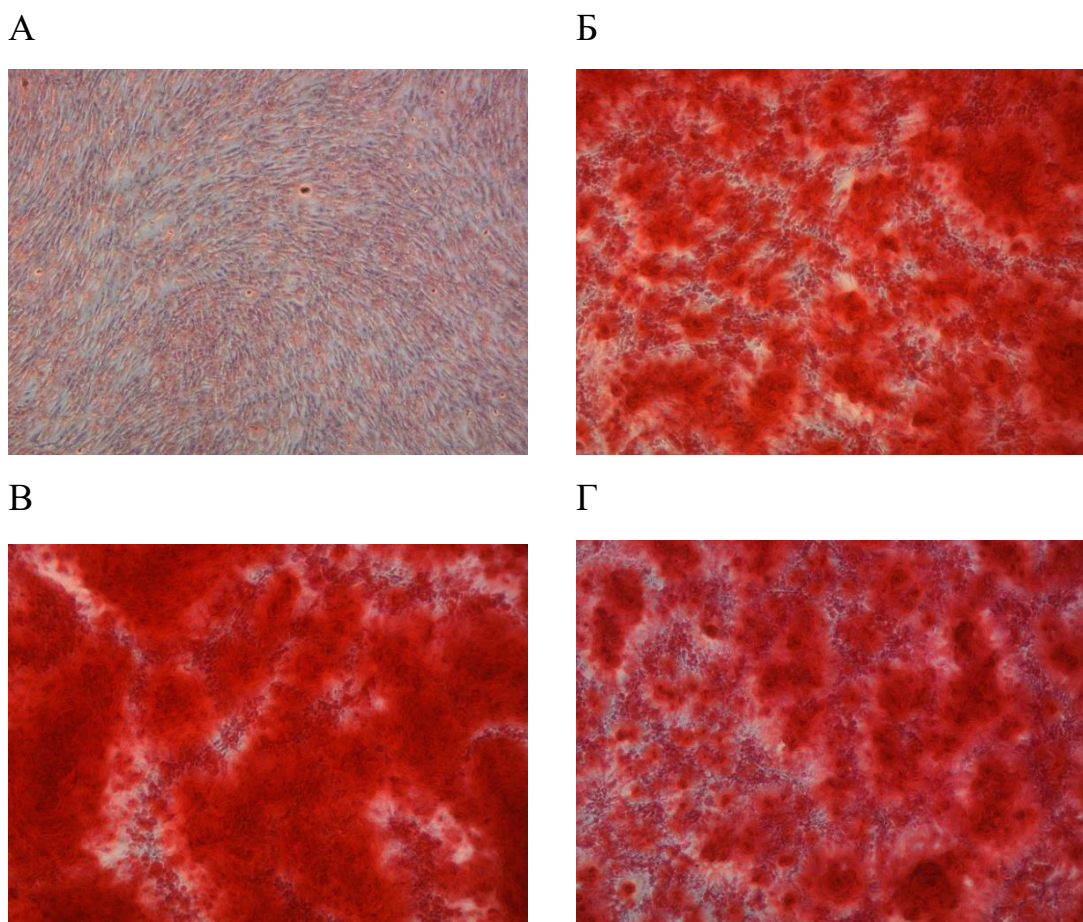


Рис. 3.2. Мікрофотографії цитопрепаратів культур МСК тимуса, 10-а доба культивування в звичайному (А) або остеогенному (Б, В, Г) середовищі після контакту протягом 24 год. з тимоцитами (В) або клітинами кісткового мозку (Г). Забарвлення алізариним червоним. Ок. x10, об. x10.

Як можна побачити на фото, під впливом короткочасного попереднього співкультивування з тимоцитами ефективність диференціювання в остеогенному напрямку підвищувалась (рис. 3.1, В), що також було підтверджено результатами вимірювання оптичної щільності екстрактів барвника (табл. 3.1)

Таблиця 3.1.

Вплив співкультивування МСКт з клітинами тимуса та кісткового мозку на їх лінійне диференціювання

Статистичні показники	Оптична щільність лізатів клітин, зафарбованих алізариним червоним для виявлення кальцій-вмісних остеоцитів, ум.од.				Оптична щільність лізатів клітин, зафарбованих масляним червоним для виявлення ліпідвмісних адипоцитів, ум.од.		
	неіндуковані	остеоіндуковані			неіндуковані	адипоіндуковані	
	-	-	КТ	ККМ	-	-	КТ
М	0,022	0,344*	0,391*#	0,349*+	0,196	0,315*	0,286*
±m	0,003	0,013	0,019	0,008	0,003	0,013	0,003
n	5	6	6	5	5	6	5

Примітки: КТ – попереднє співкультивування з тимоцитами; ККМ – попереднє співкультивування з клітинами кісткового мозку;

* <0,05 – порівняно з МСКт, культивованими в звичайному поживному середовищі без додавання факторів диференціювання; # <0,05 – порівняно з МСКт, культивованими в остеогенному/адипогенному диференціовальному середовищі; + <0,05 – порівняно з МСКт, культивованими в диференціовальному середовищі після попереднього співкультивування з тимоцитами.

Цього не відбувалось при співкультуванні з ККМ. Тимоцити і МСКт ефективно взаємодіють і в фізіологічних умовах, тому і при створенні контакту

клітин *in vitro* може спостерігатись відповідна взаємодія [15]. Таким чином, встановлено, що *in vitro* МСКт диференціюються в остеогенному напрямку, а тимоцити потенціюють цей процес [194]. *In vivo* такі явища відносно тимоцитів поки що не описані, однак було виявлено *in vitro* і *in vivo*, що протягом 48 годин після стресу, викликаного гострою кровотечею, ГСК секретують білки BMP-2, BMP-6, що направляють розвиток МСК кісткового мозку по остеобластній лінії [60].

Було показано ефективне адипогенне диференціювання МСКт (рис. 3.3). Здатність МСКт до адипогенного диференціювання може розглядатись в аспекті їх участі у віковому жировому переродженні органу.

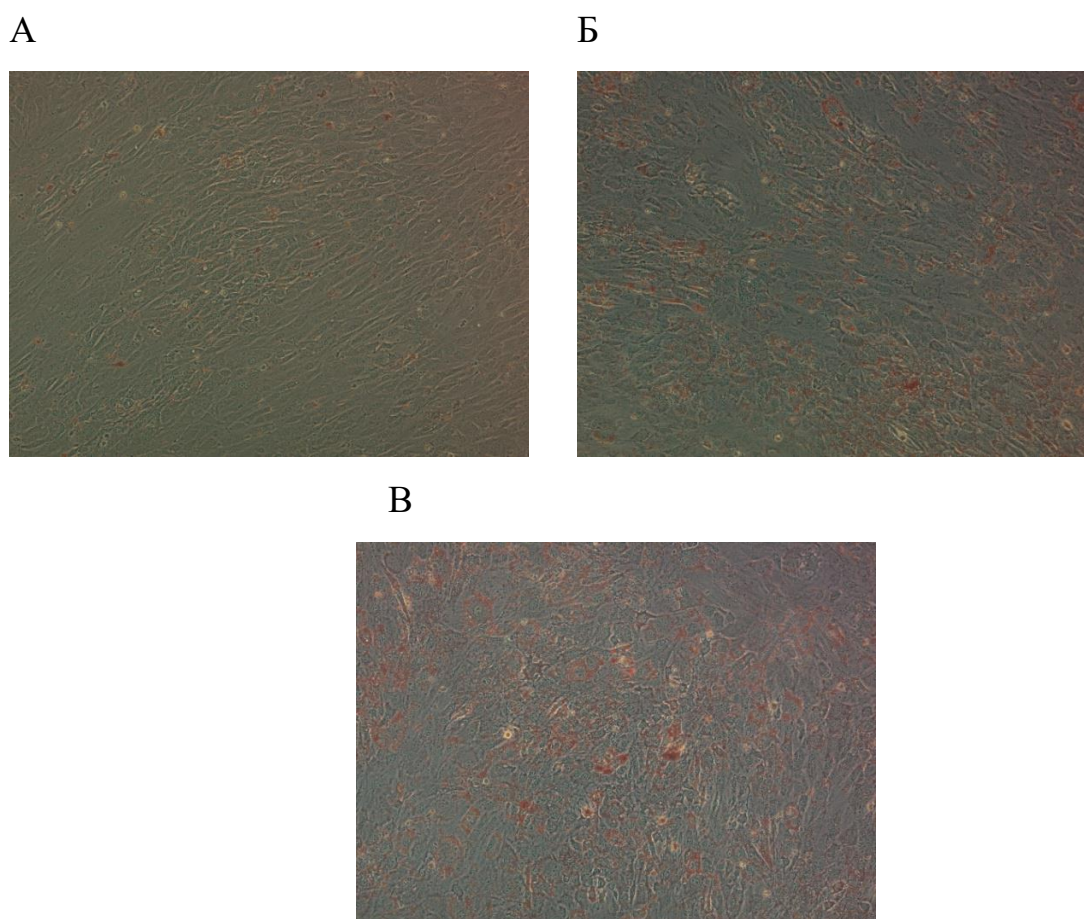


Рис. 3.3. Мікрофотографії цитопрепаратів культур МСК тимусу, 10-а доба культивування в звичайному (А) або адипогенному (Б, В) середовищі після контакту протягом 24 год. з тимоцитами (В). Забарвлення масляним червоним. Ок. x10, об. x10.

При адипогенному диференціюванні ККМ не використовувались для попереднього співкультивування, так як вони можуть містити адипогенні клітини різного ступеня диференціювання, які, на відміну від остеобластів, іноді присутні майже вільно в паренхімі кістковомозкового каналу і які, мабуть, можуть не адгезуватись до скла в процесі виділення і швидко проліферувати в адипогенному середовищі. Кокультивування МСКт з тимоцитами не впливало на інтенсивність адипогенного диференціювання.

Отже, було продемонстровано, що попередній добовий контакт МСКт з тимоцитами, але не ККМ, достовірно потенціює їх остеогенне диференціювання, не впливаючи на адипогенний напрямок.

Отримані дані свідчать про велику схожість властивостей МСК, які походять із різних органів, і підтверджують, що головною з них є можливість мультилінійного диференціювання.

3.3. Висновки до розділу 3

1. Встановлено, що найбільшу кількість асоціацій стромальних і лімфоїдних клітин у вигляді ФЛР формують тимоцити, найменшу – ККМ. Кількість ФЛР тимоцитів з адипоцитами була в 2,3 рази вище ніж ККМ з адипоцитами, а з МСКт тимоцити формували в 2,7 разів більше ФЛР ніж ККМ.

2. Показано, що контактна експозиція МСКт з тимоцитами, але не ККМ, протягом 24 годин посилює диференціювання стромальних клітин за остеогенним напрямком на 13,6%.

Результати, представлені у даному розділі, опубліковано у власних наукових працях [192], [194] та пройшли апробацію на:

1. **Демченко ДЛ.** Мембранна спорідненість гемопоетичних і мультипотентних стромальних клітин як можливий фактор впливу на лінійне

диференціювання стромальних клітин. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Іноваційні напрямки в генетичній та регенеративній медицині»; 2017 лист. 9–10; Київ, Україна. 2017, с. 255.

2. **Chekh D.** Osteogenic differentiation of thymic multipotent stromal cells stimulated by contact with thymocytes. Матеріали XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2015 квіт. 20-23; Львів, Україна. 2015, с. 388-9.

3. **Чех ДЛ, Никольский ИС, Никольская ВВ, Зубов ДА.** Влияние тимоцитов и клеток костного мозга на остеогенную дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток тимуса. Материалы XIII-Международного Конгресса "Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии", 2015 февр. 18-20; Москва, Россия. 2015, с. 92-3.

За результатами досліджень оформлено патент:

Нікольський ІС, Нікольська ВВ, **Демченко ДЛ**, Зубов ДО. ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України». Спосіб потенціювання індукції диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин *in vitro* за остеогенним напрямком. Патент України UA 106592 U.2016 квіт. 26.

РОЗДІЛ 4.

ОПТИМІЗАЦІЯ МОДЕЛІ ЦИКЛОФОСФАНОВОГО ІМУНОДЕФІЦИТУ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ КЛІТИННИХ ТРАНСПЛАНТАТІВ

Однією з найпоширеніших та відносно добре вивчених моделей глибокого ураження гемоімунотранспорту за рахунок здійснення проапоптичного впливу на проліферуючі клітини є імунodefіцит, що виникає в результаті введення ЦФ.

Чутливість клітин до ЦФ різна (не дивлячись на те, що активність проявляє не сам ЦФ, а його метаболіти, у науковій літературі загальноприйнято у відповідних дослідженнях використовувати термін - ЦФ. Головне можна відзначити таким чином: В-лімфоцити значно чутливіші до ЦФ, ніж Т-лімфоцити. Основна і стабільна закономірність полягає у тому, що клітини тим більш чутливі до ЦФ, чим вище темп їх проліферації [162]. При цьому стовбурові ГСК, що перебувають в стані спокою, практично не уражуються ЦФ, завдяки реалізації у ГСК антиоксидантного механізму шляхом активації АДГН і АВС-транспортеру. Таким чином стовбурові клітини, що знаходяться в G₀ фазі спокою володіють ефективним метаболічним захистом [195]. В результаті після введення ЦФ в КМ зберігаються малочутливі до препарату ГСК. Через деякий час після введення ЦФ клітинність КМ завдяки функціональній активності стовбурових клітин, “цитокіновому шторму” і швидкій проліферації частково відновлюється [196], а потім в циркуляцію починає виходити велика кількість ГСК, що не знаходять своїх ніш в КМ. Надзвичайно велика кількість ГСК у периферичній крові у цей час відзначається як “овершут”. Найбільша кількість ГСК потрапляє в селезінку [172], а потім клітини мігрують до різних органів, де ГСК і клітини-попередники можуть брати участь в процесах диференціювання. Посилений вихід ГСК в циркуляцію в результаті зовнішніх стимулюючих факторів опосередкований процесом, що отримав назву “мобілізація” і є одним з основних етапів постциклофосфанової регенерації імунної системи [197]. Велика кількість доказів суттєвого значення мікрооточення КМ ніш, а саме МСК, в фізіологічному виході та індукованій

мобілізації ГСК в теперішній час є ведучим напрямком в області дослідження стовбурових клітин.

І таким чином відносно всебічно вивчений імунодефіцит, що розвивається після ЦФ, можливо використовувати не лише як модель для вивчення імунопатології, а і у якості ситуації, що дозволяє виявляти особливості регенеративної активності певних імуотропних факторів.

З урахування викладеного завданням цієї частини роботи було підібрати оптимальну схему введення клітинних препаратів та визначити період дослідження їх впливу на регенерацію імунної системи.

Для цього мишам внутрішньочеревно вводили 0,1 мл водного розчину циклофосфану (200 мг/кг). Через 1, 2 або 5 тижнів після введення циклофосфану імунізували тварин еритроцитами барана, через 4 дні проводили повторну інекцію для виявлення РГСТ і ще через добу оцінювали стан імунної системи.

4.1. Дослідження динаміки змін клітинних показників лімфоїдних органів мишей після дії циклофосфану

Одноразове введення ЦФ в дозі 200 мг/кг призводить до зменшення маси тимуса. Морфологічні зміни в тимусі супроводжуються змінами його клітинної популяції. Ці зміни свідчать про розвиток гострої інволюції тимуса. Відомо, що ЦФ викликає пряму індукцію апоптозу тимоцитів. Як можна побачити з рис. 4.1, маса та клітинність тимуса до 12 доби виявлялись зниженими, показники відновлювались до 19 доби і були знову зниженими до кінця експерименту. Таким чином, спочатку спостерігалась атрофія тимусу, потім, імовірно, одночасно відбувалися процеси утилізації загиблої лімфоїдної тканини і її відновлення, що спостерігалось на 19 день експерименту, і знову атрофія. Потрібно відмітити, що така реакція тимуса спостерігається при опроміненні мишей: при цьому першопочаткова регенерація тимуса забезпечується внутрішньо-тимусними клітинами-попередниками, а повторна відбувається на основі поліпотентних клітин КМ [198]. Можливо припустити, що аналогічні процеси відбуваються і під

дією ЦФ, який також викликає загибель лімфоцитів в мітозі та апоптоз інтерфазних клітин. Низький темп відновлення тимоцитів під час повторної регенерації може бути пов'язаний із ураженням циклофосфаном системи кровотворення і слабкою активністю відновлення її і клітин-попередників після дії ЦФ.

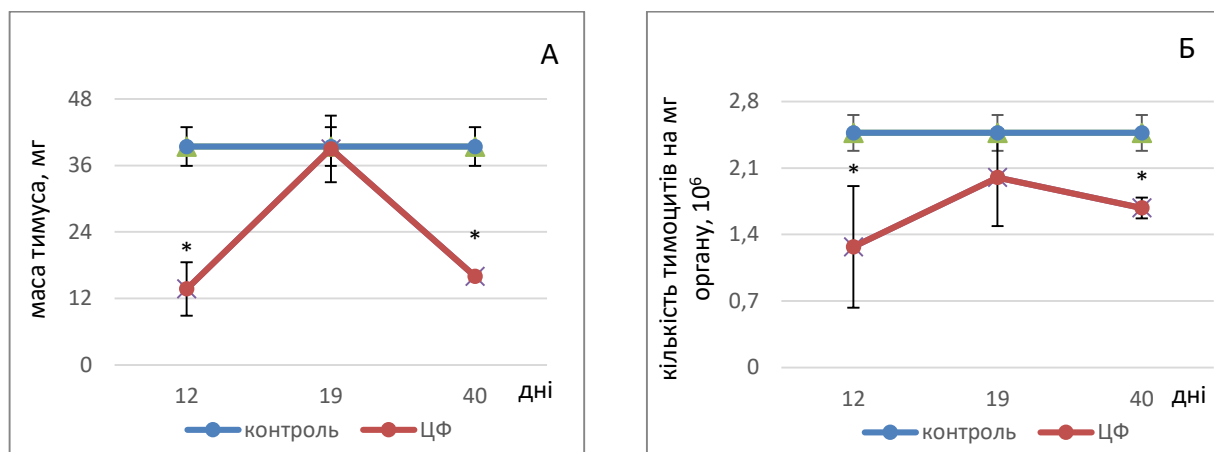


Рисунок 4.1. Вплив циклофосфану на тимус мишей: А – маса тимуса; Б – кількість клітин на мг органу. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n = 8-4$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували фіз.розчин.

В ході експерименту були продемонстровані зміни в селезінці (рис. 4.2). Маса органу достовірно зростала на 12 та 40 добу, при цьому клітинність органу залишалась ще в межах норми на 12 день, а далі знижувалась. Цікаво відмітити, що маса селезінки змінювалась в протилежному напрямку від змін тимуса. Очевидно, ці зміни обумовлені підвищеним кровонаповненням і набряком селезінки у відповідь на надходження в неї підвищеної кількості елементів клітинного розпаду, що виникають разом з атрофічними процесами в тимусі та інших тканинах і органах імунної системи.

Як можна побачити з даних на рис. 4.3 кількість клітин в апоптозі у лімфатичних вузлах в процесі реакції на ЦФ до 12 доби достовірно зростала і зберігалася підвищеною в подальший період експерименту, що свідчить про суттєвий вплив ЦФ за даних умов на розвиток апоптичних механізмів у різних лімфоїдних органах.

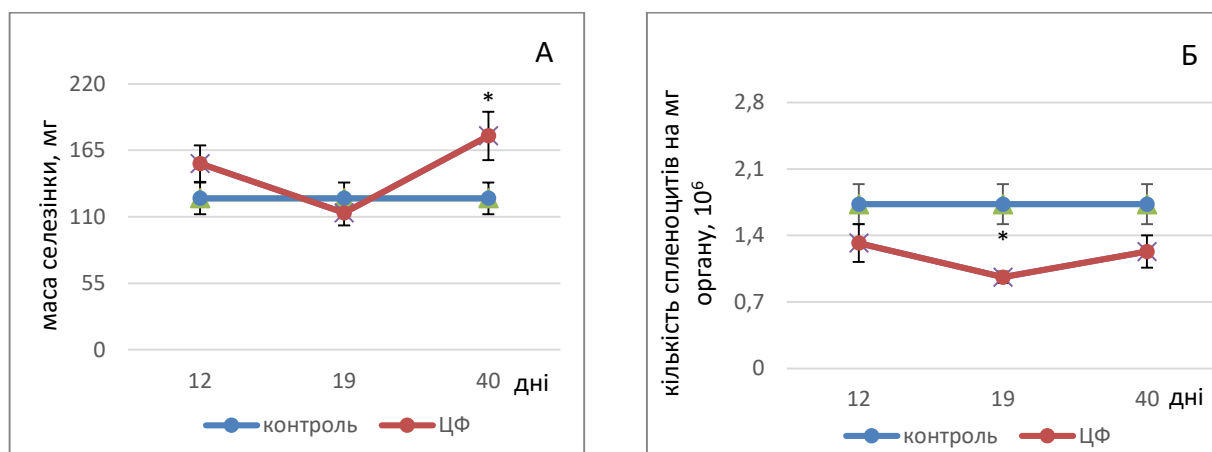


Рис. 4.2. Вплив циклофосфану на на селезінку мишей: А – маса селезінки; Б – кількість клітин на мг органу. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n = 8-4$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували фіз.розчин.

