

Державна установа «Інститут генетичної та регенеративної медицини
Національної академії медичних наук України»

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Нікольська Катерина Ігорівна

УДК 612.35.646 : 612.017 : 615.361.

ДИСЕРТАЦІЯ

**«СТИМУЛЯЦІЯ РЕГЕНЕРАЦІЇ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ОПРОМІНЕНИХ
МИШЕЙ ТРАНСПЛАНТАЦІЄЮ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОVBУРОВИХ
КЛІТИН І ПРОГЕНІТОРІВ, ПРЕІНКУБОВАНИХ З
МУЛЬТИПОТЕНТНИМИ СТРОМАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ ТИМУСА»**

14.03.08 – імунологія та алергологія

(Медичні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня: кандидата медичних наук

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

_____ К.І.Нікольська

Науковий керівник: **Бутенко Геннадій Михайлович,**
академік НАМН України,
член-кореспондент НАН України,
доктор медичних наук, професор

Харків – 2020

АНОТАЦІЯ

Нікольська К.І. Стимуляція регенерації імунної системи опромінених мишей трансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин і прогеніторів, преінкубованих з мультипотентними стромальними клітинами тимуса. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.08 “Імунологія та алергологія” (Медичні науки). – ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», Київ; Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2020.

Дисертація присвячена вивченню стимуляції імунобіологічної, регенеративної і радіозахисної активності трансплантованими летально опроміненим мишам сингенними гемопоетичними стовбуровими клітинами (ГСК) і прогеніторами, преінкубованими *in vitro* з мультипотентними стромальними клітинами (МСК) тимуса, а також самими МСК тимуса.

Експерименти проведені на 519 мишах лінії СВА. Адаптовані методики отримання кріоконсервованих МСК тимуса, клітин кісткового мозку (ККМ) і клітин фетальної печінки (КФП) мишей. Вивчені деякі їх культуральні та функціональні властивості а також здатність МСК тимуса до лінійного диференціювання за остео- і адипогенними напрямками.

Вперше встановлено, що МСК тимуса та гемопоетичні клітини мають мембранну спорідненість, яка забезпечує можливість міжклітинної контактної взаємодії *in vitro*, що проявляється формуванням фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР) з центрально розташованою МСК і кількома приєднаними до неї гемопоетичними клітинами. Найбільшою спорідненістю до МСК тимуса володіють тимоцити (утворюють 84 % ФЛР) і суттєво меншою – клітини лімфатичних вузлів (52 %) і КФП (24 %), що відображає наявність найвищої мембранної спорідненості до МСК тимуса у незрілих Т-клітин.

В роботі використано два головних експериментальних підходи. У першому експерименті для вивчення впливу міжклітинної контактної взаємодії МСК тимуса з ГСК і прогеніторами на виживаність летально опромінених мишей з променевим імунodefіцитом досліджували наступні препарати ГСК і прогеніторів: ККМ, КФП, а також ці клітини, преінкубовані *in vitro* протягом 20 годин з сингенними МСК тимуса мишей лінії СВА, що нарощували в культурі у вигляді дискретних колоній фібробластних клітин. Як контроль на дію клітин вивчали активність кондиційного середовища сумісної культури сингенних КФП та МСК. Клітинні препарати вводили внутрішньовенно через 24 години після опромінення мишей в дозі 9 Гр у кількості $0,5 \times 10^6$ клітин. Спостереження за виживаністю тварин проводили протягом 16 тижнів, фіксуючи кількісний і якісний стан популяції мишей кожного дня.

Трансплантація сингенних ККМ мишам підвищувала виживаність в ранні терміни після опромінення; на 3 тиждень – суттєво. Далі кількість виживших тварин поступово зменшувалася так, що на 15 тиждень гинули всі миші. Відомо, що обрана для вивчення впливу гемопоетичних клітин на летально опромінених мишей доза ККМ ($0,5 \times 10^6$ клітин) є пороговою і дозволяє чутливо вловлювати можливі зміни активності клітин.

Встановлено, що динаміка виживаності тварин після введення ККМ, преінкубованих з МСК тимуса, спочатку мало відрізнялася від такої у мишей, що отримували інтактні ККМ. Але з 7 тижня кількість виживших тварин у цій групі переставала зменшуватись, показник виходив на плато і залишався таким до кінця спостереження (16 тижнів). З 14 тижня і до закінчення експерименту виживаність мишей у цій групі була достовірно вища, ніж у контролі і дорівнювала 13 %.

Динаміка виживаності мишей в результаті трансплантації КФП принципово відрізнялася від тієї, що була в експериментах з ККМ, тим, що ці клітини суттєво більше підвищували виживаність мишей на всіх термінах спостереження, починаючи з ранніх, як при введенні ККМ, і на відміну від цього, значно підвищували виживаність у пізньому періоді до 40 %. В

результаті трансплантації КФП, що були преінкубовані з МСК, динаміка виживаності була іншою. Вона значно більше, ніж під впливом інтактних КФП, підвищувалася у ранньому періоді (на 39–52 %), а наприкінці дослідження статистично не відрізнялась від виживаності у групі мишей, яким трансплантували нормальні КФП.

Для більш чіткого відображення радіозахисної дії досліджуваних клітин додатково був використаний метод визначення середньої тривалості життя загиблих тварин (СТЖ). Виявилося, що СТЖ значно підвищувалася (4,7 раза) тільки в групі мишей, що отримували преінкубовані КФП, мабуть, за рахунок високої виживаності у ранньому періоді.

Таким чином, встановлено, що міжклітинна контактна взаємодія з МСК тимуса *in vitro* стимулює радіозахисну активність ККМ (підвищення виживаності опромінених мишей) і КФП (підвищення виживаності опромінених мишей і подовження середньої тривалості життя загиблих тварин).

Скоріш за все дія розглянутих в експерименті гемопоетичних клітин, як і стромальних, реалізується через підсилення імунологічної активності. Перевірці цього припущення були присвячені наступні імунологічні дослідження у другому експерименті.

Перш за все була розроблена відповідна завданню експериментальна модель. На 25-й день після трансплантації клітин летально опроміненим тваринам з променевим імунодефіцитом вводили внутрішньочеревно 10^8 еритроцитів барана, а через 4 дні проводили повторну імунізацію ін'єкцією такої ж кількості еритроцитів у подушечку задньої лапи. Ще через добу (30-й день після опромінення) оцінювали виживаність тварин і визначали показники імунної системи. Встановлено, що у зазначений термін тільки нормальні і преінкубовані КФП підвищували виживаність тварин.

Летальне опромінення індукувало глибоку гіпотрофію тимуса, а введення як нормальних, так і преінкубованих ККМ, а також преінкубованих КФП призводило до значного, майже повного, відновлення тимуса до 30-го дня після опромінення. Преінкубовані КФП були значно активніші від нормальних.

Клітинність кісткового мозку у опромінених мишей також значно зменшувалася, а трансплантація всіх клітинних препаратів сприяла її суттєвому відновленню. Кількість КУО-Ф на стегову кістку у опромінених мишей теж значно знижувалася, а у мишей, що отримували різні препарати ГСК і прогеніторів та МСК, їх чисельність суттєво підвищувалася.

Відносно тварин, які отримували нормальні клітини, у мишей, що отримували преінкубовані КФП, суттєво зростала кількість лейкоцитів (на 16 %) і лімфоцитів (на 54 %) у периферичній крові.. Після введення преінкубованих ККМ вміст лімфоцитів також зростав (на 20 %), але кількість лейкоцитів і нейтрофілів суттєво знижувалася (відповідно на 16 % і 28 %) проти рівня тварин, які отримували нормальні ККМ, що свідчить про відмінності у дії преінкубованих ККМ і КФП на лімфоїдні і міелоїдні клітини.

Важливі результати отримані при вивченні природного і адаптивного імунітету. Поглинальна активність макрофагів під впливом опромінювання була близько норми з тенденцією до підвищення, а після трансплантації нормальних КФП показник достовірно перевищував норму. У мишей з променевим імунодефіцитом суттєво по відношенню до норми підвищувалася бактерицидна активність перитонеальних макрофагів. Після введення клітин вона була приблизно на нормальному рівні, за виключенням підвищення відносно норми в результаті ведення преінкубованих КФП. В цілому, поглинальна стадія фагоцитозу і бактерицидна активність мало ушкоджувалися опроміненням, а ГСК і прогенітори за цих умов активність мало змінювали

Природна цитотоксичність спленоцитів опромінених мишей значно знижувалася, а трансплантація досліджених клітинних препаратів, за виключенням КФП, призводила до суттєвого її збільшення. Особливо цитотоксичність підвищувалася у мишей, що отримували преінкубовані КФП, причому суттєво більше (в 1,7 раза), ніж у тварин з непреінкубованими клітинами.

Індекс реакції бласттрансформації лімфоцитів, яка здійснювалася клітинами лімфатичних вузлів опромінених мишей, зменшувався в усіх

досліджених групах. Реакція суттєво підсилювалася в результаті трансплантації преінкубованих ККМ, нормальних і преінкубованих КФП. Причому статистично достовірна різниця в активності РБТЛ спостерігалася між групами мишей, що отримували нормальні і преінкубовані ККМ на користь останніх з перевищенням інтенсивності реакції на 25 %.

Спленоцити летально опромінених мишей *in vitro* продукували значно меншу кількість вірусіндукованого α/β - і КонА-індукованого γ -інтерферону. Суттєве зниження продукції вказаних типів інтерферонів спостерігалось і в культурах спленоцитів тварин, які одержували нормальні ККМ і КФП. У протипагу цьому, встановлено, що введення мишам ГСК і прогеніторів, преінкубованих з МСК тимуса, сприяло значному відновленню здатності спленоцитів до синтезу α/β - і γ -інтерферонів. Відповідно, для ККМ та іККМ кількість α/β -інтерферона зростала у 3 рази. Для КФП та іКФП кількість α/β -інтерферона підвищувалася в 1,6 рази, γ -інтерферона – в 2 рази.

«Спонтанний» ФНПа в культурі спленоцитів нормальних мишей визначався у слідових кількостях. Навпаки, цитокін у помітній кількості продукувався клітинами опромінених тварин. Причому він виявлявся приблизно в однаково меншій кількості в групах майже незалежно від властивостей введених ГСК і прогеніторів. Індукований ЛПС синтез ФНПа спленоцитами опромінених мишей *in vitro* практично не відрізнявся від того, що був у нормальних тварин, а у мишей, що отримували клітини, він знижувався за виключенням тварин, які отримували преінкубовані КФП.

Інтенсивність реакції ГСТ у опромінених мишей значно знижувалася. Вона була значно зниженою у тварин, що отримували нормальні ККМ, КФП, іКФП. Інтенсивність ГСТ в групах тварин, що одержували іККМ, була вищою, оскільки показник ГСТ в цих групах статистично не відрізнявся від норми. Можна припустити, що саме ГСК і прогенітори кісткового мозку, преінкубовані з МСК, скоріше за все, набувають властивостей, що сприяють їх диференціюванню у клітини, що беруть участь у розвитку реакції ГСТ. Не

виключена також опосередкована дія iKKM на інші клітини-учасники розвитку ГСТ.

Вивчення гуморального імунітету показало, що у опромінених мишей формування АУК в селезінці та синтез гемолізинів та гемаглютинінів у відповідь на імунізацію еритроцитами барана значно пригнічені. В результаті трансплантації преінкубованих КKM і КФП у порівнянні із веденням нормальних клітин суттєво підвищувалися: рівень гемолізинів (відповідно до типу клітин в 16 і 2,5 раза), гемаглютинінів (в 23 і 15 разів), утворення АУК в селезінці (в 4,7 і 3,1 раза).

Велика увага приділялася у роботі і вивченню і властивостей МСК. Вперше показано, що трансплантовані летально опроміненим мишам з променевим імунodefіцитом МСК тимуса (5×10^4 клітин/мишу) суттєво стимулювали регенеративну активність імунної системи, що проявлялося достовірним підвищенням виживаності тварин (на 13 %) і значним зростанням абсолютної (в 3,5 раза) та відносної маси (в 4 раза) тимуса, кількості тимоцитів (в 21 раз) і клітинності тимуса (в 10,8 раза). У таких мишей також суттєво зростала і клітинність кісткового мозку (в 2,6 раза), відновлювалася здатність стромальних клітин кісткового мозку до формування колоній фібробластних клітин (в 4,7 раза). Вперше виявлено, що під впливом трансплантованих МСК тимуса у опромінених та імунізованих мишей відбувалася виражена активація імунної системи: значно зростав вміст гемолізинів і гемаглютинінів в сироватці крові, підвищувалася продукція спленоцитами γ -інтерферона (в 7,5 раза), стимулювалася природна цитотоксичність (в 1,5 раза) і вираженість ГСТ, що разом узятє можна розглядати як позитивний вплив МСК тимуса на активність імунної системи при радіаційному кістковомозковому синдромі.

В цілому, результати роботи свідчать про значну стимулюючу роль контактної взаємодії з МСК тимуса у формуванні функціональної активності ГСК і прогеніторів КKM та КФП, реалізація якої призводить до ефективної стимуляції відновлення імунної системи. Трансплантація МСК тимуса опроміненим мишам ефективно стимулює регенерацію імунної системи.

Отримані дані можуть бути використані для розробки нових підходів у клітинній трансплантації з метою корекції імунодефіцитів.

Ключові слова: гемопоетичні стовбурові клітини, імунна система, імунологічна активність, міжклітинна контактна взаємодія, мультипотентні стромальні клітини, променевий імунодефіцит, регенерація.

ABSTRACT

Nikolska K.I. Stimulation of the immune system regeneration in irradiated mice through transplantation of hematopoietic stem cells and progenitors preincubated with multipotent stromal cells of thymus. – Qualifying scientific paper, manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Medicine: Specialty 14.03.08 – Immunology and allergology (Medical Sciences) – State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv; V.N. Karazin Kharkiv National University, the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2020.

The thesis is devoted to studying Stimulation of the immunobiological, regenerative and radioprotective activities in mice lethally irradiated with transplanted syngenic hematopoietic stem cells (HSC) and progenitors, preincubated in vitro with multipotent stromal cells (MSC) of thymus, and very MSC of thymus.

The experiments covered 519 mice of CBA line. The methods were adopted for obtaining cryopreserved MSC of thymus, cells of the bone marrow (CBM) and the cells of fetal liver (CFL) in mice. The author explored some cultural and functional properties, as well as ability of the thymus MSC to differentiating linearly by the osteo- and adipogenous directions.

It was found out for the first time that the thymus MSC hematopoietic stem cells feature membrane affinity securing the option of intracellular contact interaction in vitro, which is expressed through formation of the fibroblastic lymphocytic

rosettes (FLR) with the centrally located MSC and several hematopoietic cells attached thereto. The utmost affinity to the thymus MSC is shown by the thymocytes (forming 84% of the FLR), and much less by the lymph nodes cells (52 %) and the CFL (24 %), reflecting availability of the highest membrane affinity to the thymus MSC in immature T-cells.

There were two major experimental approaches employed in the paper. As a part of the first experiment covering exploration of the possible intercell contact interaction between the thymus MSC with HSC and the progenitors targeting survivability of the irradiated mice with radiation immunodefictes, the following HSC and progenitors preparations were explored: The CBM and the CFL, as well as these cells preincubated in vitro for 20 hours with syngenic MSC of thymus in mice of CBA line, as grown in the culture in the form of fibroblastic cells' colonies. As a control over the cells effect, the study covered activity of the condition environment covering the joint culture of the syngenic CFL and MSC. The cellular preparations were injected intravenously 24 hours after the mice irradiation in the dose of 9 Gy, in the amount of 0.5×10^6 cells. The observations covering survivability of animals were held for 16 weeks recording the quantitative and qualitative of mice population from day to day.

The syngenic CBM transplantation to mice improved survivability during early periods upon irradiation; on week 3 - materially. Later on, the number of survived animals has been reducing, with all the mice dying on week 15. Apparently, the CBM dose (0.5×10^6 cells) selected for studying influence of hematopoietic cells on lethally irradiated mice is a threshold one, allowing sensitively capturing possible changes in the cells activity.

It was found out that dynamics of animals' survivability after injection of CBM, preincubated from the thymus MSC, initially was slightly different from that of mice receiving intact CBM. However, after week 7 the number of surviving animals in this group has not been reducing anymore, the value reached the plateau and remained as such up to the observation end (16 weeks). From week 14 and up to

the experiment completion the mice survivability in this group was reliably higher than that in the control group, constituting 13 %.

The mice survivability as a result of the CFL transplantation was dramatically different from that used in the CBM experiments, with the cells improving the mice survivability to much higher extent during all the observation periods, ranging from the earliest ones when injecting the CBM, and unlike the latter much exceeding survivability during the late period. Upon transplantation of the CFL preincubated from the thymus MSC, the survivability dynamics was different. It is much higher than that under impact of intact CFL, rising during the earlier period (by 39–52 %), and at the survey end being statically not different from survivability in the group of mice subject to transplantation of normal CFL.

For clearer demonstration of the explored cells' radioprotective action, there was additionally used the method of finding out the average life duration of deceased animals (hereafter referred to as the ALD). It was found out that the ALD used to increase significantly (4.7 times) only in the group of mice, obtaining the preincubated CFL, possibly due to high survivability during the early period.

Therefore, it was found out that intercellular contact interaction with MSC of thymus in vitro stimulated radioprotective activity of CBM (improved survivability among irradiated mice) and CFL (improved survivability among irradiated mice and extending average life duration of deceased animals).

Most likely, the action of the experiment covered hematopoietic cells, similarly to the stromal ones, is effected through strengthening of the immunological activity. The following immunological studies under the second experiment were devoted to verifying this assumption.

First of all, the experimental model was developed in line with the terms of reference. On day 25 following cells transplantation to lethally irradiated mice with radiation immunodeficiency, there were 10^8 of sheep erythrocytes abdominally, and 4 days past re-immunization was held through injecting the same number of erythrocyte in the hindpaw pad. One day past (day 30 after irradiation) survivability of animals was assessed and the immune systems' performance was determined. It

was found out that over the specified period the normal and preincubated CFL improved survivability of animals.

The lethal irradiation induced profound malnutrition of thymus, while injection of both normal and preincubated CBM, as well as preincubated CFL led to material almost complete restoration of thymus up to the day 30 following irradiation. The preincubated CFL were much more active than the normal ones. The bone marrow cellularity in irradiated mice reduced materially as well, while transplantation of all the cellular preparations facilitated to the material restoration thereof. The number of CUO-F by the femoral bone in irradiated mice materially reduced as well, and the mice obtaining various HSC and progenitors preparations, as well as the MSC, the number thereof increased materially.

As regards the animals obtaining normal cells, in mice that have obtained preincubated CFL, the count of leucocytes increased (by 16 %), and the count of lymphocytes increased (by 54 %) in peripheral blood. Upon injection of the preincubated CBM, count of lymphocytes grew as well (by 20%), while the number of leucocytes and neutrophils was reducing materially (by 16 % and 28 %, respectively) against the level recorded in animals obtaining normal CBM, indicating to differences in action of preincubated CBM and CFL on lymphoid and myeloid cells.

The important results were obtained when studying the natural and adaptive immunity. The macrophages' absorbing activity under effect of irradiation was close to the standard value, showing the trend to increase, and following the normal CFL transplantation the performance is much higher than the standard value. The mice with radiation immunodefictes showed significant increase of peritoneal macrophages' bactericide activity as compared to the standard value. Upon the cells injection it was approximately normal, save for increase against the standard value following injection of the preincubated CFL. In general, the absorption stage of phagocytosis and the bactericide activity were slightly damaged with irradiation, and the HSC and progenitors under such conditions changed activity only slightly.

The natural cytotoxicity of splenocytes in irradiated mice reduced materially, while transplantation of the explored cellular preparations, save for the CFL, resulted in the material increase thereof. Cytotoxicity showed special increase in mice that have obtained preincubated CFL, the increase was much higher (1.7 times) than in animals with non-preincubated cells.

The index of lymphocyte transformation reaction, effected by the cells of irradiated mice lymphatic nodes reduced in all the studied groups. Reaction improved significantly upon transplantation of the preincubated CBM, the normal and preincubated CFL. The statistically significant difference in the blast-transformation reaction's activity was observed between the groups of mice obtaining the normal and preincubated CBM for the benefit of the latter with the reaction intensiveness excess by 25 %.

Splenocytes of lethally irradiated mice in vitro produced much lessee number of virus-induced α/β - and ConA-induced γ -interferon. Material reduction of the foregoing interferon types was observed in the cultures of splenocytes in animals, obtaining normal CBM and CFL. By contrast, it was found out that the HSC and progenitors injection to mice, as preincubated from the thymus MSC, facilitated tom material restoration of splenocytes ability to synthesis of α/β - and γ -interferons. Respectively, for the CBM and iCBM the number of α/β -interferon was increasing 3 times. For the CFL and iCFL the number of α/β -interferon was increasing 1.6 times, γ -interferon – 2 times.

The Spontaneous FNP α in the culture of splenocytes in normal mice was found in trace quantities. On contrary, cytokine in the noticeable quantity was produced by cells of the irradiated animals. It was identified approximately in the similarly lower amount in the groups almost irrespective of the properties shown by the injected HSC and progenitors. The induced LPS synthesis of FNP α with splenocytes of the irradiated mice in vitro was practically the same as the one of normal animals, and in the mice obtaining cells it was reducing save for the animals obtaining preincubated CFL.

The HST reaction intensiveness in the irradiated mice reduced materially. It was much reduced in animals obtaining normal CBM, CFL and iCFL. The HST intensiveness in the groups of animals receiving iCBM was higher, since the HST value in these groups was statistically not different from the standard value. Presumably, the HSC and progenitors of bone marrow, preincubated with MSC, most likely acquire properties facilitating to differentiation thereof in the cells taking part in the HSC reaction development. One may not rule out indirect effect of the iCBM on the other cells taking part in the HST development.

Studying of the humoral immunity showed that that in the irradiated mice formation of antibody-producing cells in spleen and synthesis of hemolysines and haemagglutinines responding to immunization of sheep erythrocytes was significantly suppressed. Upon transplantation of the preincubated CBM and CFL as compared to injection of the normal cells, the following increased significantly: The hemolysines level (according to the cells type - 16 and 2.5 times), haemagglutinines (23 and 15 times), formation of antibody-producing cells in spleen (4.7 and 3.1 times).

The thesis paid much attention to studying the MSC properties. It was shown for the first time that the MSC of thymus transplanted to the lethally irradiated mice with radiation immunodefices (5×10^4 cells/mouse) materially stimulated regenerative activity of the immune system, showing out through reliable improvement of animals survivability (by 13 %) and material increased of the absolute (3.5 times) and relative (4 times) of thymus, number of thymocytes (21 times) and thymus cellularity (10.8 times). In such mice cellularity of the bone marrow was increasing (2.6 times), stromal cells of the bone marrow restored their ability to form colonies of the fibroblastic cells (4.7 times). It was forum for the first time that under impact of the transplanted MSC of thymus in the irradiated and immunized mice there was manifest activation of the immune system: The content of hemolysines and haemagglutinines was increasing in the blood serum, building up production of γ -interferon by splenocytes (7.5 times), the natural cytotoxicity was stimulated (1.5 times) and the manifest nature of HST, which may be treated

together as the positive impact of the thymus MSC on activity of the immune system subject to the radiation bone marrow syndrome.

Generally, the thesis results are indicative of the material stimulating role of the contact interaction with the thymus MSC in forming functional activity of the HSC and the CBM and CFL progenitors, exercising of which results in efficient stimulation of immune system restoration. Transplantation of the thymus MSC to the irradiated mice efficiently stimulates the immune system regeneration. The obtained data may be used to develop the new approaches to cell transplantation for the purpose of immunodeficiencies adjustment.

Key words: hematopoietic stem cells, immune system, immunological activity, intercellular contact interaction, multipotent stromal cells, radiation immunodeficiencies, regeneration.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці у наукових фахових виданнях України:

1. Нікольський І.С., Нікольська К.І. Гемопоезтические стволовые клетки в лечении сахарного диабета. *Імунологія та алергологія*. 2006. № 3. С. 19-22 (*Особистий внесок здобувача: участь в обговоренні та аналізі літературних даних, їх систематизуванні, написанні статті*).
2. Коляденко В.Г., Никольская Е.И. Гемопоезтические стволовые клетки и атопический дерматит. *Український журнал дерматології, венерології, косметології*. 2007. № 2. С. 5-7 (*Особистий внесок здобувача: участь в обговоренні та аналізі літературних даних, їх систематизуванні, написанні статті*).
3. Nikolskaya K. I., Butenko G. M. Structural-functional organisation of the bone marrow hematopoietic stem cells niches. *Cell and Organ Transplantology*. 2016. Vol. 4, No 1. P. 101-117 (*Особистий внесок здобувача: участь в обговоренні та аналізі літературних даних, їх систематизуванні, написанні статті*).
4. Nikolska K. I. Peculiarities of culture and in vitro contact interaction of cryopreserved thymic multipotent stromal cells and hemopoietic cells. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018. Vol. 28, No 1. P. 5–13 (Видання входить до міжнародної наукометричної бази **Scopus**).
5. Nikolska K. I. The effects of the transplantation of thymus-derived multipotent stromal cells on the immune system and survival of lethally irradiated mice. *Cell and Organ Transplantology*. 2018. Vol. 6, No 2. P. 158-163.
6. Нікольська К.І., Бутенко Г.М. Корекція кістково-мозкового синдрому у опромінених мишей трансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин. *Фізіологічний журнал*. 2019. Т.65, № 1. С.3-14. (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, проведення експериментів, статистична обробка результатів, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті*).
7. Nikolska K.I. Impact of transplantation of cryopreserved and preincubated with

thymic multipotent stromal cells of hemopoietic stem cells on lethally irradiated mice survival. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2019.Vol. 29, No 2. P. 115–124 (Видання входить до міжнародної наукометричної бази **Scopus**).

Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:

8. Никольский И.С., Никольская В.В., Федорчук А.Г., Никольская Е.И., Марущенко Ю.Л. Радиозащитное действие криоконсервированных клеток эмбриональной печени в сингенной и ксеногенной комбинациях // Матеріали ІХ Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 25-26 квітня 2007 р.). *Імунологія та алергологія*. 2007. № 3. С.97–98 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
9. Нікольська В.В., Нікольська К.І. Колонієутворення стромальними клітинами тимусу // Матеріали Х Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації(Київ, Україна, 2008 р.). *Імунологія та алергологія*. 2008. № 2. С.140 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
10. Никольский И.С., Никольская В.В., Федорчук А.Г., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Никольская Е.И., Зубов Д.А., Лисица Н.А., Семенова Я.-М.А. Влияние преинкубированных с мультипотентными стромальными клетками тимуса сингенных клеток эмбриональной печени на иммунную систему летально облученных мышей // Матеріали ХІ Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 2009 р.). *Імунологія та алергологія*. 2009. № 2-3. С.145 (*Особистий внесок здобувача: участь у*

формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез).

- 11.Никольский И.С., Никольская В.В., Зубов Д.А., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Никольская Е.И., Лисица Н.А., Семенова Я.-М.А., Федорчук А.Г. Регенерация иммунной системы облученных животных при трансплантации сингенных клеток эмбриональной печени, стимулированных контактом с мультипотентными стромальными клетками тимуса // Сучасні теорія та практика клінічної імунології та алергології: матеріали XII Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 2010 р.). *Імунологія та алергологія*. 2010. № 1. С.163(*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
- 12.Никольский И.С., Никольская В.В., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Никольская Е.И., Зубов Д.А., Лисица Н.А., Семенова Я.-М., Федорчук А.Г., Сорокин Г.К. Повышение эффективности сингенных клеток эмбриональной печени в регенерации иммунной системы летально облученных мышей в результате контактного взаимодействия этих клеток и мультипотентных стромальных клеток тимуса // Материалы VI Съезда по радиационным исследованиям (Москва, Россия, 25–28 октября 2010 г.) .Москва: изд-во Рос. ун-та Друж. Народов, 2010. Т. 1. С. 94 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
- 13.Никольская Е.И. Мембранное взаимодействие ex vivo мультипотентных стромальных и гемопоэтических клеток // Сучасні питання клінічної та лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (Київ, Україна, 12–13 квітня 2011 р.). *Імунологія та алергологія*. 2011. № 4. С.100-101.
- 14.Никольский И.С, Никольская В.В., Савинова В.О., Никольская Е.И., Тарануха Л.И., Семенова Я.-М.А., Кубицкая А.О. Иммуномодулирующая

активность мультипотентных стромальных клеток тимуса // МатеріалиХІІІ Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації(Київ, Україна, 26-27 квітня 2012 р.). *Імунологія та алергологія*. 2012. Дод.1. С.45-46 (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез).