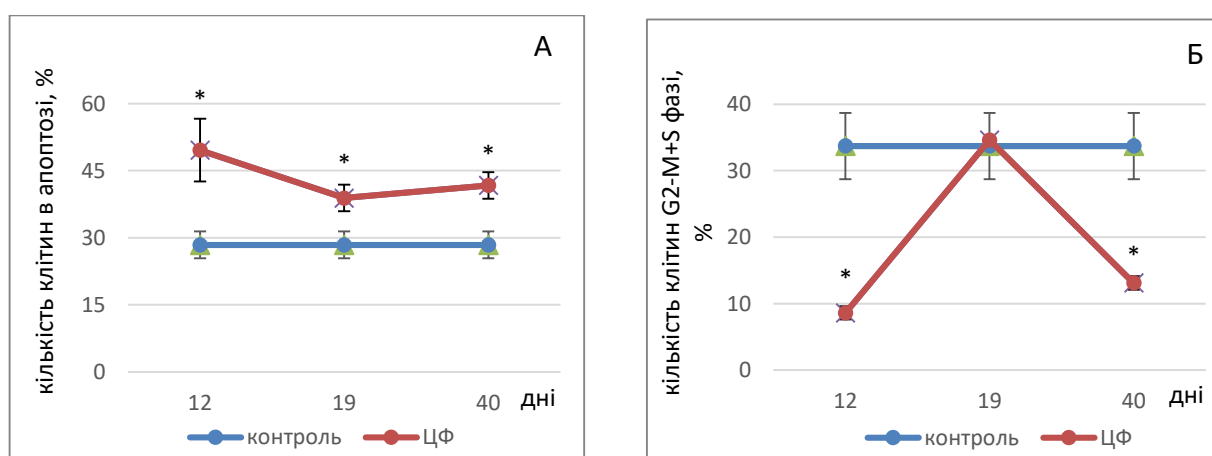


Рис. 4.3. Вплив циклофосфану на клітини брижових лімфатичних вузлів мишей: А – відносна кількість клітин, що знаходяться в апоптозі; Б – відносна кількість клітин, що знаходяться в в G2-M+S фазах клітинного циклу. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n = 8-4$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували фіз.розчин.

Проліферативна активність до 12 доби достовірно знижувалась, потім до 19 доби нормалізувалась, але до 40 доби знову достовірно знижувалась (рис.4.3), тобто її динаміка в основному відповідала змінам показників тимуса, і певною мірою динаміці змін лімфоцитів у периферичній крові, що можливо, відображає наявність взаємозв'язків на рівні підсилення міграції високоактивних

T - лімфоцитів із тимуса на периферію при високій клітинності. Не виключено також, що паралельна періодичність змін клітинності тимуса і проліферативної активності периферійних лімфоцитів детермінована певними змінами загальних регуляторних механізмів, що індукуються дією ЦФ.

4.2. Дослідження динаміки змін кількості лейкоцитів у периферичній крові після дії циклофосфану

Кількість лейкоцитів в крові до 12 доби суттєво зменшувалась (рис. 4.4). До 19 доби вона мала тенденцію до відновлення, і на 40 добу вже була в межах норми.

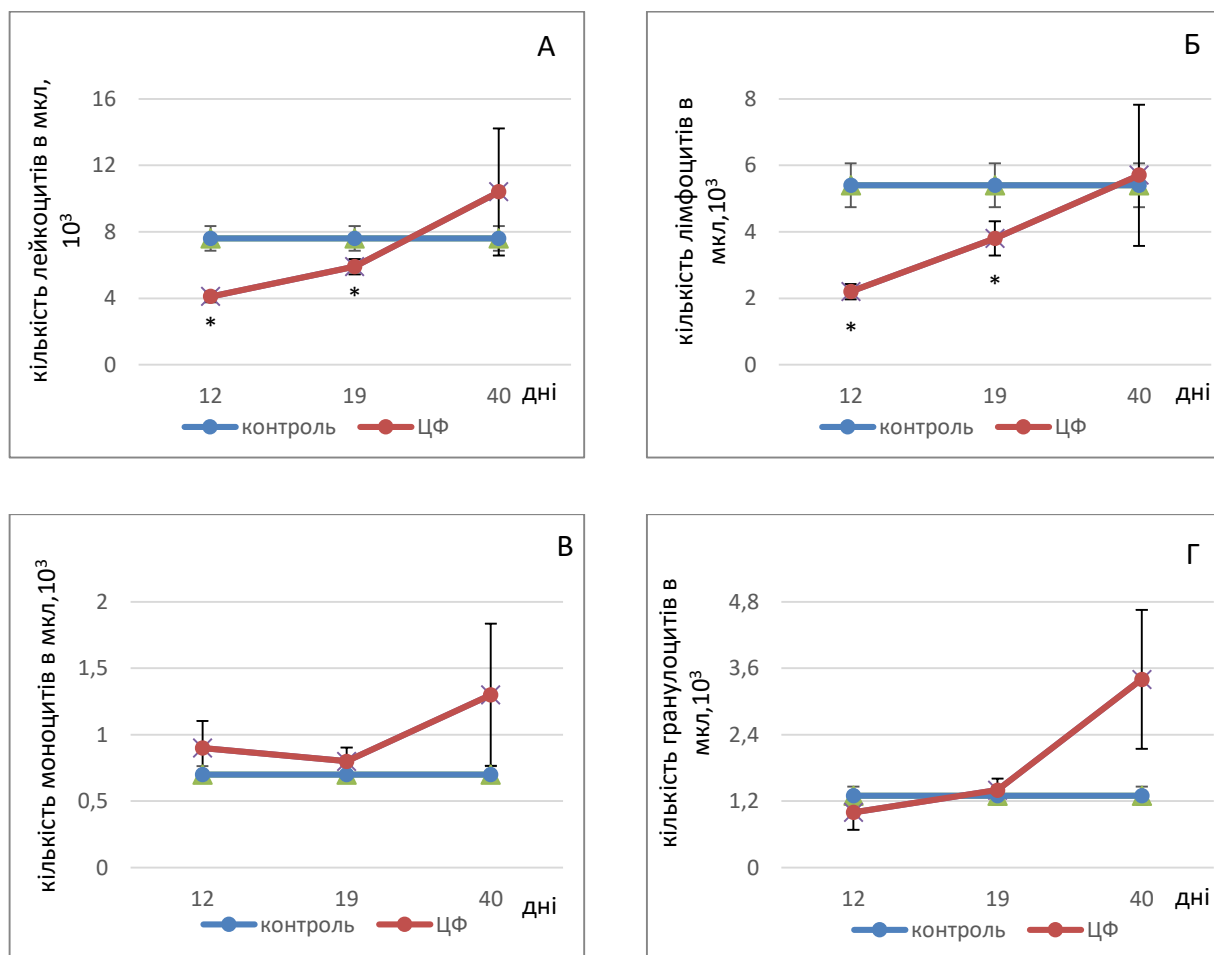


Рис. 4.4. Вплив циклофосфану на абсолютну кількість клітин периферичної крові мишей: А – лейкоцити; Б – лімфоцити, В – моноцити; Г – гранулоцити. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n = 8-4$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували фіз.розчин.

Аналогічним чином та достовірно змінювалась і кількість лімфоцитів, які мають, як відомо, високу чутливість до апоптозу. Можна припустити, що лімфоцитопенія пов'язана щонайменшою мірою з дією трьох факторів. По-перше, суттєву роль відіграє апоптоз периферичних зрілих клітин, по-друге, не виключене ураження кістковомозкових клітин-попередників лімфоцитів і, по-третє, реальним механізмом може бути стресова реакція на введення циклофосфану, стандартним компонентом котрої у певний час може бути лімфоцитопенія. Як можна побачити на рисунку 4.4 кількість гранулоцитів та моноцитів периферичної крові була незмінною в перші 2 терміни експерименту та незначно зростала до 40 доби, що свідчить про те, що зменшення кількості лейкоцитів в периферичній крові мишей після введення ЦФ обумовлене переважно зниженням рівня саме лімфоїдних клітин. З урахуванням незначного періоду життя гранулоцитів (1-3 доби) дані свідчать про наявність ефективного гранулопоезу у зазначений період.

4.3. Дослідження динаміки змін показників еритропоезу мишей після застосування циклофосфану

Внутрішньочеревне введення ЦФ призводить до розвитку гіпоплазії КМ. Клітинність КМ суттєво знижувалась на 12 день і повністю не відновлювалась до кінця спостережень (рис.4.5), що разом зі зниженими показниками еритроцитів, гемоглобіну та гематокриту свідчить про вираженні порушення еритроцитарного кровотворення. Відновлення показників до 40-ї доби ймовірно відбувається за рахунок дозрівання гемопоетичних попередників, що збереглися. Відновлення клітинності КМ довготривале і не завершується навіть до кінця експерименту.

Разом з попередніми даними можна говорити про початкове порушення під дією ЦФ усіх ростків кровотворення з послідуною регенерацією. У відновленні лімфоїдної складової помітну роль мабуть відігравав на ранніх етапах тимус.

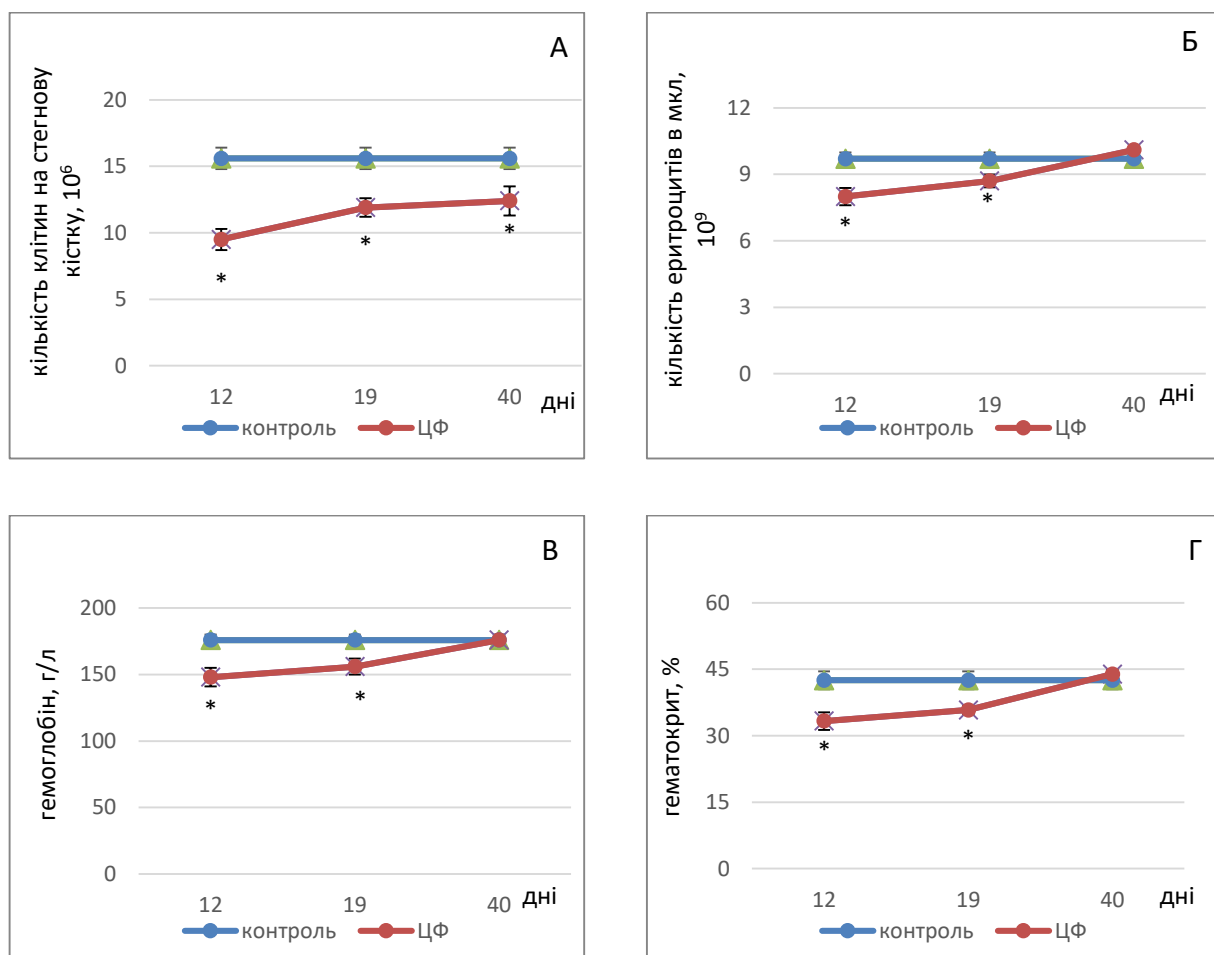


Рис. 4.5. Вплив циклофосфану на еритропоез мишей: А – абсолютна кількість клітин кісткового мозку на стегнову кістку; Б – абсолютна кількості еритроцитів периферичної крові; В – концентрація гемоглобіну; Г – гематокрит. Статистичні дані подані як $M \pm m$. * $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували фіз.розчин.

4.4. Дослідження динаміки змін імунологічних показників мишей після застосування циклофосфану.

Досліджено поглинальну активність перитонеальних макрофагів, що була достовірно підвищена на всіх термінах експерименту (рис. 4.6). Відомо, що поглинальна активність фагоцитів підвищується при певному подразненні клітин. Можна припустити, що перитонеальні макрофаги не дуже чутливі саме до ЦФ, але елементи тканинного розпаду, що виникають під впливом препарату, можуть відігравати суттєву стимулюючу поглинальну активність роль.

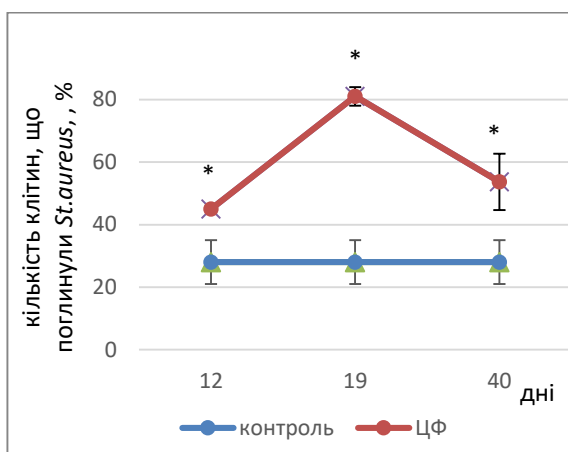


Рис. 4.6. Вплив циклофосфану на фагоцитарну активність перитонеальних макрофагів мишей. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n = 8-4$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували фіз.розчин.

Як продемонстровано на рисунку 4.7. цитотоксична активність лімфоцитів була незначно підвищена на 12 добу експерименту та перебувала в межах норми на наступні строки, демонструючи певну стійкість до дії ЦФ. Відомо, що ЦФ в першу чергу вражає Т-хелперні клітини, і вже через них можлива супресія цитотоксичних Т-клітин, для чого потрібні вищі дози ЦФ.

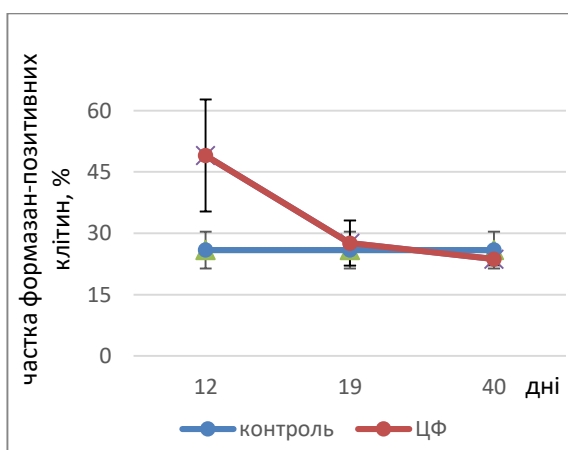


Рис. 4.7. Вплив циклофосфану на природну цитотоксичність клітин лімфатичних вузлів мишей. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n = 8-4$).

Також було проведено дослідження гуморального імунітету шляхом визначення АУК в селезінці. Їх кількість суттєво знижувалась до 12 доби більш ніж в 2 рази, залишалась зниженою на 19 добу (рис. 4.8). Нормалізація імунної

відповіді відбувалась вже до 40 доби, що свідчить про досить виражену імуносупресивну дію ЦФ у відношенні формування АУК і здатність імунної системи до регенерації гуморального імунітету.

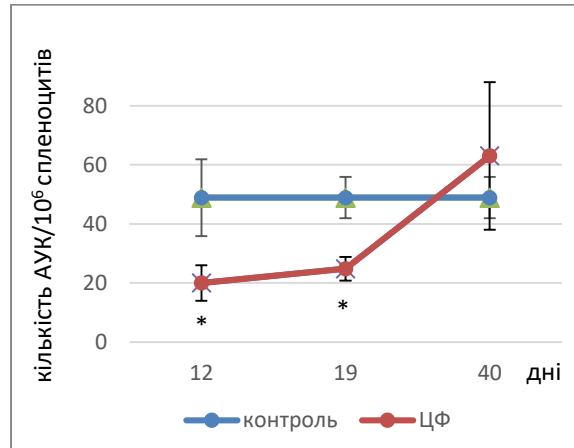


Рис. 4.8. Вплив циклофосфану на антитілоутворення мишей: кількість АУК відносно кількості спленоцитів клітин. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n = 8-4$).
* $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували фіз.розчин.

В цілому, можна помітити, що ураження гемопоезу та імунної системи відбувається практично в один і той же час, що свідчить про значну роль ураження кровотворення в розвитку ЦФ імунодефіциту, а однонаправлена і подібна динаміка показників кровотворення та імунітету може свідчити про провідну роль кістковомозкового гемопоезу в регенерації імунної системи. На ранніх етапах суттєвий репаративний вклад вносить і тимусний лімфопоез.

Динаміка досліджуваних змін під дією ЦФ має закономірний характер зі зниженням і поступовим поокращенням показників. Однак, щоб оцінити саме вплив клітинних трансплантатів в подальших дослідженнях було обрано термін 12 днів, коли ще більшість показників імунної системи достовірно знижені. Їх відновлення на даному терміні буде свідчити саме про регенеративну активність трансплантованих клітин.

4.5. Висновок до розділу 4

1. Оптимізовано модель циклофосфан-індукованої імуносупресії для дослідження регенеративної активності клітинних препаратів. Показано, що одноразове введення ЦФ в дозі 200 мг/кг маси тіла викликає глибоке ураження лімфатичних органів та кісткового мозку до 12 дня після застосування, з поступовим відновленням на 19 день дослідження та достовірною нормалізацією практично всіх досліджуваних показників на 40 день.

Результати досліджень даного розділу пройшли апробацію:

1. **Чех ДЛ, Никольский ИС, Никольская ВВ, Тарануха ЛИ, Савинова ВО, Семенова М-ЯА.** Динамические особенности индуцированного циклофосфаном гемоиммунодефицита. Материалы Международной форум “Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы”, 2014 май 14-17; Казань, Россия. 2014, с. 195-6

РОЗДІЛ 5.

ВПЛИВ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ ІМУННОЇ СИСТЕМИ МИШЕЙ, ЩО ОТРИМУВАЛИ ЦИКЛОФОСФАН ТРАНСПЛАНТАЦІЇ МУЛЬТПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ТИМУСА, КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ, ЇХ КОТРАНСПЛАНТАЦІЇ ТА ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ, АКТИВОВАНИХ КОНТАКТОМ З МУЛЬТИПОТЕНТНИМИ СТРОМАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ ТИМУСА

Одним із основних напрямків регенеративної медицини є вивчення механізмів відновлення імунної системи, що має велике теоретичне і практичне значення, оскільки глибокі ураження імунітету спостерігаються при чисельних видах патології: токсичних впливах, стресах, аутоімунних, алергічних, інфекційних, а також імунопроліферативних синдромах імунологічної недостатності. З урахуванням часто незадовільної лікувальної ефективності існуючих заходів перманентно існує необхідність розробки нових. У теперішній час з метою підсилення регенерації імунної системи використовують різні типи стовбурових клітин, в тому числі МСК, які є найменш вивченими в цьому аспекті. Історично, першим методом трансплантації ГСК була трансплантація КМ. ГСК - це родоначальні високоспеціалізовані клітини, які головним чином перебувають у “нішах” КМ в умовах контактної взаємодії з МСК і їх похідними [199]. Вплив мікрооточення забезпечує реалізацію закладених в ГСК програм самопідтримки, поліпотентності та проліферації [200]. Це дозволяє виводити необхідну кількість клітин в диференціювання по різним напрямкам, при збереженні константної кількості ГСК, функціонування яких необхідне для нормального гемопоезу.

Відомо, МСК є основою КМ ніш ГСК і в значній мірі визначають вищезазначені прояви активності ГСК та запобігають дії на них проапоптичних чинників [201].

Клітинна терапія наразі є перспективним напрямком регенеративної медицини, коли починають використовуватись необхідні типи клітин саме для певних потреб ураженого організму.

Тому завданням цієї частини роботи було вивчити вплив клітинних препаратів серед яких були МСКт та ККМ окремо та разом, а також ККМ, активовані контактом з МСКт, на регенерацію імунної системи після введення ЦФ.

Для виконання цього завдання мишам лінії C57BL масою 18-20 г внутрішньочеревно вводили водний розчин циклофосфану (200 мг/кг). Через 2 години вводили в ретроорбітальний синус досліджувані клітинні препарати в об'ємі 0,1 мл. Через тиждень імунізували тварин внутрішньочеревно еритроцитами барана (10^8), через 4 дні проводили повторну інєкцію в подушечку лапи (10^8) і ще через добу оцінювали стан імунної системи.

При котрансплантації ККМ вводили в один ретроорбітальний синус, МСКт - в іншій одночасно. ККМа отримували після 2 годин інкубації ККМ на моношарі МСКт. Після ресуспедування збирали ККМ, що слабо приєдналися до МСКт.

5.1. Дослідження впливу трансплантації клітинних препаратів на регенерацію клітинних показники органів мишей після введення циклофосфану

Через 12 днів після введення ЦФ маса тіла у мишей була зниженою на 13% у порівнянні з контрольною групою інтактних тварин ($16,8 \pm 0,8$ г відносно $19,3 \pm 0,4$ г; $p < 0,05$), що, вірогідно, може бути результатом загальнотоксичного впливу ЦФ. Після введення таким мишам МСКт та ККМ цей показник залишався практично незмінним, відповідно $16,3 \pm 0,2$ г і $16,1 \pm 0,2$ г. При трансплантації ККМа ($17,0 \pm 0,5$) та котрансплантації ($17,3 \pm 0,3$) маса дещо зростала, однак все одно ще була достовірно нижче норми. Тому можна вважати, що загальним антитоксичним впливом за даних умов клітинні препарати практично не володіли.

Введення ЦФ призводило до зниження клітинності кісткового мозку на 36% ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольною групою інтактних тварин. Введення ККМ викликало ще інтенсивніше зниження клітинності, що досягало вже 53% ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольною групою (рис. 5.1) і було достовірно нижчим і по відношенню до групи тварин, що отримували ЦФ.

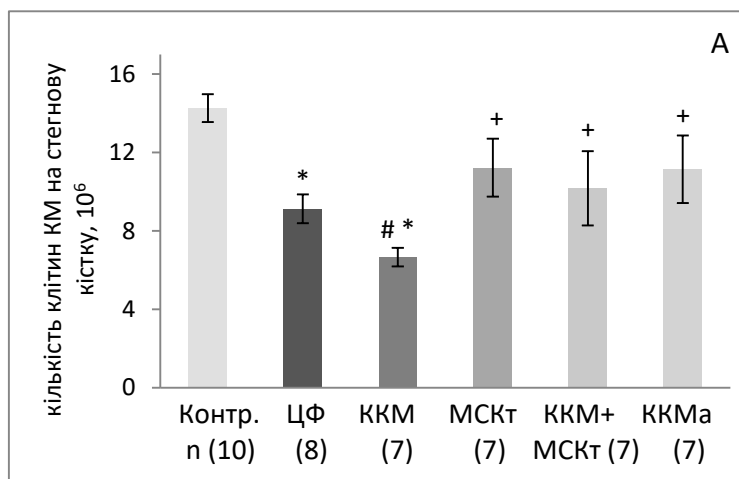


Рис. 5.1. Вплив клітинних препаратів на кількість клітин в кістковому мишей із циклофосфан-індукованою імуносупресією. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n=7-10$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фіз.розчин; # $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ; + $p < 0,5$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і ККМ.

Показники мишей, що отримували МСКт у цей термін уже достовірно не відрізнялася від норми, що свідчило про позитивний вплив клітин [202]. Трансплантація ККМа та котрансплантація в даному випадку демонструвала схожий вплив до такого МСКт, що свідчило про позитивний вплив саме МСКт на процес відновлення КМ (рис. 5.1) як безпосередньо при котрансплантації, так і опосередковано за рахунок індукції нових властивостей ККМ після контакту з МСКт.

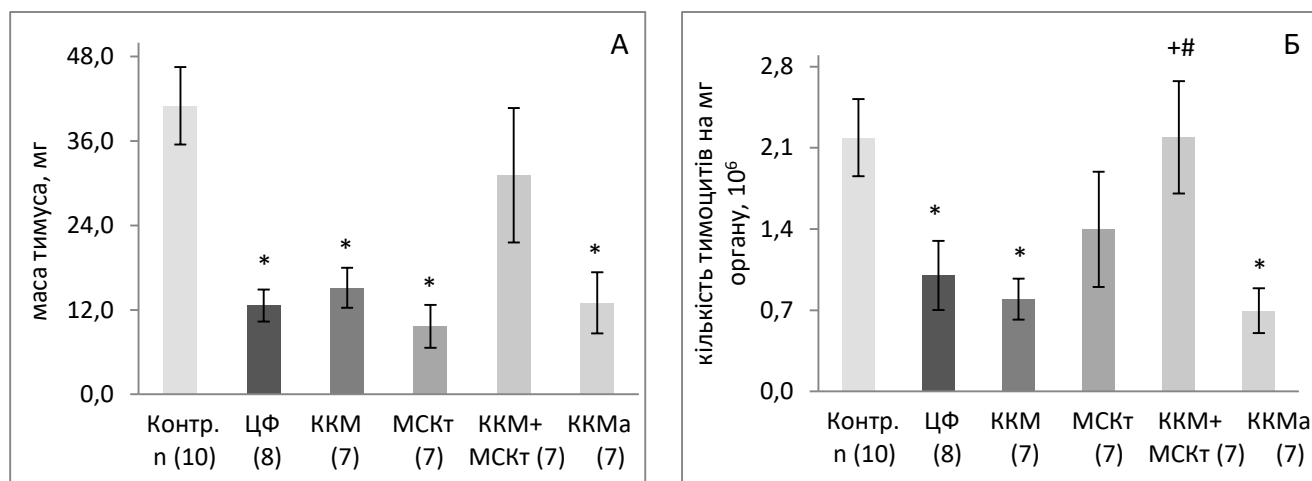


Рис. 5.2. Вплив клітинних препаратів на тимус мишей із циклофосфан-індукованою імуносупресією: А – маса тимуса; Б – кількість клітин на мг органу. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n=7-10$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фіз.розчин; # $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ; + $p < 0,5$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і ККМ.

Під дією ЦФ достовірно знижувалась маса тимуса на 69,3% ($p < 0,05$), загальна кількість тимоцитів на 87,2% ($p < 0,05$) (рис. 5.2, А) та клітинність органу на 63,6% ($p < 0,05$) (рис. 5.3., Б) у порівнянні з контрольної групою інтактних мишей, що свідчило про інволюцію тимусу [203, 204]. Застосування ККМ та ККМа не впливало на ці показники. Однак трансплантація МСКТ та їх спільне введення з ККМ демонстрували відновлення клітинності органу, тоді як маса відновлювалась лише при котрансплантації.

Маса селезінки мишей, що отримували ЦФ, через 12 днів була суттєво підвищена, кількість спленоцитів при цьому не змінювалась, а кількість клітин на мг органу відповідно зменшувалась (рис. 5.3). Характерна зміна показників дозволяє припустити, що збільшення селезінки в результаті дії ЦФ обумовлене саме судинними розладами і набряком органу.

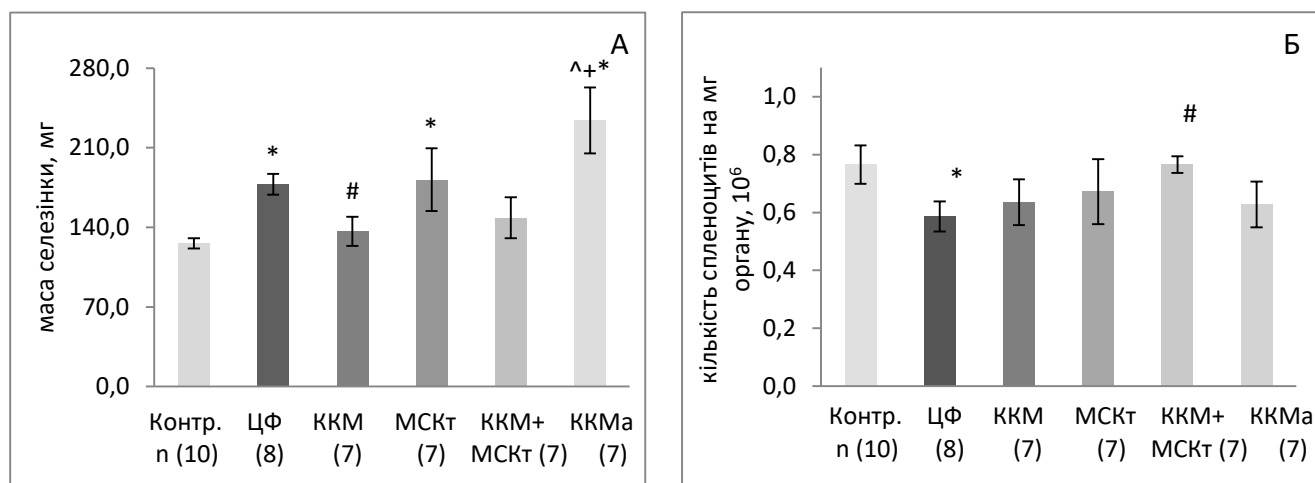


Рис. 5.3. Вплив клітинних препаратів на селезінку мишей із циклофосфан-індукованою імуносупресією: А – маса селезінки; Б – кількість клітин на мг органу. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n=7-10$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фіз.розчин; # $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ; + $p < 0,5$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і ККМ.

Після введення мишам ККМ та котрансплантації достовірно нормалізувались маса селезінки та її клітинність. В результаті введення мишам МСКТ абсолютна кількість спленоцитів в органі дещо зростала, тому показник клітинності практично не відрізнявся від того, що був у нормальних мишей, тоді як маса залишалась збільшеною. Введення ККМа призводило до ще більшого зростання маси органу, однак абсолютна кількість спленоцитів теж зростала, тому показник клітинності практично не відрізнявся від того, що був у нормальних мишей. Таким чином, за даних умов експерименту виявляється позитивна дія всіх клітинних препаратів, однак очевидно механізм впливу був різним.

При введенні ЦФ також достовірно знижувалася клітинність брижових лімфовузлів на 44,8% ($p < 0,05$) порівняно з контрольної групою інтактних мишей. Трансплантація ККМ призводила до ще більшого пригнічення цього показника вже на 55,2% ($p < 0,05$) (рис. 5.4, А). Трансплантація МСКТ, ККМа та котрансплантація призводили до відновлення клітинності органу [205].

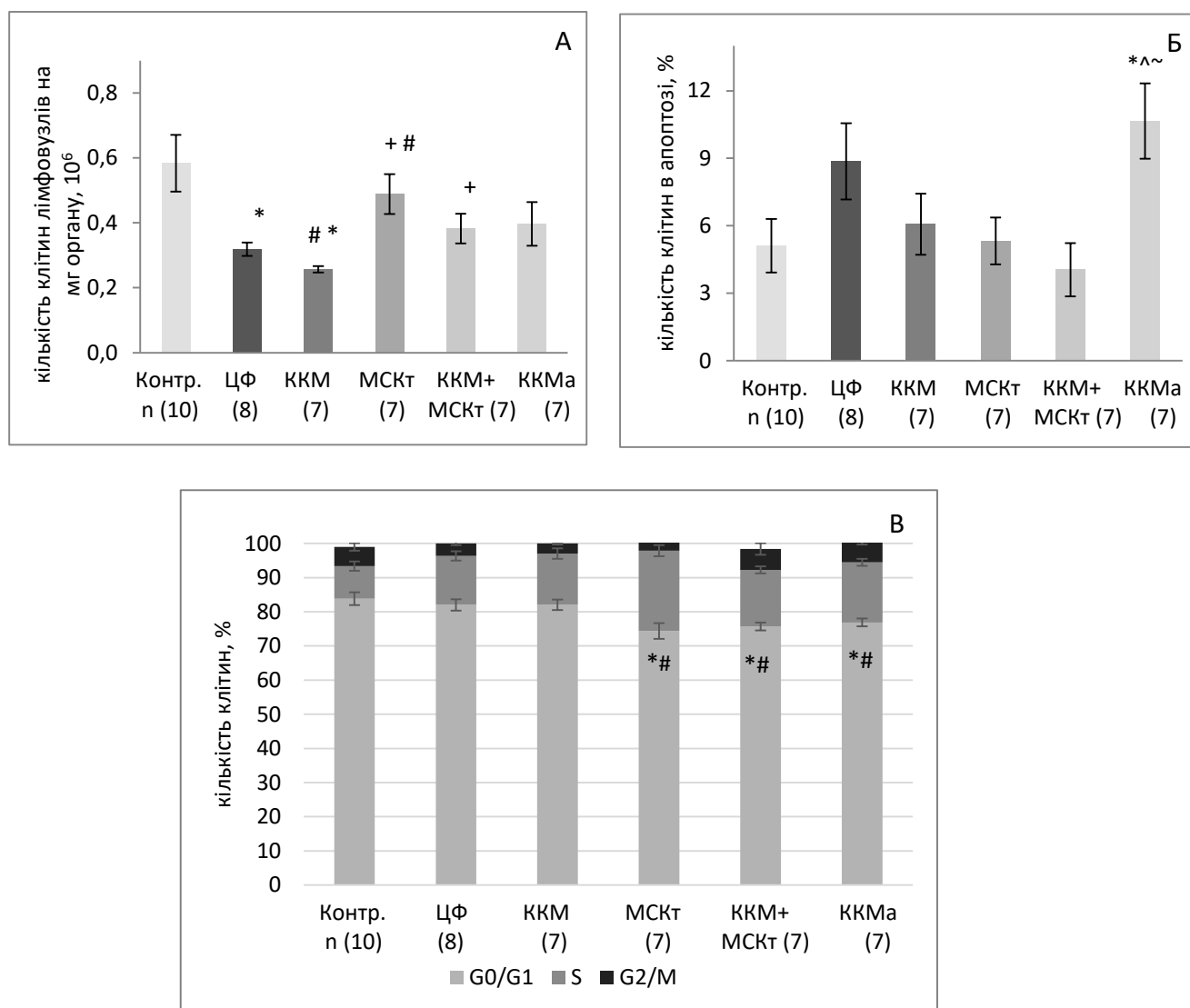


Рис. 5.4. Вплив клітинних препаратів на брижові лімфатичні вузли мишей із циклофосфан-індукованою імуносупресією: А – кількість клітин на мг органу; Б – відносна кількість клітин, що знаходяться в апоптозі; В – відносна кількість клітин, що знаходяться в G0/G1, S та G2-M фазах клітинного циклу. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n=7-10$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фіз.розчин; # $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ; + $p < 0,5$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і ККМ; ^ $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і МСКТ; ~ $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ, ККМ та МСКТ.

Відповідна різниця впливу клітинних препаратів вже спостерігалася по відношенню до показників КМ, і ще раз демонструє, що позитивний вплив

реалізується саме завдяки МСКт, і контактна взаємодія МСКт з ККМ надала нових властивостей останнім.

Доречно відмітити, що показники спонтанного апоптозу клітин лімфатичних вузлів після введення ЦФ мали тенденцію до збільшення, а під впливом ККМа вже достовірно збільшувались порівняно з контрольної групою інтактних мишей (рис. 5.4, Б).

При застосуванні МСКт, ККМа та котрансплантації кількість клітин в G0/G1-фазах суттєво зменшувалась, а у S+G2/M фазах достовірно збільшувалась (рис. 5.4, В) [206]. Тоді як ККМ не мали такої активності.

Таким чином, отримані дані демонструють, що після введення ЦФ у практично максимальній дозі, що не викликає загибелі мишей, спостерігаються глибокі ураження клітинного складу кісткового мозку, тимуса, селезінки і лімфатичних вузлів з наступною спонтанною регенерацією. В результаті трансплантації МСКт відбувається суттєве підвищення клітинних показників усіх названих органів, що свідчить про підтримку цими клітинами лімфоїдних клітин в цілому за даних умов. Частково схожість впливу проявляють ККМа та котрансплантація, ймовірно за рахунок впливу саме МСКт, адже ККМ не проявляли такої активності.

5.2. Дослідження впливу трансплантації клітинних препаратів на відновлення гематологічних показників мишей після введення циклофосфану

Застосування ЦФ достовірно знижувало гематокрит на 14,6% ($p < 0,05$), кількість еритроцитів на 17% ($p < 0,05$), та гемоглобін на 18,4% ($p < 0,05$). Трансплантовані МСК, ККМа не впливали на дані показники, тоді як інтактні ККМ нормалізували гематокрит та гемоглобін, і водночас достовірно підвищували кількість ретикулоцитів в крові в 2,2 рази ($p < 0,05$) (рис. 5.5). Подібний ефект спостерігався і при котрансплантації. За показниками ретикулоцитів можна чітко спостерігати різнонаправленість впливу ККМ та

МСКТ, так як останні знижували показник в 3,5 рази ($p < 0,05$). Тоді як ККМа та котрансплантація не має жодного впливу, що може бути як результат нейтралізації ефекту різнонаправлених клітин.

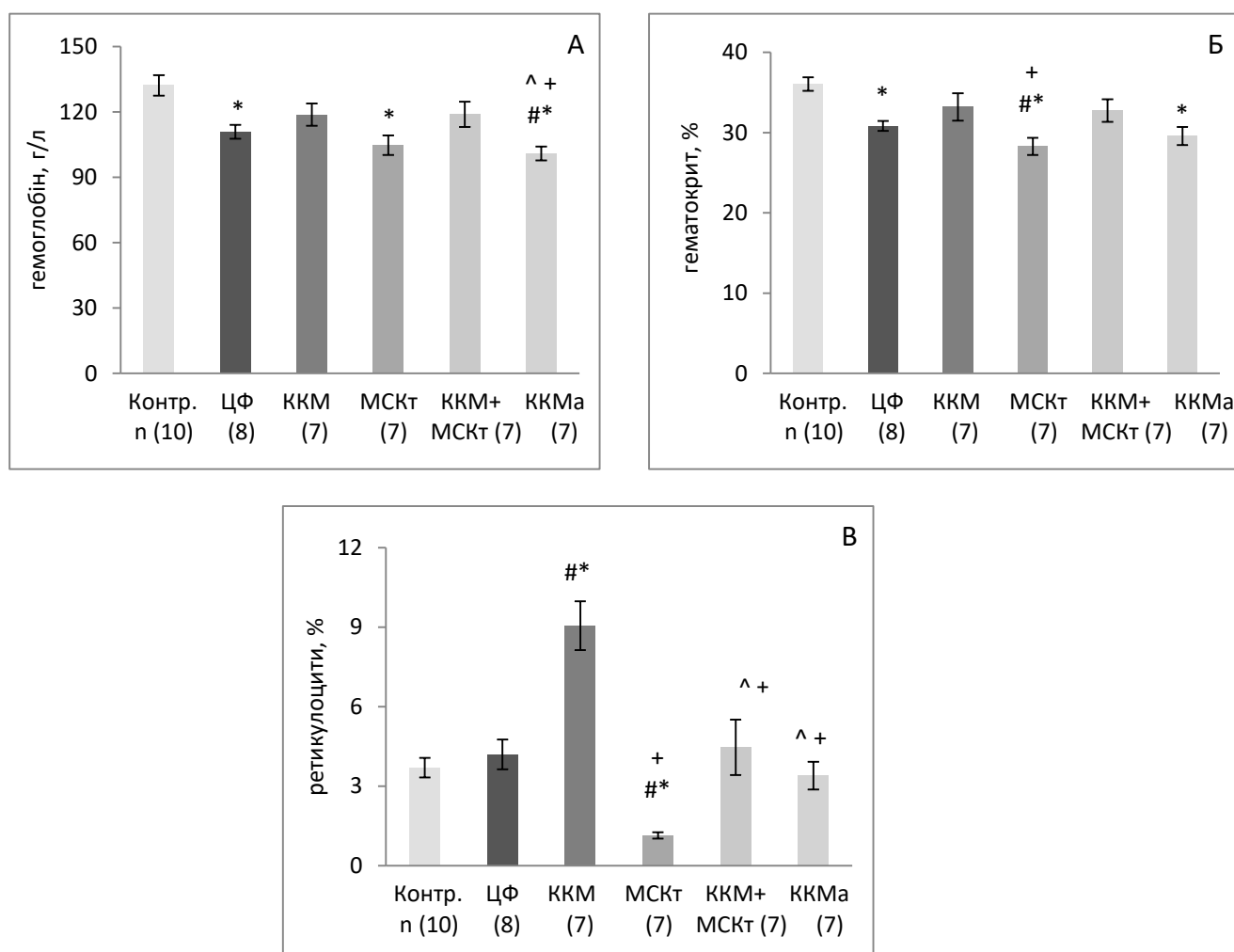


Рис. 5.5. Вплив клітинних препаратів на гематологічні показники мишей із циклофосфан - індукованою імуносупресією: А – сироваткова концентрація гемоглобіну; Б – гематокрит; В – відносна кількість ретикулоцитів. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n=7-10$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фіз.розчин; # $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ. + $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і ККМ. ^ $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і МСКТ.