- 15.Nikolskaya K., Zubov D., Taranukha L., Vasyliiev R., Semenova Y.-M. Immune system regeneration with fetal liver cells stimulated by contact with thymic multipotent stromal cells in irradiated mice // Stem Cells and Clinical Application: poster presentations 7th Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research associated with Fraunhofer Life Science Symposium(Leipzig, Germany, 29-30 November 2012). Leipzig, 2012. P. 74. (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез).
- 16.Никольская Е.И. Повышение продолжительности жизни летально облученных мышей под влиянием мультипотентных стромальных клеток тимуса // Актуальні проблеми регенеративної медицини: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю(Київ, Україна, 4–5 жовтня 2012 р.). *Журнал Національної Академії медичних наук України*. 2012. Т.18, додаток. С.107-108.
- 17.Никольский И.С., Никольская В.В., Савинова В.О., Тарануха Л.И., Семенова Я.-М.А., Никольская Е.И., Чех Д.Л. Иммунобиологическая активность трансплантатов гемопоэтических и мультипотентных стромальных клеток тимуса // Актуальные вопросы трансплантации стволовых клеток: материалы I Евразийского конгресса «Трансплантация стволовых клеток» (Минск, Беларусь, 25–27 сентября 2013 г.). Минск, 2013. С. 109-111 (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез).

- 18.Никольская Е.И., Тарануха Л.И., Никольская В.В., Семенова Я-М.А., Никольский И.С. Характеристика активности различных типов мультипотентных клеток в лечении пострadiaционного костно-мозгового синдрома у мышей // Трансплантація – сьогодення, минуле та майбутнє: матеріалинауково-практичної конференції з міжнародною участю(Київ, Україна, 7 листопада 2014 р.). Київ, 2014. С.32 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
- 19.Нікольська К.І. Потенціювання імунорегенеративної і радіозахисної активності гемопоетичних клітин-попередників контактом з мультипотентними стромальними клітинами тимусу // Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині: матеріалиміжнародної науково-практичної конференції(Київ, Україна, 9–10 листопада 2017 р.). *Клітинна та органна трансплантологія*. 2017. Т.5, № 2. С. 254.

Наукові праці, що додатково відображають зміст дисертації:

- 20.Никольский И.С., Никольская В.В., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Зубов Д.А., Никольская Е.И. Радиозащитное действие мультипотентных стромальных клеток тимуса. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2009. № 2/1 (24). С. 284-285 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, проведення експериментів, статистична обробка результатів, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті*).
- 21.Никольский И.С., Никольская В.В., Зубов Д.А., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Никольская Е.И. Восстановление иммунной системы облученных животных сингенными клетками эмбриональной печени, стимулированными контактом с мультипотентными стромальными клетками тимуса. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2010. № 2/1 (29). С. 61-62 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, проведення експериментів, статистична*

обробка результатів, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті).

- 22.Никольская Е.И., Тарануха Л.И., Никольская В.В., Галицкая С.Н., Никольский И.С. Сравнительная характеристика активности различных типов гемопоэтических и мультипотентных стромальных клеток в купировании костно-мозгового синдрома у летально облученных мышей. *Российский иммунологический журнал*. 2014. Т. 8 (17), № 3. С. 354-356
(*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, проведення експериментів, статистична обробка результатів, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті*).
- 23.Никольская Е.И. Клеточная композиция костномозговых ниш гемопоэтических стволовых клеток (обзор литературы). *Журнал Національної Академії медичних наук України*. 2015. Т. 21, № 3-4. С. 272-286.

Патенти:

- 24.Нікольський І.С., Нікольська В.В., Зубов Д.О., Тарануха Л.І., Галицька С.М., Нікольська К.І., Федорчук О.Г. Спосіб підвищення радіорезистентності організму // Пат. 49204 Україна, МПК А61К 35/26; Заявлено 06.10.2009; Дата публ. 26.04.2010, Бюл. № 8 (*Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень та їх аналізі, написання тексту патенту, патентний пошук*).
- 25.Нікольський І.С., Нікольська В.В., Зубов Д.О., Нікольська К.І., Савінова В.О., Малишева О.О., Спосіб одержання фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР), як модельного аналогу тимічної ніши *ex vivo* // Пат. 80076 Україна, МПК С12N 5/00; Заявлено 04.12.2012; Дата публ. 13.05.2013, Бюл. № 9 (*Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень та їх аналізі, написання тексту патенту, патентний пошук*).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	25
ВСТУП	28
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. КОНТАКТНА ВЗАЄМОДІЯ ГСК І ПРОГЕНІТОРІВ З МСК ТИМУСА У ФОРМУВАННІ ТА ФУНКЦІОНУВАННІ ІМУННОЇ СИСТЕМИ	37
1.1. МСК та їх похідні у структурі і функціонуванні кістковомозкових ніш ГСК	37
1.1.1. Гемопоетичне мікрооточення	37
1.1.2. Ендостальна ніша	41
1.1.3. Судинна ніша	47
1.1.3.1. CAR-клітини	48
1.1.3.2. Клітини, що експресують нестин	50
1.1.3.3. Ендотеліальні клітини	52
1.2. МСК тимуса; участь у формуванні органу і функціонуванні імунної системи	54
1.2.1. Основні загальні властивості МСК, структурно- функціональні особливості МСК тимуса	54
1.2.2. Участь МСК тимуса в ембріональному органогенезі і функціонуванні дорослого тимуса	55
1.2.3. Взаємодія МСК і гемопоетичних клітин у функціонуванні імунної системи	58
Висновки до розділу 1	65
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	66
2.1. Експериментальні тварини та схема проведення досліджень	66
2.2. Отримання препаратів ГСК і прогеніторів із кісткового мозку та фетальної печінки; їх кріоконсервування	68
2.3. Індукція лінійного диференціювання МСК тимуса	70
2.4. Опромінення тварин	71

2.5.	Оцінка маси і клітинності лімфоїдних органів і кісткового мозку	71
2.6.	Визначення колонієутворюючих одиниць фібробластів (КУО-Ф)	72
2.7.	Визначення кількості лейкоцитів в периферичній крові і клітинного складу лейкоцитарної формули	72
2.8.	Визначення фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів	72
2.8.1.	Отримання перитонеальних макрофагів	72
2.8.2.	Визначення поглинальної активності	73
2.8.3.	Визначення бактерицидної активності в НСТ-тесті	74
2.9.	Визначення цитотоксичної активності природних кілерів МТТ-методом	75
2.10.	Реакція бласттрансформації лімфоцитів	76
2.11.	Визначення α/β - і γ -інтерферонів в супернатантах культур спленоцитів	78
2.11.1.	Вірус хвороби Ньюкасла	78
2.11.2.	Вірус везикулярного стоматиту	79
2.11.3.	Індукція синтезу α/β -інтерферону in vitro	79
2.11.4.	Індукція синтезу γ -інтерферону in vitro	79
2.11.5.	Титрування інтерферону	80
2.12.	Визначення активності фактору некрозу пухлин	80
2.13.	Постановка реакції гіперчутливості сповільненого типу	81
2.14.	Визначення кількості антитілоутворюючих клітин методом локального гемолізу в гелі	82
2.15.	Визначення титру гемаглютинінів та гемолізинів	83
2.15.1.	Визначення титру гемаглютинінів	83
2.15.2.	Визначення титру гемолізинів	83
2.16.	Статистичний аналіз	84

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ДЕЯКИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МСК ТИМУСА І КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ МИШЕЙ IN VITRO.

ФІБРОБЛАСТО-ЛІМФОЦИТАРНІ РОЗЕТКИ	85
3.1. Характеристика властивостей тимусних МСК	86
3.1.1. Культуральні властивості МСК тимуса	86
3.1.2. Остеогенне і адипогенне диференціювання МСК тимуса	91
3.2. Дослідження клітинних препаратів ГСК і прогеніторів фетальної печінки, а також деяких властивостей МСК тимуса ...	94
3.2.1. Оптимізація одержання клітин фетальної печінки (КФП)	94
3.2.2. Визначення короточасного впливу кондиційного середовища МСК тимуса на життєздатність КФП	97
3.2.3. Встановлення впливу на життєздатність КФП сумісного їх культивування з МСК тимуса	98
3.2.4. Контактна взаємодія МСК і гемопоетичних клітин. Фібробласто-лімфоцитарні розетки	99
Висновки до розділу 3	101
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ КОНТАКТНОЇ ВЗАЄМОДІЇ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ І ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ З МСК ТИМУСА НА РАДІОЗАХИСНУ АКТИВНІСТЬ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН	103
4.1. Розробка схеми для вивчення впливу преінкубації ККМ і КФП з МСК тимуса на радіозахисну активність трансплантованих гемопоетичних клітин	103
4.2. Вплив трансплантації нормальних та преінкубованих з МСК тимуса ККМ і КФП, а також МСК тимуса на виживаність і середню тривалість життя загиблих тварин після летального опромінення	106
Висновки до розділу 4	117

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ НА ІМУННУ СИСТЕМУ ОПРОМІНЕНИХ МИШЕЙ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ МСК ТИМУСА ТА ІНДУКОВАНИХ КОНТАКТНОЮ ВЗАЄМОДІЄЮ З НИМИ ГСК І ПРОГЕНІТОРІВ КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ...	118
5.1. Експериментальна модель вивчення впливу контактної взаємодії МСК тимуса з ГСК і прогеніторами на їх імунобіологічну і регенеративну активність	119
5.2. Вивчення впливу препаратів ГСК і прогеніторів, а також МСК тимуса на 30-денну виживаність опромінених мишей	121
5.3. Вивчення імунобіологічної активності різних препаратів ГСК і прогеніторів, а також МСК тимуса	123
Висновки до розділу 5	142
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	144
ВИСНОВКИ	166
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	169
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	170
ДОДАТОК 1. Список публікацій здобувача за темою дисертації	209
ДОДАТОК 2.	215

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АУК	антитілоутворюючі клітини
ВВС	вірус везикулярного стоматиту
ВХН	вірус хвороби Ньюкасла
ГСК	гемопоетичні стовбурові клітини
ГСТ	гіперчутливість сповільненого типу
ДР-ГСК	довгочасно репопулюючі гемопоетичні стовбурові клітини
ЕТС	ембріональна теляча сироватка
іККМ	клітини кісткового мозку, преінкубовані з мультипотентними стромальними клітинами (індуковані ККМ)
іКФП	клітини фетальної печінки, преінкубовані з мультипотентними стромальними клітинами (індуковані КФП)
ІІ	інтерлейкін
ККМ	клітини кісткового мозку
КМ	кістковий мозок
Кон А	конконавалін А
КС	кондиційне середовище
КР-ГСК	короткочасно репопулюючі гемопоетичні стовбурові клітини
КУО-Ф	колонієутворююча одиниця фібробластів
КСФ	колонієстимулюючий фактор
КСФ-Г	колонієстимулюючий фактор гранулоцитів
КСФ-ГМ	колонієстимулюючий фактор гранулоцитів і макрофагів
КСФ-М	колонієстимулюючий фактор макрофагів
КФП	клітини фетальної печінки
ЛПС	ліпополісахарид
МСК	мультипотентні стромальні клітини
МТТ	3- (4,5-діметілтуазол-2-іл) -2,5 бромдіфеніл тетразол
НСТ	нітросиній тетразолій
РБТЛ	реакція бласттрансформації лімфоцитів

СТЖ	середня тривалість життя
ТЦД	тканинна цитопатична доза
ФГА	фітогемаглютинін
ФІТЦ	флуоресцеїна ізотіюціанат
ФЛР	фібробластолімфоцитарні розетки
ФНП α	фактор некрозу пухлин α
5-ФУ	5-фторурацил
BrdU	bromodeoxyuridine
CAR-клітини	CXCL12-abundent reticular cells
Col $\alpha 1$ (I)	collagen $\alpha 1$ (I)
c-Kit	tyrosine-protein kinase Kit or CD117
CXC	хемокіни підсімейства CXC, що характеризуються наявністю однієї амінокислоти, що розділяє N-кінцеві цистеїни
CXCL12	CXC motif chemokine 12 also known as stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)
CXCR4	CXC chemokine receptor type 4
DTR	рецептор дифтерійного токсину
GFP	green fluorescent protein
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54),
Jagged-1	ліганд рецептора Notch 1
Lepr	receptor for the fat cell-specific hormone leptin
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1
LSK-клітини	lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺ cells
LTC-ICs	long term culture initiating cells
Nes	nestin
NG2	neural/glial antigen 2
NK-клітини	natural killer cells
Notch	сигнальний шлях Notch

Osx	Osterix; транскрипційний фактор, відомий також як Sp7
pDCs	plasmacytoid dendritic cells
PDGF	platelet-derived growth factor
PPR	parathyroid hormone-related protein receptor
Sca-1	stem cells antigen-1
SCF	stem cell factor
SDF-1	stromal cell-derived factor 1 also known as CXC motif chemokine 12 (CXCL12)
SLAM	signalling lymphocyte-activation molecule
SNO-cells	spindle-shaped N-cadherin ⁺ CD45 ⁻ osteoblastic cells
SP	side population
TER-119	a lineage marker for erythroid cells
TGF	transforming growth factor
Tie2	receptor tyrosine kinase of the Tie family
TLR	toll-like receptor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLA-4	very late antigen-4
Wnt	один з внутрішньоклітинних сигнальних шляхів

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми досліджень. Стимуляція регенерації імунної системи є однією із найважливіших проблем теоретичної і практичної медицини. Відомо, що імунна система - одна з найбільш чутливих до дії шкідливих чинників навколишнього середовища, іонізуючого випромінювання і стресів різного характеру. Неминучі кількісні і якісні ушкодження імунної системи виникають і при первинних імунодефіцитах, багатьох розповсюджених інфекціях, аутоімунних, алергічних і онкологічних захворюваннях. Такі ситуації обтяжуються і тим, що імунодепресивною дією володіють і ліки багатьох класів: хіміотерапевтичні, гормональні, протизапальні та інші. При їх використанні виникають клінічно виражені імунодефіцити з ураженням центральних і периферичних органів імунної системи, що значно ускладнюють лікування.

Особливе перенавантаження патогенами у першу чергу зазнають бар'єрні тканини, у тому числі слизові оболонки і шкіра. Їх структура побудована так, що відділяє організм від навколишнього середовища механічним способом. Але це зовсім не гарантує захист. Є активний, більш чутливий до дії несприятливих чинників навколишнього середовища, механізм, і не дарма шкіру і слизові оболонки відносять до дифузних вторинних органів імунної системи – SALT (skin associated lymphoid tissue) і MALT (mucosa associated lymphoid tissue), клітини яких повинні справлятися з патогенами, що подолали механічний захист шкіри або слизових оболонок. У формуванні SALT і MALT приймає участь багато клітин, які тропні до бар'єрних тканин, а також рециркулюючих клітин. Велике значення у функціонуванні і регенерації бар'єрних тканин поряд з гемопоетичними клітинами мають і мультипотентні стромальні клітини (МСК) першого і другого типів (МСК-1 і МСК-2).

Вплив на організм іонізуючого випромінювання у високих дозах характеризується вираженим спустошенням імунної системи з дуже повільною її регенерацією. При летальному опроміненні відновлення імунної системи

практично не відбувається, а формується кістковомозковий синдром, обумовлений лізисом і гальмуванням утворення гемопоетичних клітин, формуванням імунodefіциту з розвитком опортуністичної інфекції, джерелом якої є уражені бар'єрні тканини [1, 2].

Природно, що основним патогенетично обґрунтованим методом лікування за цих обставин є відновлення клітин, структури і функцій імунної системи, а найбільш раціональним підходом для цього є трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) та їх прогеніторів, з яких формуються всі імунні клітини [3]. У теперішній час трансплантація ГСК широко використовується для лікування гематологічних, аутоімунних захворювань та імунodefіцитів різної етіології [4, 5, 6]. З метою відновлення мікрооточення ГСК застосовуються і МСК [7,8,9]. Але не ясно, за яких умов субпопуляції ГСК мають найбільші регенеративні властивості, і чи можливо їх підсилювати за допомогою МСК, які в організмі ГСК ефективно підтримують, але дія їх в цілому не однозначна [10].

В ембріональному і фетальному періодах велику роль у розвитку ГСК послідовно відіграє аортomezонефральна зона і потім - фетальна печінка та деякі інші органи. У дорослому організмі головним місцем розвитку ГСК є кістковий мозок, де відбувається самопідтримка, зберігання диференціовального потенціалу і проліферація клітин за участю міжклітинних контактів з МСК [11–15].

В залежності від мікрооточення і стадії диференціювання ГСК мають певні властивості і фенотип. Найбільш характерною поверхневою молекулою ГСК є CD34 (високоглікозильований трансмембранний протеїн типу сіаломуцину). Проте, було показано, що деякі ГСК не експресують CD34, але мають певні властивості незрілих ГСК [16]. До того ж, ГСК експресують CD90 (Thy1-антиген) при відсутності CD38 і молекул HLA-DR. Ці рецептори і лінійні антигени, включаючи панлейкоцитарний CD45, експресуються при комітації ГСК [17, 18].

Окремо виділяють групу LSK-клітин ($\text{lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$), які експресують Sca-1 і c-Kit, але не мають лінійних маркерів [19]. В основному ці клітини складають side population (SP) [20]. Клітини субпопуляції CD34^+ мають обмежену здатність до самовідновлення (короткоживучі ГСК, ST-HSC). CD34^+ -клітини є гетерогенними за своїми функціональними властивостями, складом транскрипційних факторів і активності внутрішньоклітинної сигналізації. Серед КР-ГСК виділяють клітини з експресією FLT3^+ лімфопоетичного напрямку та FLT3^- -клітини, відповідальні за мієлопоез [21].

Довгочасно репопулюючі ГСК (ДР-ГСК) експресують CD150 [22]. Певна субпопуляція ГСК експресує ранній CD133 (AC133) [23]. За фенотипом деякі автори виділяють у мишей 16 субпопуляцій ГСК, а у людини – 7 [24].

Розвиток ГСК значною мірою обумовлений мікрооточенням, одним із головних компонентів якого є МСК та їх похідні: SNO-клітини (spindle-shaped N-cadherin $^+$ CD45 $^-$ osteoblastic cells), Lepr^+ -клітини, CAR-клітини (CXCR12 abundant reticular cells), фібробласти, остеобласти, адипозні та деякі інші клітини і міжклітинний матрикс [11, 25–28].

У кістковому мозку МСК і ГСК знаходяться у тісному контакті, що забезпечує, разом з іншими факторами, перебування ГСК у дормантному стані, можливість самооновлення і вихід їх у відповідний час у диференціювання. Контакт з МСК також сприяє проліферативній активності ГСК і клітин-прогеніторів. Сформулювалось уявлення про так звані кістково-мозкові «ніші» ГСК, де останні перебувають у сприятливих умовах мікрооточення, і де забезпечується ефективна участь ГСК в процесах гемопоезу від дормантного стану ГСК до їх виходу у диференціювання [11,29]. ГСК і МСК в сумісній культурі *ex vivo* моделюють кісткомозкову «нішу» [30,31]. Здатність МСК кісткового мозку до підтримування функцій ГСК наразі використовується для розробки клінічних методик котрансплантації ГСК і МСК [9,32–36].

На відміну від МСК кісткового мозку, роль МСК тимуса – ще одного провідного органу імунітету – у функціонуванні ГСК і прогеніторів мало вивчена. Між тим, є важливі дані про участь мезенхімальних клітин уже в

ембріональному органогенезі тимуса [37], формуванні дорослого тимуса [38], утворенні ними тимусних «ніш», через які проходять і підпадають під позитивну та негативну селекцію тимоцити ранніх стадій диференціювання [38]. МСК тимуса також беруть участь і в контролі міграції тимоцитів [40].

Але невідомо, чи має значення контактна взаємодія МСК тимуса з ГСК і прогеніторами для реалізації регенеративної активності останніх.

Враховуючи вищезазначене, актуальність вивчення ролі контактної взаємодії ГСК і МСК тимуса у регенерації і функціонуванні імунної системи, сформульована мета і поставлені завдання дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в лабораторії імунології відділу клітинних та тканинних технологій ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» відповідно до НДР № 01070008763 «Вивчити особливості направлено диференціювання стовбурових клітин та клітин-попередників в нейрональні, ендотеліальні клітини та остеобласти/остеокласти з метою їх подальшого застосування для трансплантації» (здобувач – виконавець), № 0110U002200 «Вивчити деякі механізми взаємодії мультипотентних стромальних і гемопоетичних стовбурових клітин та залежні від їх властивостей процеси диференціювання лімфоцитів» (здобувач – виконавець), № 0113U000102 «Вивчити механізми імунокорекції при спільному застосуванні гемопоетичних стовбурових і мультипотентних стромальних клітин» (здобувач – виконавець) та відповідно до НДР № 0105U002647 «Вивчення радіопротекторної активності регіональних гемопоетичних клітин в експерименті» лабораторії імуногенетики Інституту експериментальної радіології Наукового центру радіаційної медицини НАМН України (здобувач – виконавець).

Мета роботи: підвищення ефективності регенерації імунної системи опромінених мишей трансплантацією МСК тимуса і преінкубованих з ними клітин кісткового мозку та фетальної печінки.

Задачі дослідження.

1. Адаптувати способи отримання і культивування ГСК і прогеніторів фетальної печінки мишей. Вивчити вплив кріоконсервування на життєздатність отриманих КФП і їх здатність до контактної взаємодії з МСК тимуса.
2. Оптимізувати методики одержання та культивування МСК тимуса в різних умовах *in vitro* та визначити їх життєздатність і здатність до лінійного диференціювання після кріоконсервування.
3. Визначити наявність мембранної спорідненості у МСК і деяких клітин гемопоетичного походження за їх контактною взаємодією *in vitro*.
4. Вивчити вплив сингенної трансплантації МСК тимуса на виживаність і тривалість життя загиблих летально опромінених мишей і активність клітин у регенерації імунної системи опромінених реципієнтів.
5. Дослідити вплив сингенної трансплантації преінкубованих з МСК тимуса ГСК і прогеніторів кісткового мозку на виживаність і середню тривалість життя загиблих летально опромінених мишей.
6. Вивчити вплив трансплантації нормальних і преінкубованих з МСК тимуса ГСК і прогеніторів фетальної печінки на виживаність мишей і середню тривалість життя загиблих тварин.
7. Дослідити можливість стимуляції у опромінених мишей клітинної регенерації трансплантацією преінкубованих з МСК тимуса ГСК і прогеніторів кісткового мозку та фетальної печінки.
8. Визначити можливість стимуляції імунологічної активності преінкубованих з МСК тимуса ГСК і прогеніторів кісткового мозку та фетальної печінки при їх трансплантації летально опроміненим мишам.

Об'єкт дослідження. Імунологічна, регенеративна і радіозахисна активність МСК тимуса, особливості регенеративної, імунологічної і радіозахисної активності ГСК і прогеніторів фетальної печінки і кісткового мозку, преінкубованих з МСК тимуса *in vitro*.

Предмет дослідження. Препарати ГСК і прогеніторів кісткового мозку дорослих мишей, фетальної печінки мишей і МСК тимуса мишей лінії СВА, виживаність і тривалість життя опромінених мишей, активність природного і адаптивного імунітету летально опромінених мишей – реципієнтів ГСК і прогеніторів після їх інкубації *in vitro* з МСК тимуса.

Методи дослідження. Летальне опромінення мишей лінії СВА у дозі 9 Гр на установці «Тератрон» з радіонуклідним джерелом ^{60}Co , потужність дози – 151 сГр/хв. Культивування МСК тимуса, ГСК і прогеніторів кісткового мозку і фетальної печінки. Дослідження активності МСК тимуса і кісткового мозку у формуванні колоній стромальними клітинами-попередниками фіброblastів (КУО-Ф) за допомогою культурального методу; індукція лінійного диференціювання МСК тимуса по остеогенному та адипогенному напрямкам *in vitro*; визначення цитотоксичної активності природних кілерів МТТ-методом; вивчення вмісту α/β - і γ -інтерферонів та фактору некрозу пухлин α (ФНПа) в супернатантах культур спленоцитів за допомогою культурального методу; визначення проліферативної активності спленоцитів під впливом фітогемаглютиніну (ФГА) в реакції бласттрансформації лімфоцитів МТТ-методом; оцінка показників поглинальної активності перитонеальних макрофагів з ФІТЦ-міченим стафілококом, а також бактерицидної активності клітин в НСТ-тесті; вивчення рівня аглютининів та гемолізінів в сироватці крові мишей і кількості антитілоутворюючих клітин (АУК) в селезінці; оцінка реакції гіперчутливості сповільненого типу за величиною інфільтративно-запальної реакції у місці повторного введення антигену; визначення кількості клітин кісткового мозку, маси і клітинності тимуса і селезінки, кількості лейкоцитів в периферичній крові і лейкоцитарної формули.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше показано, що МСК тимуса і гемопоетичні клітини мають виражену мембранну спорідненість, яка надає їм можливість контактної взаємодії, що *in vitro* проявляється формуванням фібробласто-лімфоцитарних асоціацій у вигляді розеток, коли до стромальної клітини міцно прикріплюється кілька гемопоетичних клітин.

Уперше встановлено, що трансплантація МСК тимуса стимулює регенерацію імунної системи, підвищуючи виживаність летально опромінених мишей в результаті відновлення кількості клітин в тимусі і кістковому мозку з підсиленням здатності останніх до утворення фібробластних колоній і активації природного і адаптивного імунітету. Отримані дані свідчать про можливість використання МСК тимуса для регенерації імунної системи у подальшому для корекції імунодефіцитів. Уперше виявлено, що в результаті преінкубації *in vitro* з МСК тимуса суттєво зростає радіозахисна, регенеративна і імунологічна активність ГСК і прогеніторів фетальної печінки і кісткового мозку, що при їх трансплантації проявляється підвищенням виживаності летально опромінених тварин з відновленням клітинності тимуса, зростанням кількості лімфоцитів у периферичній крові і вираженою стимуляцією природного і адаптивного імунітету. Встановлене підвищення регенеративної, імунологічної і радіозахисної активності ГСК і прогеніторів кісткового мозку та фетальної печінки в результаті попередньої контактної взаємодії з МСК тимуса, виявлене при трансплантації клітин летально опроміненим мишам, висвітлює фундаментальне значення кооперації ГСК з МСК тимуса у формуванні властивостей гемопоетичних клітин. Подовження виживаності летально опромінених мишей і суттєва стимуляція імунорегенеративної активності, виявлені при трансплантації сингенних МСК тимуса, є новими даними і розширюють уявлення про механізм імунобіологічної дії цих клітин. Методика контактної взаємодії МСК–ГСК може бути покладена в основу способу підвищення ефективності трансплантатів ГСК.

Практичне значення отриманих результатів. Запропонована модель для вивчення контактної взаємодії МСК і гемопоетичних клітин *in vitro* на основі їх мембранної спорідненості, яка проявляється утворенням фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР), сприяє розвитку наукового напрямку вивчення клітинної кооперації у функціонуванні імунної системи. Виявлений феномен і методику його отримання доречно використовувати в лабораторній практиці і клінічній роботі.

У практиці результати дослідження можуть бути використані в лабораторній роботі з різними типами гемопоетичних клітин і МСК в культурі *in vitro*. Отримані дані можуть бути основою для розробки способів підвищення ефективності клінічної трансплантації ГСК і прогеніторів шляхом попередньої інкубації цих клітин з МСК тимуса.