Отже в порівнянні з ефективністю трансплантації клітинних препаратів на лімфоїдні органи вплив на гематологічні показники був протилежним, тобто суттєво активніше діяли саме ККМ у процесі регенерації еритропоезу. За показниками ретикулоцитів можна чітко спостерігати різнонаправленість впливу

ККМ та МСКт. Тоді як ККМа та котрансплантація не має жодного впливу, що може бути як результат нейтралізації ефекту різнонаправлених клітин.

5.3. Дослідження впливу трансплантації клітинних препаратів на функціональну активність імунної системи мишей після введення циклофосфану

В результаті трансплантації клітин виражених змін зазнавала функціональна активність імунної системи. Що було продемонстровано при дослідженні перитонеальних макрофагів (рис. 5.6).

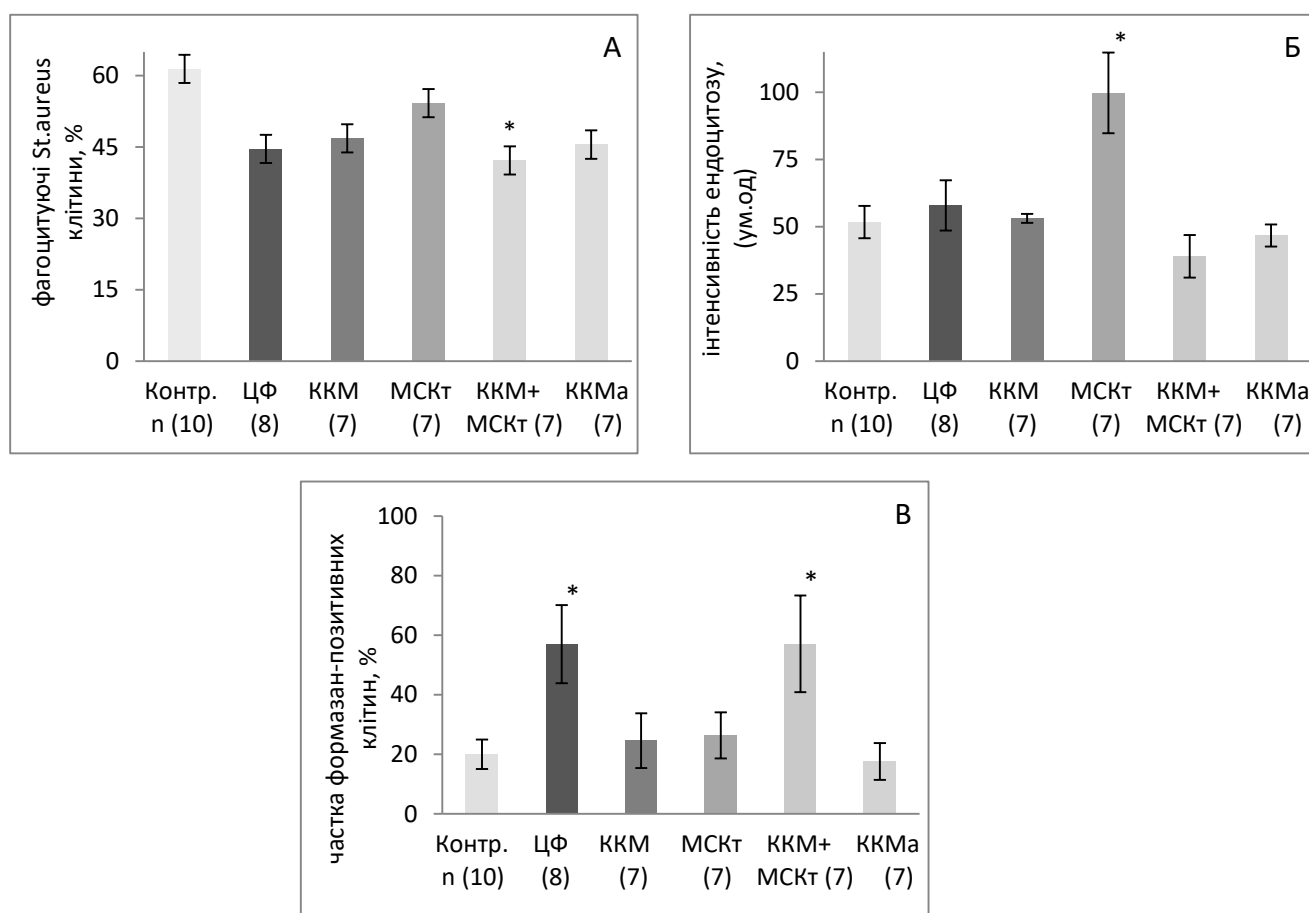


Рис. 5.6. Вплив клітинних препаратів на функціональну активність перитонеальних макрофагів мишей із циклофосфан-індукованою імуносупресією: А – відносна фагоцитарна активність клітин; Б – інтенсивність поглинання *St.aureus* клітинами; Б – бактерицидна активність. Статистичні дані подані як $M \pm m$ (n=7- 10). * $p < 0,05$ – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фіз.розчин.

Якщо поглинальна активність макрофагів практично не змінювалась ні в результаті введення ЦФ, ні після дії клітинних препаратів, то інтенсивність поглинання окремо фагоцитуючими клітинами у мишей, що отримували МСКт значно зростав, що свідчить про стимулюючий вплив трансплантованих клітин на фагоцити.

Під впливом трансплантованих ККМ, ККМа та МСКт спостерігалась нормалізація бактерицидної активності, що не відбувалось при котрансплантації цих клітин.

Також в результаті введення ККМа та котрансплантації спостерігався виражений пригнічуючий вплив на природну цитотоксичність спленоцитів (рис. 5.7, А) та реакцію бласттрансформації, індукованої фітогемаглютиніном (ФГА) (рис. 5.7, Б), які після застосування ЦФ та ККМ не мали достовірних відмін від норми.

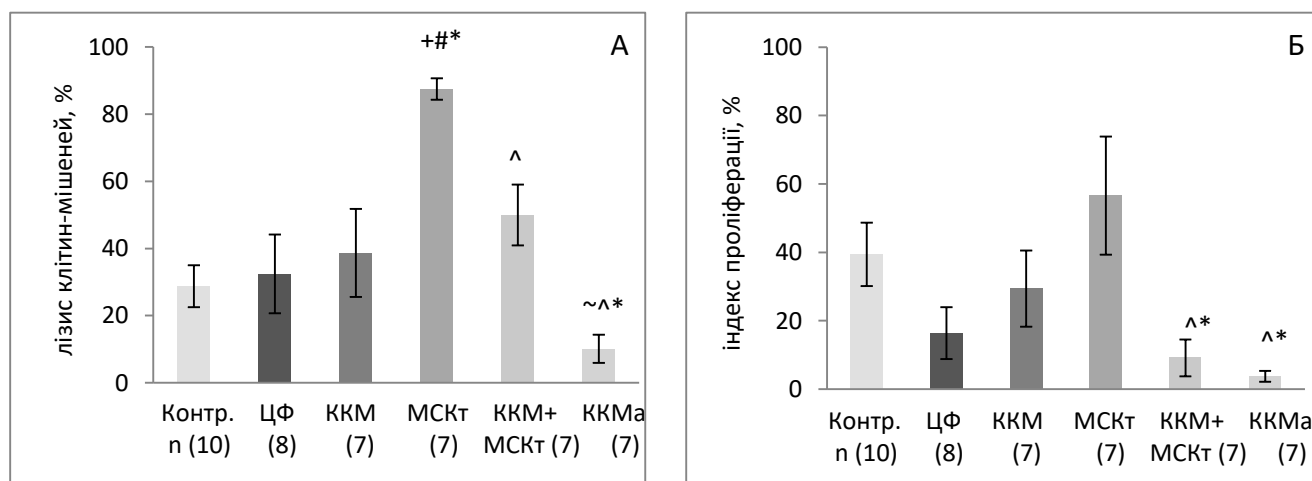


Рис. 5.7. Вплив клітинних препаратів на функціональну активність спленоцитів мишей із циклофосфан-індукованою імуносупресією: А – цитотоксична активність спленоцитів. Б – мітоген-активована проліферація спленоцитів в РБТЛ. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n=7-10$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фіз.розчин; # $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ; + $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і ККМ; ^ $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і МСКт; ~ $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ, ККМ та МСКт.

У використанні терміни дослідження введення МСКт достовірно підвищувало природну цитотоксичність спленоцитів.

Між тим, кількість антитілоутворюючих клітин (АУК) в селезінці мишей, яким вводили ЦФ, в цей же час була достовірно зниженою, і жоден з клітинних препаратів, крім МСКт не нормалізував її рівня. За умов введення МСКт спостерігалось суттєве збільшення кількості АУК у селезінці (рис.5.8).

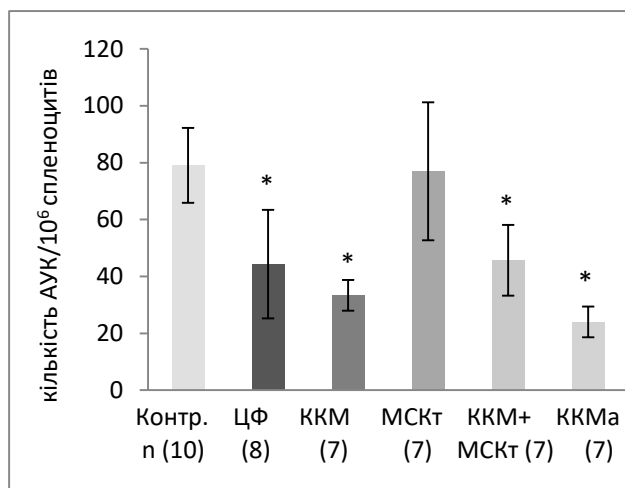


Рис. 5.8. Вплив клітинних препаратів на показники антитілоутворення В-клітин у селезінці мишей із циклофосфан-індукованою імуносупресією. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n=7-10$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фіз.розчин;

Активність реакції ГСТ у мишей у визначені терміни є нормальною. Мабуть, механізми регенерації ГСТ у цей час уже повністю відновлені, і введення МСКт не впливає на цю реакцію. Протилежний ефект мав місце при формуванні реакції ГСТ, що була суттєво підвищена після котрансплантації (рис. 5.7). Трансплантовані ККМ не чинили впливу на функціональну активність імунної системи. Ці дані корелюють з вивченням набутого імунітету, що показало, знову ж таки, пригнічуючий вплив ККМа на активність реакції гіперчутливості сповільненого типу у мишей (рис. 5.7), яка була нормальною при застосуванні ККМ.

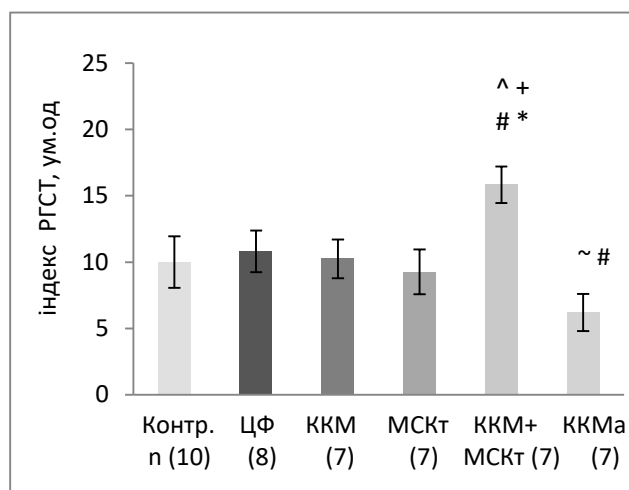


Рисунок 5.9. . Вплив клітинних препаратів на реакцію гіперчутливості сповільненого типу. у мишей із циклофосфан-індукованою імуносупресією. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n=7-10$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фіз.розчин; # $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ; + $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і ККМ; ^ $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і МСКт; ~ $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ, ККМ та МСКт.

Отже ми спостерігали різницю ефективності та направленості різних клітинних препаратів. Кожні з клітин мають свої особливості, а їх поєднання при трансплантації не просто поєднує окремі ефекти, а надає нових властивостей таким клітинним трансплантатам.

5.4. Висновки до розділу 5

1. Встановлено, що трансплантація ККМ призводить до регенерації еритроїдного кровотворення з нормалізацією зниженого показника гематокриту, концентрації гемоглобіну та збільшенням кількості ретикулоцитів у крові в 2,2 рази. Нормалізує клітинність селезінки до рівня контрольних тварин та бактерицидну активність перитонеальних макрофагів, що була підвищена в 2,9 рази при дії ЦФ.

2. Показано, що на відміну від ККМ, трансплантація ККМ, активованих контактною взаємодією з МСКт, тваринам з імуносупресією спричиняє

нормалізацію кількості клітин у кістковому мозку, тимусі, селезінці і лімфатичних вузлах. Викликає підвищення проліферативної активності клітин лімфатичних вузлів (на 6,9% в G2/M+S фазах) порівняно з контролем. Нормалізує підвищену в 2,9 рази при дії ЦФ бактерицидну активність перитонеальних макрофагів. Знижує природну цитотоксичність спленоцитів в 2,9 рази та рівень РБТЛ спленоцитів в 10,4 рази порівняно з контролем.

3. Трансплантація МСКт тваринам з імуносупресією супроводжується відновленням кількості клітин кісткового мозку, тимуса, селезінки і лімфатичних вузлів, збільшенням проліферативної активності клітин лімфовузлів (в 1,6 рази в G2/M+S фазах) порівняно з контролем, зниженням рівня ретикулоцитів в 3 рази, нормалізацією підвищеної в 2,9 рази бактерицидної активності перитонеальних макрофагів, посиленням нормальної фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів в 1,9 рази та цитотоксичної активності спленоцитів в 3 рази, стимуляцією формування АУК в селезінці до нормального рівня, що був знижений в 1,8 рази після дії ЦФ.

4. Котрансплантація ККМ і МСКт асоційована з відновленням кількості клітин кісткового мозку, тимуса, селезінки і лімфатичних вузлів з підвищенням індексу проліферації клітин лімфатичних вузлів в 1,4 рази порівняно з контролем. Нормалізує знижену концентрацію гемоглобіну та гематокриту в крові, як і ККМ. Подібно дії ККМа, знижує рівень РБТЛ спленоцитів в 4,3 рази порівняно з контролем. На відміну від трансплантації інших клітинних препаратів, застосування ККМ сумісно з МСКт викликає посилення Т-клітинної імунної відповіді при формуванні РГСТ в 1,6 рази порівняно з контролем.

Результати, представлені у даному розділі, опубліковано у власних наукових працях [212, 215, 216] та пройшли апробацію:

1. Демченко ДЛ, Нікольська ВВ. Прискорення регенерації ураженої циклофосфаном імунної системи при котрансплантації гемопоетичних стовбурових та мезенхімальних стромальних клітин тимусу. Матеріали V

ювілейного Міжнародного медичного конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України», 2016 квіт. 19-21; Київ, Україна. 2016, с. 133.

2. **Demchenko D**, Tymoshenko A. The impact of thymic multipotent stromal cells transplantation to immune system regeneration after cyclophosphamide. Матеріали XIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2017 квіт.15-27; Львів, Україна. 2017, с. 203.

3. **Demchenko D**, Borisyuk A. Acceleration the immune system regeneration after cyclophosphamide by multipotent stromal cells and hematopoietic stem cells cotransplantation. Матеріали XII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2016 квіт.19-21; Львів, Україна. 2016,с. 137.

4. **Чех ДЛ**, Никольский ИС, Никольская ВВ, Савинова ВО, Тарануха ЛИ, Семенова Я-МА, Никольская ЕИ. Иммунобиологическая активность трансплантатов гемопоэтических и мультипотентных стромальных клеток тимуса Материалы I Евразийского конгресса «Трансплантация стволовых клеток», 2013 сент. 25-27; Мінськ, Беларусь. 2013, с.109-111.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Трансплантація ГСК, застосовується для регенерації імунної та кровотворної систем. Історично, саме трансплантація КМ була першим методом трансплантації ГСК.

ГСК - це родоначальні клітини, які перебувають у “нішах” КМ в умовах контактної взаємодії з клітинами мікрооточення [174], що забезпечує їх самопідтримку, поліпотентність та проліферацію [200]. Відомо, що МСК є основою кістковомозкових “ніш” ГСК і в значній мірі визначають розвиток останніх, регулюють їх міграцію і проліферацію та перешкоджають впливу проапоптичних чинників [201]. Значну роль при цьому відіграє мембранний зв'язок з іншими клітинами. Взаємодія МСК і ГСК є невід'ємною частиною гемопоезу.

Традиційним джерелом МСК вважається КМ, однак наразі досліджують ці клітини і з інших тканин. МСК різного походження мають як спільні, так і відмінні риси, відповідно деякі з них можуть мати переваги для відновлення тих чи інших пошкоджень в організмі.

Особливе місце в імунній системі займають найменш вивчені, особливо у регенерації імунної системи, МСК тимуса, які, між тим, приймають участь у ембріональному морфогенезі і формуванні дорослого центрального органу імунітету [4], селекції тимоцитів, їх дозріванні і міграції [193]. Процес розвитку тимоцитів проходить в так званих “тимусних нішах”, одним із основних елементів яких є саме МСКт. Таким чином сукупність властивостей МСКт може бути важливою для регенерації імунної системи і аргументує актуальність вивчення зазначеної активності цих клітин.

Викладені дані свідчать про взаємодію МСКт і клітин гемопоетичного походження, а також про те, що застосування МСКт з метою регенерації імунної системи може бути найбільш ефективним у випадку, коли в організмі ще залишається певна кількість ГСК і клітин попередників, але внаслідок розладів у функціонуванні мікрооточення, чутливого до факторів альтерації, порушується

міжклітинна взаємодія, що необхідна для повноцінного розвитку ГСК. Саме така ситуація виникає в організмі при дії екстремальних факторів, таких як іонізуюче випромінювання та хіміотерапія, що часто використовуються в клінічній практиці.

Однією з моделей глибокого ураження гемоімунопоезу за рахунок здійснення проапоптичного впливу на проліферуючі клітини є імунодефіцит, що виникає в результаті введення ЦФ. При цьому стовбурові клітини, що перебувають в стані спокою, напро́ти - практично не уражуються ЦФ, завдяки реалізації у ГСК антитоксичного механізму за участю АДГН і ABC-транспортеру [5].

Широковикористовуваним методом регенерації після глибокого спустошення тканин під дією екстремальних факторів є також поповнення пулу ГСК за рахунок їх трансплантації. Однак їх спільна з МСК трансплантації могла б за рахунок прямого контакту клітин, або ж через цитокіни МСК сприяти підтримці введених ГСК, забезпечувати відповідно краще приживлення і розвиток трансплантату. Різноманітні ростові, хоумінгові та імуномодуляторні фактори, що виробляють МСК можуть направляти міграцію ГСК до пошкоджених тканин та створювати там необхідне мікрооточення ГСК для реалізації регенерації.

Розробка методів трансплантації клітинних препаратів, де б можна було використати всі переваги МСК, виключаючи їх безпосереднє введення в організм, могла б бути дуже перспективною при клінічному використанні. Одним із таких нових підходів може бути використання попередньої контактної взаємодії МСК з ГСК *in vitro*, яке призводить до суттєвої активації взаємодіючих клітин, ефективною і направленою зміни властивостей ГСК, які будуть в подальшому трансплантовані.

Враховуючи викладене, метою роботи було дослідити контактну взаємодію МСКт та ГСК *in vitro* та вплив трансплантації цих клітин в різних комбінаціях, а саме введених окремо, разом чи активованих контактом з МСКт ККМ на регенерацію імунної системи та кровотворення у мишей після введення ЦФ, що у майбутньому може бути покладено в основу розробки більш ефективних методів відновлення імунної системи.

Так, досліджуючи взаємодію МСКт та гемопоетичних клітин, нами було встановлено, МСКт мають високу спорідненість до лімфоїдних клітин різного походження і здатні формувати ФЛР знаходячись просто в суспензії, однак інтенсивніше цей процес відбувається при механічному впливі (центрифугуванні).

Відомо, що МСКт здатні взаємодіяти з різними клітинами вродженого та адаптивного імунітету. Переважна більшість робіт приділяє увагу секреції розчинних факторів в МСК-імуномодуляції. Очевидно з літератури, що було зареєстровано декілька кандидатів на роль медіаторів: простагландин E2 (PGE2), індоламін -2,3 - діоксигеназа, оксид азоту, IL -27, IL-10, IL-6,, трансформуючий фактор росту-бета (TGF- β), хемотаксичний білок моноцитів, людський лейкоцитарний антигену G, фактор росту гепатоцитів, інгібуючий фактор лейкоцитів та інші [36, 37]. В нашій роботі ми наголошуємо на невідому роль також міжклітинних контактів.

Подальші дослідження були проведені щоб з'ясувати чи в результаті взаємодії клітин лише МСКт здійснюється вплив на ГСК чи дія розповсюджується і на стромальні клітини.

Було показано, що МСКт в остеогенному середовищі досить активно диференціюються по відповідному напрямку. Ефект практично не вивчений, тому що остеогенних процесів в тимусі, практично, не відбувається. Однак можна припустити, що тимусні "ніші" мають подібну структуру до кістково-мозкових, однією зі складових якої є саме остеобласти.

Більш очікувано відбувається ефективно адипогенне диференціювання МСКт, процес, який може бути основою для вікового жирового переродження тимусу. Це явище також вивчено недостатньо, але теж свідчить про здатність МСКт до мультипотентного диференціювання, звичайного і обов'язкового для узагальненого образу МСК [65].

Нами показано, що добовий культуральний контакт МСКт з тимоцитами, але не ККМ, суттєво активує остеогенне диференціювання.

В літературі є дані, що ККМ, що не прилипають, а також LSK-клітини, культивовані з МСК КМ і розділені міліпоровою мембраною, прискорюють

остегенне диференціювання МСК, що реєструвалось по збільшенню кількості КУО фібробластів і КУО остеобластів [93]. Ефект був пов'язаний з дією цитокінів (IL-6, SDF-1, остеокальцин), секреція котрих значно підсилювалась остеобластами у присутності гемопоетичних клітин.

В умовах нашого експерименту, коли МСКт і гемопоетичні клітини знаходяться у тісному контакті 24 години, відігравати певну роль може саме контактна взаємодія, але не виключено, що за цей час тимоцити продукують певні цитокіни, що теж вносять вклад у зміну властивостей МСКт з підсиленням їх здатності до диференціювання.

Враховуючи стале уявлення про значну роль стромальних клітин у функціонуванні гемопоетичних клітин, наведені в роботі дані свідчать, що взаємодія названих клітин одночасно індукує активні зміни в обох типах контактуючих клітин та рецепторна взаємодія мембран має реципрокний характер. Результат взаємодії, мабуть, визначається багатьма факторами: мікрооточенням, наявністю контакту, синтезом певного спектру цитокінів та ін.

Потрібно зазначити, що активація лінійного диференціювання МСК гемопоетичними клітинами може мати велике значення у розвитку патології, коли дисбаланс і порушення функцій стромальних клітин можуть бути опосередковані кількісними і функціональними розладами в субпопуляціях імунних клітин. Роботи в цьому напрямку будуть сприяти прогресу у вивченні патологічних процесів системного і місцевого характеру у сполучній тканині.

На наступному етапі роботи виникла необхідність вибору підходящої моделі ураження імунної системи з метою подальшого дослідження на ній результатів контактної взаємодії МСКт та ГСК вже в *in vivo* системі.

ЦФ - індукований імунодефіцит є простою і відтворюємою моделлю, яка дозволяє вивчити вплив на різні ланки імунної відповіді. Однак враховуючи протиріччя, неоднозначність трактування накопичених даних, ця класична модель імуносупресії вимагає детального опису з метою виявлення найбільш значимих критеріїв порушення функції імунітету.

Обравши три терміни спостережень після введення ЦФ ми змогли виявити, що після імунодепресивного ефекту за певний час відбувається поступове нерівномірне відновлення імунної системи. Динаміка змін більшості показників імунної системи та гемопоезу має хвилеподібний характер з імуносупресією і поступовим відновленням. У тимусі спостерігались двоххвилові зміни і, можна припустити, що такий ефект регенерації пов'язаний з дозріванням менш чутливих до дії ЦФ місцевих клітин-попередників. Однак, коли їх запас вичерпується, ми спостерігаємо знову зниження тимусних показників, як це буває при дії випромінювання.

Внутрішньочеревне введення циклофосфану призводить до розвитку гіпоплазії кісткового мозку. Зміни відбуваються як в тимусі, лімфатичних вузлах і селезінці, так і в циркулюючій популяції лімфоцитів. Мієло- і лімфосупресивний ефект ЦФ був описаний ще в середині 60-х років. Одноразове введення ЦФ в дозі 200 мг / кг призводить до дезорганізації структури тимуса, зменшення його маси, розмірів коркової і мозкової речовини часточок, заміщення паренхіми жировою тканиною. Ймовірно, це пов'язано з пошкодженням ДНК лімфоцитів під дією ЦФ, зменшенням відсотка тимоцитів в S-стадії клітинного циклу і гальмуванням проліферативної активності тимоцитів. Відомо, що ЦФ викликає пряму індукцію апоптозу тимоцитів. Крім того, апоптоз тимоцитів може бути підсилений опосередковано через Fas-ліганди, експресія яких після введення ЦФ в тимусі значно збільшується.

Апоптоз розцінюється як спосіб «очищення» тканини від можливих наслідків при сублетальному пошкодженні клітин, недостатньому для прямого їх знищення шляхом некрозу. Проте за рахунок включення спеціальних біохімічних механізмів апоптоз значно перевершує репаративний потенціал тканини і визначає знищення всієї тканини.

Введення ЦФ також призводить до змін кількості формених елементів крові. Кількість еритроцитів і рівень гемоглобіну зменшується. Вважається, що це обумовлено прямим інгібуючим впливом препарату на гемопоез. Токсична мієлодепресія проявляється певної черговістю змін периферичної крові: спочатку

реєструється лейкопенія, потім - тромбоцитопенія і лише в останню чергу - анемія, що пов'язано з тривалим терміном життя еритроцита. Явище дезорганізації клітинного складу КМ після одноразового введення ЦФ в максимальну переносимій дозі зберігаються тривало, що пов'язано з виснаженням пулу стовбурових кровотворних клітин, мобілізацією їх на периферію, а також змінами в гемопоезіндукуючому мікрооточенні, що відіграє важливу роль у регуляції проліферації і диференціювання ГСК.

Вважається, що інгібуючий ефект циклофосфану спрямований, у першу чергу, на популяцію В-клітин. При його введенні виснажуються В-клітинно залежні області селезінки і лімфатичних вузлів і пригнічується їх стимульована проліферація. Ми бачили двократне зниження кількості АУК з першого терміну і до кінця експерименту.

Таким чином ми спостерігали зміни як в клітинній, так і в гуморальній ланці імунітету у мишей під дією ЦФ. Виходячи з отриманих результатів динаміки цих змін було обрано термін 12 діб для наступних досліджень ефектів клітинних трансплантатів. Імуносупресія в цей термін є вираженою по всіх досліджуваних показниках.

Наступним поставленим завданням було дослідити ефективність застосування різних клітинних препаратів з метою регенерації імунної системи після введення ЦФ. Серед клітинних трансплантатів були: ККМ, МСКт, ККМ разом з МСКт та ККМ, активовані попереднім добовим контактом з МСКт.

Показано, що введення ЦФ призводило до зниження клітинності кісткового мозку, яка не відновлювалась на 12 день. Але у цей термін клітинність органу мишей, що отримували клітинні препарати, що містили МСКт, або ККМ, що були у безпосередньому попередньому контакті з МСКт, уже достовірно не відрізнялась від норми, що свідчить про позитивний вплив трансплантованих клітин.

Є дані, що трансплантовані МСК здатні до міграції у кістковий мозок [209]. Відомо також, що застосування ЦФ може стимулювати експресію на МСК рецептора CXCR4 [210], який опосередковує їх міграцію до кісткового мозку

[211]. Можна припустити, що після внутрішньовенного введення МСКт мишам принаймні частина з них переміщується до кісткового мозку, сприяючи відновленню мікрооточення ГСК. Або ж ГСК, що вводяться реципієнту після контакту з МСКт *in vitro*, вже активовані до проліферації та диференціювання за рахунок якого відновлювалась клітинність кісткового мозку в ході експерименту. Тоді як інтактні ККМ не показали таких результатів, хоча і відомо, що трансплантовані ГСК також здатні мігрувати до КМ реципієнта, розмножуватись там та забезпечувати довготермінове кровотворення. Можливо, відновлення кістково-мозкових показників не відбулося через недостатність підтримки від мікрооточення, так як застосування ЦФ, виснажуює більшу частину гемопоетичної системи, в тому числі КМ ніші [212]. Також МСКт трансплантовані разом з ККМ могли за рахунок своєї гомеостатичної імуномодуляторної дії мінімізувати запальні ефекти пов'язані саме з процедурою трансплантації ГСК.

Під дією ЦФ достовірно знижувались показники тимусу, що свідчило про відому з літератури гостру інволюцію тимусу [31, 32]. Відомо, що ЦФ індукує апоптоз тимоцитів, який здійснюється різним механізмом, як класичним шляхом, за рахунок активації каспаз опосередкованої Fas-лігандами, експресія яких після введення ЦФ в тимусі значно збільшується, так і каспазозалежним альтернативним шляхом, коли ядерна транслокація мітохондріальних апоптоз-індукуючих факторів (AIF) та ендонуклеаз G (EndoG) викликається окисним пошкодженням [213].

І знову ж таки в результаті трансплантації клітинних препаратів, де фігурують МСКт клітинність органу суттєво збільшувалась. Нормалізація цього показника може бути пов'язана зі здатністю МСК пригнічувати активність вказаних проапоптотичних процесів [201]. Згідно літературних даних, це можливо за рахунок позитивної регуляції МСК експресії антиапоптотичних протеїнів Bcl-2 і p-Akt та зниження експресії проапоптотичного білка Bax [214].

Маса селезінки мишей, що отримували ЦФ, через 12 днів суттєво підвищувалась, кількість спленоцитів при цьому не змінювалась, а клітинність органу навіть зменшувалась, що дозволяє припустити, що збільшення селезінки в

результаті дії ЦФ обумовлене судинними розладами і набряком органу. Нормалізація маси спостерігалась тільки при введенні ККМ та котрансплантації, а показник клітинності практично не відрізнявся від того, що був у нормальних мишей після всіх клітинних препаратів. Отже, можна говорити про їх позитивний вплив на відновлення селезінки, однак очевидно, що механізм цього впливу реалізовувався різними шляхами. Дія МСКт по відношенню до селезінки, як і до інших лімфоїдних органів частково може, мабуть, реалізуватися тим же антиапоптичним механізмом.

При введенні ЦФ також достовірно знижувалася клітинність брижових лімфовузлів. Трансплантація МСКт, ККМа та котрансплантація призводила до повного відновлення цього показника. Можна припустити, що позитивний вплив препаратів, де знову ж таки прямо або опосередковано були задіяні МСКт, здійснювався за рахунок їх міграції та паракринної антиапоптичної активності. Відомо, що МСК здатні мігрувати до лімфовузлів, що корелює з експресією ними CCR7 – рецептора, який є необхідним для трансміграції через високий ендотелій венул [44, 45]. Патологічні процеси посилюють міграцію МСК в регіональні лімфовузли, що продемонстровано на діабетичних мишах C57BL/6 [217] та при пересадці рогівки ока [218]. Було показано *in vitro*, що апоптотичні клітини здатні активувати МСК до секреції stanniocalcin-1 (STC-1) - пептидного гормону, який і опосередковує їх антиапоптичні ефекти [201]. Хоумінг МСК і паракринна дія посилює їх імуномодулюючий ефект *in vivo* [219].

Дані про позитивний вплив МСКт, ККМа та котрансплантації на клітини лімфовузлів підтримуються результатами вивчення проліферативної активності клітин, яка значно підвищувалась. Кількість клітин в G0/G1-фазах суттєво зменшувалась, а у S+G2/M фазах достовірно збільшувалась.

Цікаво, що показники спонтанного апоптозу клітин лімфатичних вузлів після введення ККМа збільшувались, що зазвичай корелює із стимуляцією проліферативної активності клітин у нормальних тварин.

Хоча певна кількість робіт свідчить про імунодепресивну і антипроліферативну дію кістковомозкових МСК *in vitro* [220, 221], в ході

проведеного експерименту було показано відновлення лімфоїдних органів саме за рахунок клітинних препаратів, що або містили в своєму складі МСКт, або піддавались попередньому контакту з МСКт. Отже, показано саме стимулюючий проліферацію лімфоцитів ефект МСКт *in vivo*, що може свідчити про залежність спрямованості дії МСК від їх походження і оточуючих факторів. В експериментах *in vitro* вже було показано модулюючий вплив МСК в залежності від їх співвідношення до моноклеарних клітин периферичної крові, та від розчинних факторів. Так високопроліферативні Т-клітини при активації IL-2, IL-7 або IL-15 інгібувалися у присутності кісткомозкових МСК і навпаки, низькопроліферативні Т-клітини при однаковому впливі стимулювалися [222]. Також у дослідженнях повідомлялося про вплив кісткомозкових МСК людини на активовані лімфоцити в моделі ендотоксикозу *in vitro*. Після 24-годинної інтоксикації МСК підтримували проліферативну активність лімфоцитів, на відміну від дії на інтактні лімфоцити, проліферація яких інгібувалась МСК [223]. Ці дані демонструють імуномодулюючу активність МСК кісткового мозку і, враховуючи їх чутливість до стану мікрооточення, доцільно припустити, що і МСКт можуть включати механізми підтримки, коли взаємодіють з пошкодженими ЦФ імунними клітинами.

Таким чином, отримані дані демонструють, що після введення ЦФ у практично максимальній дозі, що не викликає загибелі мишей, спостерігаються глибокі ураження клітинного складу КМ, тимуса, селезінки і лімфатичних вузлів з наступною спонтанною регенерацією. В результаті трансплантації МСКт, ККМа та котрансплантації відбувається суттєве підвищення клітинних показників усіх названих органів, що свідчить про підтримку цих клітинних препаратів лімфоїдних клітин в цілому за даних умов. Те, що інтактні ККМ не мали такого ефекту демонструє, що контактна взаємодія МСКт з ГСК надала нових властивостей останнім.

Вплив клітинних препаратів на гематологічні показники був протилежним по ефективності. Після введення ЦФ кількість еритроцитів, гемоглобіну та гематокрит достовірно знижувалася. Анемія є класичним проявом токсичного

ефекту ЦФ [224] і обумовлена прямим інгібуючим впливом препарату на гемопоез [225]. Але навіть після введення ЦФ в високих дозах пригнічення гемопоезу буває досить короткочасним, початкові ознаки регенерації відзначаються вже через тиждень разом з мобілізацією ГСК і овершуту [226] та завершуються звичайно протягом місяця. В процес відновлення залучаються різні ростові цитокіни, експресія яких в КМ в цей час збільшується [227].

У проведених дослідженнях встановлено, що через 12 днів після введення ЦФ ознаки регенерації червоної крові є досить вираженими, але процес далекий від завершення. Трансплантація МСКт не лише не сприяла відновленню показників, а і призводила до суттєвого зниження гематокриту і значного зменшення кількості ретикулоцитів. Дані у чомусь узгоджуються з дослідженнями *in vitro*, що показали пригнічення еритроїдного диференціаціонування клітин еритробластоїдної лінії K562, кокультивованих разом з МСК [220]. В той же час ККМ проявляли більшу активність щодо відновлення гематокриту та гемоглобіну, і водночас достовірно підвищували кількість ретикулоцитів в крові, що свідчить про активний процес еритропоезу. Подібний ефект спостерігався і при котрансплантації. Отже, можна говорити, що такі результати котрансплантації обумовлені головним чинником за рахунок ККМ, однак не виключений і вплив МСКт. Є дослідження, що демонструють стимулюючий вплив комбінованої трансплантації ГСК та МСК на гранулоцитопоез та еритропоез після гострої крововтрати за рахунок зниження рівня цитогенетично модифікованих клітини в кістковому мозку шляхом підсилення МСК продукції цитопротекторних факторів - білків теплового шоку (HSP32 і HSP70) [228]. Неочікувано і не зовсім зрозуміло чому ККМа втрачають свій потенціал до відновлення гематологічних показників. Таке різноманіття даних яскраво демонструє залежність властивостей МСК та ГСК від мікрооточення та процесів кооперації в організмі.

Виражених змін зазнавала функціональна активність імунної системи. Якщо поглинальна активність макрофагів практично не змінювалась ні в результаті введення ЦФ, ні після дії всіх клітинних препаратів, то інтенсивність поглинання фагоцитуючих клітин у мишей, що отримували МСКт значно зростала, що

свідчить про стимулюючий вплив трансплантованих клітин на більшість окремих фагоцитів.

Бактерицидна активність перитоніальних макрофагів в НСТ-тесті під впливом ЦФ суттєво підвищувалась, що, мабуть, відображає індукцію бактерицидності продуктами, що утворюються в результаті проапотичної і токсичної дії ЦФ на тканини, а також, можливо, є наслідком стимулюючої дії на фагоцити активованої імуносупресивним ефектом умовно-патогенної мікрофлори. Цікавим і неочікуваним був той факт, що під впливом трансплантованих ККМ і МСКт окремо, а також ККМа спостерігалась нормалізація бактерицидної активності, що, скоріш за все, означає, що протягом 12 діб трансплантовані клітини сприяють припиненню опортуністичної інфекції та дезінтоксикації організму. Отримані результати корелюють з дослідженнями, що демонструють позитивний вплив МСК на бактеріальний кліренс у доклінічних моделях гострого респіраторного дистрес-синдрому та сепсису [229]. Однак нормалізації не відбувалось при котрансплантації, що демонструє не просту сумачію властивостей окремих клітинних препаратів МСКт та ГСК, а з набуттям індивідуальних особливостей реакцій імунної системи при котрансплантації.

У використанні терміни дослідження введення МСКт достовірно підвищувало природну цитотоксичність спленоцитів, а ККМа навпаки достовірно знижали. Відомо, що застосування ЦФ чинить імуномодулюючий вплив на природну цитотоксичність спленоцитів, який може бути як пригнічуючий так і стимулюючий залежно від умов [230]. Ймовірно тому ЦФ в ході нашого експерименту не викликав відхилень від норми цього показника. ККМа, набуваючи нових властивостей, відмінних від інтактних ККМ, здатні пригнічувати цитотоксичність, механізм такого впливу не вивчений, однак викликає інтерес для майбутніх досліджень. Між тим є дані, що МСК здатні пригнічувати цитотоксичність *in vitro* [231]. Однак було також показано, що інгібуючий вплив МСК проявляється не завжди [232] і, можливо, що по відношенню до реалізації ефекта на НК-клітини мають значення модулюючі обставини. Так відомо, що під впливом цитокінів, особливо ІЛ-2, підвищується

літична активність і утворюються ЛАК-клітини з більшою цитотоксичною активністю. А при регенерації імунної системи в стимуляції проліферації приймає участь кілька цитокінів і у тому числі ІЛ-2, який може обумовити посилення цитотоксичності. Необхідно врахувати і те, що властивості натуральних кілерів можуть проявляти Т- і В-лімфоцити, а також макрофаги і гранулоцити. Вміст цих клітин у селезінці досить великий, а те, що їх активність за умов експерименту підвищується, вище наголошувалось.

Таким чином, за досліджених умов, МСКт суттєво і позитивно впливають на природний імунітет.

Активність реакції ГСТ у мишей у визначені терміни є нормальною. Мабуть, механізми регенерації ГСТ у цей час уже повністю відновлені. Це можна пояснити більш високою чутливістю до ЦФ клітин-супресорів ГСТ, що призводить іноді навіть до стимулюючого впливу введення ЦФ [233]. На інтенсивність нормально вираженої ГСТ клітинні препарати не впливали, окрім котрансплантації, що викликала суттєве підвищення реакції і це знову ж таки демонструє не просту сумачію впливу двох видів клітин. Ще однією характерною ознакою саме котрансплантації та ККМа був пригнічуючий вплив на реакцію бласттрансформації індукованої ФГА, яка після застосування ККМ або МСКт не мала достовірних відмінностей від норми.