Результати наголошують і на реальну можливість застосування МСК тимуса у подальшому для проведення імунотерапії при гемоімунодефіцитах. Практичне значення мають і дані про збереження належної активності вивчених кріоконсервованих клітин, що свідчить про можливість збереження досліджених МСК і ГСК у кріобанках для подальшої трансплантації.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною науковою працею, в якій висвітлені власні думки та розробки автора, що дозволили вирішити поставлені завдання. Дисертант оволодів сучасними високотехнологічними імунологічними, цитологічними, культуральними та кріобіологічними методами. Робота містить теоретичні положення та висновки, сформульовані автором особисто. Використані в дисертаційній роботі положення чи гіпотези інших авторів мають відповідні посилання і використані лише для підкріплення ідей дисертанта. Планування дисертаційної роботи та обговорення основних її положень проведено спільно з науковим керівником академіком НАМН України, професором Г.М. Бутенком.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи оприлюднені на IX Українській науково-практичній конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, 2007), X Українській науково-практичній конференції з актуальних питань клінічної лабораторної імунології, алергології та імунології (Київ, 2008), VII Російській конференції імунологів Уралу «Актуальні питання фундаментальної і клінічної імунології та алергології» (Архангельськ, 2009), конференції "Нове у діагностиці, лікуванні і профілактиці імуно- та алергопатологій" (Львів, 2009), VIII конференції імунологів Уралу (Сиктивкар, 2010), Українській науково-практичній конференції з міжнародною участю

«Сучасні теорія та практика клінічної імунології та алергології» (Київ, 2010), VI з'їзді з радіаційних досліджень (Москва, 2010), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні питання клінічної та лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації» (Київ, 2011), XIII Українській науково-практичній конференції з актуальних питань клінічної та лабораторної імунології, алергології і імунореабілітації (Київ, 2012), 7th Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research associated with Fraunhofer Life Science Symposium 2012 «Stem Cells and Clinical Applications» (Leipzig, 2012), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми регенеративної медицини» (Київ, 2012), I Євразійському конгресі «Трансплантація стовбурових клітин» (Мінськ, 2013), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Трансплантація – сьогодення, минуле та майбутнє» (Київ, 2014), Міжнародній науково-практичній конференції «Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині» (Київ, 2017).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано в 25 наукових працях, серед яких 7 статей у наукових фахових виданнях (у т.ч. з них 2 статті у виданнях, що мають імпакт-фактор і входять до наукометричної бази даних Scopus), 4 статті у інших наукових (нефахових) виданнях, 2 патенти на корисну модель, 12 тез доповідей на фахових вітчизняних і міжнародних наукових конференціях.

Обсяг і структура дисертації.

Дисертаційна робота складається зі вступу, 6 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 221 сторінку (8,9 д.а.), з них основного тексту – 148 сторінок (6,1 д.а). Робота ілюстрована 11 таблицями, 18 рисунками та 7 фотографіями. Список використаних джерел містить 359 найменувань.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.

**КОНТАКТНА ВЗАЄМОДІЯ ГСК І ПРОГЕНІТОРІВ З МСК ТИМУСА У
ФОРМУВАННІ ТА ФУНКЦІОНУВАННІ ІМУННОЇ СИСТЕМИ****1.1 МСК та їх похідні у структурі і функціонуванні кістковомозкових
ніш ГСК****1.1.1. Гемопоетичне мікрооточення**

Те, що головним елементом мікрооточення, яке забезпечує функціонування ГСК, є стромальні клітини, встановлено з використанням декількох експериментальних підходів.

При трансплантації кісткового мозку (КМ) в селезінку опромінених мишей виявили, що колонії в центральних ділянках введеного кісткового мозку були переважно гранулоцитарними, в той час як клітини КМ, оточені строною селезінки, давали, головним чином, еритроїдні колонії. В області, де межі обох типів строми перекривалися, розташовувалися змішані колонії, що явно вказувало на визначальну роль строми у виборі напрямку розвитку власне гемопоетичних клітин [41].

Вдалося перенести кровотворне мікрооточення методом гетеротопної трансплантації стромальних клітин КМ [42]. При імплантації КМ фрагментом гемопоетичні клітини залишали трансплантат, а стромальні попередники будували нове мікрооточення, що заселялося репопулюючими гемопоетичними клітинами реципієнта. Дослідження такого процесу формування вогнищ ектопічного кровотворення принесли переконливі докази на користь величезної ролі взаємодії ГСК зі строною. Якщо імплантували КМ в непроникній для клітин дифузійній камері, в ній також виникало кровотворне мікрооточення з

кістковою тканиною, що заселялося гемопоетичними клітинами після порушення цілісності камери [43].

Важливі дані по вивченню стромальної регуляції ГСК отримані на мишах-мутантах з генетично зумовленим дефектом стромальної регуляції. Фенотипічно плейотропна мутація по гену Sl виражається у важкій макроцитарній анемії, стерильності, пов'язаній з відсутністю зародкових клітин, і білим кольором шерсті. ГСК у мутантів нормальні, що виявлялося при трансплантації їх опроміненим сингеним мишам дикого типу (+/+), у яких повністю при цьому відновлювалося кроветворення. Однак, при зворотній схемі досліду, при трансплантації нормальних ГСК мутантам, відновлення кроветворення не відбувалося. Якщо перенести селезінку мишей Sl/Sl спленектомованим сибсам, через деякий час опромінити їх і ввести нормальні ГСК, то в перенесеній селезінці кроветворні колонії не виникали. Навпаки, в разі трансплантації +/- селезінки мишам Sl/Sl на кроветворній території, що виникає, відбувався інтенсивний гемопоез, достатній навіть для корекції анемії. Таким чином, у мишей з генетично порушеною строю кроветворних органів виявлялася відсутність будь-якого дистанційно і системно діючого чинника регуляції ГСК. В одному і тому ж організмі може відбуватися нормальне кроветворення в одних ділянках і патологічне - в сусідніх. Все це однозначно свідчило про локальний характер регуляції проліферації ГСК стромальним гемопоетичним мікрооточенням [43].

Участь строми КМ в функціонуванні ГСК, як і в багатьох інших фізіологічних процесах, найбільш зручно вивчати в культурі клітин. Однак, протягом десятиліть створити тривалу культуру кроветворних клітин не вдавалося. Вирішальний внесок у подолання проблеми внесла розробка моношарових «декстеровських» культур ГСК за участю стромальних елементів [44]. Як виявилось, невдалі спроби пояснювалися відсутністю в культурах необхідних для життєдіяльності ГСК, стромальних елементів. При посіві в культуру кісткомозкових клітин відбувалося утворення колоній фібробластів. У моношарових культурах КМ гемопоетичні клітини часто розташовувалися

поверх фібробластів, створюючи вигляд «бруківки» (cobblestone area) [44]. Вважається, що саме в цих ділянках відбувалася взаємодія ГСК і МСК, індукувалося активне кровотворення так, що в культурі стабільно підтримувалися ГСК і проліферуючі клітини-попередники. І відбувалося це тільки в умовах прямого контакту кровотворних клітин з клітинами шару, що прилягає. При розділі клітин фільтром, непроникним для них, гемопоєз швидко вичерпувався. Причому, саме фібробласти КМ, але не селезінки, шкіри або кістки, істотно покращували виживання ГСК *in vitro* [43].

В умовах регенерації МСК кісткового мозку могли індукувати в ГСК експресію гена $\text{H3 TGF}\beta 1$. Такі ГСК підсилювали мегакаріоцитопоез, пригнічували диференціювання і проліферацію гранулоцитів, моноцитів і еритроцитів. У ГСК із зниженим рівнем експресії $\text{TGF}\beta 1$ підвищувалася здатність до утворення LTC-CFC (long-term culture-colony forming cell) в результаті культивування з МСК і стимулювалося утворення CAFC (cobblestone area-forming cell). Такі ГСК краще мігрували під стромальним шаром. У ГСК з підвищеним рівнем експресії $\text{TGF}\beta 1$ здатність до утворення LTC-CFC і CAFC знижувалася [33].

Виявлено клітини, які ініціюють тривалі культури (LTC-ICs - long term culture initiating cells), які отримали таку назву, оскільки виявляли здатність до колонієутворення протягом 5 тижнів і більше, і тільки при кокультивуванні зі стромальними фібробластами. Останні продукували фактор стовбурових клітин (SCF - stem cell factor), інтерлейкін-3 (ІЛ-3) і гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (КСФ-Г). $\text{CD}34^+\text{CD}38^-$ -клітини в цих умовах виявляли здатність до самовідновлення в межах 6-тижневого періоду. Інкубація ГСК і клітин-попередників в безсироватковому середовищі з додаванням FLT3-ліганда (receptor tyrosine kinase), SCF, ІЛ-3, ІЛ-6, КСФ-Г і фактора росту нервів (NGF - nerve growth factor) індукувала проліферацію з утворенням через 10 днів колоній із вмістом від 4 до 1000 клітин, 40% з яких включали більше однієї LTC-ICs. Протягом перших 10 днів кількість LTC-ICs зростала в 30 разів, а до кінця 1-3 тижня - в 50 разів. За відсутності розчинних стромальних факторів

відзначалося зниження ефекту. А найкращі результати отримані при культивуванні стимульованих цитокінами ГСК в тісному контакті зі стромою. Автори прийшли до висновку, що для збільшення кількості і поліпшення властивостей ГСК, культивованих з цитокінами, необхідний контакт ГСК зі стромальними клітинами. Проте, значна роль цитокінів в реалізації ефекту стромальних клітин теж очевидна. Безпосередній контакт з МСК діє на міграцію ГСК і профіль експресії генів підтримки ГСК під час експансії *ex vivo* [45]. У той же час внаслідок контакту з ГСК *in vitro* в залежності від часу кокультивування змінюється експресія генів у МСК. Спочатку реєструється підвищення експресії ICAM-1 та VCAM1, а після 72 годин відбувається зниження експресії генів, які кодують матриксні молекули (SPP1, COL6A1, 7A1, MMP1,3, TIMP1,3 і HAS1) і молекули адгезії до матриксу (ITGs), що може бути ефективним впливом МСК на тканинну міграцію ГСК [33].

При спільному культивуванні ГСК і МСК вдалося виділити за об'єктивними критеріями три різних компартмента: 1) середовище, в якому ГСК ростуть без перманентного контакту з МСК; 2) поверхня МСК; і 3) навколишнє середовище під шаром МСК. При виконанні фазовоконтрастної, конфокальної та електронної мікроскопії ідентифіковані клітини, що залишаються в суспензії, які прилипають до поверхні МСК, і клітини, які мігрували під «фідерний» шар. При цьому моношар МСК, що злився, може служити границею двох різних компартментів. Виявилося, що ці просторові обмеження впливають на проліферацію і диференціювання ГСК. Так, прикметною ознакою став стан клітинного циклу культивованих ГСК. Відомо, що відразу після виділення ГСК з периферичної крові вони знаходяться у фазі G0/G1. Статус змінюється при вирощуванні ГСК зі стимулюючими факторами. При спільному культивуванні ГСК і МСК значне і послідовне збільшення G2/M-клітин спостерігалось над шаром МСК, а не серед клітин, що не прилипають або перебувають під шаром МСК. Так що міжклітинні контакти на поверхні шару МСК сприяють поділу клітин, а ГСК, що мігрували під шар МСК, зберігають фенотип і значно сповільнену швидкість поділу. Формування

підшарової фракції ГСК уповільнювалося при блокуванні $\beta 1$ -інтегринів або рецептора хемокінів 4 типу (CXCR4 - chemokine receptor type 4). Ефект ще більш посилювався при комбінованій блокаді, вказуючи на синергічну роль $\beta 1$ -інтегринів і осі фактора стромального походження SDF1/CXCR4 у формування цієї фракції. Неясно, чи середовище під шаром МСК активно підтримує незрілий стан ГСК, або МСК створюють обстановку ніші, яка своїми механізмами привертає на себе міграцію ГСК, які перебувають в спокої. Брати участь можуть обидва механізми. Але вдалося показати, що мігрують через шар МСК переважно $CD34^+CD38^-$ -ГСК [30].

Таким чином, здавалося би, значно спрощена експериментальна ситуація в культурі *ex vivo*, вже, тим не менш, ставить ряд питань, анонсує складність процесів, що відбуваються в нішах *in vivo*. У даний час більшістю авторів виділяються кістковомозкові ніші двох типів: ендостальні і судинні [11, 25].

1.1.2 Ендостальна ніша

У функціонуванні ендостальної ніші основне значення надається остеобластам. Зрілі остеобласти виявляються уздовж ендоста на межі між кісткою і паренхімою КМ. Там же знаходяться веретеноподібні N-кадгерин⁺CD45⁻-остеобласти (spindle-shaped N-cadherin⁺CD45⁻ osteoblastic cells; SNO-клітини), які експресують високий рівень N-кадгеріна і є незрілими клітинами. Морфологічно вони значно відрізняються від кубічних зрілих остеобластів [46].

Основною функцією остеобластів при кістковому ремоделюванні є секреція протеїнів немінералізованого кісткового матриксу, іменованого остеїд. Позаклітинний матрикс відіграє велику роль у функціонуванні ніш, зокрема, у впливі на міграцію ГСК. В ендості знаходяться колаген I і IV типу, фібронектин і ламінін. Колаген IV типу і ламінін пов'язані з кістковомозковими судинами, включаючи артеріоли, вени і синуси. Фібронектин розподілений і в центральній частині КМ. Всі білки, за винятком колагену IV типу, присутні в кістці. Фібронектин, колаген III і IV типу і ламінін знаходяться також в

періоді. Синтез матричних білків інтенсифікується клітинами остеобластичної лінії у міру їх диференціювання від преостеобластів до зрілих остеобластів. Вони виробляють у великій кількості і остеопонтин, остеокальцин, сіалопротейн і лужну фосфатазу [47]. Певне місце в ніші належить також і полісахаридам, зокрема, гіалуронової кислоти.

Також важливо, що остеобласти регулюють диференціювання остеокластів. Як і адипоцити, остеобласти походять із МСК, що диференціюються. Здатність МСК до мультилінійного диференціювання і наявність на її початку загальних міжлінійних генетичних механізмів в її процесі підтверджується тимчасовою експресією у преадипоцитів продуктів, характерних для остеобластичної лінії, і навпаки. Для вивчення ролі остеобластів у формуванні кістковомозкової ніші ГСК використано досить багато підходів. Встановлено, що первинні остеобласти людини підтримують проліферацію примітивних гемопоетичних прогеніторів *in vitro*, що свідчить про можливу участь остеобластів в гемопоезі [48].

In vivo активна роль остеобластів як регулятора ГСК в нішах була показана у кількох роботах [46, 49]. Використовували вплив конститутивно активованої системи паратгормон (PTH - parathyroid hormone)/пептидний рецептор паратгормону (PPR - parathyroid hormone-related protein receptor), що знаходиться під контролем остеобластного промотора колагену $\alpha 1$ (I) (Col $\alpha 1$ (I)). У PPR-трансгенних мишей значно збільшувався вміст ГСК в КМ в поєднанні з розширенням площі губчастої кістки і підвищенням кількості трабекулярних остеобластів, що експресують високий рівень Jagged-1, ліганда сигнального шляху Notch (Notch ligand receptor). Активація PPR паратиреоїдним гормоном приводила до зростання кількості остеобластів в стромальних культурах, а додавання інгібітору γ -секретази, яка пригнічує активацію Notch, запобігало ефект [49]. Нарешті, при дослідженні стромальних культур мишей дикого типу, стимульованих паратгормоном, відтворювалася ситуація, що спостерігалася в культурі клітин PPR-трансгенних мишей, що,

загалом, дозволило авторам зробити висновок про участь остеобластів як регуляторного компонента при формуванні кістковомозкових ніш ГСК.

Показано також, що клітини, які експресують Tie2 і N-кадгерін у мишей, що отримували 5-фторурацил (5-ФУ), ідентифіковані як ГСК у спокої, перебували в контакті з остеобластами, які вистилають кістку і експресують остеокальцин [50].

Виснаження остеобластів з використанням фрагмента 2,3-kb промотора Col $\alpha 1$ (I), що забезпечує експресію тимідинкінази (Col2,3 Δ ТК), з подальшим введенням ганацикловіра призводило до зменшення кількості еритроїдних попередників і В-лімфоцитів. Разом з тим, відбувалася активація екстрамедулярного гемопоезу в селезінці і печінці. В результаті абляції ендостальних остеобластів порушувався і процес самооновлення довгочасно репопулюючих гемопоетичних стовбурових клітин (ДР-ГСК). Таким чином, була продемонстрована істотна роль клітин остеобластної лінії в гемопоезі і отримано дані про те, що і поза кістковим мозком також є клітинні елементи, здатні підтримувати кровотворення. У багатьох дослідженнях з міченими ГСК встановлена їх локалізація після трансплантації в ендостальному регіоні, і це відповідає даним про те, що довготривало репопулюючі і утримуючі бромдезоксипуридин (BrdU-bromodeoxyuridine) ГСК переважно локалізовані поблизу SNO-клітин в ендості [51].

Наведених даних, здавалося б, досить для закріплення за остеобластами основної ролі в створенні ніш ГСК. Однак, PPR і Col $\alpha 1$ (I) експресують і продукують CXCR12 ретикулярні клітини (CAR-клітини - CXCR12 abundant reticular cells), що знаходяться в деякому віддаленні від ендоста [52].

До того ж, дані про внесок остеобластів, особливо зрілих остеобластів, в підтримці ГСК при подальшому розгляді виявилися суперечливими. Показано, що обробка паратгормоном збільшує кількість короткоживучих ГСК не внаслідок експансії остеобластів, а завдяки продукції Wnt-ліганда Wnt10b Т-клітинами. Більш того, не завжди збільшення кількості остеобластів досить для експансії ГСК. Обробка мишей кістковим анаболіком стронтіном (strontin) веде

до експансії зрілих остеобластів, але не впливає, ні на кількість, ні на функцію ГСК. Навпаки, у мишей з хронічним запальним артритом, що виснажує кількість остеобластів, ГСК залишаються у нормальній кількості. Раніше також було встановлено, що кількість ГСК не змінювалася у мишей зі зменшеною кількістю зрілих остеобластів. І нарешті, умовна делеція хемокіна CXCL12 (CXCL12 - CXC motif chemokine 12, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)) [53] або SCF в зрілих остеобластах не впливають на вміст ГСК в КМ [54].

В оцінці ситуації важлива та обставина, що лінія остеогенних клітин гетерогенна, і клітини різного ступеня зрілості можуть володіти різною функціональною активністю. Так, примітивні остеогенні клітини експресують вищий рівень CXCL12 і SCF і підтримують тривалу репопулюючу активність ГСК краще, ніж більш диференційовані клітини [55], а дослідження в системі сигналізації CXCL12-CXCR4 виявило її необхідність для хоумінга і підтримки ГСК та імунних клітин, що розвиваються, включаючи В-лімфоцити, плазмацитоїдні дендритні клітини (pDCs -plasmacytoid dendritic cells) і натуральні клітини кілери (NK-клітини-natural killer cells) в КМ [53].

Мабуть, ендостальний регіон представляє собою мікрооточення, яке включає остеогенні клітини різного ступеня зрілості, що підходить для підтримки лімфоїдних попередників, і, можливо, велику роль в цьому відіграє N-кадгерін. Останній є кальцій-залежною гомофільною молекулою, яка формує адгезивні сполуки. Він експресується субпопуляціями остеогенних клітин з найбільшою активністю у незрілих клітинах, а також ГСК і їх клітинами-попередниками [55]. Принаймі, деякі субпопуляції ГСК локалізуються поблизу SNO-клітин, і N-кадгерін включається в адгезію ГСК до остеогенних прогеніторів [55]. Тому передбачалося, що остеобласти підтримують функцію ГСК формуванням прямої взаємодії через N-кадгерін опосередковану адгезію. Однак, функціональні дослідження з використанням умовного нокауту N-кадгеріна в гемопоетичних і стромальних клітинах, остеопрогеніторах і остеобластах не виявили жодних змін у вмісті ГСК, хоча суперекспресія N-кадгеріна дещо збільшувала їх кількість [56].

Активовані остеобласти можуть продукувати остеопонтин, який лімітує експансію ГСК, а також ангіопоетин і тромбопоетин, які зв'язуються з Tie2 і рецептором тромбопоетина Mpl (myeloproliferative leukemia protein) відповідно, і сприяють дормантному стану ГСК [50].

Можна припустити, що певна суперечливість деяких результатів обумовлена тим, що або в ніші функціонують різні специфічні популяції остеобластів, або для здійснення певних функцій не потрібні виключно остеобласти, і вони можуть витіснятися іншими типами клітин, компенсуючи кількісну або функціональну нестабільність остеопрогеніторів.

За умови активації PPR позитивним регулятором ГСК є також Jagged-1. Незважаючи на те, що Jagged-1 проявляє себе як вирішальний фактор при PPR-активованому остеобластами нарощуванні ГСК, він не бере участі в їх гомеостазі [49, 50]. Пов'язаними з остеобластами негативними регуляторами вважаються остеопонтин і канонічний інгібітор Wnt Dkkorf 1 (canonic ingibitor Wnt Dkkorf 1). Разом з тим, виявлена підтримуюча роль Wnt в регуляції остеобластами В-лімфоцитопоеза. А надлишкова експресія канонічного інгібітора Wnt Dkkorf 1 призводить до втрати стану покою ГСК, що супроводжується зниженням серійного трансплантаційного потенціалу [57].

CXCL12, що експресується остеобластами, разом з CXCR4 відіграє одну з головних ролей в хемотаксисі, виживанні і утриманні ГСК в КМ. Велике значення мають також SCF, ІЛ-8 і менше - деякі інші цитокіни, що активують клітини через асоційований з функцією лімфоцитів антиген 1 (LFA-1 -lymhocyte function-associated antigen 1), дуже пізній антиген 4 (VLA-4-very late antigen -4), дуже пізній антиген 5 (VLA-5-very late antigen-5), адгезивну молекулу CD44 і MT1-матриксну металлопротеїназу [58].

Виділення ГСК з різних регіонів КМ показало, що CD150⁺CD48⁻LSK (lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺)-клітини із ендостальної ніші мають вищий проліферативний і хоумінговий потенціал, ніж ГСК такого ж фенотипу, отримані з центральної частини КМ. Встановлено також, що CD150⁺CD48⁺-LSK-клітини, раніше визначені як попередники В-лімфоцитів, здатні до мультилінійного

диференціювання, однак тільки коли вони ізольовані з ендостальної області [59].

На 3D-моделі *ex vivo* двоспрямована міграція CD34⁺-клітин досягала піку через 24 години культивування в простих сфероїдах, що складаються з неіндукованих МСК. А з сфероїдів, що складаються з остеоіндукованих МСК, або змішаних, ці клітини практично не мігрували. Вони залишалися в центральній частині змішаного сфероїда, сформованого остеоіндукованими клітинами, що свідчить про суттєві відмінності в активності адгезії в залежності від властивостей стромальних клітин. Важливо також зазначити, що у ГСК, що адгезують до остеоіндукованих МСК, пригнічується в значній мірі проліферативна активність, реалізуючи ситуацію, подібну до тієї, що простежується в нішах ГСК *in vivo* [60].

Остеобластна ніша підтримує ГСК в стані спокою в фазі G0, а відомо, що найбільша активність у відновленні гемопоезу обумовлена ГСК, що знаходяться саме в такому стані [50].

В ендостальній області розташовуються тривало репопулюючі ГСК, що зберігають мітку BrdU. Однак, тільки 6 % тривало репопулюючих ГСК, ідентифікованих за сигнальними маркерами, що активують молекули лімфоцитів (SLAM - signaling lymphocyte activation molecule), були позитивні по BrdU. Дискусійне значення мають і дані про те, що кількість ГСК не зменшувалася в деяких експериментах у мишей зі зменшеною кількістю остеобластів. Також кількість ГСК не зменшувалась і при умовному виснаженні у остеобластів N-кадгеріна і CXCL12 [54]. А деякі подальші дослідження не підтвердили значущою асоціації між остеобластами і ГСК. До того ж, певний вплив на ГСК в експериментах з вивченням ролі PPR може бути пов'язаний з експресією цих молекул на CAR-клітинах.

Проте, абсолютно очевидно, що остеогенні клітини відіграють певну роль у формуванні мікрооточення ГСК в ендості, формуючи так звану ендостальну нішу. Її вплив на функціонування ГСК і гемопоез може визначатися мембранними контактними взаємодіями і цитокін-рецепторними зв'язками,

реалізація яких багато в чому залежить від субпопуляційної приналежності і ступеня зрілості взаємодіючих клітин, що не завжди може бути враховано в експериментах.

І все ж, винятковість ролі остеогенних клітин у формуванні кісткомозкової ніші заперечується ще й тим, що в онтогенезі кровотворення послідовно розвивається в жовтковому мішку, аорто-гонадо-мезонефральній області, фетальній печінці, плаценті і може здійснюватися в селезінці. Однак, у всіх цих областях, з яких можуть бути виділені ГСК, відсутні остеобласти, проте всюди містяться периваскулярні клітини, просторово тісно пов'язані з генерацією ГСК. Також показано, що лінія ендотеліальних клітин фетальної печінки AFT024 ефективно підтримує ГСК *in vitro*.

Зазначена суперечливість результатів вивчення ролі остеобластів та інших стромальних клітин у формуванні ендостальної ніші ГСК і, з іншого боку, поява даних про участь в процесі ендотеліальних і периваскулярних клітин аргументували дослідження їх значення і сприяли формуванню уявлень про судинні ніші.

1.1.3. Судинна ніша.

Важливу роль компонентів ніші грають периваскулярні і ендотеліальні клітини. Вивчення судинного компонента у формуванні ніш ГСК дозволило по-новому поглянути і на ендостальну нішу, так як стало зрозуміло, що вплив цього регіону не обмежується власне ендостальною поверхнею, як передбачалося спочатку. Насправді ендост добре васкуляризований синусоїдами з CAR-клітинами (CXCL12-abundant reticular cells) і артеріолами, що проходять уздовж ендостальної області. Навколосудинні ділянки також асоційовані з ГСК. Після трансплантації опроміненим мишам ГСК переважно мігрують до ендостальної поверхні трабекулярних зон, хоча і розподіляються випадково у неопромінених тварин. Вважають, що експансія ГСК в ендостальній області після пошкодження КМ пояснюється тісною близькістю

остеобластів і кровоносних судин. Летальне опромінення розриває синусоїдальну мережу, що і сприяє перерозподілу ГСК в ендост [61].

Саме поблизу від синусоїдальних судин ендоста виявили ГСК по SLAM-маркерах ($CD150^+$, $CD48^-$ і $CD41^-$) [62]. З використанням лінії мишей, що експресують зелений флуоресцентний білок (GFP-green fluorescent protein) внаслідок вбудовування гена білка в *sxcl12*-локус, в контакт з ГСК виявляли CAR-клітини і в ендостальному, і в неендостальному кістковому мозку, але головним чином біля синусоїдів. У синусоїдальних ділянках губчастої кістки виявляються зони з високою експресією CXCL12 і E селектину, важливих для хоумінга і розселення нормальних і лейкемічних ГСК. Про взаємодію ГСК з судинами і периваскулярними клітинами говорять і результати активації симпатичних нервів, закінчення яких обплітають периваскулярні клітини, що дозволяє регулювати циркадну, стресову і індуковану мобілізацію ГСК за допомогою звільнення норадреналіну, що змінює судинну проникність і модулює експресію CXCL12 [63]. До того ж, симпатична нервова система відіграє критичну роль в регенерації КМ, очевидно, шляхом реалізації подібних механізмів, коли викликана хіміотерапією абляція адренергічної іннервації гальмує відновлення чисельності ГСК [64].

1.1.3.1 CAR-клітини

CAR-клітини є мезенхімальними прогеніторами, здатними до диференціювання в адипоцити і остеобласти. Більшість індивідуальних CAR-клітин експресують одночасно і адипогенні, і остеогенні гени, включаючи *pparg*, *runx2* і *osx*, і мають потенціал до диференціювання в адипоцити і остеобласти в культурі. Відповідно до цього, короткочасна абляція CAR-клітин *in vivo* порушує адипогенний і остеогенний диференціальний потенціал кісткомозкових клітин. Точний клітинний склад CAR-субпопуляції не відомий, хоча встановлено, що в ній представлені клітини, які експресують

лептіновий рецептор (Lep^r-receptor for the fat cell-specific hormone leptin), нестін, Mx1, транскрипційні фактори Prx 1 і Osx [58,59].

Lep^r⁺-клітини мають фенотип попередників МСК, складають 70% CD45⁻/TER119⁻PDGFR α ⁺-МСК КМ і синтезують SCF і CXCL12. При фенотипуванні вони частково перекриваються з клітинами, позитивними на нестін, і є популяцією, що самооновлюється і необхідна для остео- і адипогенної регенерації [65].

В контакті з CAR-клітинами виявляється більшість CD150⁺CD48⁻CD41⁻ ГСК (97%), ранні попередники В-клітин, плазматичні клітини, плазмоцитоїдні дендритні клітини (DCs-plasmacytoid dendritic cells) і NK-клітини, що свідчить, про їх функціонування як елементів ніші для ГСК і попередників всіх імунних клітин, які генеруються кістковим мозком (так звані «ретикулярні» ніші) [66].