Клітини В-ряду досить чутливі до ЦФ, і відновлення антитілогенезу після введення ЦФ затримується. Мабуть, ці особливості є важливими для регенерації гуморальної імунної відповіді за допомогою клітинних трансплантатів. Так, в результаті введення лише МСКт чисельність АУК в селезінці відновлювалась до нормального рівня

Взагалі на сьогодні відома незначна кількість публікацій стосовно впливу МСК на антитілогенез, і наявні результати досить суперечливі. Експозиція збагаченої популяції В-клітин з опроміненими мононуклеарними клітинами периферичної крові призводила до збільшення продукції імуноглобуліну G, яке нівелювалось додаванням МСК. Цікаво, що ефект МСК був скасований після додавання анти-CD40 та ІЛ-10, що вказує на те, що пригнічення МСК

продукування імуноглобулінів було опосередковано Т-клітинами, а не безпосереднім впливом на В-клітини [234]. Було показано, що МСК інгібують секрецію імуноглобулінів клітинами стимульованої мононуклеарної фракції (неочищені В-клітини). Тим не менш, ті ж самі клітини без поліклональної стимуляції підвищують вироблення IgG у присутності МСК [235]. Встановлено також, що МСКт стимулюють синтез антитіл *in vivo*, коли вводяться сингенним нормальним мишам до імунізації [236]. В системі первинної імунної відповіді *in vitro* МСК КМ пригнічували антитілоутворення, а МСКт значно його стимулювали [237]. Це знову ж таки підтверджує, що напрямок впливу МСК залежить і від умов їх функціонування, і від тканинного походження.

Таким чином сингенна трансплантація нормальних ККМ мишам C57BL через 2 години після введення тваринам циклофосфану на 12 день експерименту проявляється зниженням клітинності КМ, причому нижче рівня мишей, що отримували ЦФ, нормалізацією селезінкових показників, кількості гемоглобіну і гематокриту з підвищенням чисельності ретикулоцитів, відновленням бактерицидної активності перитонеальних макрофагів у НСТ-тесті.

На відміну від інтактних, активовані ККМ забезпечують підвищену спонтанну проліферативну активність лімфоцитів зі зниженням кількості лімфоцитів у фазах G_0/G_1 і підвищенням їх чисельності в фазах (S+ G_2/M) та апоптозі, відновленню клітинності КМ, лімфатичних органів. Регенерацію гематологічних показників стимулюють ККМ, що, мабуть, є головною ситуаційною функцією нормальних ККМ, а ККМа, цю здатність втрачають і виражено активуються в напрямку дії на імунну систему: відновлюють бактерицидну активність перитонеальних макрофагів у НСТ-тесті, пригнічують природну цитотоксичність спленоцитів, активність РБТЛ. Однак знижені показники антитілоутворення свідчать, що процес регенерації імунної системи не закінчений.

Трансплантація МСКт призводить до підвищення проліферації лімфоцитів зі зменшенням кількості клітин в G_0/G_1 -фазах і його підвищенням в S і S+ G_2/M - фазах з відновленням клітинності КМ, тимуса, селезінки і лімфатичних

вузлів. Але відносна кількість ретикулоцитів знижується. Зростає поглинальна і бактерицидна активність перитонеальних макрофагів, нормалізується проліферативна активність та здатність до утворення АУК, підвищується природна цитотоксичність.

Таким чином, трансплантовані МСКт сприяють регенерації КМ і лімфоїдних органів, стимулюють природний і адаптивний імунітет. На регенерацію еритропоезу вони впливають негативно.

Котрансплантація ККМ і МСКт веде до активації проліферації лімфоцитів зі зниженням кількості клітин у фазах G_0/G_1 і підвищенням їх чисельності в $S+G_2/M$ - фазах, а також відновлення клітинних показників КМ і всіх показників тимуса, селезінки і клітинності лімфатичних вузлів. Спостерігається нормалізація рівня гемоглобіну і гематокриту. Дія на імунологічні реакції проявляється зниженням поглинальної активності макрофагів та інтенсивності РБТЛ, але бактерицидність залишалась підвищеною, винятковим і вираженим є підвищення РГСТ.

Таким чином, дія котрансплантації ККМ і МСКт принципово вбирає в себе стимуляцію регенерації гематологічних показників, притаманну ККМ, і істотний вплив на відновлення КМ та органів імунної системи, що характерно для МСКт. Котрансплантація суттєво впливає на імунологічні реакції, але за деякими показниками в напрямку, протилежному дії МСКт.

Таким чином, можна виділити наступні положення.

При циклофосфановому гемоімунодефіциті:

- Всі типи трансплантованих клітин істотно впливають на регенерацію імунної та кровотворної систем.
- Клітини проявляють властиву їм дію, яка характеризується певним спектром змін в імунній та кровотворній системах.
- Вплив котрансплантації ККМ і МСКт не є простою сумацією дії клітин, а набуває особливостей, як притаманних окремим клітинам, так і появою нових характеристик, і обумовлений, мабуть, розвитком складних кооперативних процесів у регенеруючому організмі.

- Сильний, часто вирішальний, вплив на активність клітин надає контактна взаємодія ККМ і МСКт.
- Характерною дією нормальних ККМ можна вважати позитивний вплив на регенерацію гематологічних показників.
- Активовані МСКт ККМ не змінюють гематологічних показників, однак мають виражений пригнічуючий вплив на природну цитотоксичність, нормалізують РБТЛ, збільшують кількість клітин у апоптозі.
- МСКт мають виражений позитивний вплив на поглинальну активність макрофагів, бактерицидність в НСТ-тесті, РБТЛ, природну цитотоксичність і формування АУК.
- Дія котрансплантації ККМ і МСКт складається ніби з чотирьох частин: стимуляція гематологічних показників (як при дії ККМ), пригнічення активності РБТЛ (як при впливі ККМа), нормалізація клітинності лімфоїдних органів (як при дії МСКт), стимуляція формування ГСТ, яка є рисою, притаманною саме котрансплантації.

Результат впливу трансплантації ГСК і МСК на регенерацію імунної системи визначається, можливо, різними якостями самих клітин певного типу, популяційним складом трансплантатів та ситуацією, яка складається в організмі і зумовлює взаємодію клітин трансплантатів з хазяїном шляхом формування міжклітинних контактів і цитокинового впливу.

Отже, показано, що попереднє співкультивування ККМ з МСКт вносить зміни у прояв імунорегенеративної активності цих клітин при трансплантації імунodefіцитним мишам. Отримано нові дані стосовно впливу котрансплантації МСКт та ККМ і з'ясовано, що взаємодія клітин надає нових властивостей такому клітинному трансплантату. Отримані дані з ефективності клітинних препаратів експериментально обґрунтовують можливість їх застосування при різній імунopatології та можуть бути корисними у розробці нових підходів до трансплантації ГСК та МСК з метою клінічного використання.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено вирішення важливого наукового питання: участі МСКт і ККМ у постциклофосфановій регенерації імунної системи. Встановлено, що попередня контактна взаємодія МСКт та ККМ надає клітинним трансплантатам нових імунорегенеративних та імюнокорегуючих властивостей.

1. Встановлено, що найбільшу кількість асоціацій стромальних і лімфоїдних клітин у вигляді ФЛР формують тимоцити, найменшу – ККМ. Кількість ФЛР тимоцитів з адипоцитами була в 2,3 рази вища ніж ККМ з адипоцитами, а з МСКт тимоцити формували в 2,7 разів більше ФЛР ніж ККМ.

2. Показано, що контактна експозиція МСКт з тимоцитами, але не ККМ, протягом 24 годин посилює диференціювання стромальних клітин за остеогенним напрямком на 13,6%.

3. Оптимізовано модель циклофосфан-індукованої імюносупресії для дослідження регенеративної активності клітинних препаратів. Показано, що одноразове введення ЦФ в дозі 200 мг/кг маси тіла викликає глибоке ураження лімфоїдних органів та кісткового мозку до 12 дня після застосування, з поступовим відновленням на 19 день дослідження та достовірною нормалізацією практично всіх досліджуваних показників на 40 день.

4. Встановлено, що трансплантація ККМ призводить до регенерації еритроїдного кровотворення з нормалізацією зниженого показника гематокриту, концентрації гемоглобіну та збільшенням кількості ретикулоцитів у крові в 2,2 рази. Нормалізує клітинність селезінки до рівня контрольних тварин та бактерицидну активність перитонеальних макрофагів, що була підвищена в 2,9 рази при дії ЦФ.

5. Показано, що на відміну від ККМ, трансплантація ККМ, активованих контактною взаємодією з МСКт, тваринам з імюносупресією спричиняє нормалізацію кількості клітин у кістковому мозку, селезінці і лімфатичних вузлах. Викликає підвищення проліферативної активності клітин лімфатичних вузлів (в 1,4 рази в G2/M+S фазах) порівняно з контролем. Нормалізує підвищену в 2,9 рази

при дії ЦФ бактерицидну активність перитонеальних макрофагів. Знижує природну цитотоксичність спленоцитів в 2,9 рази та рівень РБТЛ спленоцитів в 10,4 рази порівняно з контролем.

6. Трансплантація МСКт тваринам з імуносупресією супроводжується відновленням кількості клітин кісткового мозку, тимуса, селезінки і лімфатичних вузлів, збільшенням проліферативної активності клітин лімфовузлів (в 1,6 рази в G2/M+S фазах) порівняно з контролем, зниженням рівня ретикулоцитів в 3 рази, нормалізацією підвищеної в 2,9 рази бактерицидної активності перитонеальних макрофагів, посиленням нормальної фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів в 1,9 рази та цитотоксичної активності спленоцитів в 3 рази, стимуляцією формування АУК в селезінці до нормального рівня, що був знижений в 1,8 рази після дії ЦФ.

7. Котрансплантація ККМ і МСКт асоційована з відновленням кількості клітин кісткового мозку, тимуса, селезінки і лімфатичних вузлів з підвищенням індексу проліферації клітин лімфатичних вузлів в 1,4 рази порівняно з контролем. Нормалізує знижену концентрацію гемоглобіну та гематокриту в крові, як і ККМ. Подібно дії ККМа, знижує рівень РБТЛ спленоцитів в 4,3 рази порівняно з контролем. На відміну від трансплантації інших клітинних препаратів, застосування ККМ сумісно з МСКт викликає посилення Т-клітинної імунної відповіді при формуванні РГСТ в 1,6 рази порівняно з контролем.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978 г.;4(1–2):7–25.
2. Takam Kanga P, Bazzoni R, Dal Collo G, Cassaro A, Tanasi I, Russignan A, и др. The Role of Notch and Wnt Signaling in MSC Communication in Normal and Leukemic Bone Marrow Niche. *Front Cell Dev Biol*. 8 январь 2021 г.;8:599276.
3. Banwell CM, Partington KM, Jenkinson EJ, Anderson G. Studies on the role of IL-7 presentation by mesenchymal fibroblasts during early thymocyte development. *Eur J Immunol*. август 2000 г.;30(8):2125–9.
4. Campinoti S, Gjinovci A, Ragazzini R, Zanieri L, Ariza-McNaughton L, Catucci M, и др. Reconstitution of a functional human thymus by postnatal stromal progenitor cells and natural whole-organ scaffolds. *Nat Commun*. декабрь 2020 г.;11(1):6372.
5. Barda-Saad M, Rozenszajn LA, Globerson A, Zhang AS, Zipori D. Selective adhesion of immature thymocytes to bone marrow stromal cells: relevance to T cell lymphopoiesis. *Exp Hematol*. февраль 1996 г.;24(2):386–91.
6. Han J, Zúñiga-Pflücker JC. A 2020 View of Thymus Stromal Cells in T Cell Development. *J Immunol*. 15 январь 2021 г.;206(2):249–56.
7. Kreins AY, Maio S, Dhalla F. Inborn errors of thymic stromal cell development and function. *Semin Immunopathol*. февраль 2021 г.;43(1):85–100.
8. Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy*. 2006 г.;8(6):559–61.
9. Kawashima A, Yasuhara R, Akino R, Mishima K, Nasu M, Sekizawa A. Engraftment potential of maternal adipose-derived stem cells for fetal transplantation. *Heliyon*. март 2020 г.;6(3):e03409.
10. Никольский ИС, Никольская ВВ, Савинова ВО. Влияние внутривенного введения мультипотентных стромальных клеток тимуса на иммунный ответ. *Вестник Уральской Медицинской Академической Науки*. 2012 г.;4:55–6.

11. Wu X, Jiang J, Gu Z, Zhang J, Chen Y, Liu X. Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress. *Stem Cell Res Ther.* декабрь 2020 г.;11(1):345.
12. Pevsner-Fischer M, Levin S, Zipori D. The Origins of Mesenchymal Stromal Cell Heterogeneity. *Stem Cell Rev Rep.* сентябрь 2011 г.;7(3):560–8.
13. Mucientes A, Herranz E, Moro E, González-Corchón A, Peña-Soria MJ, Abasolo L, и др. Influence of Mesenchymal Stem Cell Sources on Their Regenerative Capacities on Different Surfaces. *Cells.* 23 февраль 2021 г.;10(2):481.
14. Lee W, Wang L, Yen M, Hsu P, Lee Y, Liu K, и др. Resident vs nonresident multipotent mesenchymal stromal cell interactions with B lymphocytes result in disparate outcomes. *STEM CELLS Transl Med.* 28 январь 2021 г.;sctm.20-0289.
15. Никольский ИС, Никольская ВВ, Зубов ДА. Фибробласто- и масто-лимфоцитарные розетки. *Российский Аллергологический Журнал.* 2011 г.;4(1):260–1.
16. Nikolska K. I. Peculiarities of Culture and In vitro Contact Interaction of Cryopreserved Thymic Multipotent Stromal Cells and Hemopoietic Cells. *Probl Cryobiol Cryomedicine.* 25 март 2018 г.;28(1):005–13.
17. Mills KA, Chess-Williams R, McDermott C. Novel insights into the mechanism of cyclophosphamide-induced bladder toxicity: chloroacetaldehyde's contribution to urothelial dysfunction in vitro. *Arch Toxicol.* ноябрь 2019 г.;93(11):3291–303.
18. Till JE, McCULLOCH EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* февраль 1961 г.;14:213–22.
19. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation: Hematopoietic stem cell. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* ноябрь 2010 г.;2(6):640–53.
20. Babovic S, Eaves CJ. Hierarchical organization of fetal and adult hematopoietic stem cells. *Exp Cell Res.* декабрь 2014 г.;329(2):185–91.

21. Mahony CB, Bertrand JY. How HSCs Colonize and Expand in the Fetal Niche of the Vertebrate Embryo: An Evolutionary Perspective. *Front Cell Dev Biol.* 12 март 2019 г.;7:34.
22. Klaus A, Robin C. Embryonic hematopoiesis under microscopic observation. *Dev Biol.* август 2017 г.;428(2):318–27.
23. Gao X, Xu C, Asada N, Frenette PS. The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult. *Development.* 15 январь 2018 г.;145(2):dev139691.
24. O'Malley DP, Kim YS, Perkins SL, Baldrige L, Juliar BE, Orazi A. Morphologic and immunohistochemical evaluation of splenic hematopoietic proliferations in neoplastic and benign disorders. *Mod Pathol.* декабрь 2005 г.;18(12):1550–61.
25. Bujko K, Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Hematopoietic Stem and Progenitor Cells (HSPCs). В: Ratajczak MZ, редактор. *Stem Cells [Интернет]*. Cham: Springer International Publishing; 2019 [цитируется по 6 март 2020 г.]. с. 49–77. Доступно на: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-31206-0_3
26. Scaldaferri ML, Klinger FG, Farini D, Di Carlo A, Carsetti R, Giorda E, и др. Hematopoietic activity in putative mouse primordial germ cell populations. *Mech Dev.* май 2015 г.;136:53–63.
27. Cao H, Cao B, Heazlewood CK, Domingues M, Sun X, Debele E, и др. Osteopontin is An Important Regulative Component of the Fetal Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell Niche. *Cells.* 27 август 2019 г.;8(9):985.
28. Challen GA, Boles N, Lin K-YK, Goodell MA. Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry A.* январь 2009 г.;75A(1):14–24.
29. Scaldaferri ML, Klinger FG, Farini D, Di Carlo A, Carsetti R, Giorda E, и др. Hematopoietic activity in putative mouse primordial germ cell populations. *Mech Dev.* май 2015 г.;136:53–63.
30. Singh P, Pelus LM. CXCR4-SDF-1 Signaling in Nestin+ Mesenchymal Stem Cell Is Required for HSC Maintenance during Homeostasis and Regeneration after Irradiation. *Blood.* 2 декабрь 2016 г.;128(22):3883–3883.

31. Parekh C, Crooks GM. Critical Differences in Hematopoiesis and Lymphoid Development between Humans and Mice. *J Clin Immunol.* май 2013 г.;33(4):711–5.
32. Lévesque J-P, Helwani FM, Winkler IG. The endosteal ‘osteoblastic’ niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia.* декабрь 2010 г.;24(12):1979–92.
33. Massberg S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I, Köllnberger M, Tubo N, Moseman EA, и др. Immunosurveillance by Hematopoietic Progenitor Cells Trafficking through Blood, Lymph, and Peripheral Tissues. *Cell.* ноябрь 2007 г.;131(5):994–1008.
34. Rossi L, Challen GA, Sirin O, Lin KK-Y, Goodell MA. Hematopoietic Stem Cell Characterization and Isolation. В: Filippi M-D, Geiger H, редакторы. *Stem Cell Migration* [Интернет]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [цитируется по 5 февраль 2020 г.]. с. 47–59. Доступно на: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-145-1_3
35. Dykstra B, Kent D, Bowie M, McCaffrey L, Hamilton M, Lyons K, и др. Long-Term Propagation of Distinct Hematopoietic Differentiation Programs In Vivo. *Cell Stem Cell.* август 2007 г.;1(2):218–29.
36. Weksberg DC, Chambers SM, Boles NC, Goodell MA. CD150⁺ side population cells represent a functionally distinct population of long-term hematopoietic stem cells. *Blood.* 15 февраль 2008 г.;111(4):2444–51.
37. Pearce DJ, Ridler CM, Simpson C, Bonnet D. Multiparameter analysis of murine bone marrow side population cells. *Blood.* 1 апрель 2004 г.;103(7):2541–6.
38. Ratajczak MZ. Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells: *Curr Opin Hematol.* июль 2008 г.;15(4):293–300.
39. Bertoncello I, Williams B. Hematopoietic Stem Cell Characterization by Hoechst 33342 and Rhodamine 123 Staining. В: *Flow Cytometry Protocols* [Интернет]. New Jersey: Humana Press; 2004 [цитируется по 6 март 2020 г.]. с. 181–200. Доступно на: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-773-4:181>

40. Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Miura Y, Suda T. In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood*. 15 декабря 1992 г.;80(12):3044–50.
41. Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: A simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 4 декабря 2001 г.;98(25):14541–6.
42. Arai F, Hiraio A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, и др. Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche. *Cell*. июль 2004 г.;118(2):149–61.
43. Chen C-Z, Li M, de Graaf D, Monti S, Gottgens B, Sanchez M-J, и др. Nonlinear partial differential equations and applications: Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 26 ноябрь 2002 г.;99(24):15468–73.
44. Balazs AB, Fabian AJ, Esmon CT, Mulligan RC. Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies hematopoietic stem cells in murine bone marrow. *Blood*. 15 март 2006 г.;107(6):2317–21.
45. Oguro H, Ding L, Morrison SJ. SLAM Family Markers Resolve Functionally Distinct Subpopulations of Hematopoietic Stem Cells and Multipotent Progenitors. *Cell Stem Cell*. июль 2013 г.;13(1):102–16.
46. Gangenahalli GU, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma RK, Chandra R, и др. Hematopoietic Stem Cell Antigen CD34: Role in Adhesion or Homing. *Stem Cells Dev*. июнь 2006 г.;15(3):305–13.
47. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1–CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*. ноябрь 2006 г.;20(11):1915–24.
48. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, и др. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*. январь 2004 г.;10(1):64–71.
49. Galán-Díez M, Kousteni S. The Osteoblastic Niche in Hematopoiesis and Hematological Myeloid Malignancies. *Curr Mol Biol Rep*. июнь 2017 г.;3(2):53–62.