CAR-клітини тісно прилягають до синусоїдального ендотелію. Однак вони не експресують панендотеліальний маркер (PECAM-1-platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 or CD31) і маркер гладком'язових клітин α актин (SMA α -smooth muscle actine A). Дані свідчать, що CAR-клітини є популяцією, відмінною від ендотеліальних і гладком'язових клітин. CAR-клітини не експресують також CD45, Sca-1, але мають VCAM-1, CD44, рецептор ростового фактора тромбоцитарного походження альфа (PDGFR α - receptor platelet-derived growth factor α) і рецептор ростового фактора тромбоцитарного походження бета (PDGFR β - receptor platelet-derived growth factor β) [52].

Для висвітлення ролі CAR-клітин *in vivo* використана модель трансфекції рецептора дифтерійного токсину (DTR - receptor diphtheria toxin). Комплекс DTR-GFP був впроваджений в cxcl12-локус (cxcl12-DTR-GFP), що дозволило введенням миші дифтерійного токсину видаляти клітини, які експресують CXCL12. Остеобласти, що вкривають кістку, і ендотеліальні клітини в цих умовах не пошкоджувалися, але спостерігалася виражена деплеція CAR-клітин з двократним зменшенням вмісту в КМ ГСК; знижувалася також і кількість проліферуючих В-клітинних і еритроїдних прогеніторів. Більшість із решти

ГСК перебували в стані спокою з високою експресією генів, відповідальних за мієлоїдний шлях розвитку.

В цілому, результати показують, що CAR-клітини є адипо-остеогенними клітинами-попередниками, які продукують велику кількість критично важливих для функціонування ніші цитокінів і які необхідні для проліферації В-клітинних, плазмocyтоїдних ДК, NK-клітин, еритроїдних прогеніторів і, в той же час, збереження ГСК в недиференційованому стані.

У людини CAR-клітинами, можливо, є кістковомозкові стромальні попередники, що активно продукують CXCL12, які експресують асоційовану з меланомою молекулу клітинної адгезії - (MCAM-melanoma cell adhesion molecule), іменовану також CD146 [52, 66].

1.1.3.2 Клітини, що експресують нестін

Білок проміжних філаментів нестін (Nes, nestin) експресується нейрональними клітинами, а також виявляється в різних периваскулярних і ендотеліальних клітинах. У КМ трансгенних мишей, у яких GFP експресується під контролем нейроспецифічного регуляторного елемента Nes-гена, клітини, що експресують GFP, названі Nes-GFP⁺, виявляють виключно периваскулярне розташування. З Nes-GFP^{bright}-клітинами в області артеріол асоціюються ГСК, що перебувають в спокої, і їх інтеграція зберігається після введення 5-фторурацилу, що свідчить, що періартеріолярні структури можуть створювати муфту для ГСК в спокої, і після гемотоксичного пошкодження. Проліферуючі ГСК зростають в кількості по напрямку від артеріол до синусоїдів. Маркер перицитів NG2 (neural/glial antigen) переважно мітить асоційовані з артеріолами Nes-GFP⁺-клітини, тоді як Lepr переважно мітить Nes-GFP^{dim}, асоційовані з синусоїдами. Делеція NG2-клітин індукує вихід ГСК в клітинний цикл і розселення далеко від артеріол.

До Nes-GFP⁺-клітин прилягають 60% CD150⁺CD48⁻Lin⁻-ГСК. Експресія mRNA CXCL12 і SCF багато вище у відсортованих CD45⁻Nes⁻GFP⁺-клітин в порівнянні з відсортованими CD45⁻Nes⁻GFP⁻ [67].

Після *in vivo* деплеції нестін⁺-клітин з використанням DTR-опосередкованої нокаутної технології кількість ГСК в КМ редукувалася в 2 рази, але зростала в селезінці, що свідчить про залучення клітин, які експресують нестін, в утримання ГСК в КМ.

Відсортована фракція Nes-GFP⁺ містила клітини, що диференціюються в адипоцити і остеобласти, які формують мезенхімальні сфери і колонієутворюючі одиниці фібробластів (КУО-Ф). З урахуванням викладених властивостей клітини ідентифіковані як МСК [67]. Вважається, що останні вносять значний вклад у формування ніші [68–70]. Нестін виявляється також у субпопуляції CD146⁺-клітин у людини і експресується фракцією периваскулярних стромальних клітин мишей разом з тромбоцитарним рецептором ростового фактора PDGFR- α [76]. За тестом утворення КУО-Ф ці клітини складають практично всі кістковомозкові МСК. Вони розташовуються поблизу ГСК біля волокон симпатичних нервів і експресують гени, відповідальні за збереження та утримання ГСК в КМ, включаючи контролюючі CXCL12 і SCF [71].

Периваскулярні CD146⁺CD45⁻МСК людини, які знаходяться в кістковому мозку, здатні відновлювати гетеротопічні кістковомозкові ніші, що свідчить, що МСК і їх прогенітори обумовлюють розвиток ніш ГСК і регулюють гемопоез. Функціонально і фенотипічно близькі мезенхімальні прогенітори мишей CD51⁺CD105⁺CD90⁻CD45⁻Tie2⁻ здатні відновлювати ніші ГСК, формуючи донорську ектопічну кістку через енхондральну осифікацію, створюючи при цьому кістковомозкову порожнину з судинами і ГСК реципієнта [72]. Іншими дослідженнями також показано, що PDGFR α ⁺Sca-1⁺CD45⁻TER119⁻-маркери ідентифікують МСК, здатні диференціюватися в остеобласти, ретикулярні клітини і адипоцити *in vivo*. Ясно, що МСК - один з основних елементів ніші, що підтримують самовідновлення ГСК. Важливо

відзначити, що по відношенню до примітивних $CD34^+CD38^-$ ця здатність найбільш виражена у МСК з КМ, кордової крові і менш - у МСК адипозного походження, що, за відсутності кореляції по цитокиновому профілю, узгоджується з високим ступенем адгезії до ГСК МСК кісткового мозку і кордової крові проти МСК адипозного походження. Також тільки МСК КМ і кордової крові продукують велику кількість N-кадгеріна, VCAM-1, нейральної молекули клітинної адгезії (NCAM-1-neural cell adhesion molecule1) і інтегринів, що загалом, на думку авторів свідчить про те, що один з основних механізмів підтримки самооновлення ГСК за допомогою МСК складається з міжклітинної контактної взаємодії [73].

1.1.3.3 Ендотеліальні клітини

Ендотеліальні клітини, що вистилають синусоїдальні кровоносні судини в КМ, також є претендентами на одну з головних ролей в регуляції функцій ГСК. Важливість судинного компонента у формуванні ніш можна було припустити вже на підставі тісного структурного зв'язку гемопоезу з судинною мережею.

З синусоїдальним ендотелієм асоціюються високозбагачені ДР-ГСК ($CD150^+CD48^-CD41^-Lin^-$) [74] і позитивні по фактору транскрипції $Nr2f6^+$ -ГСК, які безпосередньо прилягають до клітин, позитивних на кадгерін, характерний для васкулярного ендотелію (VE- vascular endothelial) [75], що вже саме по собі може розглядатися як вагомий аргумент на користь ендотеліальних клітин як елементів, які визначають основні властивості ніші. Це припущення підтримується виявленням здатності ендотеліальних клітин до підтримки гемопоезу шляхом експресії поверхневих маркерів, включаючи E селектин, і високим рівнем секреції ангіогенних факторів. Це фактор росту фібробластів 2 (FGF-2, fibroblast growth factor 2), дельтоподібний ангіогенний фактор-1 (DLL-1-delta-like 1), інсуліноподібний зв'язуючий фактор 2 (IGFBP2- insulin like growth factor binding protein 2), ангіопоетин 1 (ANGPT1- angiopoietin1), DHH- Desert hedgehog і епідермальний фактор росту (EGF - epidermal growth factor).

Селективна активація AKT1 (внутрішньоклітинного ферменту, одного з трьох членів сімейства протеїнкіназ B) в ендотеліальних клітинах дорослих мишей після мелоабляції збільшує кількість ГСК і прискорює гематологічне відновлення [76].

Продукція CXCL12 васкулярним ендотелієм зміцнює адгезію CD34⁺-клітин за допомогою посилення експресії взаємодіючих інтегринів VLA-4 і LFA-1 з відповідними ендотеліальними лігандами - VCAM-1 і молекули міжклітинної адгезії 1 (ICAM-1 - intercellular adhesion molecule 1). Відомо також, що ендотеліальні клітини, отримані з різних тканин, можуть підтримувати ГСК в культурі клітин. Однак ці результати не виключають можливість того, що ендотеліальні клітини посилюють проліферацію ГСК опосередковано, регулюючи активність інших клітин - кандидатів в компоненти ніші, включаючи CAR-клітини і Nes⁺- клітини, хоча в деяких роботах показано, що кількість ГСК редукується, якщо CXCL12 або SCF видаляється з ендотеліальних клітин з використанням Tie2-Cre-мишей, що свідчить, що власне самі ендотеліальні клітини необхідні для підтримки пулу ГСК [53, 54].

Руйнування VEGF2- і VE-кадгерін-залежних сигнальних шляхів з використанням моноклональних антитіл показує, що синусоїдальні ендотеліальні клітини контролюють пул ГСК, підтримують самовідновлення і запобігають виснаженню ГСК в безсироватковій культурі та *in vivo* через Notch-сигналізацію [77]. Ендотеліальна специфічна делеція Jagged-1 з використанням VE-cadherin-cre показує, що синусоїдальні ендотеліальні клітини прямо залучені в самовідновлення ГСК в умовах гомеостатичних і регенеративних процесів тоді, коли периваскулярні клітини, включаючи PDGFR α ⁺CD51⁺-МСК, не змінюються в кількості і здатності генерувати КУО-Ф [78]. Навпаки, CD31^{hi}endomucin^{hi}-ендотеліальні клітини модулюють неоангіогенез через Notch-сигналізацію і шляхом впливу на рівень периваскулярних прогеніторів. Стан активації ендотеліальних клітин може відігравати критичну роль в секреції факторів, що визначають долю ГСК [76].

Висловлюється припущення, що вплив на ГСК має SCF, що продукується ендотеліальними клітинами і поза нішами [54].

Експресія Е-селектину (що знаходиться виключно на ендотеліальних клітинах) сприяє ГСК-проліферації, тоді як антагоністи Е-селектину сприяють стану спокою і самооновлення [79]. Можливо, ендостальна ніша забезпечує гіпоксичне середовище для підтримки ГСК в стані спокою, в той час як судинна ніша дозволяє ГСК проліферувати і диференціюватися в середовищі з більш високим вмістом кисню [80]. Показано, що гіпоксія і фактори адаптації до неї є обов'язковими умовами для нормального функціонування кістковомозкових ніш ГСК [81].

1.2 МСК тимуса; участь у формуванні органу і функціонуванні імунної системи

1.2.1 Основні загальні властивості МСК, структурно-функціональні особливості МСК тимуса

Вперше МСК були виділені із кісткового мозку як клітини, що формують *in vitro* колонії фібробластів. Ці клітини були визначені як колонієутворюючі одиниці фібробластів (КУО-Ф) [82]. Кількість КУО-Ф у культурі клітин визначає її клоногенний потенціал. Міжнародне товариство з клітинної терапії запропонувала для МСК мінімальні критерії: фібробластна морфологія, адгезія до пластику, утворення колоній фібробластних клітин, облігатна експресія CD73, CD90 і CD105 при відсутності експресії CD116 і CD14 (моноцити, макрофаги), CD34 (гемопоетичні попередники), CD31 (ендотеліальні клітини), CD45 (лейкоцити), CD19, CD79a (В-лімфоцити) і HLA-DR [83]. Найважливішою властивістю МСК є притаманна клітинам облігатна здатність до диференціювання по трьох напрямках: остеогенному, хондрогенному і адипогенному [84].

У кістковому мозку вміст МСК складає лише 0,01-0,001%. В інших тканинах кількість МСК також невелика. Але вони можуть бути виділені, очищені і розмножені у культурі *in vitro*. Джерелом МСК є кістковий мозок, жирова тканина (судинно-стромальна фракція), тимус, селезінка, лімфатичні вузли, пуповина, фетальна печінка та деякі інші органи і тканини. За певних умов отримані МСК можуть бути направлені в диференціювання у спеціальних середовищах за остеогенним, хондрогенним і адипогенним напрямками. Іноді згадується і можливість трансдиференціювання МСК. Але це питання не вважається вирішеним остаточно. Поверхневий фенотип клітин із різних джерел по мембранним маркерам, за виключенням облігатних молекул, може варіювати в залежності від походження клітин [85].

Необлігатно МСК також експресують такі молекули клітинної поверхні: STRO1(stromal precursor antigen 1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), SH2 (Src homology 2) SH3/SH4, CD271, GD2 (ganglioside 2), SSEA4 (stage-specific embryonic antigen-4) [86, 87] і хемокінові рецептори: CXCR4, CXCR6, CXCR1, CCR1, CCR7, через які відповідають на хемокіни CXCL12, CXCL16, CXCL1, CCL3, CCL19 і беруть участь у хоумінгу. В експериментальних умовах після внутрішньовенного введення МСК відбувається їх міграція у вогнища запалення, де продукуються прозапальні цитокіни. Ефективну мобілізацію МСК із кісткового мозку можна викликати введенням G-CSF и SDF1 (CXCL12) [88]. Відомо, що МСК володіють тропізмом до ушкоджених тканин, що притаманне і мікровезикулам МСК [89].

1.2.2 Участь МСК тимуса в ембріональному органогенезі і функціонуванні дорослого тимуса

Участь мезенхіми у формуванні тимуса миші можна побачити вже в ембріональному періоді. Тимус виникає як вирост епітелію 3-4 пари жаберних карманів, далі епітеліальне утворення спускається по шийі і оточується примітивною сполучною тканиною – перитимічною мезенхімою. Потім

навколо епітеліального зачатка виникає сполучнотканинна капсула і до 12 доби вагітності тимус занурюється у товстий шар мезенхіми [90].

На цій стадії розвитку у тимус надходять ГСК, що походять із аорто-гонадо-мезонефральної області (AGM-області). Оскільки кровоносних судин в епітелії ще немає, ГСК мігрують в нього із близько розташованої васкулярної сітки, перетинаючи перитимічну мезенхіму і тимічну капсулу. Дослідження клітинних маркерів на моделях трансгенних тварин показали, що мезенхіма навколо капсули тимуса походить із клітин, які мігрують із нейрального гребінця [91]. Цей факт пояснює, чому в результаті видалення головної частини нейрального гребінця відбувається гальмування розвитку тимоцитів, що супроводжується черепно-лицевим і кардіальним дефектами [92] притаманними синдрому Di George у людини [93].

Руйнування гена *rae28*, який є гомологом *polyhomeotic* гена дрозофіли, призводить до порушення розвитку нейрального гребінця і суттєвому пригніченню формування тимуса [94]. Однією з причин цих подій є те, що ген *rae28* регулює експресію генів *НохА*, і його інактивація негативно впливає на генерацію клітин нейрального гребінця і морфогенез тимуса [95]. До того ж у таких мишей знижується експресія гену *Рах-1* у клітинах мезенхіми нейрального гребінця, а, як *Рах-1*-, так і *Рах-2*-мутантні тварини мають дефекти розвитку тимуса, пов'язані з неправильним розвитком нейрального гребінця [96, 97].

Ефективний вплив мезенхіми на морфогенез тимуса показаний і в інших роботах [98–100]. Саме в капсулі і трабекулах виявляється відносно велика кількість МСК, але і в епітеліальній частині органу вони формують розгалужену тонку сітку і впливають на диференціювання тимоцитів. Показано, що епітеліальні дольки, які оточені мезенхімою, *in vitro* генерують усі субпопуляції тимоцитів. Натомість епітеліальні дольки, що були позбавлені навколишньої мезенхіми, показують суттєве зниження клітинності і містять майже самі незрілі тимоцити ($CD4^+CD8^-$), а диференціювання наступних стадій блокується. Але ніші для кісткомозкових попередників формують саме МСК.

В нормі кількість ніш дорівнює 160. У стаціонарному стані тільки 6% відкриті для прийому попередників. Тому підтримка ніш трансплантованими МСК є необхідною для регенерації тимуса [102].

МСК представлені в тимусі і практично в усіх органах і тканинах [102]. Для їх ідентифікації використовується визначення певних поверхневих молекул- маркерів (фенотип). Але ці маркери не є специфічними до МСК різного походження. Існує консенсус відносно того, що МСК людини позитивні по CD44, CD73, CD90 і CD105 [83].

Усі мишачі МСК закономірно експресують антиген стовбурових клітин 1 (Sca-1) і CD44, але частота експресії CD73, CD90, CD105 змінюється [103]. Інші властивості МСК тимуса також значно відрізняються. Вони диференціюються і за адипогенним, і менш інтенсивно за остеогенним напрямком. У них слабо виражена експресія CD44 і практично відсутня CD73, CD90.2, CD105 і CD34. МСК тимуса не експресують МНС II навіть при індукції інтерфероном, хоча мають відповідний рецептор. МСК тимуса виділяються також слабкою антипроліферативною активністю і, на відміну від клітин іншого походження, відсутністю позитивного впливу при трансплантації мишам з індукованим стрептозотоцином діабетом. Але є протилежні дані. МСК тимуса людини проявляли високий потенціал до мультипотентності і високу проліферативну активність і були здатні до продукції власного позаклітинного матриксу [104].

Генетичні дослідження показали, що МСК тимуса сильно відрізняються по експресії генів від МСК дермальних і кістковомозкових [105].

Хемокінові рецептори беруть участь у розселенні МСК із КМ у тканини у першому і другому триместрах гестації. Після трансплантації КМ стромальні клітини можуть мігрувати у тимус, де беруть участь у позитивній селекції тимоцитів [106]. За відсутності тимуса більшість Т-клітин, які прикріплюються до строми КМ, проявляють незрілий фенотип [37]. Мезенхімальні клітини важливі для формування і наступної підтримки функціонального тимічного мікрооточення [107]. При культивуванні аутологічних клітин тимусні МСК

підтримували тимоцити і особливо стимулювали розвиток CD4⁺CD8⁻ подвійно негативних клітин, які потім диференціювалися в CD4⁺-позитивні тимоцити.

Акцидентальна атрофія тимуса пов'язана зі збагаченням органу фібробластами і наприкінці адипоцитами, що, мабуть, виникають шляхом епітеліально-мезенхімального переходу [108], за яким можна прослідкувати по маркеру EpCAM, який є найбільш характерним маркером епітелія тимуса [109].

Завдяки процесам епітеліо-мезенхімального і мезенхімально-епітеліального переходів, клітини, як допускається, переміщуються при необхідності між двома фенотипами протягом нормального ембріонального морфогенезу або відновлення тканини [110]. Дійсно, процес епітеліально-мезенхімального переходу був описаний у тимусі і може сприяти пов'язаній з віком інволюції тимуса і втрати функціонально повноцінних епітеліальних клітин, які заміщуються фібробластами і потім жиром у старіючому тимусі [108].

1.2.3 Взаємодія МСК і гемопоетичних клітин у функціонуванні імунної системи

МСК і їх стромальні нащадки можуть вважатися повноцінними регуляторними клітинами, які в організмі впливають на усі головні імунні клітини і їх функції [111-120]. Особливе місце займають дослідження в онкогенезі [10, 121–123]. Розробляються і методи імунотерапії аутоімунних захворювань за допомогою МСК [124,125].

МСК секретують значну кількість цитокінів, які стимулюють проліферацію і диференціювання гемопоетичних клітин різного ступеня зрілості: колонієстимулюючий фактор макрофагів (КСФ-М), Flt-3L, фактор стовбурових клітин (SCF), інтерлейкіни (IL) – IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14 і IL-15 [126] і TGFβ [127]. В результаті стимулювання синтезу IL-1α МСК продукують сам IL-1α, фактор, що інгібує лейкемію (LIF), гранулоцитарний (КСФ-Г) і гранулоцитарний-макрофагальний (КСФ- ГМ) [128]. Наразі є дані,

що найбільшою імуносупресивною активністю володіють МСК, які продукують ІЛ-35 [129].

Одним із паракринних факторів, які секретуються МСК, є позаклітинні везикули і інкапсульовані у них мікро-РНК [130,131] та інші біологічно активні молекули [132-140].

Відома регуляторна дія МСК на велику кількість клітин уродженого і адаптивного імунітету: $CD4^{+}$ - і $CD8^{+}$ -Т-клітини [141-143], Трег- клітини [144], В-клітини [142], NK-клітини [142], дендритні клітини моноцитарного походження [145] і нейтрофіли [146]. Взаємодія з МСК призводить до анергії лімфоцитів [147] і дендритних клітин [148] у зв'язку з припиненням проліферації на ранній стадії, а також пригнічує апоптоз нейтрофілів [146].

Розчинні фактори, що секретують МСК, такі як ІЛ-6 і КСФ-М [149], а також міжклітинні контакти сприяють модуляції МСК дозрівання ДК [150].

В алогенній комбінації МСК майже зовсім не активують Т-лімфоцити [151]. Відомо, що для адекватної стимуляції Т-клітин необхідні два сигнали. Перший включає розпізнавання Т-клітинним рецептором (TCR) молекул МНС разом з антигеном на поверхні антигенпрезентуючих клітин (АПК). Далі для активації необхідним є костимулюючий сигнал, який походить від взаємодії CD28 на Т-клітині з CD80 або CD86 (суперродина B7) на АПК. Правда, МСК експресують на своїй поверхні низькі рівні МНС і не експресують корецептори. Але тільки цим толерогенні властивості навряд чи можна пояснити [152]. Коли експресія МНС класу II і I активується, або здійснюється ретровірусна індукція B7-1 або B7-2, це не призводить до підвищення імуногенності МСК [153]

До того ж, було встановлено, що МСК пригнічують проліферацію Т-лімфоцитів, індуковану алоантигенами, мітогенами і антитілами до CD3 і CD28 [145]. Така реакція проходить без рестрикції по МНС, тому що може здійснюватися як ауто-, так і алогенними МСК [154].

Вважається, що антипроліферативний ефект є обумовленим розчинними факторами, тому що він проявляється, коли МСК і Т-лімфоцити розділені напівпроникною мембраною. Показано, що супресивна дія може бути

реалізована TGF- β [155], фактором росту гепатоцитів (HGF), простагландином E₂ (ПГЕ₂) [145], галектинами і IDO [156]. Подібною дією володіє G-протеїн (HLA-G), який є молекулою неklasичного HLA класу I і активує проліферацію регуляторних Т-клітин. Повідомлялось також, що МСК можуть індукувати продукцію IL-10 плазмоцитоїдними дендритними клітинами, що стимулюють формування регуляторних Т-клітин. МСК пригнічують диференціювання дендритних клітин, а незрілі дендритні клітини сприяють генерації регуляторних CD4⁺ і CD25⁺, а також CD8⁺ і CD28⁺ Т-лімфоцитів, які гальмують експансію Т-клітин. Отримані дані, що у процесі взаємодії МСК і дендритних клітин змінюються імуномодулююча активність обох типів клітин, особливо дендритних [157]. Контактна взаємодія МСК з дендритними клітинами пригнічує формування плазмоцитоїдних дендритних клітин pDCs, які є центральними регуляторами антивірусного імунітету. При цьому диференціювання мієлоїдних дендритних клітин не порушується [158].

Алогенні МСК частіше не викликають відторгнення у імуносупресивних реципієнтів і в імунопривілейних областях [159]. Навпаки, трансплантація алогенних МСК хазяїну з неушкодженою імунною системою може призвести до відторгнення МСК [160].

Т-лімфоцити не проліферують у відповідь на контакт з алогенними МСК у культурі *in vitro*, залишаючись у G1-фазі клітинного циклу. Міжклітинна взаємодія призводить до пригнічення експресії цикліну D2 і зростання рівня p27 у Т-клітинах [144].

МСК пригнічують апоптоз тимоцитів. Вони можуть запобігати індукованій активаційній загибелі Т-клітин шляхом пригнічення експресії Fas рецептора і дії Fas ліганда [161].

Таким чином, імуносупресія, що індукується МСК, обумовлена дією розчинних факторів і міжклітинними контактами [142]. Причому, більшість розчинних факторів не обов'язково конститутивно продукується МСК; їх секреція може індукуватися шляхом взаємодії активованих ефektorних клітин і

МСК. Як $CD4^{+}$ -, так і $CD8^{+}$ -лімфоцити адгезують до МСК, причому спорідненість збільшується у активованих Т-клітин [162].

МСК ефективно пригнічують проліферацію Т-клітин у змішаній культурі за рахунок стимуляції синтезу γ -інтерферона і ІЛ-10 з наступною активацією продукції в МСК індоламін-2,3-діоксигенази (IDO), що супроводжується локальним дефіцитом триптофану і обумовленим цим пригніченням проліферації Т- і NK-клітин [153]. З іншого боку, МСК пригнічують експресію CD69, ІЛ-12, ІЛ-2 і продукцію інтерферона γ , а також індуковане ІЛ-12 фосфатування STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5), що може бути використано для стимуляції NK-клітин [163]. *In vitro* МСК також знижують активність «наївних» Т-лімфоцитів, Т-клітин пам'яті і пригнічують проліферацію і цитотоксичність, сприяють зниженню долі антиген-специфічних клітин, які продукують γ -інтерферон.

Таким чином, МСК можуть гальмувати імунні реакції *in vitro* і *in vivo* без участі МНС. Імунорегуляторні властивості проявляють МСК кісткового мозку, тимуса і селезінки [164], жирової тканини [165]. Більш того, схожу активність зберігають фібробласти, остеобласти і адипоцити, що диференціювалися із МСК [166].

Але є дані, що у присутності низьких рівнів ІФН- γ , МСК експресують молекули МНС класу II і отримують фагоцитарні функції з можливістю представлення антигену $CD4^{+}$ -Т-клітинам [167]. Високі рівні ІФН- γ знижують експресію молекул МНС класу II, призводячи таким чином до переключення функції МСК на імуносупресивну активність [167].

NK-клітини володіють вираженою цитолітичною активністю по відношенню до клітин, які слабо експресують молекули МНС класу I. До таких клітин належать і МСК. Тим не менш, аутологічні МСК не лізуються NK-клітинами. У той же час, алогенні МСК ефективно лізувалися активованими NK-клітинами, що свідчить про недостатній проти лізису захист МСК слабкою експресією на них МНС класу I [168]. До того ж МСК здійснюють гальмівну

дію по відношенню до проліферації NK-клітин і продукції ними цитокінів [169].

При сумісному культивуванні з активованими ІЛ-2 або ІЛ-15 NK-клітинами, МСК також пригнічують цитотоксичну активність, продукцію цитокінів, виділення гранзиму В і експресію активаційних рецепторів. Ці ефекти значною мірою залежать від міжклітинних контактів і дії $TGF\beta 1$ і $PGE2$, які продукуються під час сумісного культивування [169, 170]. В цілому вважається, що взаємодія МСК і NK-клітин значно залежить від активації клітин обох типів і мікрооточення. Сумісне культивування активованих лімфоїдних клітин з МСК підсилювало проліферацію клітин і синтез лімфоцитами ІЛ2. У свою чергу, активовані лімфоцити стимулювали експресію на МСК ICAM-1 [171].

In vitro МСК людини пригнічують проліферацію В-клітин шляхом зупинки клітинного циклу у фазі $G0/G1$. При цьому порушується диференціювання В-лімфоцитів із зменшенням продукції IgM, IgG і IgA. На відміну від цього, повідомлено про стимулюючий ефект МСК на активовані *in vitro* В-лімфоцити і плазматичні клітини [172]. Показано, що МСК тимуса стимулюють антитілогенез *in vivo* і первинну імунну відповідь на еритроцити барана *in vitro*. Причому МСК кісткового мозку така активність не була притаманна [82].

Відповідь В-клітин на *rokwweed* мітоген повністю пригнічується при контакті з МСК і дії присутніх у культурі клітин розчинних факторів. Показано, що МСК знижують експресію на В-клітинах CXCR4, CXCR5, CCR7, і пригнічують хемотаксис на CXCL12, CXCL13 [173].

Розвиток В-клітин потребує тісної взаємодії попередників В-клітин з МСК. Вона відбувається при контакті пре-В-клітинного рецептора (pre-BCR) з його стромальним лігандом Galectin-1, що необхідно для виживання клітин-предходників, їх проліферації і диференціювання [174]. Стимули проліферації можуть бути Т-незалежними [175], Т-залежними антигенспецифічними або

неспецифічними [176]. Як правило, результати є дозозалежними і можуть варіювати відповідно до умов культивування.

МСК ефективно експресують рецептори до ІЛ-17. Цей цитокін сприяє їх проліферації і прискорює відновлення гемопоезу після трансплантації ГСК [177], демонструючи, мабуть, функцію стромальної підтримки ГСК.

Трансплантація МСК призводить до значного клінічного покращення на моделях розсіяного склерозу, ревматоїдного артрити і експериментального аутоімунного енцефаломієліту, що супроводжується пригніченням активності ТН17 клітин [178, 179] із зміщенням диференціювання у бік ТН2 і зниженням продукції ІЛ-17. МСК ефективно пригнічують продукцію ТН17-клітинами прозапальних цитокінів: ІЛ-17 і ІЛ-22 і можуть перепрограмувати диференційовані ТН17-клітини у ІЛ-10⁺FOX⁺T_{рег}-клітини. До того ж, МСК попереджують формування нових ТН17 із наївних Т-клітин [180].

За певних умов МСК сприяють індукції ТН17-клітин, що підтверджує концепцію двунаправленої активності МСК, яка залежить від міжклітинних контактів, паракринних впливів і стану активації Т-клітин [181].

Клінічні дані по використанню МСК свідчать, що МСК ефективні як регуляторні фактори імунних процесів [182–185].

Виявлена експресія МСК великого спектру патерн-розпізнаючих рецепторів від TLR1 (toll-like receptor 1) до TLR10 [186, 187]. Рівень експресії рецепторів підвищується під впливом інтерферонів α і γ , ФНП та ІЛ1 β [188].

Показано також, що МСК експресують функціональні цитозольні NOD-подібні рецептори: NOD1 і NOD2, які після активації сприяють секреції клітинами фактору росту ендотелію судин (VEGF) і ІЛ-8 [189].

Більшість лігандів TLR (ЛПС) сприяють міграційній активності МСК *in vitro*. Активація TLR3 і TLR4 їх природними лігандами може пригнічувати імунорегуляторну активність МСК і таким чином Т-клітинна імунна відповідь під час інфекційного процесу може суттєво зростати і сприяти елімінації патогена [190, 191].

За аналогією з дихотомією M1 і M2 макрофагів, виділені дві субпопуляції МСК. Активація TLR4 сприяє утворенню прозапальної субпопуляції МСК1, що продукує ІЛ-6, ІЛ-8 і TGF β . Стимуляція TLR3 індукує появу клітин протизапальної субпопуляції (МСК2), яка секретує ІЛ-4, ІЛ-1RA, COX2, IDO [192]. Вважається, що коли МСК проникають у інфіковані тканини, вони беруть участь у швидких антимікробних реакціях як МСК1 клітини. При тривалому запаленні і деструкції тканини активується TLR3, що сприяє перепрограмуванню МСК в МСК2 клітини, що веде до завершення запалення і ремоделювання тканини [193]. Таким чином, у теперішній час сформована і підкріплена переконливими даними думка, що МСК є не тільки імуносупресорами, але і клітинами, які діють у протилежному напрямку [194]. Значення МСК у перепрограмуванні макрофагів до M2-субпопуляції показано на моделі сепсису. Трансплантація мишиних МСК КМ при цьому суттєво знижувала летальність. Ефект МСК нівелювався при деплеції макрофагів в організмі. Пізніше важлива роль МСК у розвитку макрофагів показана у різних експериментальних дослідженнях [195-201].

МСК, особливо простимульовані через TLR3, підсилюють синтез факторів, що активують нейтрофіли, сприяють їх виживаності, підсилюють життєздатність і прозапальну активність клітин [194].

Котрансплантація МСК і невеликої кількості ГСК значно покращує короткочасне і довготривале відновлення гемопоезу [202]. Але є дані, що трансплантація МСК більш ефективна при імунозапальних процесах, ніж їх використання з метою стимуляції регенерації [182].

Вважається, що функція МСК не є фіксованою, а залежить від мікрооточення, контактної і гуморальної взаємодії МСК з іншими клітинами стромы, лімфоцитами і клітинами вродженого імунітету. Всупереч складнощам наразі розробляється багато різних методів для клінічного використання стовбурових клітин [203].

Висновки до розділу 1.

Велику роль у функціонуванні ГСК відіграє мікрооточення, представлене стромальними клітинами, окремі субпопуляції яких розвиваються із МСК. У кістковому мозку формуються структурно-функціональні утворення у вигляді так званих «ніш». Останні підрозділяють на ендостальну нішу, головним елементом якої для міжклітинної контактної взаємодії з ГСК виступають SNO-клітини, і судинну нішу, яка складається в основному із CAR-клітин, Nes⁺-клітин і ендотеліальних клітин. В тимусі ніші для прогеніторів ГСК формуються із МСК цього органу. Міжклітинна контактна взаємодія між ГСК і МСК здійснюється і в периферичних лімфоїдних органах і утвореннях, у якій приймають участь місцеві і мобілізовані із кісткового мозку МСК.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях: [11], [25], [204], [205].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Експериментальні тварини та схема проведення досліджень

В експериментах було використано 519 мишей лінії СВА масою 18-20 г розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Е. Кавецького НАН України. КФП отримували із плодів мишей цієї ж лінії 14 діб гестації. Термін гестації визначався від моменту виявлення копулятивної пробки у самок, відсаджених з самцями для спарювання напередодні. Тимус для одержання МСК і кістковий мозок для одержання клітин кісткового мозку забирали у мишей 4-6-тижневого віку. Утримання мишей та робота з ними здійснювались у відповідності до міжнародних прийнятих правил проведення робіт з експериментальними тваринами [206]. Всі роботи з експериментальними тваринами проводили 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), а також з дотриманням усіх принципів біоетики та норм біологічної безпеки.

Відповідно до мети робота була побудована наступним чином. Перш за все, враховуючи невелику кількість робіт по вивченню культуральних властивостей МСК тимуса в імунологічних дослідженнях, вважали за необхідне провести спостереження особливостей нарощування цих клітин в культурі *in vitro* в різних умовах і їх стійкість до кріоконсервування. Останнє було необхідним для оцінки кріоконсервування як способу накопичення необхідної кількості МСК тимуса для проведення експериментів і визначення перспективи можливості використання кріоконсервування для клінічного застосування у майбутньому.

Виходячи з відомих позицій про провідну роль МСК кісткового мозку у створенні гемопоетичного мікрооточення з контактною взаємодією МСК-ГСК у кістковомозкових нішах і деякі дані про подібні функції МСК у тимусі було доцільним дослідити, чи не володіють МСК тимуса і гемопоетичні клітини мембранною спорідненістю, яка могла би розглядатися як передумова для вивчення наслідків контактної взаємодії клітин *in vitro*. Результати надані у розділі 3.

Враховуючи, що найважливішим і інтегральним показником ефективності трансплантації гемопоетичних клітин є виживаність опромінених тварин-реципієнтів, цьому питанню були присвячені спеціальні експерименти. Результати викладені у розділі 4.

Розділ 5 присвячений вивченню впливу на імунну систему опромінених мишей трансплантації МСК тимуса та індукованих попередньою контактною взаємодією з ними ГСК і прогеніторів кісткового мозку, а також фетальної печінки.

Основні дані про експериментальні групи наведені в зведеній таблиці експериментів 2.1.

Таблиця 2.1

Розподіл тварин по експериментальних групах

Експериментальні групи	Кількість тварин
Нормальні миши лінії СВА для отримання ККМ	41
Вагітні самки лінії СВА для отримання КФП	23
Нормальні миши лінії СВА для отримання МСК	75
Нормальні миши лінії СВА для вивчення ФЛР	10
Нормальні миши лінії СВА	15
Опромінені миши лінії СВА	38
Опромінені миши лінії СВА, яким вводили КС	46
Опромінені миши лінії СВА, яким трансплантували ККМ	56
Опромінені миши лінії СВА, яким трансплантували іККМ	51

Продовження таблиці 2.1

Експериментальні групи	Кількість тварин
Опромінені миши лінії СВА, яким трансплантували КФП	55
Опромінені миши лінії СВА, яким трансплантували іКФП	54
Опромінені миши лінії СВА, яким трансплантували МСК	55
Всього	519

2.2. Отримання препаратів ГСК і прогеніторів із кісткового мозку та фетальної печінки; їх кріоконсервування

В роботі використовували ККМ і КФП мишей. Евтаназію тварин проводили методом цервікальної дислокації під ефірним наркозом. КФП отримували наступним чином. Печінку 14-добових плодів мишей СВА збирали в пеніцилінові флакони з 5 мл розчину консерванту (середовище DMEM/F12 (Sigma, США), 2×10^3 од/мл пеніциліну (Дарниця, Україна), 2×10^3 мкг/мл стрептоміцину (Дарниця, Україна), 2×10^3 мкг/мл канаміцину (ВАТ “Київмедпрепарат”, Україна), 2,5 мкг/мл фунгізону (Briston Myers Squibb, Росія)), промивали цим же розчином та залишали в ньому на 2-4 години при 4°C. Потім консервант видаляли, додавали 2–3 мл розчину Хенкса і руйнували паренхіму печінки за допомогою 3-4-кратного пропускання через наконечник автоматичного дозатора. Переносили одержаний матеріал в центрифужну пробірку, залишали на 10 хвилин для осадження крупних фрагментів, переносили однорідну суспензію клітин в мікропробірки і центрифугували її 10 хвилини при 250 g. Осад ресуспендували в середовищі для кріоконсервування (середовище RPMI 1640 (Sigma, США), 20% ембріональної телячої сироватки (ETC) (Sigma, США), 5% диметилсульфоксиду (ДМСО) (Sigma, США)).

Для одержання ККМ із внутрішнього каналу стегнової кістки мишей за допомогою шприца вимивали кістковий мозок 2 мл розчину Хенкса,

ресуспендували його, пропускаючи послідовно через голки діаметру, що поступово зменшувався. Після відстоювання однорідну суспензію переносили в центрифужні пробірки і відмивали клітини центрифугуванням (10 хвилин при 250 g), осад ресуспендували в середовищі для кріоконсервування. У разі стійкості клітин до кріоконсервування методика є зручним способом збирання достатньої кількості необхідних для експерименту клітин.

Кріоконсервування проводили за методикою, що була розроблена в Інституті проблем кріобіології та кріомедицині НАН України [207] на програмному заморожувачі KRYO-516 (Planer, Англія) в кріопробірках (Nunc, США) по 1,8 мл. Процес заморожування клітин проводили згідно з 4-етапною програмою (табл. 2.2). Після завершення програми кріопробірки переносили в низькотемпературний банк для довгострокового зберігання в рідкому азоті до використання в експерименті.

Таблиця 2.2

Програма кріоконсервування клітинних препаратів ГСК і прогеніторів

№ етапу	Температура (°C)		Швидкість заморожування (°C/хв)	Час (хв)
	початкова	кінцева		
1.	+ 20,0	- 4,0	- 2,0	8
2.	- 4,0	- 8,0	- 0,5	8
3.	- 8,0	- 70,0	- 10,0	6,2
4.	- 70,0	- 70,0	0,0	5

Розморожування клітин проводили безпосередньо перед застосуванням. Кріопробірки з клітинами діставали з низькотемпературного банку і занурювали у водяну баню при температурі 40°C, витримували протягом 30-60 секунд до появи в кріопробірці рідкої фази, потім вміст кріопробірки розморожували при кімнатній температурі. Час збереження матеріалу до застосування становив не більш однієї години.

Від кріопротектора і ЕТС клітини відмивали центрифугуванням при 250 g протягом 5 хвилин., осад ресуспендували в поживному середовищі (середовище

RPMI 1640 з 10% ETC, (Sigma, США), 2 mM L-глутаміну (Sigma, США), 10 mM HEPES Na-солі (Sigma, США), 100 Од/мл пеніциліну (Дарниця, Україна), 100 мкг/мл стрептоміцину (Дарниця, Україна), 100 мкг/мл канаміцину (ВАТ “Київмедпрепарат”, Україна)). Кількість клітин, що містили ядра, підраховували в камері Горяєва з використанням 3% розчину оцтової кислоти. Життєздатність клітин, яка становила 80-90%, що відповідає літературним даним [208] оцінювали за допомогою фарбування трипановим синім (0,3 % розчин), враховуючи, що життєздатні клітини не сприймають барвник.

2.3. Індукція лінійного диференціювання МСК тимуса

Оскільки стандартного способу отримання МСК тимуса не існує, МСК тимуса виділяли за розробленою методикою із експлантатів органу з вирощуванням клітин, як описано в розділі 3. З метою додаткового ідентифікування МСК вивчали відому здатність цих клітин до диференціювання по остеогенному та адипогенному напрямкам.

Остеогенне диференціювання індукували культивуванням у остеогенному середовищі DMEM/F12, 1:1, (Sigma, США) з додаванням 15% ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 10 mM L-глутаміну (Sigma, США), 50 мкг/мл L-аскорбінової кислоти (Sigma, США), 10 mM 3-гліцерофосфату (Sigma, США), 0,1 мкМ дексаметазону (Sigma, США), 100 Од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину (Дарниця, Україна).

Адипогенне диференціювання індукували культивуванням у адипогенному середовищі DMEM-HG (РАА, Німеччина) з високим вмістом глюкози (4,5 г/л) з додаванням 10% конячої сироватки (РАА, Німеччина), 10 mM L-глутаміну (Sigma, США), 0,5 мкМ дексаметазону (Sigma, США), 6 мкг/мл інсуліну (Sigma, США), 100 Од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину (Дарниця, Україна). Культивування проводили в CO₂-інкубаторі (Joan, Франція) при 37°C і 5% CO₂ протягом 10 діб.

Для визначення ефективності диференціювання використовували фарбування індукованих в остеогенному напрямку культур на відкладення солей кальцію 1% розчином алізаринового червоного S (Sigma, США) та індукованих в адипогенному напрямку культур на ліпідні вакуолі 0,2% розчином масляного червоного O (Sigma, США) [209]. Алізариновий червоний та масляний червоний екстрагували 10% розчином оцтової кислоти або ізопропіловим спиртом відповідно. Інтенсивність забарвлення отриманих розчинів оцінювали в лунках 96-лункового планшету, що містили по 200 мкл екстракту, вимірюючи оптичну щільність на спектрофотометрі Sunrise (Tecan, Австрія) при довжині хвилі 520 нм.

2.4. Опромінення тварин

Тварин опромінювали одноразово за допомогою установки «Тератрон» з радіонуклідним джерелом ^{60}Co . Доза опромінення становила 9,0 Гр.

2.5. Оцінка маси і клітинності лімфоїдних органів і кісткового мозку

Відносну масу тимуса і селезінки визначали за формулою (2.1):

$$\text{Відносна маса} = \frac{\text{Маса лімфоїдного органу}}{\text{Маса тіла тварини}} \times 100\% \quad (2.1)$$

Для визначення клітинності отримували фрагмент тимуса або селезінки, зважували його, диспергували тканину у фізіологічному розчині NaCl, 2 рази відмивали клітини центрифугуванням при 250 g протягом 10 хилин. Після ресуспендування осаду підраховували кількість ядровмісних клітин у камері Горяєва, використовуючи 3 % розчин оцтової кислоти, і розраховували кількість клітин в 1 мг тканини.

2.6. Визначення колонієутворюючих одиниць фібробластів (КУО-Ф)

Процес колонієутворення вивчали шляхом посіву клітин ($0,5 \times 10^6$ ККМ або 100 МСК) на чашку Петрі (Ø100 мм, Costar, США) в поживному середовищі, що містило DMEM/F12, 1:1, (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 10 мМ L-глутаміну (Sigma, США) та по 100 МО/мл пеніциліну та стрептоміцину (Дарниця, Україна). Культивували в CO₂-інкубаторі (Jouan, Франція) при 37°C і 5% атмосфері CO₂ протягом 14 діб. Надалі колонії фарбували кристалічним фіолетовим та підраховували за допомогою інвертованого мікроскопа [210].

2.7. Визначення кількості лейкоцитів в периферичній крові і клітинного складу лейкоцитарної формули

Визначення кількості лейкоцитів в периферичній крові, отриманої після декапітації тварин, які були під ефірним наркозом, і лейкоцитарної формули в мазках крові, пофарбованих азур-еозином, проводили загальноприйнятими в гематології методами в камері Гряєва і мікроскопією мазків крові відповідно..

2.8. Визначення фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів

2.8.1. Отримання перитонеальних макрофагів

Наркотизованим ефіром мишам в черевну порожнину 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 центрифугуванням (250 g, 10 хвилин). Осад ресуспендували в 1 мл середовища RPMI-1640 з 10% ETC.

Підраховували кількість життєздатних клітин. Кінцеву концентрацію клітин доводили до 4×10^6 /мл.

2.8.2. Визначення поглинальної активності

Метод ґрунтується на тому, що фагоцити, які захопили мікроорганізми, пофарбовані флуоресцеїна ізотіоціанатом (ФІТЦ), самі починають інтенсивно флуоресціювати. При цьому вони чітко відрізняється від фагоцитів, які не поглинули мікроби, що реєструється проточним цитофлюориметром.

Клітини стафілокока в концентрації 2×10^8 /мл фарбували флюорохромом ФІТЦ з розрахунку 0,1 мг/мл протягом 12 год при $+4^\circ\text{C}$ в карбонатно-бікарбонатному буфері, рН 9,5. Не зв'язаний ФІТЦ видаляли відмиванням шляхом центрифугування при 1000 g .

У лунки 96-лункового планшета вносили суспензію ФІТЦ-міченого стафілокока і суспензію перитонеальних макрофагів в співвідношенні макрофаг/стафілокок 1:10. Інкубували 20 хв при 37°C . Макрофаги осаджували центрифугуванням при 200 g 1,5 хв при $+4^\circ\text{C}$. Одноразово відмивали охолодженим ФСБ з 0,02 % ЕДТА, який сприяє припиненню поглинальної активності клітин і видаленню незв'язаного стафілокока. Зразки фіксували охолодженим розчином фосфатно-сольового буферу з 2% параформальдегіду і 0,02% ЕДТА. Приготовлені таким чином проби зберігали до 2 діб при $+4^\circ\text{C}$.

Проби аналізували на проточному цитофлюориметрі. Налаштування встановлювали таким чином, щоб у вікні Dot Plot розміщувалася популяція макрофагів. На екран виводили гістограми по FL1 для макрофагів і відповідні статистичні дані. Розраховували відсоток фагоцитуючих клітин з флуоресценцією.

2.8.3. Визначення бактерицидної активності в НСТ-тесті

Визначали бактерицидну активність перитонеальних макрофагів мишей у загальноприйнятому тесті відновлення нітросинього тетразолію (НСТ) [211]. Метод базується на здатності фагоцитів утилізувати в процесі активації кисень з наступним утворенням високореактогенних вільних радикалів кисню.

Отримані клітини перитонеального ексудату суспендували у поживному середовищі RPMI-1640 у концентрації 1×10^6 /мл. В лунки 96-лункового планшета вносили по 0,1 мл суспензії клітин та інкубували у термостаті при 37°C у вологій атмосфері 5% з CO₂ протягом 2 годин. Після інкубації з лунок відбирали надосадову рідину та за допомогою розчину фосфатно-сольового буферу тричі промивали моношар адгезованих клітин (95% з них становлять перитонеальні макрофаги). При постановці спонтанного НСТ-тесту у лунки вносили 0,1 мл 0,2 % розчину НСТ (Chemarol, Чехія) і 0,1 мл середовища RPMI-1640, при постановці стимульованого НСТ-тесту – 0,1 мл розчину НСТ і 0,1 мл розчину зимозана. Інкубацію здійснювали у термостаті при 37°C у вологій атмосфері з 5% CO₂ протягом 30 хвилин. На кожен досліджувану точку використовували щонайменше 3 лунки. Потім з лунок відбирали надосадову рідину, а моношар адгезованих макрофагів обробляли 0,1 мл 2N розчину NaOH та 0,1 мл ДМСО для розчинення темно-синіх гранул діформазану. Оптичну щільність отриманої рідини у кожній лунці вимірювали при 630 нм за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізатора. Для отримання контрольного значення оптичної щільності до пустих лунок аналогічно вносили 0,1 мл 2N розчину NaOH та 0,1 мл ДМСО. Отримані результати виражали у вигляді індексу активності у спонтанному чи індукованому НСТ-тесті, який вираховували за формулою (2.2):

$$I_{\text{НСТ}} = \frac{E_{\text{досл.}} - E_{\text{контр.}}}{E_{\text{контр.}}} \times 100\% \quad (2.2)$$

де Інст – індекс НСТ-тесту;
 $E_{\text{досл.}}$ – екстинція дослідних зразків;
 $E_{\text{контр.}}$ – екстинція контрольних зразків.
 Результати виражали у відсотках.

2.9. Визначення цитотоксичної активності природних кілерів МТТ-методом

Цитотоксичну активність спленоцитів визначали МТТ-методом [212]. Метод заснований на здатності мітохондріальних ферментів в життєздатних клітинах переводити доданий в культуру клітин субстрат – МТТ-тетразолієву соль жовтого кольору в кристалічний МТТ-формазаєн лілового кольору.

Диспергували селезінку, кількість ядровмісних клітин підраховували в 3% розчині оцтової кислоти, а життєздатність спленоцитів оцінювали фарбуванням трипановим синім. Доводили концентрації клітин до $2,5 \times 10^6$ /мл. Як мішені 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 плоским дном вносили:

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

Планшети залишали на 16-18 годин інкубації при 37°C та 5 % CO₂ у вологій камері. Потім в кожен лунку додавали 20 мкл розчину МТТ (5 мкг/мл).

Далі планшет інкубували при тих самих умовах 3 години. Супернатант видаляли і в кожному лунку додавали по 150 мкл розчинника кристалів – ДМСО. Через 30 хв. інкубації при кімнатній температурі відбувалося повне розчинення кристалів. Оптичну щільність вмісту лунок, який мав забарвлення від світло-лілового (при максимальному лізисі) до яскраво-лілового (при мінімальному лізисі), визначали за допомогою мультилункового спектрофотометра Sunrise Тесан (Австрія), враховуючи різницю оптичної щільності при довжині хвилі 540 нм та фонового значення 690 нм.

Цитотоксичність визначали як цитотоксичний індекс у відсотках (2.3):

$$ЦІ = 100 - \frac{D-KE}{KM} \times 100\% \quad (2.3)$$

- де ЦІ – цитотоксичний індекс;
 Д – оптична щільність дослідної лунки;
 KE – оптична щільність лунки з контролем ефекторів;
 KM – оптична щільність лунки з контролем мішеней.

2.10. Реакція бласттрансформації лімфоцитів

Реакцію бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ), індуковану фітогемаглютиніном (ФГА), визначали теж МТТ-методом.

Бласттрансформацією називається перехід малих лімфоцитів із інтерфази в проліферацію через утворення бластних форм. Цей процес супроводжується морфологічними змінами лімфоцитів: збільшенням розмірів до утворення бластних форм, з підвищеною кількістю мітохондрій, рибосом, лізосом. В лімфоцитах індукуються біохімічні процеси, котрі збільшують синтез білка, РНК, ДНК, в результаті чого відбувається мітотичний поділ клітин. Проліферація Т-лімфоцитів індукується при культивуванні *in vitro* лейкоцитів крові з деякими мітогенами. В роботі використовувався Т-клітинний мітоген – ФГА.

Одержували суспензії клітин брижових лімфатичних вузлів, доводили до концентрації $2,5 \cdot 10^6$ /мл. В лунки 96-лункового планшету вносили:

- контроль: суспензія лімфоцитів - 100 мкл,
поживне середовище RPMI-1640 з 10% ETC - 100 мкл
- дослід: суспензія лімфоцитів - 100 мкл,
ФГА в поживному середовищі RPMI-1640 з 10% ETC - 100 мкл

Кінцева концентрація ФГА становила 20 мкг/мл. Планшет інкубували 72 год при 37°C та 5 % CO₂ у вологій камері. В кожну лунку додавали 20 мкл робочого розчину МТТ в концентрації 5 мкг/мл. Планшет інкубували при тих самих умовах 3 години. Потім планшет центрифугували при 200g 5 хвилин, після чого на дні лунок візуально визначалися лілові кристали формагану. Супернатант видаляли і в кожну лунку додавали по 150 мкл ДМСО. Через 30 хвилин інкубації при кімнатній температурі відбувалося повне розчинення кристалів. Оптичну щільність вмісту лунок визначали за допомогою мультилункового спектрофотометра, розраховуючи 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 ((2.4):

$$IP = \frac{D}{K} \quad (2.4)$$

де IP – індекс реакції;

D – оптична щільність дослідної лунки;

K – оптична щільність контрольної лунки.

2.11 Визначення α/β - і γ -інтерферонів в супернатантах культур спленоцитів

Суть напівкількісного методу титрування інтерферону полягає у здатності інтерферону пригнічувати цитопатогенну дію вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) [213].

Індукцію синтезу α/β -інтерферону здійснювали вірусом хвороби Ньюкасла (ВХН), а для виявлення цитопатогенної дії – ВВС. Обидва віруси люб'язно надані старшим науковим співробітником ДУ “Інститут отоларингології ім. проф. О. С. Коломійченка НАМН України” Л. Д. Кривохатською.

Інтерферон визначали по антивірусній активності мікрометодом [214], враховуючи цитопатогенну дію ВВС на фетальні фібробласти мишей.

Використовували клітини 2-3 пасажу первинно-трипсинізованої культури фетальних фібробластів мишей лінії СВА. Трипсинізовані клітини вносили у культуральний флакон (площа 25 см²) у кількості $0,5-1,0 \times 10^6$ клітин в об'ємі 5 мл. Як поживне середовище для культур клітин використовували середовище DMEM/F12 з 10% ETC, (Sigma, США), 2 mM L-глутаміну (Sigma, США), 10 mM HEPES Na-солі (Sigma, США), 100 ОД/мл пеніциліну (Дарниця, Україна), 100 мкг/мл стрептоміцину (Дарниця, Україна), 100 мкг/мл канаміцину (ВАТ “Київмедпрепарат”, Україна))

2.11.1 Вірус хвороби Ньюкасла

Вірус хвороби Ньюкасла (ВХН) культивували в 9-10-денних курячих ембріонах, заражених введенням в алантоїсну порожнину по 0,2 мл матеріалу, що містив 10^3-10^4 тканинних цитопатогенних доз (ТЦД)₅₀/мл вірусу. Ембріони витримували 48 годин при 37°C, а потім охолоджували протягом 18-24 годин при 4°C, після чого збирали алантоїсну рідину. У ній визначали кількість ВХН

шляхом титрування на 3-4-денній первинно-трипсинизованій культурі фібробластів курячих ембріонів. Інфекційний титр вірусу складав 10^8 - 10^9 ТЦД₅₀/мл.

2.11.2. Вірус везикулярного стоматиту

У роботі використовували ВВС штам Індіана. ВВС культивували в курячих ембріонах за тою ж методикою, що і ВХН. Пасажування проводили *in vitro* на клітинах 3-4-денного пасажу первинно-трипсинізованої культури фетальних фібробластів мишей.

2.11.3. Індукція синтезу α/β -інтерферону *in vitro*

До 5×10^6 спленоцитів в 1 мл середовища, додавали ВХН із розрахунку 10 ТЦД на клітину. Після інкубації протягом 24 годин при 37°C суспензію клітин центрифугували, збирали супернатант, закисляли середовище 0,1N HCl до рН 2,0–2,2, а через 3–4 доби нейтралізували 0.1N NaOH до рН 7,0–7,2. Отримані зразки розливали по аліквотам і зберігали при -20°C.

2.11.4. Індукція синтезу γ -інтерферону *in vitro*

Індукцію синтезу γ -інтерферону здійснювали внесенням у культуру клітин конконаваліна А (Кон А) (Sigma, США). До 5×10^6 спленоцитів в 1 мл середовища, добавляли КонА до кінцевої концентрації 10 мкг/мл. Після інкубації протягом 24 годин при 37°C суспензію клітин центрифугували і збирали супернатант. Отримані зразки розливали по аліквотам і зберігали при -20°C.

2.11.5. Титрування інтерферону

В лунки 96-лункового планшета вносили клітини 2-3 пасажу культури фетальних фібробластів мишей в об'ємі 100 мкл (2×10^5 /мл). Через 24 години на моношар клітин додавали по 100 мкл 2-кратних розведень досліджуваних проб. У контролі були клітинні культури, у які не добавляли ні матеріал з інтерфероном, ні вірус. Контролем вірусу були культури з такою ж кількістю вірусу, як і в дослідних пробірках. Як позитивний контроль використовували попередньо отриманий лабораторний стандарт інтерферону. Ще через 24 години в кожену лунку вносили по 100 ТЦД ВВС. Облік результатів проводили ще через 24 годин, коли у контролі вірусу відбувалася повна дегенерація клітинного пласту. Титром вважали найбільше розведення, що захищало більш ніж 50% клітин моношару від цитопатогенного дії вірусу. Результати виражали в $\log_2$ титру.