50. He N, Zhang L, Cui J, Li Z. Bone Marrow Vascular Niche: Home for Hematopoietic Stem Cells. *Bone Marrow Res.* 14 апрель 2014 г.;2014:1–8.
51. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, и др. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* октябрь 2003 г.;425(6960):841–6.
52. Guerrouahen BS, Al-Hijji I, Tabrizi AR. Osteoblastic and Vascular Endothelial Niches, Their Control on Normal Hematopoietic Stem Cells, and Their Consequences on the Development of Leukemia. *Stem Cells Int.* 2011 г.;2011:1–8.
53. Matsuoka Y, Nakatsuka R, Sumide K, Kawamura H, Takahashi M, Fujioka T, и др. Prospectively Isolated Human Bone Marrow Cell-Derived MSCs Support Primitive Human CD34-Negative Hematopoietic Stem Cells: Novel MSCs Support Primitive Human CD34⁻ HSCs. *STEM CELLS.* май 2015 г.;33(5):1554–65.
54. Harkness L, Zaher W, Ditzel N, Isa A, Kassem M. CD146/MCAM defines functionality of human bone marrow stromal stem cell populations. *Stem Cell Res Ther.* декабрь 2016 г.;7(1):4.
55. Greenbaum A, Hsu Y-MS, Day RB, Schuettpelz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, и др. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature.* март 2013 г.;495(7440):227–30.
56. Coşkun S, Chao H, Vasavada H, Heydari K, Gonzales N, Zhou X, и др. Development of the Fetal Bone Marrow Niche and Regulation of HSC Quiescence and Homing Ability by Emerging Osteolineage Cells. *Cell Rep.* октябрь 2014 г.;9(2):581–90.
57. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, и др. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature.* октябрь 2013 г.;502(7473):637–43.
58. Perlin JR, Sporrij A, Zon LI. Blood on the tracks: hematopoietic stem cell-endothelial cell interactions in homing and engraftment. *J Mol Med.* август 2017 г.;95(8):809–19.
59. Zaretsky AG, Engiles JB, Hunter CA. Infection-Induced Changes in Hematopoiesis. *J Immunol.* 1 январь 2014 г.;192(1):27–33.

60. Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HZ, Kodama T, и др. Differential function of Tie2 at cell–cell contacts and cell–substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol.* май 2008 г.;10(5):513–26.
61. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* декабрь 1966 г.;16(3):381–90.
62. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* октябрь 1970 г.;3(4):393–403.
63. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* сентябрь 1991 г.;9(5):641–50.
64. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* февраль 2011 г.;12(2):126–31.
65. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, и др. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy.* 2006 г.;8(4):315–7.
66. Billing AM, Ben Hamidane H, Dib SS, Cotton RJ, Bhagwat AM, Kumar P, и др. Comprehensive transcriptomic and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells reveals source specific cellular markers. *Sci Rep* [Интернет]. август 2016 г. [цитируется по 31 январь 2019 г.];6(1). Доступно на: <http://www.nature.com/articles/srep21507>
67. Mosna F, Sensebé L, Krampere M. Human Bone Marrow and Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells: A User’s Guide. *Stem Cells Dev.* октябрь 2010 г.;19(10):1449–70.
68. Elahi KC, Klein G, Avci-Adali M, Sievert KD, MacNeil S, Aicher WK. Human Mesenchymal Stromal Cells from Different Sources Diverge in Their Expression of Cell Surface Proteins and Display Distinct Differentiation Patterns. *Stem Cells Int.* 2016 г.;2016:1–9.

69. Davies JE, Walker JT, Keating A. Concise Review: Wharton's Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells: Wharton's Jelly an Enigmatic MSC Source. *STEM CELLS Transl Med.* июль 2017 г.;6(7):1620–30.
70. Chen J-Y, Mou X-Z, Du X-C, Xiang C. Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Asian Pac J Trop Med.* сентябрь 2015 г.;8(9):739–46.
71. Monsarrat P, Vergnes J-N, Planat-Bénard V, Ravaud P, Kémoun P, Sensebé L, и др. An Innovative, Comprehensive Mapping and Multiscale Analysis of Registered Trials for Stem Cell-Based Regenerative Medicine: Mapping of Stem Cell-Based Registered Trials. *STEM CELLS Transl Med.* июнь 2016 г.;5(6):826–35.
72. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell.* июль 2015 г.;17(1):11–22.
73. Atoui R, Chiu RCJ. Concise Review: Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells in Cellular Transplantation: Update, Controversies, and Unknowns. *STEM CELLS Transl Med.* март 2012 г.;1(3):200–5.
74. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, и др. Comparison of Allogeneic vs Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Delivered by Transendocardial Injection in Patients With Ischemic Cardiomyopathy: The POSEIDON Randomized Trial. *JAMA.* 12 декабрь 2012 г.;308(22):2369.
75. Alagesan S, Griffin MD. Autologous and allogeneic mesenchymal stem cells in organ transplantation: what do we know about their safety and efficacy? *Curr Opin Organ Transplant.* февраль 2014 г.;19(1):65–72.
76. Griffin MD, Elliman SJ, Cahill E, English K, Ceredig R, Ritter T. Concise review: Adult mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory diseases: How well are we joining the dots?: MSC Therapy for Inflammatory Diseases. *STEM CELLS.* октябрь 2013 г.;31(10):2033–41.
77. Reger RL, Tucker AH, Wolfe MR. Differentiation and Characterization of Human MSCs. В: Prockop DJ, Bunnell BA, Phinney DG, редакторы. *Mesenchymal Stem Cells* [Интернет]. Totowa, NJ: Humana Press; 2008 [цитируется по 1 февраль

2019 г.]. с. 93–107. Доступно на: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-169-1_7

78. Sarugaser R, Hanoun L, Keating A, Stanford WL, Davies JE. Human Mesenchymal Stem Cells Self-Renew and Differentiate According to a Deterministic Hierarchy. Egles C, редактор. PLoS ONE. 4 август 2009 г.;4(8):e6498.

79. Dombrowski C, Helledie T, Ling L, Grünert M, Canning CA, Jones CM, и др. FGFR1 Signaling Stimulates Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells by Inhibiting the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21^{Waf1} and p27^{Kip1}: FGFR1 Increases the Proliferation of hMSCs. STEM CELLS. декабрь 2013 г.;31(12):2724–36.

80. Bramono DS, Murali S, Rai B, Ling L, Poh WT, Lim ZX, и др. Bone marrow-derived heparan sulfate potentiates the osteogenic activity of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). Bone. апрель 2012 г.;50(4):954–64.

81. Ling L, Dombrowski C, Foong KM, Haupt LM, Stein GS, Nurcombe V, и др. Synergism between Wnt3a and Heparin Enhances Osteogenesis via a Phosphoinositide 3-Kinase/Akt/RUNX2 Pathway. J Biol Chem. 20 август 2010 г.;285(34):26233–44.

82. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components. Exp Cell Res. август 2001 г.;268(2):189–200.

83. Scott MA, Nguyen VT, Levi B, James AW. Current Methods of Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells Dev. октябрь 2011 г.;20(10):1793–804.

84. Pountos I, Georgouli T, Henshaw K, Howard B, Giannoudis PV. Mesenchymal Stem Cell physiology can be affected by antibiotics: An in vitro study. Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr. 27 октябрь 2014 г.;60(4):1–7.

85. Riis S, Nielsen FM, Pennisi CP, Zachar V, Fink T. Comparative Analysis of Media and Supplements on Initiation and Expansion of Adipose-Derived Stem Cells: Effect of Media on ASCs. STEM CELLS Transl Med. март 2016 г.;5(3):314–24.

86. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K, Emmons RV, Rowe DW, Robey PG. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse

and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation*. 27 апрель 1997 г.;63(8):1059–69.

87. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 1 апрель 2005 г.;105(7):2631–9.

88. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci*. октябрь 2006 г.;31(10):589–95.

89. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. февраль 2006 г.;6(2):93–106.

90. Yin T. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 1 май 2006 г.;116(5):1195–201.

91. Taichman RS, Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1 май 1994 г.;179(5):1677–82.

92. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, и др. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. октябрь 2003 г.;425(6960):841–6.

93. Jung Y, Song J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Z, Williams B, и др. Hematopoietic Stem Cells Regulate Mesenchymal Stromal Cell Induction into Osteoblasts Thereby Participating in the Formation of the Stem Cell Niche. *Stem Cells*. август 2008 г.;26(8):2042–51.

94. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. февраль 2007 г.;128(4):693–705.

95. Vincent A, Van Seuning I. Epigenetics, stem cells and epithelial cell fate. *Differentiation*. сентябрь 2009 г.;78(2–3):99–107.

96. Eslaminejad MB, Fani N, Shahhoseini M. Epigenetic regulation of osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in culture. *Cell J*. 2013 г.;15(1):1–10.

97. Herlofsen SR, Bryne JC, Høiby T, Wang L, Issner R, Zhang X, и др. Genome-wide map of quantified epigenetic changes during in vitro chondrogenic

differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *BMC Genomics*. 2013 г.;14(1):105.

98. Mortada I, Mortada R. Epigenetic changes in mesenchymal stem cells differentiation. *Eur J Med Genet*. февраль 2018 г.;61(2):114–8.

99. Konno M, Hamazaki TS, Fukuda S, Tokuhara M, Uchiyama H, Okazawa H, и др. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture. *Biochem Biophys Res Commun*. октябрь 2010 г.;400(4):461–5.

100. Higuchi S, Lin Q, Wang J, Lim TK, Joshi SB, Anand GS, и др. Heart extracellular matrix supports cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng*. март 2013 г.;115(3):320–5.

101. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, и др. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol*. январь 2009 г.;24(1):70–7.

102. Subbarao R, Ullah I, Kim E-J, Jang S-J, Lee W-J, Jeon R, и др. Characterization and Evaluation of Neuronal Trans-Differentiation with Electrophysiological Properties of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Porcine Endometrium. *Int J Mol Sci*. 14 май 2015 г.;16(12):10934–51.

103. Bae J-S, Han HS, Youn D-H, Carter JE, Modo M, Schuchman EH, и др. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Neuronal Networks with Functional Synaptic Transmission After Transplantation into Mice with Neurodegeneration. *Stem Cells*. май 2007 г.;25(5):1307–16.

104. Liu W, Song F, Ren L, Guo W, Wang T, Feng Y, и др. The multiple functional roles of mesenchymal stem cells in participating in treating liver diseases. *J Cell Mol Med*. март 2015 г.;19(3):511–20.

105. Li Q, Zhou X, Shi Y, Li J, Zheng L, Cui L, и др. In Vivo Tracking and Comparison of the Therapeutic Effects of MSCs and HSCs for Liver Injury. Pant AB, редактор. *PLoS ONE*. 30 апрель 2013 г.;8(4):e62363.

106. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, и др. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. октябрь 2003 г.;425(6961):968–73.
107. Sottile F, Aulicino F, Theka I, Cosma MP. Mesenchymal stem cells generate distinct functional hybrids in vitro via cell fusion or entosis. *Sci Rep* [Интернет]. декабрь 2016 г. [цитируется по 7 февраль 2019 г.];6(1). Доступно на: <http://www.nature.com/articles/srep36863>
108. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Säwén P, Röhl W, Hescheler J, и др. Bone marrow–derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med*. май 2004 г.;10(5):494–501.
109. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. апрель 2000 г.;113 (Pt 7):1161–6.
110. Tallone T, Realini C, Böhmeler A, Kornfeld C, Vassalli G, Moccetti T, и др. Adult Human Adipose Tissue Contains Several Types of Multipotent Cells. *J Cardiovasc Transl Res*. апрель 2011 г.;4(2):200–10.
111. Samsonraj RM, Rai B, Sathiyathan P, Puan KJ, Röttschke O, Hui JH, и др. Establishing Criteria for Human Mesenchymal Stem Cell Potency: Establishing Criteria for hMSC Potency. *STEM CELLS*. июнь 2015 г.;33(6):1878–91.
112. Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. In Vitro High-Capacity Assay to Quantify the Clonal Heterogeneity in Trilineage Potential of Mesenchymal Stem Cells Reveals a Complex Hierarchy of Lineage Commitment. *STEM CELLS*. 1 февраль 2010 г.;28(4):788–98.
113. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 15 ноябрь 2007 г.;110(10):3499–506.
114. Kean TJ, Lin P, Caplan AI, Dennis JE. MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. *Stem Cells Int*. 2013 г.;2013:1–13.
115. Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci*. июль 2017 г.;74(13):2345–60.

116. Galleu A, Riffo-Vasquez Y, Trento C, Lomas C, Dolcetti L, Cheung TS, и др. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. *Sci Transl Med*. 15 ноябрь 2017 г.;9(416):eaam7828.
117. He S, Gleason J, Fik-Rymarkiewicz E, DiFiglia A, Bharathan M, Morschauser A, и др. Human Placenta-Derived Mesenchymal Stromal-Like Cells Enhance Angiogenesis via T Cell-Dependent Reprogramming of Macrophage Differentiation: PDA-002 Enhances Angiogenesis via Immunomodulation. *STEM CELLS*. июнь 2017 г.;35(6):1603–13.
118. Denton AE, Linterman MA. Stromal networking: cellular connections in the germinal centre. *Curr Opin Immunol*. апрель 2017 г.;45:103–11.
119. Coulson-Thomas VJ, Coulson-Thomas YM, Gesteira TF, Kao WW-Y. Extrinsic and Intrinsic Mechanisms by Which Mesenchymal Stem Cells Suppress the Immune System. *Ocul Surf*. апрель 2016 г.;14(2):121–34.
120. Wang S, Huang S, Gong L, Yuan Z, Wong J, Lee J, и др. Human Neonatal Thymus Mesenchymal Stem Cells Promote Neovascularization and Cardiac Regeneration. *Stem Cells Int*. 16 сентябрь 2018 г.;2018:1–7.
121. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, и др. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. январь 2002 г.;30(1):42–8.
122. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, и др. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 15 май 2002 г.;99(10):3838–43.
123. Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol*. декабрь 2009 г.;37(12):1445–53.
124. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, и др. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. январь 2009 г.;15(1):42–9.

125. English K, Barry FP, Mahon BP. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunol Lett.* январь 2008 г.;115(1):50–8.
126. Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- κ B signaling in resident macrophages. *Blood.* 14 июль 2011 г.;118(2):330–8.
127. Cutler AJ, Limbani V, Girdlestone J, Navarrete CV. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells Modulate Monocyte Function to Suppress T Cell Proliferation. *J Immunol.* 1 декабрь 2010 г.;185(11):6617–23.
128. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol.* ноябрь 2014 г.;15(11):1009–16.
129. Aboalola D, Han VKM. Different Effects of Insulin-Like Growth Factor-1 and Insulin-Like Growth Factor-2 on Myogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2017 г.;2017:1–15.
130. Wang M, Yuan Q, Xie L. Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem Cells Int.* 14 июнь 2018 г.;2018:1–12.
131. Zhao N, Li H, Yan Y, Jiang R, He X. Mesenchymal stem cells overexpressing IL-35 effectively inhibit CD4⁺ T cell function. *Cell Immunol.* февраль 2017 г.;312:61–6.
132. He L, Zhang H. MicroRNAs in the Migration of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev Rep.* февраль 2019 г.;15(1):3–12.
133. Mardpour S, Hamidieh AA, Taleahmad S, Sharifzad F, Taghikhani A, Baharvand H. Interaction between mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles and immune cells by distinct protein content. *J Cell Physiol.* июнь 2019 г.;234(6):8249–58.
134. Laurenzana I, Lamorte D, Trino S, De Luca L, Ambrosino C, Zoppoli P, и др. Extracellular Vesicles: A New Prospective in Crosstalk between Microenvironment

and Stem Cells in Hematological Malignancies. *Stem Cells Int.* 27 май 2018 г.;2018:1–11.

135. Капранов NM, Davydova YuO, Gal'tseva IV, Petinati NA, Bakshinskaitė MV, Drize NI, и др. Co-Culturing of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells with Autological and Allogenic Lymphocytes. *Bull Exp Biol Med.* март 2018 г.;164(4):446–52.

136. Rasmuson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* июль 2006 г.;312(12):2169–79.

137. Volarevic V, Gazdic M, Simovic Markovic B, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N. Mesenchymal stem cell-derived factors: Immuno-modulatory effects and therapeutic potential: Mesenchymal stem cell-derived factors. *BioFactors.* 10 сентябрь 2017 г.;43(5):633–44.

138. Ding D-C, Shyu W-C, Lin S-Z. Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant.* февраль 2011 г.;20(1):5–14.

139. Consentius C, Akyüz L, Schmidt-Lucke JA, Tschöpe C, Pinzur L, Ofir R, и др. Mesenchymal Stromal Cells Prevent Allostimulation In Vivo and Control Checkpoints of Th1 Priming: Migration of Human DC to Lymph Nodes and NK Cell Activation: MSC Control Checkpoints of Th1 Priming. *STEM CELLS.* октябрь 2015 г.;33(10):3087–99.

140. Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, Louis-Pence P, Bony C, Apparailly F, и др. Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism. *Stem Cells.* август 2007 г.;25(8):2025–32.

141. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, и др. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 1 март 2005 г.;105(5):2214–9.

142. Cui R, Rekasi H, Hepner-Schefczyk M, Fessmann K, Petri RM, Bruderek K, и др. Human mesenchymal stromal/stem cells acquire immunostimulatory capacity upon cross-talk with natural killer cells and might improve the NK cell function of immunocompromised patients. *Stem Cell Res Ther.* декабрь 2016 г.;7(1):88.

143. Michelo CM, Fasse E, van Cranenbroek B, Linda K, van der Meer A, Abdelrazik H, и др. Added effects of dexamethasone and mesenchymal stem cells on early Natural Killer cell activation. *Transpl Immunol.* июль 2016 г.;37:1–9.

144. Najjar M, Fayyad-Kazan M, Meuleman N, Bron D, Fayyad-Kazan H, Lagneaux L. Immunomodulatory effects of foreskin mesenchymal stromal cells on natural killer cells. *J Cell Physiol.* июль 2018 г.;233(7):5243–54.

145. Volarevic V, Al-Qahtani A, Arsenijevic N, Pajovic S, Lukic ML. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-1Ra producing mesenchymal stem cells as modulators of diabetogenesis. *Autoimmunity.* июнь 2010 г.;43(4):255–63.

146. Glass CK, Natoli G. Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nat Immunol.* январь 2016 г.;17(1):26–33.

147. Selleri S, Bifsha P, Civini S, Pacelli C, Dieng MM, Lemieux W, и др. Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by metabolic reprogramming. *Oncotarget.* 24 май 2016 г.;7(21):30193–210.

148. Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, и др. Mesenchymal-Stem-Cell-Induced Immunoregulation Involves FAS-Ligand-/FAS-Mediated T Cell Apoptosis. *Cell Stem Cell.* май 2012 г.;10(5):544–55.

149. Ge W, Jiang J, Arp J, Liu W, Garcia B, Wang H. Regulatory T-Cell Generation and Kidney Allograft Tolerance Induced by Mesenchymal Stem Cells Associated With Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression: Transplantation. декабрь 2010 г.;90(12):1312–20.

150. Kong Q, Sun B, Bai S, Zhai D, Wang G, Liu Y, и др. Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF- β . *J Neuroimmunol.* февраль 2009 г.;207(1–2):83–91.

151. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells.* ноябрь 2007 г.;25(11):2739–49.

152. Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*. 1 июль 2007 г.;92(7):881–8.
153. Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, и др. Mesenchymal-Stem-Cell-Induced Immunoregulation Involves FAS-Ligand-/FAS-Mediated T Cell Apoptosis. *Cell Stem Cell*. май 2012 г.;10(5):544–55.
154. Rashedi I, Gómez-Aristizábal A, Wang X-H, Viswanathan S, Keating A. TLR3 or TLR4 Activation Enhances Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Treg Induction via Notch Signaling: TLR Activation and Treg Induction by MSCs. *STEM CELLS*. январь 2017 г.;35(1):265–75.
155. Comoli P, Ginevri F, Maccario R, Avanzini MA, Marconi M, Groff A, и др. Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. *Nephrol Dial Transplant*. 8 январь 2007 г.;23(4):1196–202.
156. O'Connor BP, Vogel LA, Zhang W, Loo W, Shnider D, Lind EF, и др. Imprinting the Fate of Antigen-Reactive B Cells through the Affinity of the B Cell Receptor. *J Immunol*. 1 декабрь 2006 г.;177(11):7723–32.
157. Augello A, Tasso R, Negrini S, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, и др. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. май 2005 г.;35(5):1482–90.
158. Feng X, Che N, Liu Y, Chen H, Wang D, Li X, и др. Restored Immunosuppressive Effect of Mesenchymal Stem Cells on B Cells After Olfactory 1/Early B Cell Factor-Associated Zinc-Finger Protein Down-Regulation in Patients With Systemic Lupus Erythematosus: OAZ Impairs MSC Function in SLE. *Arthritis Rheumatol*. декабрь 2014 г.;66(12):3413–23.
159. Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Treatment Modality for Tissue Repair. *Ann N Y Acad Sci*. сентябрь 2009 г.;1176(1):101–17.

160. Gazdic M, Volarevic V, Arsenijevic N, Stojkovic M. Mesenchymal Stem Cells: A Friend or Foe in Immune-Mediated Diseases. *Stem Cell Rev Rep.* апрель 2015 г.;11(2):280–7.

161. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. Unutmaz D, редактор. *PLoS ONE.* 26 апрель 2010 г.;5(4):e10088.

162. Телегин Л. Ю. Фармакогенетика циклофосфамида. М.: ИНФРА-М; 2012. 80 с.