2.12. Визначення активності фактору некрозу пухлин

Активність фактору некрозу пухлин α (ФНПа) визначали по цитотоксичній дії супернатантів культур спленоцитів на чутливі до ФНПа клітини L 929 [177].

Проби, що містили 5×10^6 спленоцитів і 10 мкг/мл ліпополісахариду (ЛПС) E.coli («Sigma», США) в 1 мл повного поживного середовища інкубували 24 години при 37°C , центрифугували 5 хв при 200g, відбирали супернатанти і визначали в них вміст ФНПа, що синтезується лейкоцитами спонтанно (без індуктора) або при індукції ЛПС.

В лунки 96-лункового планшета вносили 10^4 клітини L 929 в об'ємі 100 мкл. Через 24 години до моношару клітин добавляли по 100 мкл дворазових розведень досліджуваних проб, а потім додавали по 100 мкл актиноміцину D (200 мкг/мл) (Sigma) для припинення проліферації клітин під час проведення

аналізу. Як позитивний контроль використовували попередньо отриманий лабораторний стандарт ФНПа,. Планшети інкубували 24 години при 37°C в атмосфері 5 % CO₂ і абсолютної вологості. Потім відбирали культуральне середовище. Клітини, що збереглися, фарбували 0,1% розчином генціан-віолета (50 мкл), промивали водою, висушували та екстрагували барвник 100 мкл 3% розчину оцтової кислоти. Вимірювали оптичну густину розчину в кожній лунці при 630 нм. Титром вважали найбільше розведення, що викликало лізис більше 50% моношару клітин. Результати виражали в log₂ титру.

2.13. Постановка реакції гіперчутливості сповільненого типу

Реакція гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ) є моделлю для визначення здатності сенсibilізованих лімфоцитів виділяти лімфокіни, що активують макрофаги, завдяки чому останні виконують функцію ефektorів клітинного імунітету [215]. Інтенсивність реакції ГСТ визначали за величиною інфільтративно-запальної реакції у місці повторного введення антигену.

Мишей сенсibilізували одноразовим внутрішньочеревним введенням 10⁸ еритроцитів барана в 0,2 мл фізіологічного розчину. Через 4 доби після сенсibilізації в підшву задньої лапи вводили 10⁸ еритроцитів барана в 0,05 мл фізіологічного розчину (завершальна ін'єкція), а в іншу контрольну лапу вводили фізіологічний розчин NaCl в такому ж об'ємі.

Оцінку реакції проводили через 24 години. Визначали величину інфільтративно-запальної реакції, оцінюючи різницю у масі дослідної і контрольної лап. Індекс реакції обчислювали для кожної тварини за формулою (2.5):

$$IP = \frac{D-K}{K} \times 100\% \quad (2.5)$$

де IP – індекс реакції;
 Д – маса дослідної лапи;
 К – маса контрольної лапи.

2.14. Визначення кількості антитілоутворюючих клітин методом локального гемолізу в гелі

Метод ґрунтується на здатності антиеритроцитарних IgM-антитіл, що продукуються антитілоутворюючими клітинами імунізованих тварин, руйнувати в присутності комплементу еритроцити барана, які поміщено разом з антитілоутворюючими клітинами до агарозного гелю.

Мишей імунізували еритроцитами барана внутрішньоочеревирно в дозі 10^8 клітин на мишу. На 5 добу після ін'єкції, виділяли селезінку, диспергували 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). Заливали в кожен 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, що формуються продукцією IgM-антитіл до еритроцитів барана однією

антитілоутворюючою клітиною (АУК). Результати представляли у вигляді кількості АУК на 10^6 клітин селезінки.

2.15. Визначення титру гемаглютининів та гемолізинів

Визначення титру гемаглютининів та гемолізинів проводили класичним методом у декомплементованій нагріванням при 56°C протягом 30 хвилин сироватці.

2.15.1 Визначення титру гемаглютининів

Готували ряд двократних послідовних розведень декомплементованої сироватки крові у пластикових планшетах в об'ємі 50 мкл. Потім додавали у кожную лунку по 50 мкл 1% суспензії еритроцитів барана та залишали при кімнатній температурі. Оцінку реакції проводили через 2 год. При позитивній реакції еритроцити, що аглютинували, застеляли дно лунки рівномірним шаром. При негативній реакції усі еритроцити збиралися разом у вигляді крапки.

Найбільше розведення сироватки, яке ще аглютинувало еритроцити, визначали як титр гемолізинів. Результати реакції виражали в $\log_2$ титру.

2.15.2. Визначення титру гемолізинів

Готували ряд двократних послідовних розведень декомплементованої сироватки крові у пластикових панелях в об'ємі 50 мкл. Додавали у кожную лунку по 50 мкл 1% суспензії еритроцитів барана, 30 хвилин інкубували при 37°C . До суміші додавали комплемент мурчака, розведеного фізіологічним розчином (1:10), в об'ємі 50 мкл на лунку. Суміш перемішували і інкубували при 37°C 1 годину.

Найбільше розведення сироватки, яке спричиняло гемоліз еритроцитів, визначали як титр гемолізинів. Результати реакції виражали в $\log_2$ титру.

2.16. Статистичний аналіз

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики за допомогою програм Excell (MS Office XP) та Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.). Для визначення відмінностей між досліджуваними групами використовували непараметричний критерій Мана-Уїтні (U) [216] і точний критерій Фішера [217]. Дані представлені у вигляді медіани (Median) з нижнім і верхнім квантилями (25% – 75%) [218]. При інтерпретації результатів критичною величиною рівня значущості вважали $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

**ВИВЧЕННЯ ДЕЯКИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МСК ТИМУСА І КЛІТИН
ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ МИШЕЙ IN VITRO. ФІБРОБЛАСТО-
ЛІМФОЦИТАРНІ РОЗЕТКИ**

Основні дослідження у роботі виконані *in vivo* і *in vitro* на мишах лінії СВА з використанням клітинних препаратів ГСК і прогеніторів кісткового мозку, фетальної печінки, а також МСК тимуса. Перспективність запропонованих експериментальних підходів визначається теоретичними положеннями клітинної імунології і можливим використанням клітин у майбутньому у клініці. У той же час відомі істотні розходження у властивостях МСК різного тканинного походження. Зазначене допускає можливість цілеспрямованого використання певних стовбурових клітин в залежності від потреб. Але досягнення вказаної мети поки що виглядає достатньо проблематично, оскільки наразі властивості стовбурових клітин, які визначають в основному їх можливе клінічне призначення, вивчені недостатньо. Особливо це стосується тимусних МСК і КФП.

Цей розділ саме призначений викладенню методик оптимізації одержання залучених у роботу клітин і вивченню деяких їх властивостей, зокрема, контактної взаємодії, яка має вирішальне значення для розвитку ГСК у кістковому мозку, тимусі і, певною мірою, у периферичній частині імунної системи.

Окреме значення надавалось дослідженню стійкості клітин до кріоконсервування, оскільки часто схеми експериментальних досліджень потребують достатньо великої кількості клітин для використання за досить короткий проміжок часу, яка може бути забезпечена саме кріоконсервуванням. Також можливість кріоконсервування відкриває перспективи створення препаратів, які можуть бути застосовані у клініці і експерименті одразу після розмороження у будь-який час.

Досліджувані у роботі МСК тимуса мало вивчені, особливо у порівнянні з МСК кісткового мозку і жирової тканини, які частіше за все традиційно представляють в експериментальних і клінічних роботах цей клас клітин. Між тим, МСК тимуса мають суттєві відмінності від МСК іншої локалізації, перш за все, за походженням. Вважається, що принаймні одна частина МСК тимуса походить із нейрального гребінця, а інша із ембріональної мезенхіми [91], що значною мірою виділяє ці клітини із загального ряду МСК. Транскриптомний аналіз також виявляє суттєві розбіжності у властивостях МСК тимуса у порівнянні з такими клітинами кісткового мозку і жирової тканин [105]. Всебічне вивчення властивостей МСК тимуса продовжується. Деякі дані у цьому напрямку отримані у нашій роботі.

3.1 Характеристика властивостей тимусних МСК

Наведені дослідження проведені з урахуванням недостатнього вивчення тимусних МСК і, з іншого боку, наявністю певних протиріч у більшості робіт по властивостям цих клітин.

3.1.1 Культуральні властивості МСК тимуса

Увага до зазначеного питання обумовлена, з одного боку, великим значенням МСК тимуса у функціонуванні органу, підтримці розвитку тимоцитів, участі в їх селекції, як викладено в огляді літератури, і, з іншого боку, недостатнім дослідженням властивостей цих клітин, що є важливим для можливого створення відповідних клітинних трансплантатів.

З урахуванням недостатньо представлених в літературі даних про методи нарізання тимусних МСК і властивостей клітин *in vitro* для вивчення цього питання досліджували особливості культур МСК тимуса:

- на поверхні целофанових пластинок;
- на скляній поверхні культуральних флаконів;

- на скляній поверхні чашок Петрі;
- на поверхні лунок пластикових 6-лункових планшетів.

Одразу після вилучення тимуса у мишей його занурювали в стерильний пеніциліновий флакон з розчином Хенкса і антибіотиками, та промивали в трьох змінах цього розчину.

Для культивування на целофані тимус подрібнювали препарувальними голками на шматочки розміром не більше 1 мм³, фрагменти тимуса фіксували у розрізах целофанових пластинок (10×10 мм²) і вносили у пеніцилінові флакони з 5мл культурального середовища. Пеніцилінові флакони з матеріалом витримували у термостаті при температурі 37°C. Через кожні 5 діб середовище культивування змінювали.

Для культивування клітин застосовували поживне середовище такого складу: середовище RPMI 1640, (Sigma) – 90 мл; ETC (Біосервіс) – 10 мл; L-глутамін, 200 mM, (Sigma) – 1 мл; HEPES Na-сіль, 1M, (Sigma) – 1 мл; пеніцилін, 2×10⁵ ОД/мл – 50 мкл; стрептоміцин, 200 мг/мл – 50 мкл; канаміцин, 200 мг/мл – 50 мкл.

Перед культивуванням клітин тимуса на скляній або пластиковій поверхнях тимус подрібнювали препарувальними голками теж на шматочки розміром не більше 1 мм³. При цьому більшість тимоцитів виходила в розчин. Фрагменти тимуса двічі промивали розчином Хенкса, відмивали від тимоцитів і потім фрагменти переносили у посуд для культивування. В скляний культуральний флакон (10×4 см²) або в скляну чашку Петрі (діаметром 10 см) вносили фрагменти одного тимуса, в лунку 6-лункового пластикового планшета – фрагменти половини тимуса в мінімальному об'ємі повного поживного середовища так, щоб тільки змочити поверхню дна флакона, чашки або лунки. Культури переносили в СО₂-інкубатор з 5 % СО₂ при 37°C. Через 2 години, коли шматочки тимуса прикріплювались до поверхні, додавали поживне середовище: 20 мл – в культуральний флакон, 10 мл – в чашку Петрі, 3 мл – в лунки 6-лункового планшета. Культури знов ставили в СО₂-інкубатор. Кожні

3–4 доби змінювали половину середовища на свіже. За ростом клітин спостерігали у світловому інвертованому мікроскопі, фіксуючи рівень клітинного росту на кожний термін спостереження.

При культивуванні на целофанових пластинках в перші дні експлантати адаптувалися до нових умов культивування, вони мали вигляд щільних шматочків з густим скупченням клітин. Початок росту клітин навколо експлантатів відмічався на 3–4-ту добу. Клітини починали мігрувати за межі експлантатів, і в зоні контакту з поверхнею целофанової плівки відбувалась їх адгезія. Надалі спостерігалось активне розмноження клітин, вони росли на обох поверхнях плівки і могли займати всю її площу. Найбільша кількість клітин була в зонах, наближених до експлантатів, поступово їх кількість зменшувалась пропорційно відстані від експлантата. Найбільш активна проліферація відмічалась на 12–13-ту добу культивування. Щільність клітин в зоні росту була неоднакова: ті, що наближені до експлантату, тісно контактували між собою, були менших розмірів, із збільшенням відстані від експланта до краю пласта їх розміри збільшувалися, між ними з'являлися щілини та різної величини порожнини. Таким чином, при культивуванні МСК на целофані виявлявся досить інтенсивний рост без помітного оком утворення колоній, що може мати значення для подальшого вивчення клоногенних факторів у культурах МСК.

При культивуванні на скляній або пластиковій поверхні навколо фрагментів тимуса в перші дні, на відміну від культивування на целофані, густим шаром лежали тимоцити, що не прикріпилися. Кількість їх зменшувалась при кожній заміні середовища при практично повному зникненні на 10–12-ту добу культивування.

Під час 3-ї заміни середовища (6–8-а доба) фрагменти тимуса, що прикріпилися, видаляли за допомогою інтенсивного змивання середовищем. На пластиковій або скляній поверхні залишався ніби відбиток, що представляв собою скупчення великих овальних клітин з нехарактерною для фібробластів морфологією. Такі клітини з'являлися на 3–4-ту добу культивування серед

дрібних округлих тимоцитів і були прикріплені до поверхні. На 5–6-ту добу на цьому місці з'являлися колонії таких великих овальних клітин (до 30–50), які, мабуть, можуть мати інші властивості, ніж типові фібробласти. В подальшому розміри таких колоній збільшувалися так, що їх можна було побачити неозброєним оком у вигляді блідої білої плями на поверхні. При цьому у складі колоній поступово з'являлися клітини більш типового фібробластоподібного типу, яких ставало все більше. Овальні більші клітини залишалися у складі сформованих колоній, але в значно меншій кількості (у співвідношенні 1:20 – 1:40), хоча це, мабуть, не знижує їх роль у розвитку культури.

Через 15–30 діб МСК тимуса, що культивувалися на целофанових пластинках та на пластиковій або скляній поверхнях фіксували розчином Май-Грюнвальда (3 хв) та фарбували азур II-еозином (3 хв). Пофарбовані колонії на поверхні скляного матрацу, скляній поверхні чашки Петрі, лунки пластикового 6-лункового планшету видно неозброєним оком (рис. 3.1).

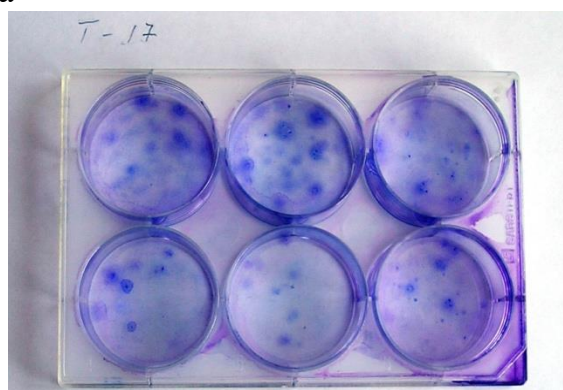
При вивченні колоній МСК тимуса під мікроскопом помітно, що клітини культур на різних культуральних поверхнях мають різноманітну форму, розміри, морфологію та характер росту (рис.3.2), що може бути важливим для формування відмінних функціональних властивостей клітин із різних культур, і що може враховуватися при розробці клітинних препаратів з необхідними властивостями.



а



б



в

Рисунок 3.1. Колонії МСК тимуса мишей на поверхні скляного флакона (а), скляної чашки Петрі (б), пластикового 6-лункового планшету (в). 15 діб культивування. Забарвлення азур II-еозином.

При культивуванні фрагментів тимуса мишей на скляній або пластиковій поверхні отримані в цілому подібні результати, які характеризувалися утворенням колоній, які містли морфологічно різні стромальні клітини, що склалися із двох основних типів: типових фібробластів і великих овальних. Колонії на пластиковій поверхні в основному були більші, клітини з них теж були значною мірою дещо більші і їх було зручніше отримувати, і тому далі для одержання МСК тимуса використовували пластикові планшети.

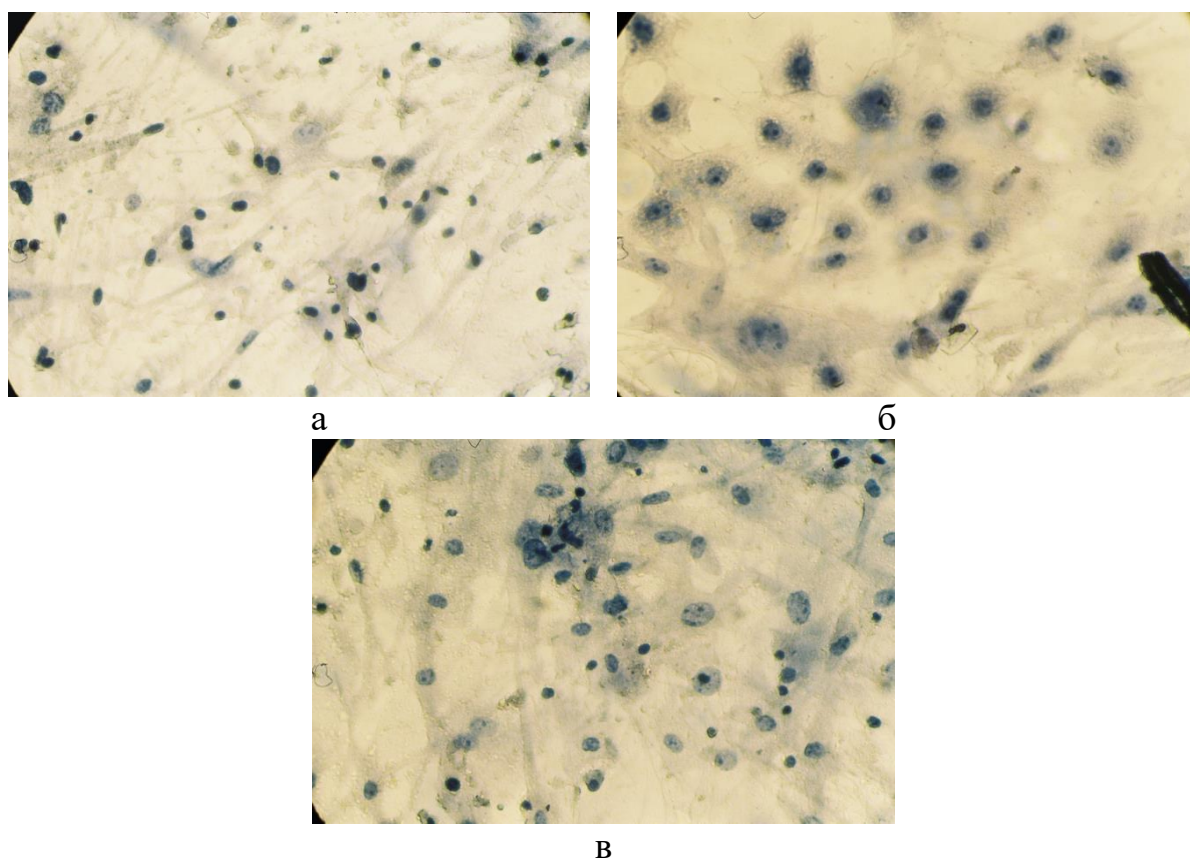


Рисунок 3.2. Культури МСК тимуса мишей на целофані (а), пластику (б) та склі (в). Збільшення $\times 200$. Забарвлення азур II-еозином.

3.1.2 Остеогенне і адипогенне диференціювання МСК тимуса

Лінійне диференціювання, що виявляє мультипотентність клітин, є одним з найбільш важливих міжнародних критеріїв приналежності певних клітин до МСК і розглядається як найбільш надійний для їх ідентифікації [83, 219]. Здатності до лінійного диференціювання МСК саме тимуса присвячена невелика кількість робіт [220, 221]. З урахуванням зазначених властивостей вважали за необхідне дослідити результати остеогенного і адипогенного диференціювання МСК тимуса за методиками, що викладені у розділі 2.

Як видно, МСК тимуса ефективно диференціювалися в остеогенному (рис.3.3, 3.4) і адипогенному (рис.3.5, 3.6) напрямкам, що свідчило про дійсно стромальне походження і мультипотентність МСК тимуса і достатню ефективність методики їх отримання

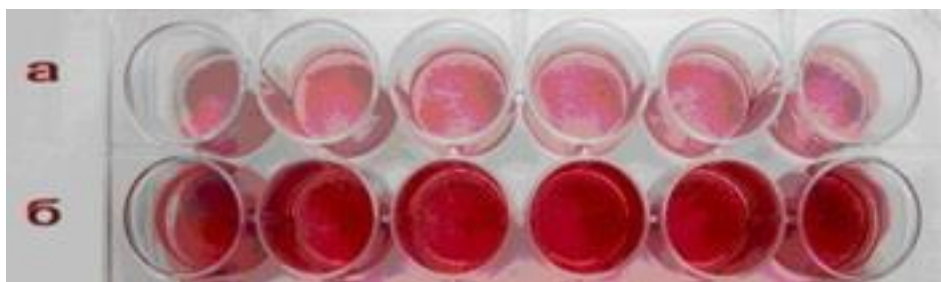


Рисунок 3.3. Остеогенне диференціювання МСК тимуса. а – МСК тимуса в звичайному поживному середовищі; б – МСК тимуса в остеогенному середовищі, 10-та доба культивування. Макропрепарат. Забарвлення алізариновим червоним.

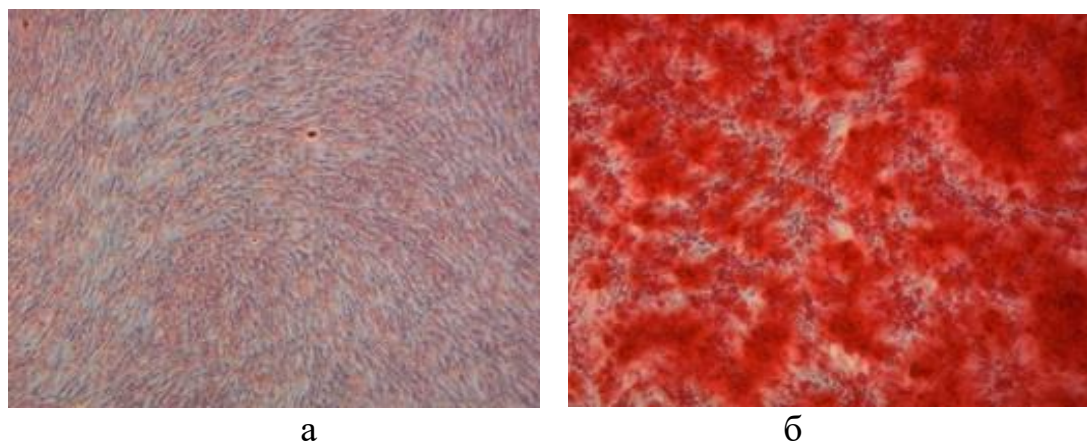


Рисунок 3.4. Остеогенне диференціювання МСК тимуса. а – МСК тимуса в звичайному поживному середовищі; б – МСК тимуса в остеогенному середовищі, 10-та доба культивування. Збільшення $\times 100$. Забарвлення алізариновим червоним.

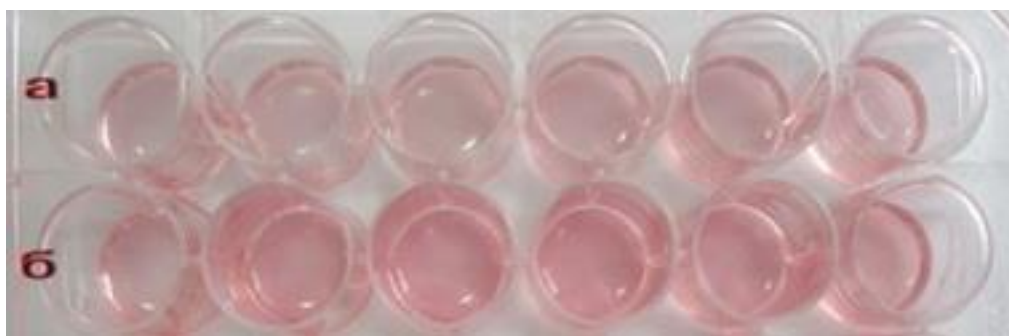


Рисунок 3.5. Адипогенне диференціювання МСК тимуса. а – МСК тимуса в звичайному поживному середовищі; б – МСК тимуса в адипогенному середовищі, 10-та доба культивування . Макропрепарат. Забарвлення масляним червоним.

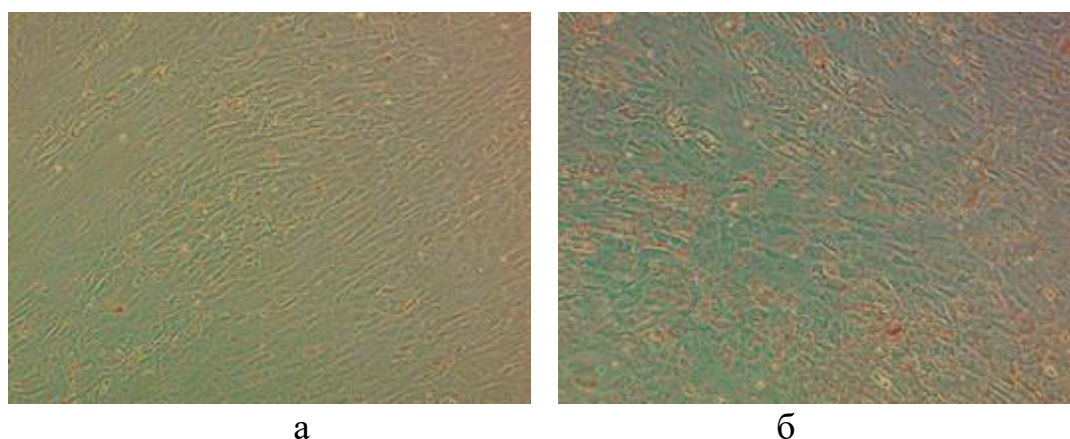


Рисунок 3.6. Адипогенне диференціювання МСК тимуса. а – МСК тимуса в звичайному поживному середовищі; б – МСК тимуса в адипогенному середовищі, 10-та доба культивування . Збільшення $\times 100$. Забарвлення масляним червоним.

3.2 Дослідження клітинних препаратів ГСК і прогеніторів фетальної печінки, а також деяких властивостей МСК тимуса

3.2.1 Оптимізація одержання клітин фетальної печінки (КФП)

Джерелом клітин була печінка 14-денних плодів мишей СВА. Кровоутворююча стадія розвитку печінки у мишей найкраще реєструється з 13-14 доби ембріогенезу. У цей час кровоутворення у жовточному мішку повністю припиняється і переходить у печінку, де гемопоетичні клітини складають 60% [207]. Їх можна виділити механічним ресуспендуванням. Але було не ясно, чи достатньо цього для отримання достатньої кількості ГСК і прогеніторів. Тому для одержання клітинних суспензій зразки печінки мишей розділяли на дві приблизно рівні частини і використовували два методи: механічне ресуспендування тканини органу та м'яку ферментативну обробку.

При механічному ресуспендуванні печінку переносили у чашку Петрі з 1–2 мл розчину Хенкса і руйнували паренхіму органу тонкими голками до одержання однорідної клітинної суспензії. Клітини змивали зі стінок невеликою кількістю розчину Хенкса у стерильну пробірку об'ємом 10 мл і пропускали через звичайний нейлоновий фільтр.

За другою методикою подрібнені фрагменти органу піддавали м'якій ферментативній обробці за допомогою суміші стандартних розчинів трипсину (0,25%) та версену (0,02%) у співвідношенні 2:1. При цьому клітини витримували при перемішування протягом 1 години в суміші трипсину та версену при 37°C, потім двічі відмивали в Дюльбеко-модифікованому середовищі Ігла (DMEM) і ресуспендували за допомогою піпетки.

В обох випадках, по закінченню процедури, клітини осаджували центрифугуванням (250 g, 10 хвилин) та ресуспендували їх в 1 мл середовища DMEM з 10 % ETC. Всі маніпуляції з клітинами проводили при кімнатній температурі.

Як видно з таблиці 3.1, кількість життєздатних клітин та ядровмісних

клітин, а також відсоток життєздатних клітин були майже однакові при їх отриманні методом механічного ресуспендування або методом м'якої ферментативної обробки.

Таблиця 3.1

Кількість клітин в суспензіях КФП, отриманих методами ресуспендування та ферментативної обробки

Показники	Статистичні показники	Методи отримання КФП	
		ресуспендування	ферментативна обробка
Кількість клітин з ядром, $\times 10^6/\text{мл}$	Median	19,9	19,1
	(25%-75%)	17,6 - 22,4	15,6 - 19,5
	n	6	5
	p	-	>0,05
Кількість життєздатних клітин, $\times 10^6/\text{мл}$	Median	17,0	15,4
	(25%-75%)	14,5 - 18,7	12,9 - 15,8
	n	6	5
	p	-	>0,05
% життєздатних клітин	Median	81,7	81,0
	(25%-75%)	79,5 - 83,5	80,6 - 81,9
	n	6	5
	p	-	>0,05

МСК тимуса відділяли від пластикової поверхні за допомогою розчину трипсин (0,25%): версену (0,02%) у співвідношенні 2:1 і піддавали кіоноксервуванню, як описано у розділі 2. Дані, наведені у таблиці 3.2 свідчать про стійкість МСК тимуса до кіоноксервування.

Таблиця 3.2

Життєздатність МСК тимуса після кіоноксервування

Статистичні показники	Життєздатність культивованих МСК, %	
	до	Після
	Кіоноксервування	
Median	82,9	84,7
(25%-75%)	75,9 - 90,3	77,5 - 92,3
n	6	6
p	-	>0,05

Є дані, що при кріоконсервуванні МСК зберігали адгезивні і проліферативні властивості, а експресія стромальних і адипогенних маркерів навіть підвищувалася [218].

Далі вивчали вплив кріоконсервування на життєздатність і активність клітин фетальної печінки. У 3 лунки 6-лункового планшету з 15-денною культурою МСК вносили по $2,5 \times 10^6$ отриманих КФП (в 2 мл) та проводили сумісне культивування при 37°C в атмосфері 5% CO_2 та абсолютної вологості. В тих же умовах культивували такі ж зразки КФП без МСК. Через 7 діб культивування збирали суспензії не адгезованих КФП з 3 лунок в одну центрифужну пробірку, осаджували центрифугуванням, ресуспендували в свіжому поживному середовищі, визначали кількість клітин та їх життєздатність. Кріоконсервування клітин здійснювали, як викладено у розділі 2.

Дані, наведені в таблиці 3.3, свідчать про те, що застосована програма кріоконсервування дозволяла ефективно зберігати життєздатність як нативних КФП, так і культивованих з культурою МСК тимуса суспензій ГСК і прогеніторів.

Таблиця 3.3

**Життєздатність культивованих з МСК тимуса КФП до і після
кріоконсервування**

Статистичні показники	Життєздатність культивованих КФП, %			
	в поживному середовищі		з МСК	
	до	після	до	після
	Кріоконсервування			
Median	84,1	85,0	84,2	86,4
(25%-75%)	82,0 - 86,6	83,8 - 86,6	81,6 - 87,2	84,6 - 88,6
n	6	6	6	6
p ₁	-	>0,05	-	>0,05
p ₂	—		>0,05	
p ₃		—		>0,05

Таким чином, програму кріоконсервування, що застосовувалася нами для заморожування нормальних ГСК і прогеніторів, можна використовувати і для

ефективного зберігання культивованих з МСК цих клітин і самих МСК тимуса. Отримані дані важливі з точки зору відомостей про зміну результатів кріоконсервування в залежності від дії на клітини біологічно активних молекул.

Відомо, наприклад, що обробка МСК перед кріоконсервуванням ІФН γ пом'якшує дію пов'язаних з процедурою факторів. Можуть по-різному впливати і інші фактори [223]. Є дані, що кріоконсервування є надійним методом збереження у клітин радіозахисної активності. Після кріоконсервування зібраного із кісткового мозку матеріалу через 2 години після летального опромінення і його інфузії через 24 години у дозі $0,5 \times 10^6$ клітин, виживанність мишей склала 65% проти 0% в групі, якій ККМ не трансплантували [224].

3.2.2 Визначення короткочасного впливу кондиційного середовища МСК тимуса на життєздатність КФП

Дослідження цього питання вбачалось необхідним для оцінки результатів вивчення контактної взаємодії МСК і ГСК в наших експериментах.

В роботі використовували кондиційне середовище, отримане при культивуванні тимуса на целофанових пластинках та на пластиковій поверхні. Через 15–20 діб від початку культивування фрагменту тимуса, коли на целофановій пластинці формувався суцільний моношар клітин навколо експланту, а в лунках 6-лункових пластикових планшетів – колонії, замінювали поживне середовище на 1 мл свіжого. Ще через 5 діб культивування відбирали кондиційне середовище, центрифугували його і зберігали при -20°C до використання.

По 0,5 мл суспензії КФП з концентрацією клітин 10^7 /мл поміщали в 3 лунки 24-лункового пластикового планшету. В одну з лунок вносили 0,5 мл поживного середовища, в 2 інші – по 0,5 мл кондиційного середовища МСК, культивованих на целофані або на пластиковій поверхні. Через 24 години сумісного культивування в CO_2 -інкубаторі при 37°C в атмосфері з 5% CO_2

суспензію КФП відбирали, підраховували кількість клітин і оцінювали їх життєздатність.

Як видно з таблиці 3.4, відсоток життєздатних клітин при культивуванні КФП з кондиційним середовищем практично не змінювався.

Таблиця 3.4

Життєздатність КФП після інкубації з кондиційним середовищем МСК тимуса

Статистичні показники	Життєздатність КФП після культивування, %		
	в поживному середовищі	з кондиційним середовищем МСК тимуса	
		від клітин на целофані	від клітин на пластику
Median	85,5	86,3	85,9
(25%-75%)	83,7 - 87,7	81,8 - 86,7	79,6 - 86,3
n	6	5	5
p ₁	-	>0,05	>0,05
p ₂	-	-	>0,05

3.2.3 Встановлення впливу на життєздатність КФП сумісного їх культивування з МСК тимуса

По 3 мл суспензії КФП (10^6 /мл) вносили у 2 лунки 6-лункового пластикового планшету: одна лунка – з МСК тимуса, що містила колонії МСК тимуса, одна лунка – контрольна (без МСК). Через 24 години сумісного культивування в CO_2 -інкубаторі при 37°C в атмосфері з 5 % CO_2 суспензію КФП відбирали, підраховували кількість і життєздатність клітин.

Як можна побачити з таблиці 3.5, відсоток життєздатних клітин при культивуванні КФП протягом 24 годин практично не змінювався. Сумісне культивування з МСК тимуса мишей також не впливало на цей показник.

Таблиця 3.5

Життєздатність КФП після інкубації з культурою МСК тимуса мишей

Статистичні показники	Життєздатність клітин, %		
	до обробки	після культивування	
		–	з МСК тимуса
Median	84,2	84,1	86,1
(25%-75%)	82,0 - 86,8	82,2 - 86,6	81,2 - 86,5
n	6	6	5
p ₁	-	>0,05	>0,05
p ₂		-	>0,05

3.2.4 Контактна взаємодія МСК тимуса і гемопоетичних клітин. Фібробласто-лімфоцитарні розетки

Зважаючи на літературні дані про контактну взаємодію МСК і ГСК, ми вивчили можливість реалізації цього процесу через мембранну спорідненість при короткочасному контакті клітин *in vitro*. Після розморожування кріоконсервовані МСК тимуса переводили в суспензію, відмивали, підраховували і змішували 10^4 МСК в 100 мкл середовища DMEM/F12 з 10^6 тимоцитів, клітин лімфатичних вузлів або КФП у співвідношенні 1:100, центрифугували 5 хвилин при 250 g, осад ресуспендували і суспензію вносили у камеру Горяєва.

В результаті взаємодії в суспензії утворювались міжклітинні контактні об'єднання із центрально розташованої МСК і приєднаних до неї гемопоетичних клітин (рис.3.7). Асоціацію МСК з трьома і більшою кількістю лімфоцитів вважали фібробласто-лімфоцитарною розеткою (ФЛР). Підраховували відносну кількість МСК, які утворювали ФЛР.

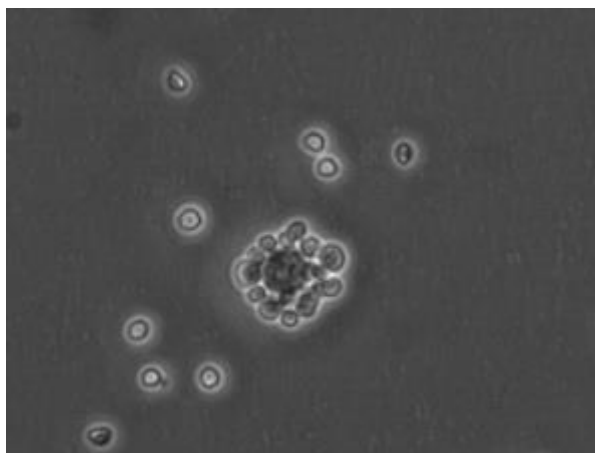


Рисунок 3.7 – Фібробласто-лімфоцитарні розетки, що утворюють МСК тимуса та тимоцити мишей СВА. Збільшення $\times 320$. Фазовий контраст.

З МСК тимуса утворювали велику кількість ФЛР тимоцити (рис.3.8). Значно меншу кількість ФЛР утворювали клітини лімфатичних вузлів і фетальної печінки, що в цілому відповідає літературним даним про більш високу спорідненість до МСК незрілих Т лімфоцитів. Кріоконсервування практично не впливало на утворення ФЛР

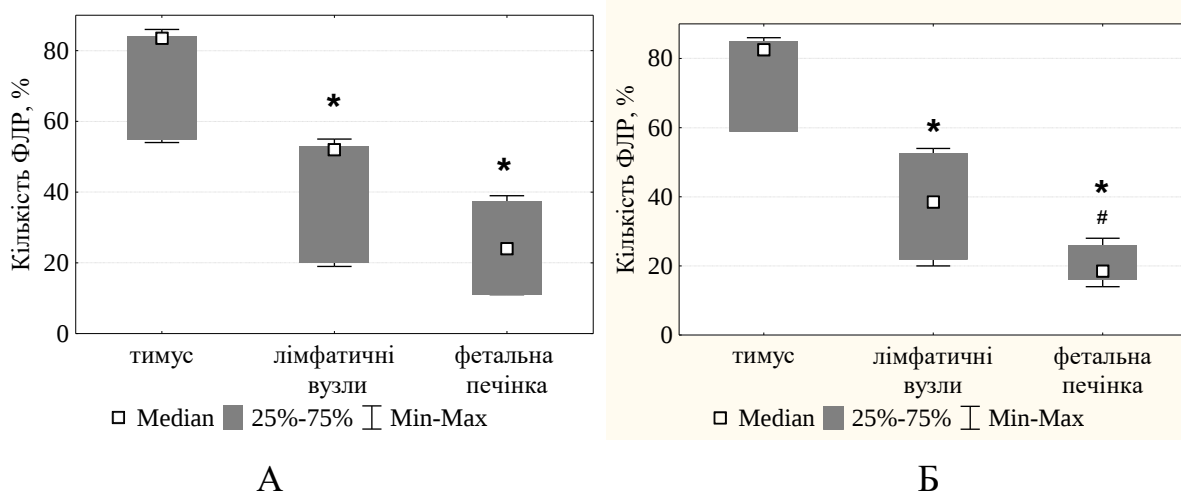


Рисунок 3.8. Кількість ФЛР, що утворені нативними (А) і кріоконсервованими (Б) МСК тимуса з клітинами тимуса, лімфатичних вузлів та фетальної печінки мишей. * – $p < 0,05$ порівняно з клітинами тимуса; # – $p < 0,05$ порівняно з клітинами лімфатичних вузлів.

Таким чином, встановлено, що при короткочасному контакті МСК тимуса з гемопоетичними клітинами в суспензії *in vitro* формувалися контактні об'єднання цих клітин у вигляді ФЛР. Більшою здатністю до контактної взаємодії з МСК тимуса володіли тимоцити, що, мабуть, відображає більш велику значущість мембранної спорідненості вивчених клітин саме у функціонуванні тимуса і, можливо, в тимусних нішах кістково-мозкових попередників тимоцитів. Активність МСК тимуса в формуванні ФЛР в результаті кріоконсервування не змінювалася. Мабуть, відомий вплив кріоконсервування, зокрема ДМСО, на диференціювальну здатність МСК, як це показано для фетальних МСК людини [208, 225, 226], не поширюється на здатність МСК тимуса мишей до утворення ФЛР, що може пояснюватись і різним походженням і іншими вихідними властивостями клітин, а також різною чутливістю певних клітинних процесів до ДМСО і самого процесу кріоконсервування. Можна припустити, що здатність МСК тимуса до утворення ФЛР найбільше залежить до від їх життєздатності, що, як встановлено нами, майже не погіршується в результаті кріоконсервування.

Висновки до розділу 3

1. ГСК і прогенітори, що містяться у фетальній печінці мишей 14 діб гестації можуть бути отримані шляхом механічної або м'якої ферментативної обробки. Життєздатність отриманих КФП і їх здатність до контактної взаємодії з МСК тимуса не порушується в результаті кріоконсервування, культивування з МСК тимуса і кондиційним середовищем МСК тимуса.
2. МСК тимуса мишей ефективно, з утворенням фібробластних колоній, нарощуються із експлантатів тимуса на скляній і пластиковій поверхні культуральних посудин. На поверхні целофанових пластинок спостерігається зливний рост МСК тимуса з обох сторін мембрани без колонієутворення. Проявляючи мультипотентність, кріоконсервовані МСК

тимуса диференціюються по остео- і адипогенному напрямкам у спеціальних середовищах. Клітини зберігають життєздатність після кріоконсервування.

3. Вперше встановлено, що МСК тимуса і гемопоетичні клітини мають виражену мембранну спорідненість, яка забезпечує їм можливість контактної взаємодії *in vitro*, що проявляється формуванням клітинних поєднань з центрально розташованою МСК і кількома приєднаними до неї гемопоетичними клітинами – фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР). Найбільшу спорідненість до МСК тимуса мають тимоцити (кількість утворених ФЛР – 84%) і, суттєво меншу, клітини лімфатичних вузлів (кількість утворених ФЛР – 52%) і КФП (кількість утворених ФЛР – 24%), що відображає наявність найвищої мембранної спорідненості до МСК тимуса у незрілих Т-клітин.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях: [227], [228], [229], [230].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ КОНТАКТНОЇ ВЗАЄМОДІЇ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ І ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ З МСК ТИМУСА НА РАДІОЗАХИСНУ АКТИВНІСТЬ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН

4.1 Розробка схеми для вивчення впливу преінкубації ККМ і КФП з МСК тимуса на радіозахисну активність трансплантованих гемопоетичних клітин

Однією з найбільш досліджених і адекватних моделей для вивчення активності ГСК і прогеніторів у регенерації імунної системи є індукований летальним опроміненням імунodefіцит. Імунна і гемопоетична системи є одними з найбільш чутливих до радіації [231]. Головним патогенетичним механізмом розвитку кістковомозкового синдрому, що виникає в результаті ураження кровотворних і лімфоїдних клітин іонізуючим випромінюванням, є імунodefіцит. Він швидко поглиблюється дією чинників мікробної агресії, яка виникає на тлі розвитку кишкового синдрому і підвищеної проникності епітеліального бар'єру, що призводить до летального результату. Зрозуміло, що адекватне походженню припинення цього патологічного процесу можливо тільки завдяки регенерації імунної системи з відновленням протиінфекційного захисту. Модель дозволяє встановити роль активності певних популяцій і субпопуляцій гемопоетичних і стромальних клітин у відновленні кровотворення та імунної системи.

Гемопоетичні і мультипотентні стромальні клітини у теперішній час вважаються найбільш ефективними засобами регенерації імунної системи [11]. Виявлена мембранна спорідненість між клітинами обох типів [229] і одержані дані, що контактна взаємодія тимоцитів з МСК стимулює лінійне диференціювання останніх [232]. Міжклітинна взаємодія є одним із механізмів лікувальної дії клітин фетальної печінки [233]. З урахуванням викладеного і

даних, наведених у літературному огляді, можна було припустити, що контакт МСК з ГСК зможе підсилити імунобіологічну активність гемопоетичних клітин, і на цій основі – радіозахисну.

Вивчали радіозахисні властивості таких кріоконсервованих препаратів ГСК і прогеніторів: клітин кісткового мозку (ККМ) та клітин фетальної печінки (КФП) мишей, а також цих же клітин, преінкубованих *in vitro* з МСК тимуса мишей, що були представлені в культурах численими фібробластними колоніями.

Також досліджували радіозахисну активність самих МСК тимуса мишей, отриманих із культур з численими фібробластними колоніями, та, як контроль на дію клітин, використовували кондиційне середовище з сумісної культури сингенних КФП мишей та МСК тимуса, враховуючи, що в спільній культурі більш вірогідно можуть бути присутні фактори як МСК, так і ГСК.

Культуру МСК тимуса мишей СВА отримували на поверхні 6-лункових планшетів із експлантатів фрагментів тимуса. На 12-ту добу культивування, коли утворювалися добре помітні численні колонії фібробластних клітин, із лунок видаляли середовище і додавали 5×10^6 розморожених ККМ або КФП в 2 мл свіжого середовища RPMI 1640 з 10% ЕТС. Для контролю впливу саме контактної взаємодії між МСК і ГСК з прогеніторами і з урахування того, що певна частина клітин може прилипнути до пластику, тобто проконтактувати з ним і змінити властивості без участі контактної міжклітинної взаємодії, ККМ та КФП в тій же кількості та концентрації інкубували в чистих планшетах. Окремо у тих же умовах культивували МСК тимуса мишей. Всі культури розміщували в інкубаторі CO_2 з 5 % CO_2 при 37°C .

Через 20 годин сумісного культивування обережним піпетуванням збирали суспензії ГСК і прогеніторів, які легко відокремлювалися від МСК тимуса, центрифугували при 250 g 10 хв, осад ресуспендували в поживному середовищі RPMI 1640 з 10% мишачої сироватки до концентрації клітин $2,5 \times 10^6/\text{мл}$. Із лунок з сумісною культурою КФП та МСК відбирали

культуральне середовище. З поверхні лунок з нормальною культурою МСК за допомогою розчину трипсину-версену знімали клітини, відмивали їх та ресуспендували в поживному середовищі RPMI 1640 з 10% мишачої сироватки до концентрації $2,5 \times 10^5$ /мл.

Таким чином, були досліджені наступні клітинні препарати:

1. Кондиційне середовище (КС) культури *in vitro* МСК тимуса і КФП (n=14).
2. ГСК і прогенітори кісткового мозку мишей (ККМ) (n=16).
3. ГСК і прогенітори кісткового мозку мишей, преінкубовані з МСК тимуса (іККМ) (n=16).
4. ГСК і прогенітори фетальної печінки мишей (КФП) (n=15).
5. ГСК і прогенітори фетальної печінки мишей, преінкубовані з МСК тимуса (іКФП) (n=14).
6. МСК тимуса мишей лінії СВА (n=16).

Контрольні опромінені миші не отримували ніяких препаратів.

Отримані ГСК і прогенітори різних клітинних препаратів в кількості $0,5 \times 10^6$ і в 0,1 мл середовища RPMI з 10 % сироватки мишей вводили в ретроорбітальний синус опроміненим напередодні (за 24 години) мишам лінії СВА. За даними літератури це мінімальна кількість ККМ, яка може сприяти виживаності летально опромінених мишей [224]. МСК вводили в кількості 5×10^4 клітин на одну мишу. За тваринами спостерігали протягом 16 тижнів, фіксуючи дату загибелі кожної миші. Експеримент проводили за блоковим принципом, коли у кожному досліді були присутні клітинні препарати із кількох груп і обов'язково контрольних нормальних тварин, тому кількість тварин у контрольній групі в цілому була суттєво вища, ніж в інших.

4.2. Вплив трансплантації нормальних та преінкубованих з МСК тимуса ККМ і КФП, а також МСК тимуса на виживаність і середню тривалість життя загиблих тварин після летального опромінення

Опромінення призводило до поступової загибелі всіх контрольних мишей до 14 тижня (рис.4.1, А). За перший місяць загинуло приблизно 70 % тварин. Контрольні опромінені миші всі загинули через 14 тижнів. Введення КС співкультури МСК і КФП не впливало на виживаність тварин. Як і контрольні опромінені миші, вони загинули протягом 14 тижнів.

Трансплантація сингенних ККМ мишам сприяла підвищенню виживаності в ранні терміни після опромінення; на 3 тиждень – суттєво. Далі кількість тварин, які вижили, поступово зменшувалася так, що на 15 тиждень гинули всі миші (рис.4.1,Б).

Доза ККМ ($0,5 \times 10^6$) за даними літератури є пороговою. Помітний позитивний вплив ККМ на початку експерименту вірогідно обумовлений наявністю серед ККМ зрілих мієлоїдних гемопоетичних клітин, які здатні до негайної реалізації протиінфекційних імунних реакцій у відповідь на інфекцію, що іде із кишківника [234]. З часом доля зрілих мієлоїдних клітин зменшується, а їх розвиток із кістковомозкових короткорепопулюючих (КР-ГСК) попередників виявляється недостатнім для формування ефективної чисельності клітин природного імунітету. Наявні у кістковому мозку В-лімфоцити не можуть робити внесок у протиінфекційний захист, оскільки для цього необхідна кооперація з Т-лімфоцитами-хелперами, яких обмаль у кістковому мозку у відповідний час.

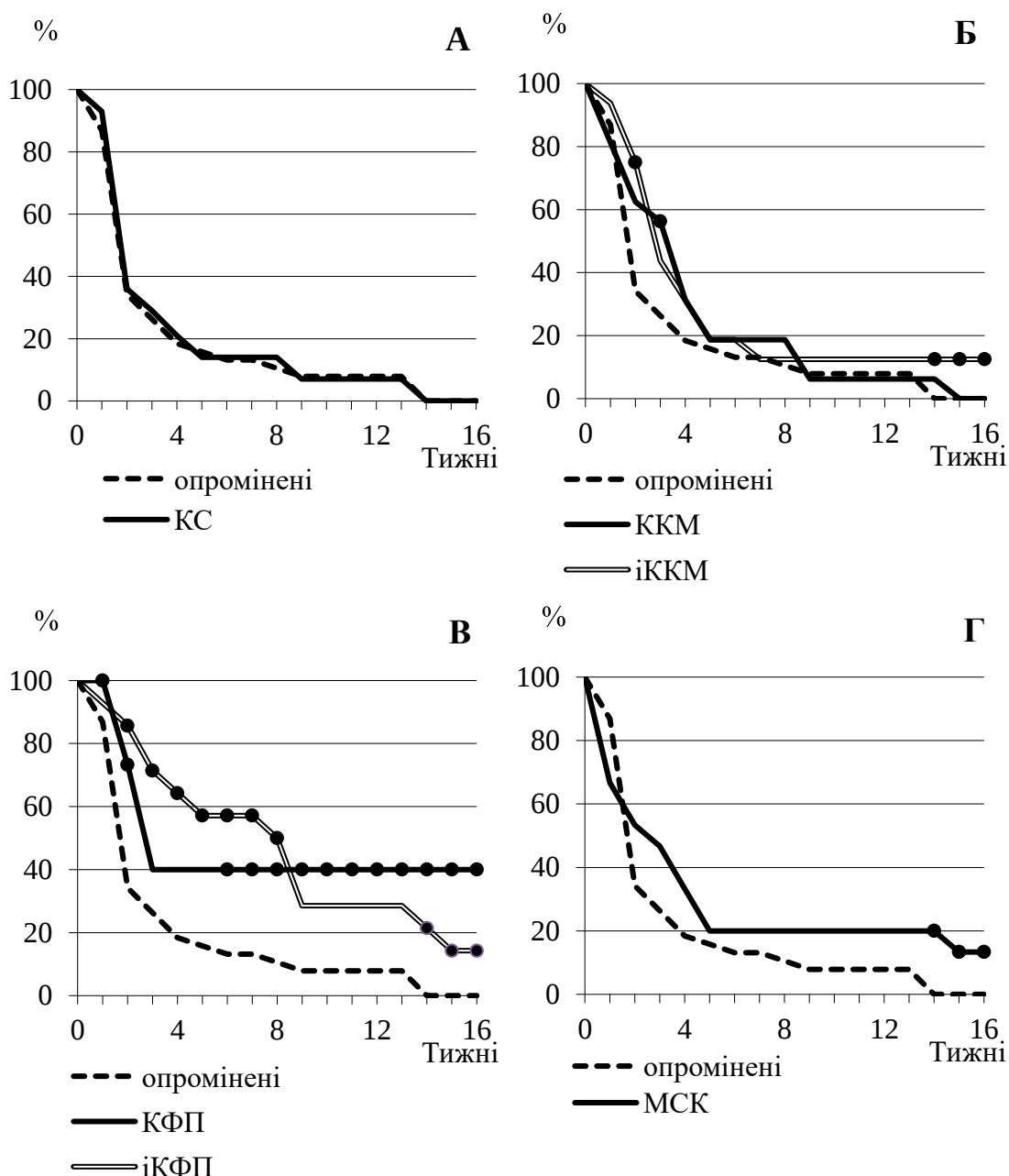


Рисунок 4.1. Динаміка виживаності летально опромінених мишей, захищених кондиційним середовищем (А), нормальними та преінкубованими з МСК тимуса ГСК і прогеніторами кісткового мозку (Б), фетальної печінки (В), МСК тимуса (Г). • (на лінії) – $p < 0.05$ по відношенню до «опромінених».

Динаміка виживаності тварин після введення iKKM спочатку мало відрізнялася від такої у мишей, що отримували нормальні KKM. Але з 7 тижня кількість тварин, що вижили, у цій групі переставала зменшуватись, показник виходив на плато і залишався таким до кінця спостереження (16 тижнів). З 14

тижня виживаність мишей у цій групі була достовірно вища, ніж у контролі. Це, мабуть, свідчить, що сумісна інкубація МСК з ГСК і прогеніторами супроводжується підтримкою життєдіяльності останніх, можливо, впливом МСК на ДР-ГСК, і підвищенням ефективності диференціювання останніх у належний час у зрілі мієлоїдні клітини і лімфоцити, які завдяки участі в імунологічних реакціях компенсують розвиток летального кістковомозкового синдрому, і тому виживаність тварин підвищується.

Динаміка виживаності мишей в результаті трансплантації КФП суттєво відрізнялася від тієї, що була в експерименті з ККМ. Як і ККМ, КФП підвищували виживаність мишей у деякі періоди. Але нормальні КФП більш виражено підвищували виживаність у пізньому після опромінення періоді (рис. 4,В), що свідчило про наявність в препаратах КФП певної кількості ГСК з прогеніторами, що здатні проявляти активність тривалий час. Зокрема, відомо, що ГСК фетальної печінки, на відміну від таких клітин кісткового мозку, у більшій кількості знаходяться у фазі G1 клітинного циклу, що свідчить про їх вихід із дормантного стану і більшу готовність до диференціювання, що робить внесок у підвищення виживаності у ранній період. Через певний тривалий час, мабуть, у більш швидкий темп диференціювання і проліферації вступають ДР-ГСК, що і забезпечує ефективніше формування імунної системи і більшу виживаність наприкінці експерименту.

В результаті трансплантації летально опроміненим мишам і КФП динаміка виживаності проявлялася по іншому. Вона була значно вищою досить тривалий час у перші тижні, що суттєво відрізняло дію цих клітин від нормальних КФП, і наприкінці дослідження, коли виживаність у цій групі була суттєво більша, ніж у контролі з опроміненими і не захищеними тваринами. Можна припустити, що позитивний ефект на початку експерименту пов'язаний зі стимуляцією при індукції КФП МСК тимуса реакцій природного імунітету шляхом активації КР-ГСК фетальної печінки, що, як відомо, відрізняються більш швидкою проліферацією, але що може привести у подальшому до виснаження КР-ГСК і недостатньо ефективного поповнення імунної системи

зрілими активними формами на пізніх термінах експерименту і починають ефективно функціонувати ДР-ГСК.

Для більш чіткого відображення і кращої демонстрації імунорегенеративної і радіозахисної дії досліджуваних клітин був використаний метод визначення середньої тривалості життя загиблих тварин (СТЖ), що дає можливість розширити характеристику радіозахисної дії клітин. Результати представлені і на рисунку 4.2.