163. Druckrey H. Experimentelle Grundlagen der Chemotherapie des Krebses. *DMW - Dtsch Med Wochenschr.* декабрь 1952 г.;77(49):1534–7.

164. Li F, Patterson AD, Höfer CC, Krausz KW, Gonzalez FJ, Idle JR. Comparative metabolism of cyclophosphamide and ifosfamide in the mouse using UPLC–ESI–QTOFMS-based metabolomics. *Biochem Pharmacol.* октябрь 2010 г.;80(7):1063–74.

165. Pette M, Gold R, Pette DF, Hartung H-P, Toyka KV. Mafosfamide induces DNA fragmentation and apoptosis in human T-lymphocytes A possible mechanism of its immunosuppressive action. *Immunopharmacology.* июнь 1995 г.;30(1):59–69.

166. Friedman OM, Boger E, Grubliauskas V, Sommer H. Synthesis of N-Phosphorylated Derivatives of Nitrogen Mustards with Latent Cytotoxicity ¹. *J Med Chem.* январь 1963 г.;6(1):50–8.

167. Alberts DS, van Daalen Wetters T. The effect of phenobarbital on cyclophosphamide antitumor activity. *Cancer Res.* август 1976 г.;36(8):2785–9.

168. Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE, Colvin OM, Civin CI, Hilton J. Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 15 май 1990 г.;75(10):1947–50.

169. Boiron J-M, Dazey B, Cailliot C, Launay B, Attal M, Mazurier F, и др. Large-scale expansion and transplantation of CD34+ hematopoietic cells: in vitro and in vivo confirmation of neutropenia abrogation related to the expansion process without

impairment of the long-term engraftment capacity. *Transfusion (Paris)*. ноябрь 2006 г.;46(11):1934–42.

170. Colvin OM. An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. *Curr Pharm Des*. август 1999 г.;5(8):555–60.

171. Šefc L, Pšenák O, Sýkora V, Šulc K, Nečas E. Response of Hematopoiesis to Cyclophosphamide Follows Highly Specific Patterns in Bone Marrow and Spleen. *J Hematother Stem Cell Res*. февраль 2003 г.;12(1):47–61.

172. Brode S, Cooke A. Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. *Crit Rev Immunol*. 2008 г.;28(2):109–26.

173. Ahlmann M, Hempel G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. октябрь 2016 г.;78(4):661–71.

174. Chatelanat O, Van Delden C, Adler D, Guerne P-A, Nendaz M, Serratrice J. [Risk factors and prophylaxis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-negative patients]. *Rev Med Suisse*. 17 октябрь 2018 г.;14(623):1829–33.

175. Prockop DJ, Bunnell BA, Phinney DG, редакторы. *Mesenchymal Stem Cells* [Интернет]. Totowa, NJ: Humana Press; 2008 [цитируется по 2 октябрь 2018 г.]. Доступно на: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-169-1>

176. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток : практическое руководство [Интернет]. пер. 5-го англ. изд. — 3-е изд. (эл.). М. : БИНОМ. Лаборатория знаний; 2014. 718 с. Доступно на: <http://files.lbz.ru/pdf/cC2581-8-ch.pdf>

177. Gregory CA, Grady Gunn W, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. июнь 2004 г.;329(1):77–84.

178. Kim W-K, Jung H, Kim D-H, Kim E-Y, Chung J-W, Cho Y-S, и др. Regulation of adipogenic differentiation by LAR tyrosine phosphatase in human mesenchymal stem cells and 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Sci*. 15 ноябрь 2009 г.;122(22):4160–7.

179. Jerne NK, Nordin AA. Plaque Formation in Agar by Single Antibody-Producing Cells. *Science*. 26 апрель 1963 г.;140(3565):405–405.

180. Фримель Г. Иммунологические методы. под ред. Г. Фримеля. М : Мир; 1987. 472 с.
181. Хайтов РМ, Пинегин БВ, Ярилин АА. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы. ГЭОТАР-Медиа. 2009. 352 с.
182. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 16 декабрь 1983 г.;65(1–2):55–63.
183. Sugiura H, Sugiura H, Nishida H, Inaba R, Mirbod SM, Iwata H. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. *J Appl Physiol*. март 2001 г.;90(3):789–94.
184. Викулин ИМ, Горбачев ВЭ, Коробицын БВ, и др. Оценка пригодности результатов измерений и исключение аномальных значений. *Наукові Праці ОНАЗ Ім О С Попова*. 2007 г.;(2):106–11.
185. Arai F, Hiraо A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, и др. Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche. *Cell*. июль 2004 г.;118(2):149–61.
186. Suniara RK, Jenkinson EJ, Owen JJ. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J Exp Med*. 20 март 2000 г.;191(6):1051–6.
187. Чертков ИЛ, Фриденштейн АЯ. Клеточные основы кроветворения. М.: Медицина; 1977. 272 с.
188. Lotfinegad P, Shamsasenjan K, Movassaghpour A, Majidi J, Baradaran B. Immunomodulatory nature and site specific affinity of mesenchymal stem cells: a hope in cell therapy. *Adv Pharm Bull*. 2014 г.;4(1):5–13.
189. Li W, Ren G, Huang Y, Su J, Han Y, Li J, и др. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ*. сентябрь 2012 г.;19(9):1505–13.
190. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 25 апрель 2012 г.;12(5):383–96.

191. Bifari F, Lisi V, Mimiola E, Pasini A, Krampera M. Immune Modulation by Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemotherapy*. 2008 г.;35(3):194–204.
192. State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Demchenko DL. ABILITY OF THYMIC MSCs AND THEIR DERIVATIVES TO INTERACT WITH THE CELLS OF LYMPHOID ORIGIN. *Biotechnol Acta*. декабрь 2018 г.;11(6):67–72.
193. Osada M, Singh VJ, Wu K, Sant'Angelo DB, Pezzano M. Label Retention Identifies a Multipotent Mesenchymal Stem Cell-Like Population in the Postnatal Thymus. *Bruns H, редактор. PLoS ONE*. 10 декабрь 2013 г.;8(12):e83024.
194. Nikolskiy I, Nikolskaya V, Demchenko D, Zubov D. Potentiation of directed osteogenic differentiation of thymic multipotent stromal cells by prior co-cultivation with thymocytes. *Cell Organ Transplantology*. 30 ноябрь 2016 г.;4(2):220–3.
195. Honoki K, Fujii H, Kubo A, Kido A, Mori T, Tanaka Y, и др. Possible involvement of stem-like populations with elevated ALDH1 in sarcomas for chemotherapeutic drug resistance. *Oncol Rep*. август 2010 г.;24(2):501–5.
196. Xu S-F, Yu L-M, Fan Z-H, Wu Q, Yuan Y, Wei Y, и др. Improvement of ginsenoside Rg1 on hematopoietic function in cyclophosphamide-induced myelosuppression mice. *Eur J Pharmacol*. 15 ноябрь 2012 г.;695(1–3):7–12.
197. Ratajczak MZ. Spotlight series on stem cell mobilization: many hands on the ball, but who is the quarterback? *Leukemia*. октябрь 2010 г.;24(10):1665–6.
198. Ярилин АА. Иммунология: учебник. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2010. 752 с.
199. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. январь 2014 г.;505(7483):327–34.
200. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, и др. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. август 2010 г.;466(7308):829–34.

201. Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, Frenkel J, Gregory C, Pochampally R, и др. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells*. 2009 г.;27:670–81.

202. State Institute of Genetic and Regenerative Medicine National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine, Nikolsky IS, Nikolskaya VV, State Institute of Genetic and Regenerative Medicine National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine, Demchenko DL, State Institute of Genetic and Regenerative Medicine National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine, и др. EFFECTS OF MULTIPOTENT STROMAL CELL TRANSPLANTATION ON MICE IMMUNE SYSTEM UNDER CONDITIONS OF ITS REGENERATION. *Fiziologichnyĭ Zhurnal*. 22 июнь 2018 г.;64(4):3–11.

203. Heng TSP, Goldberg GL, Gray DHD, Sutherland JS, Chidgey AP, Boyd RL. Effects of castration on thymocyte development in two different models of thymic involution. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 сентябрь 2005 г.;175(5):2982–93.

204. Fletcher AL, Lowen TE, Sakkal S, Reiseger JJ, Hammett MV, Seach N, и др. Ablation and Regeneration of Tolerance-Inducing Medullary Thymic Epithelial Cells after Cyclosporine, Cyclophosphamide, and Dexamethasone Treatment. *J Immunol*. 15 июль 2009 г.;183(2):823–31.

205. Demchenko D. The effect of transplantation of bone marrow cells induced by the contact with thymus-derived multipotent stromal cells on the immune system of mice, regenerating after cyclophosphamide treatment. *Cell Organ Transplantology [Интернет]*. 30 ноябрь 2018 г. [цитируется по 24 март 2021 г.];6(2). Доступно на: <http://transplantology.org/2018-6-2-en/article-5>

206. Demchenko D, Nikolskiy I. The effects of co-transplantation of bone marrow hematopoietic stem cell and thymic multipotent stromal cells on the immune system of mice during its regeneration after cyclophosphamide treatment. *Cell Organ Transplantology [Интернет]*. 18 июнь 2019 г. [цитируется по 24 март 2021 г.];7(1). Доступно на: <http://transplantology.org/2019-7-1-en/article-4/>

207. Volarevic V, Gazdic M, Simovic Markovic B, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N. Mesenchymal stem cell-derived factors: Immuno-modulatory effects and

therapeutic potential: Mesenchymal stem cell-derived factors. *BioFactors*. 10 сентябрь 2017 г.;43(5):633–44.

208. Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2011 г.;2(4):34.

209. Rombouts WJC, Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia*. 2003 г.;17:160–70.

210. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, и др. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest*. 1 декабрь 2000 г.;106(11):1331–9.

211. Wynn RF. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 2004 г.;104:2643–5.

212. Abbuehl J-P, Tatarova Z, Held W, Huelsken J. Long-Term Engraftment of Primary Bone Marrow Stromal Cells Repairs Niche Damage and Improves Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cell Stem Cell*. август 2017 г.;21(2):241-255.e6.

213. Strauss G, Westhoff M-A, Fischer-Posovszky P, Fulda S, Schanbacher M, Eckhoff SM, и др. 4-hydroperoxy-cyclophosphamide mediates caspase-independent T-cell apoptosis involving oxidative stress-induced nuclear relocation of mitochondrial apoptogenic factors AIF and EndoG. *Cell Death Differ*. 2007 г.;15:332–43.

214. Li T-S, Shi H, Wang L, Yan C. Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Satellite Cell Proliferation and Apoptosis in Immobilization-Induced Muscle Atrophy in Rats. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 29 ноябрь 2016 г.;22:4651–60.

215. Li H, Jiang Y, Jiang X, Guo X, Ning H, Li Y, и др. CCR7 Guides Migration of Mesenchymal Stem Cell to Secondary Lymphoid Organs: A Novel Approach to Separate GvHD from GvL Effect. *STEM CELLS*. 2014 г.;32:1890–903.

216. Lüttichau IV, Notohamiprodjo M, Wechselberger A, Peters C, Henger A, Seliger C, и др. Human Adult CD34⁺ Progenitor Cells Functionally Express the

Chemokine Receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but Not CXCR4. *Stem Cells Dev.* июнь 2005 г.;14(3):329–36.

217. Ezquer F, Ezquer M, Contador D, Ricca M, Simon V, Conget P. The Antidiabetic Effect of Mesenchymal Stem Cells Is Unrelated to Their Transdifferentiation Potential But to Their Capability to Restore Th1/Th2 Balance and to Modify the Pancreatic Microenvironment. *STEM CELLS.* 2012 г.;30:1664–74.

218. Omoto M, Katikireddy KR, Rezazadeh A, Dohlman TH, Chauhan SK. Mesenchymal Stem Cells Home to Inflamed Ocular Surface and Suppress Allosensitization in Corneal Transplantation. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2014 г.;55:6631.

219. Li H, Guo Z, Jiang X, Zhu H, Li X, Mao N. Mesenchymal Stem Cells Alter Migratory Property of T and Dendritic Cells to Delay the Development of Murine Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease. *STEM CELLS.* 2008 г.;26:2531–41.

220. Saleh M, Shamsasanjan K, Movassaghpour AA, Akbarzadehlaleh P, Molaeipour Z. Inhibitory Effect of Mesenchymal Stem Cell Co-Culture on Erythroid Differentiation of K562 Cells Compared to The Control Group. *Cell J.* июнь 2017 г.;19(1):127–36.

221. Liu R, Wang Y, Zhao X, Yang Y, Zhang K. Lymphocyte inhibition is compromised in mesenchymal stem cells from psoriatic skin. *Eur J Dermatol.* 20149-10 г.;(5):560–7.

222. Bocelli-Tyndall C, Bracci L, Schaeren S, Feder-Mengus C, Barbero A, Tyndall A, и др. Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the in vitro proliferation of lymphocytes stimulated by interleukins 2, 7 and 15. *Ann Rheum Dis.* 2008 г.;68:1352–9.

223. Le Burel S, Thepenier C, Boutin L, Lataillade J-J, Peltzer J. Effect of Mesenchymal Stromal Cells on T Cells in a Septic Context: Immunosuppression or Immunostimulation? *Stem Cells Dev.* 2017 г.;26:1477–89.

224. Chen Y-F, Zhao Z-Q, Wu Z-M, Zou Z-Y, Luo X-J, Li J, и др. The role of RIP1 and RIP3 in the development of aplastic anemia induced by cyclophosphamide and busulphan in mice. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 г.;7(12):8411–20.

225. Goldberg E. D. ED, Sherstobev E.Yu., Dygai A. M. Mechanisms of hematopoiesis local regulation. Tomsk STT. 2000 г.;148.
226. Ahn JS, Park S, Im S-A, Yoon S-S, Lee J-S, Kim BK, и др. High-dose Versus Low-dose Cyclophosphamide in Combination with G-CSF for Peripheral Blood Progenitor Cell Mobilization. Korean J Intern Med. 2005 г.;20(3):224.
227. Pšenák O, Šefc L, Sýkora V, Chang KT, Nečas E. Cytokine Gene Expression in Regenerating Haematopoietic Tissues of Mice after Cyclophosphamide Treatment. Acta Haematol. 2003 г.;109:68–75.
228. Maklakova IY, Grebnev DY, Yastrebov AP. [Activation of regeneration of red and white pulp of the spleen after the combined transplantation of HSC and MSCS in terms of exposure to ionizing radiation]. Patol Fiziol Eksp Ter. июнь 2017 г.;61(2):22–7.
229. Jackson MV, Morrison TJ, Doherty DF, McAuley DF, Matthay MA, Kissenpfennig A, и др. Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS: Mitochondrial Transfer from MSC to Macrophages. STEM CELLS. август 2016 г.;34(8):2210–23.
230. Teriukova NP, Pogodina ON, Blinova GI. Immunomodulating effect of cyclophosphamide on cytotoxic activity of rats and mice splenocytes. Tsitologiya. 2011 г.;53(10):800–7.
231. Chatterjee D, Marquardt N, Tufa DM, Beauclair G, Low HZ, Natlapatka T, и др. Role of gamma-secretase in human umbilical-cord derived mesenchymal stem cell mediated suppression of NK cell cytotoxicity. Cell Commun Signal [Интернет]. 2014 г. [цитируется по 26 октябрь 2018 г.];12. Доступно на: <http://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-014-0063-9>
232. Rasmuson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. Transplantation. 2003 г.;76:1208–13.
233. Grinevich Yu.A., Vihot N.E., Nikolsky I.S., Viter S.S. Enhancement of suppressor activity and cell migration under the thymostimulin and levamisole influence

in the formation of delayed hypersensitivity reaction. *Immunol Allergol*. 1983 г.;17:19–21.

234. Comoli P, Ginevri F, Maccario R, Avanzini MA, Marconi M, Groff A, и др. Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 г.;23:1196–202.

235. Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringdén O. Mesenchymal Stem Cells Stimulate Antibody Secretion in Human B Cells. *Scand J Immunol*. апрель 2007 г.;65(4):336–43.

236. Nikolskiy IS, Nikolskaya VV, Savinova VO. Influence of thymic multipotent stromal cells intravenous introduction on immune response. *Bull Ural Med Acad*. 2012 г.;4:55–6.

237. Chertkov I.L., Friedenstein A.Ya. Cellular basis of hematopoiesis. M:Medicine. 1977 г.;272.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 17 робіт: 5 статей у фахових наукових виданнях, з них 1 стаття у журналі включеному до наукометричної бази даних SCOPUS; 1 – патент на корисну модель; 11 тез наукових доповідей на міжнародних та вітчизняних конгресах і конференціях.

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації

1. **Demchenko DL**, Nikolskyi IS. The effects of co-transplantation of bone marrow hematopoietic stem cell and thymic multipotent stromal cells on the immune system of mice during its regeneration after cyclophosphamide treatment // Cell and Organ Transplantology. 2019; 7(1): 54-59.
2. **Demchenko DL**. The effect of transplantation of bone marrow cells induced by the contact with thymus-derived multipotent stromal cells on the immune system of mice, regenerating after cyclophosphamide treatment. Cell and Organ Transplantology. 2018; 6(2): 170-175.
3. **Demchenko DL**. Ability of thymic MSCs and their derivatives to interact with cells of lymphoid origin // Biotechnologia Acta. 2018; 11(6): 67-72.
4. Nikolsky IS, Nikolskaya VV, **Demchenko DL**, Taranukha LI, Semenova Y-MA, Serebrovska TV. Effects of multipotent stromal cell transplantation on mice immune system under conditions of its regeneration. Fiziol. Zh. 2018; 64(4): 3-11. (Особистий внесок здобувача: участь в обговоренні та аналізі літературних даних, їх систематизуванні, написанні статті).
5. Nikolskiy IS, Nikolskaya VV, **Demchenko DL**, Zubov DO. Potentiation of directed osteogenic differentiation of thymic multipotent stromal cells by prior co-cultivation with thymocytes. Cell and Organ Transplantology. 2016; 4(2): 220-

223. (Особистий внесок здобувача: участь в обговоренні та аналізі літературних даних, їх систематизуванні, написанні статті).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. **Демченко ДЛ.** Мембранна спорідненість гемопоетичних і мультипотентних стромальних клітин як можливий фактор впливу на лінійне диференціювання стромальних клітин. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Іноваційні напрямки в генетичній та регенеративній медицині»; 2017 лист. 9–10; Київ, Україна. 2017, с. 255.

2. **Демченко ДЛ, Нікольська ВВ.** Прискорення регенерації ураженої циклофосфаном імунної системи при котрансплантації гемопоетичних стовбурових та мезенхімальних стромальних клітин тимусу. Матеріали V ювілейного Міжнародного медичного конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України», 2016 квіт. 19-21; Київ, Україна. 2016, с. 133.

3. **Demchenko D, Tymoshenko A.** The impact of thymic multipotent stromal cells transplantation to immune system regeneration after cyclophosphamide. Матеріали XIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2017 квіт.15-27; Львів, Україна. 2017, с. 203.

4. **Demchenko D, Borisyuk A.** Acceleration the immune system regeneration after cyclophosphamide by multipotent stromal cells and hematopoietic stem cells cotransplantation. Матеріали XII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2016 квіт.19-21; Львів, Україна. 2016,с. 137.

5. **Chekh D.** Osteogenic differentiation of thymic multipotent stromal cells stimulated by contact with thymocytes. Матеріали XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2015 квіт. 20-23; Львів, Україна. 2015, с. 388-9.

6. **Чех ДЛ, Никольский ИС, Никольская ВВ, Зубов ДА.** Влияние тимоцитов и клеток костного мозга на остеогенную дифференцировку мезенхимальных

стромальных клеток тимуса. Материалы XIII-Международного Конгресса "Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии", 2015 февр. 18-20; Москва, Россия. 2015, с. 92-3.

7. Чех ДЛ, Никольский ИС, Никольская ВВ, Тарануха ЛИ, Савинова ВО, Семенова М-ЯА. Динамические особенности индуцированного циклофосфаном гемоиммунодефицита. Материалы Международный форум "Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы", 2014 май 14-17; Казань, Россия. 2014, с. 195-6

8. Чех ДЛ, Никольский ИС, Никольская ВВ, Савинова ВО, Тарануха ЛИ, Семенова Я-МА, Никольская ЕИ. Иммунобиологическая активность трансплантатов гемопоэтических и мультипотентных стромальных клеток тимуса Материалы I Евразийского конгресса «Трансплантация стволовых клеток», 2013 сент. 25-27; Минск, Беларусь. 2013, с.109-111.

Патент на корисну модель

Нікольський ІС, Нікольська ВВ, Демченко ДЛ, Зубов ДО. ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України». Спосіб потенціювання індукції диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин *in vitro* за остеогенним напрямком. Патент України UA 106592 U.2016 квіт. 26.