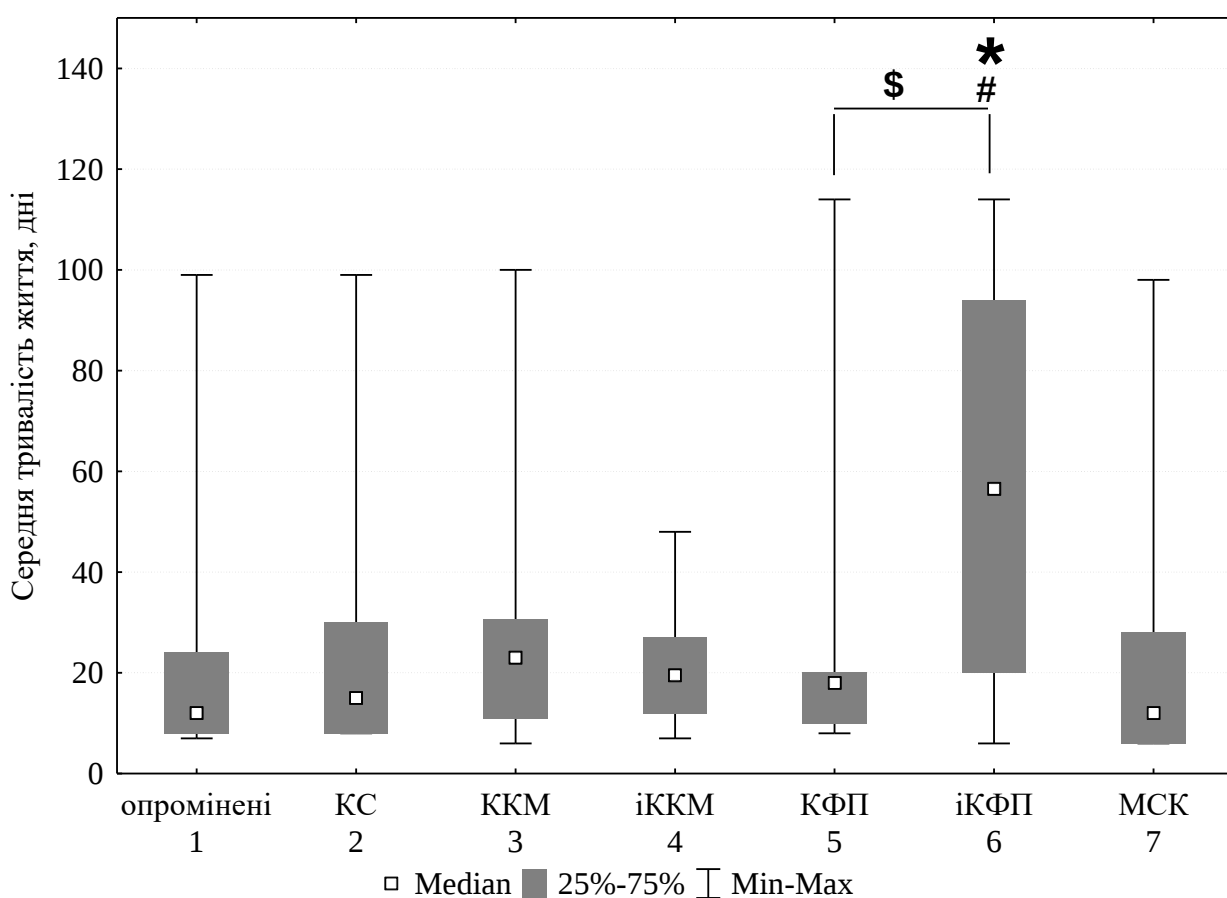


Рисунок 4.2. Середня тривалість життя загиблих летально опромінених мишей, що отримували різні препарати ГСК і прогеніторів. * – $p < 0,05$ по відношенню до опромінених мишей, # – $p < 0,05$ по відношенню до опромінених мишей, що отримували КС, \$ – $p < 0,05$ між групами.

Як можна побачити, СТЖ значно підвищувалася тільки у групі тварин, які отримували іКФП, що є наслідком вираженого зниження летальності на ранніх термінах розвитку кістковомозкового синдрому.

Окремо заслуговує на увагу той факт, що трансплантація сингенних МСК сприяла тенденції до підвищення показників виживаності майже у всі терміни спостереження, особливо у пізньому періоді (рис. 4.1, Г), з 14 тижня – достовірно. В цей час загинули всі тварини в контрольній групі опромінених тварин, а в групі мишей, що отримували МСК, залишалось живими 13 % тварин. Це дещо несподіваний результат, тому що МСК не диференціюються в гемопоетичні клітини, а стали уявлення про лікування радіаційного кістковомозкового синдрому полягають в необхідності трансплантації ГСК і прогеніторів, із яких можуть розвинутиись клітини імунної системи.

Механізм імуностимулюючої дії трансплантованих МСК може бути пояснений наявністю кількох складових. По-перше, МСК відіграють велику роль у підтримці ГСК і прогеніторів [235]. Вони є головним клітинним компонентом кістковомозкових ніш ГСК [11]. Важливу роль МСК відіграють і в тимусних нішах, де беруть участь у диференціюванні тимоцитів [16, 236–238]. Відома спорідненість МСК до незрілих Т-клітин [37, 239]. Можна лише припустити, що введені МСК певною мірою заміщають ушкоджені опроміненням стромальні клітини реципієнта [240] і створюють більш адекватне мікрооточення для зберігання і виходу у проліферацію і диференціювання ГСК і прогеніторів, що залишилися дієздатними після опромінення. Вважається, що МСК є відносно радіорезистентними до невеликих доз, а опромінення МСК дозою 2,5 Гр навіть покращує їх здатність підтримувати гемопоєз; стимулюється остеогенез пригнічується адипогенез [241]. Як правило МСК проявляють чутливість до опромінення і втрачають свої функціональні можливості незалежно від тканинного походження при летальному опроміненні. Тому має право на існування варіант, коли введені нормальні МСК підсилюють функціонування уражених МСК реципієнта і сприяють налагодженню ніш для ГСК, що вижили, своєю діяльністю [242–244].

Позитивна радіозахисна дія МСК частково може бути пояснена тим, що за деяких умов *in vitro* МСК тимуса, але не кісткового мозку підвищують синтез антитіл [82]. *In vivo* МСК теж можуть стимулювати синтез антитіл [245].

Ще одна реальна можливість полягає у виявленій нещодавно здатності МСК до участі у реакціях уродженого імунітету завдяки експресії Toll-рецепторів, що може бути механізмом нейтралізації інфекції з пригніченням тим самим розвитку кістково-мозкового і кишкового синдромів. МСК також здійснюють протимікробний захист, продукуючи антимікробні пептиди і білки, а також екстраклітинні везикули [246–248]. Причому, здатність МСК до міграції у вогнища запалення підсилюється [249]. Є дані, що МСК і міелоїдні клітини функціонально кооперуються, підсилюючи активність клітин природного імунітету у протиінфекційному захисті [250]. Введення людських кордових МСК опроміненим щурам значною мірою сприяло регенерації кісткового мозку [251]. І по-четверте, показана наявність у МСК метаболічної і адаптогенної активності, яка сприяє постстресовій регенерації імунної системи [252], а також неспецифічної загальної регенеративної дії [253–257].

Таким чином, є підстави думати, що імунорегенеративна і радіозахисна активність трансплантованих МСК може, у певній мірі, реалізовуватись ними самими, або завдяки позитивному диференціювальному, проліферативному і кооперативному їх впливу на ГСК і прогенітори.

Отримані дані показали, що у порівнянні з нормальними ККМ і КФП індукція цих клітин МСК сприяє підвищенню радіозахисної активності ККМ у пізньому після опромінення періоді (підвищення виживаності мишей – 13 % проти 0 у неіндукованих), мабуть, за рахунок ДР-ГСК. Індукція КФП забезпечує значне підвищення виживаності у ранньому періоді у 3-5 разів, мабуть, внаслідок активації КР-ГСК, з менш вираженим підвищенням виживаності у пізньому періоді. Відповідно ефект дії іКФП виділявся і значним подовженням СТЖ загиблих мишей (у 2,4 рази).

Таким чином, встановлено, що контактна взаємодія з МСК тимуса стимулює радіозахисну активність ГСК і прогеніторів, які містяться і в ККМ, і в КФП. Скоріш за все, ефективність радіозахисної дії розглянутих в експерименті індукованих МСК тимуса клітин реалізується по-різному в залежності від впливу на ГСК і прогенітори різного ступеня зрілості.

В отриманих результатах віділяються дані по КФП, як нормальних, так і преінкубованих з МСК тимуса. Тому вони викликають особливу зацікавленість ще й тому, що ГСК і прогенітори КФП досить мало вивчені, особливо у порівнянні з ГСК ККМ. Тому виникла необхідність надання більш детальної характеристики цих клітин. У зв'язку з цим треба зазначити, що вперше ГСК з'являються в області вздовж дорзальної ембріональної аорти, що визначається як аорто-гонадо-мезонефрос (АГМ). Потім вони мігрують у фетальну печінку і далі заселяють кістковий мозок, а також деякі інші тканини [258, 259].

У фетальній печінці мишей ГСК з'являються вже через 6 днів розвитку плода, і їх трансплантація опроміненим тваринам забезпечує радіозахисний ефект і відновлення гемопоезу [260]. Зменшення вмісту ГСК відбувається після 15 діб, але до того їх кількість і проліферативна активність є на рівні, вищому, ніж у дорослих кістковомозкових ГСК [261, 262]. І тут треба зазначити, що у нашій роботі використовувалися саме гемопоетичні клітини 14 діб гестації.

Гемопоетична стадія розвитку фетальної печінки людини починається із 6-го тижня гестації, так що з 7 і до 15 тижня гестації кровоутворюючі клітини складають 60% всіх клітин. В-лімфоцити, що експресують IgM, реєструються на 9-10 тижні, а до 11 тижня виявляються і клітини, позитивні на IgG і IgA [207]. У фетальній печінці в невеликій кількості знаходяться також алореактивні попередники Т-лімфоцитів [263]. Зрілих Т- і В-лімфоцитів імунофенотипічний аналіз КФП людини не виявляв. Між тим, у дорослому мікрооточенні ГСК фетальної печінки могли диференціюватися у В-лімфоцити всіх класів [264].

У фетальній печінці людини 5-12 тижнів гестації міститься певна кількість попередників гранулоцитів, які експресують рецептори для колонієутворюючих факторів і завдяки цьому можуть вступати в проліферацію і диференціювання. У цей же час у печінці людини з'являються перші гранулоцити. Фетальні клітини людини 6-12 тижнів гестації, що культивувалися *in vitro* 7-14 діб, містили в суспензії $3,78 \pm 0,48\%$ CD34⁺-клітин, $8,99 \pm 0,40\%$ CD45⁺-клітин і $1,09 \pm 0,07\%$ AC133⁺-клітин. При цьому 70% AC133⁺-

клітин експресували CD34, а 98% CD34⁺-популяції – CD45. У процесі культивування кількість CD45⁺-клітин значно зростала, а CD34⁺- і AC133⁺-клітин знижувалася. Культури формували 185,75±21,21 еритроїдних, 220,38±38,01 моногранулоцитарних і 217,50±15,31 змішаних колоній. Була позитивна кореляція між вмістом CD45⁺-клітин і кількістю колонієутворюючих одиниць. Життєздатність клітин фетальної печінки знижувалася на 10-20% в результаті кріоконсервування [208]. У свіжоізолюваних і кріоконсервованих суспензіях клітин фетальної печінки людини різного ступеня гестації виявляється приблизно 2,65±0,32% CD45⁺-клітин і 7,51±1,35% HLA-DR⁺-клітин. Низький вміст лімфоїдних клітин, мабуть, обумовлює слабку імуногенність КФП у змішаній культурі лімфоцитів. Кріоконсервування зберігає проліферативну і імунологічну активність і практично не впливає на фенотип лімфоїдних клітин [265].

Показано, що ГСК фетальної печінки людей експресують різний спектр CD-молекул. Спостерігається високий рівень CD34 [266] і CD144 [267]. Фенотип за іншими молекулами був Thy-1⁺, CD117⁺, CD123⁺, HLA-DR⁺, CD7⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD71⁺ і CD115⁺. Ці клітини відновлювали гемопоєз *in vivo* [268]. Також у фетальній печінці містяться клітини з фенотипом CD34⁺⁺ CD45^{low/-}, що експресують також CD133 [269].

Фетальні ГСК продукують велику кількість різноманітних гуморальних факторів і цитокінів, які проявляють виражений трофічний ефект, як по відношенню до трансплантованих фетальних клітин, так і сприяють позитивній їх дії на клітини реципієнта [270].

Здатність фетальних ГСК репопулювати імунну і кровотворну системи в умовах сингенної трансплантації є основною інтегральною характеристикою цих клітин. За фенотипом фетальні ГСК характеризуються наявністю експресії CD34- і CD45-антигенів, а також відсутністю CD38 і HLA-DR. Але у першому триместрі тільки 5% CD45⁺-клітин позитивні на CD34-антиген [271].

Найбільша кількість циркулюючих ГСК спостерігається у другому триместрі у зв'язку з міграцією ГСК із фетальної печінки у кістковий мозок [272]. У цьому періоді CD34⁺-клітини складають 4% клітин крові, 16 % клітин кісткового мозку, 6% клітин печінки і 1,1% клітин тимуса [273]. Разом з цим, треба відмітити, що кількість CD34⁺CD38⁻-клітин більш висока на ранніх етапах гемопоезу, що свідчить про їх менший ступінь диференціювання, але більший потенціал. Фетальні ГСК проліферують значно швидше, ніж ГСК кісткового мозку [261].

На 7% популяції ГСК, що мала фенотип Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻AA4.1⁺ (KSLA) виявлена тирозинкіназа Tie-2-рецептора. Ці клітини були найбільш активно і довготривало репопулюючими. Репопулююча активність фетальних ГСК зберігається після кріоконсервування [274].

Показано, що коли трансплантація алогенних кістковомозкових ГСК сприяє 10-35% виживаності летально опромінених тварин, введення такої ж кількості алогенних ГСК фетальної печінки відзначається 100% виживаністю [275]. Радіозахисна дія фетальних ГСК була підтверджена рядом авторів [276], у тому числі і при алогенній трансплантації на кролях [277] і собаках [278].

Фетальні ГСК, які мають більший потенціал довготривалої підтримки гемопоезу, визначені як довгочасно репопулюючі ГСК (ДР-ГСК) [279].

Різні фетальні клітини проявляють здатність до мембранної взаємодії. Так асоціації клітин у вигляді розеток виявляються у 18-тижневому кістковому мозку між макрофагами, остеокластами, з однієї сторони, і лімфоцитами, з іншої [280], що відповідає сучасним знанням про важливість мембранної взаємодії різних типів клітин у гемопоезі.

Протирадіаційний ефект КФП може бути і результатом того, що КФП містять також МСК [281], які здатні до остео-, хондро-, адипо- і міогенного диференціювання [282], підтримують фетальний гемопоез [283, 284] і розглядаються як перспективний матеріал для регенеративної медицини [261, 285], тому що, у першу чергу, фетальні МСК мають значно більшу за їх дорослі аналоги проліферативну активність і диференціювальний потенціал [286]. Вони

не несуть гемопоетичних або ендотеліальних маркерів, але експресують стромальні маркери: CD29, CD73, CD105, CD44, CD90 і протеїни позаклітинного матриксу: віментин, ламінін і фібронектин [287]. Дуже важливою рисою фетальних МСК є те, що, на відміну від дорослих МСК кісткового мозку, вони експресують певний набір маркерів плюрипотентних стовбурових клітин : Oct-3, Nalog, Rex-1, SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 і Tra-1-81, що, мабуть, має відношення до збереження ними диференціовального фенотипу і значно більшої швидкості самооновлення, ніж у дорослих клітин (30–35 годин проти 80–100 годин), яка забезпечує їм конкурентну перевагу у приживленні після трансплантації [271]. Також треба відмітити наявність у фетальних МСК активної теломерази [288], низький рівень експресії HLA I і відсутність такої HLA II. У відповідь на інтерферон γ зміна експресії названих молекул у фетальних МСК відбувається значно повільніше [289].

В 4-тижневій печінці фібробластні попередники не виявляються. Але вже на 5–6 тижні кількість КУО-Ф сягає $5,2\text{--}3,6 \times 10^5$, яка зберігається до 14–16 тижня, далі знижується і на 25–27 тижні КУО-Ф виявляються у кількості $0,2 \times 10^5$ [274].

МСК фетальної печінки забезпечують унікальне мікросередовище для ГСК у порівнянні зі стромою дорослого кісткового мозку завдяки, у тому числі, активній Wnt-сигналізації під час ембріонального гемопоезу, у той час, як мікрооточення ГСК у дорослому організмі акцентовано регулюється сигнальною системою Notch [280].

Фетальні МСК експресують характерні для мезенхімальних клітин молекули: віментин, α -актин гладких м'язів, нестін і CD146. Деяка частка фетальних МСК продукує також цитокератин 8, що свідчить про можливу участь їх у епітеліо-мезенхімальному переході. Також зареєстрована секреція великої кількості ростових факторів [290].

Фетальні МСК формують КУО-Ф [225], диференціюються за адипогенним, остеогенним і хондрогенним напрямком [226] і при цьому

активно продукують цитокіни [292]. Коли джерелом МСК була печінка 14-денних плодів мишей СВА і тканина людської печінки 6-7 тижнів гестації клітини витримували в культурі клітин до 100 подвоєнь, проявляли здатність до активного самооновлення з часом подвоєння упродовж 46 годин і мали імунофенотип: CD34⁺, CD90⁺, c-kit⁺, EPCAM⁺, c-met⁺, CD44⁺, віментин⁺ [293].

В КФП виявлені також гематосудинні клітини, що при трансплантації дорослим мишам проявляють високий потенціал приживлення судинного ендотелію і його відновлення [294].

Як і належить МСК, при кокультивуванні КФП, що містять фетальні МСК, з лімфоцитами, вони пригнічували спонтанну і мітогеніндуковану проліферацію зрілих лімфоцитів периферичної крові, а самі проявляли високий рівень спонтанної проліферації [295].

Введення фетальних клітин в організм не призводить до алергічної сенсibiliзації організму і не провокує розвиток аутоімунних реакцій [296].

Показано також, що при котрансплантації з аломієлотрансплантатами клітини фетальної печінки пригнічують індукцію РТПХ. Також котрансплантація клітин фетальної печінки з клітинами кісткового мозку здійснює позитивний імуномодулюючий і регенеративний вплив [297, 298], можливо, за участю контактної взаємодії МСК і ГСК різного ступеня зрілості.

Враховуючи викладене, можна припустити, що імуномодулюючий і радіозахисний потенціал клітин фетальної печінки [299] може бути пов'язаний не тільки з особливими властивостями фетальних ГСК, здатних до швидкої проліферації і довготривалої репопуляції, але і бути результатом взаємодії ГСК і МСК, які містяться і, мабуть, разом функціонують у фетальній печінці. Не виключено також, що самі по собі фетальні МСК здатні опосередковувати протирадіаційний ефект.

Висновки до розділу 4

1. Вперше показано, що трансплантовані летально опроміненим мишам МСК тимуса суттєво підвищують виживаність тварин (на 13 %).
2. Трансплантація опроміненим мишам нормальних ККМ сприяє тимчасовому підвищенню виживаності на короткий термін раннього після опромінення періоду. Тільки преінкубовані з МСК тимуса ККМ суттєво підвищують виживаність тварин (на 13%) і наприкінці досліджу.
3. Нормальні КФП суттєво (на 27–40 %) підвищують виживаність в основному у пізньому після опромінення періоді. Навпаки, в результаті трансплантації преінкубованих з МСК тимуса КФП виживаність значно підвищується (на 39–52 %), головним чином протягом раннього періоду, але суттєве її підвищення спостерігається і наприкінці досліджу. Зазначена динаміка виживаності узгоджується зі значним підвищенням середньої тривалості життя загиблих тварин (в 4,7 рази) виключно у групі реципієнтів преінкубованих КФП.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях: [300], [301], [302], [303], [304], [305], [306], [307], [308], [309], [310], [311], [312], [313].

РОЗДІЛ 5

**ВПЛИВ НА ІМУННУ СИСТЕМУ ОПРОМІНЕНИХ МИШЕЙ
ТРАНСПЛАНТАЦІЇ МСК ТИМУСА ТА ІНДУКОВАНИХ
КОНТАКТНОЮ ВЗАЄМОДІЄЮ З НИМИ ГСК І ПРОГЕНІТОРІВ
КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ**

Висвітлені в попередньому розділі результати експериментів показали, що препарати ГСК і прогеніторів володіють вираженою радіозахисною активністю, що, вірогідно, обумовлено стимуляцією ними регенерації імунної системи, відновлення якої гальмує розвиток летального кісткомозкового синдрому. Встановлено, що суттєво більш активними за інтактні клітини є ГСК кісткового мозку і фетальної печінки, що індукуються *in vitro* попередньою контактною взаємодією з МСК тимуса. Скоріш за все, це пов'язано з їх підвищеними після контакту з МСК імунобіологічними властивостями. Таке припущення вбачається ймовірним, тому що загибель летально опромінених мишей є наслідком глибокого пригнічення імунної системи і розвитку, по суті, опортуністичного інфекційного захворювання, що спричиняється мікроорганізмами, які проникають у внутрішнє середовище організму із ураженого кишківника. Але експерименти, які б визначили зміни регенеративної та імунобіологічної активності ГСК і прогеніторів в результаті їх контактної взаємодії з МСК тимуса *in vitro*, поки що практично не проводились. Також мало вивчена регенеративна і радіозахисна активність і самих МСК тимуса.

Тому у даному розділі роботи було поставлене завдання: вивчити вплив сингенної трансплантації МСК тимуса, а також преінкубованих з ними ГСК і прогеніторів кісткового мозку і фетальної печінки на загальний стан імунної системи летально опромінених мишей, відновлення клітинного і гуморального імунітету, природного і адаптивного, а також здатність лімфоцитів до синтезу вірус-, мітоген-індукованого інтерферону і ЛПС-індукованого ФНП α .

Перш за все, для виконання роботи була розроблена відповідна експериментальна модель.

5.1. Експериментальна модель вивчення впливу контактної взаємодії МСК тимуса з ГСК і прогеніторами на їх імунобіологічну і регенеративну активність

Досліджували регенеративні та імунобіологічні властивості ГСК і прогеніторів кісткового мозку і фетальної печінки, преінкубованих *in vitro* з первинними культурами МСК тимуса, що містили чисельні фібробластні колонії (рис.5.1).

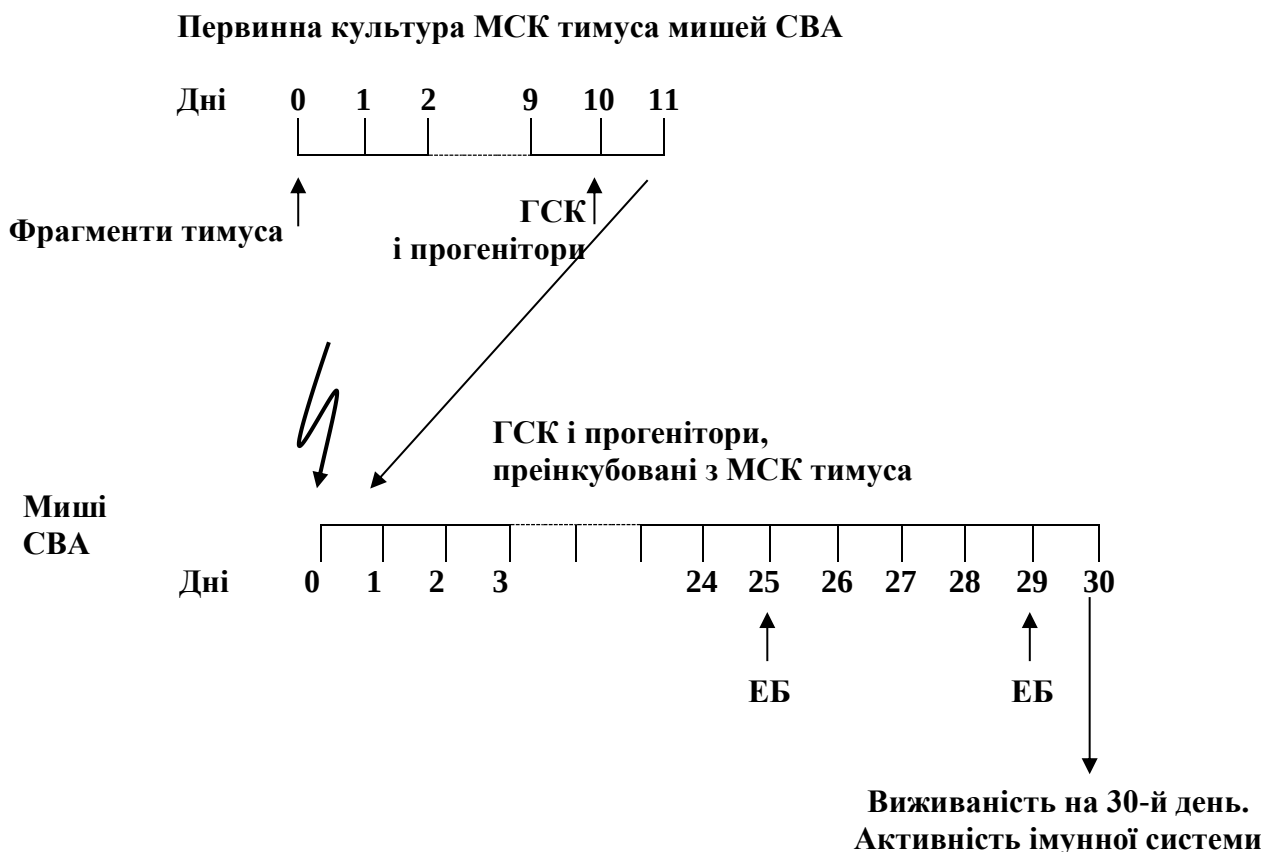


Рисунок 5.1. Схема дослідження впливу контактної взаємодії *in vitro* МСК тимуса з ГСК і прогеніторами мишей лінії СВА на імунобіологічну і регенеративну активність останніх

Всі клітини одержували, як вказано в розділах 2 і 3.

Необхідно відмітити, що гемопоєз у фетальній печінці починається на 6-й день гестації, досягає піку на 13-14-й день і закінчується приблизно на 16-у добу [207]. 14-денний термін для отримання КФП був обраний тому, що саме у цей період вміст ГСК і прогеніторів у печінці достатньо великий.

Культуру клітин МСК тимуса отримували на поверхні культуральних флаконів (25cm^2), як викладено у розділі 3. На 10-ту добу культивування, коли утворювалися добре помітні численні фібробластні колонії, із флаконів з культурами видаляли середовище і додавали $2,5 \times 10^7$ КKM або КФП в 5 мл свіжого поживного середовища на 20 год. Нормальні КKM і КФП витримували той же час на скляній поверхні культуральних флаконів з метою відділення можливого ефекту простого механічного контакту від дії мембранного міжклітинного контакту між МСК і ГСК та прогеніторами. Всі культури розміщували в інкубаторі CO_2 з 5 % CO_2 при 37°C . Через 20 годин сумісного культивування обережно механічним способом відокремлювали і збирали адгезуючі до МСК ГСК і прогенітори, центрифугували клітини (250 g) 10 хвилин, осад ресуспендували в поживному середовищі і доводили концентрацію клітин до $2,5 \times 10^6/\text{мл}$. Клітини інтактних колоній МСК тимуса, до яких не добавляли КKM або КФП, переводили в суспензію за допомогою розчину трипсин-ЕДТА і доводили концентрацію до $2,5 \times 10^5/\text{мл}$.

Отримані клітини (по $0,5 \times 10^6$ нормальних або преінкубованих КKM і КФП, або 5×10^4 МСК) в об'ємі 0,2 мл вводили в хвостову вену летально опроміненим напередодні (за 24 години) мишам лінії СВА, як описано у попередньому розділі. У контролі були тварини, що отримували кондиційне середовище (КС) кокультивованих КФП і МСК. У кожній дослідній групі було по 30 мишей. За тваринами спостерігали протягом 30 діб, фіксуючи дату загибелі кожної миші. На 25-й день імунізували всіх тварин внутрішньочеревним введенням 1×10^8 еритроцитів барана (ЕБ). Через 4 дні

проводили повторну імунізацію (для розвитку реакції ГСТ) введенням такої ж кількості еритроцитів барана в подушечку задньої лапи. Ще через добу (30-й день після опромінення) оцінювали виживаність тварин і визначали показники імунної системи.

5.2. Вивчення впливу препаратів ГСК і прогеніторів, а також МСК тимуса на 30-денну виживаність опромінених мишей

Вживаність мишей до 30 дня в групах, які отримували клітинні препарати представлена на рисунках 5.2 та 5.3. Як можна побачити, вона помітно, але недостовірно, була вища у мишей, що отримували препарати ККМ (рис. 5.2; 5.3, Б). Суттєво вища вона була у тварин, які отримували КФП, або КФП, преінкубовані з МСК тимуса (рис. 5.2; 5.3, Б).

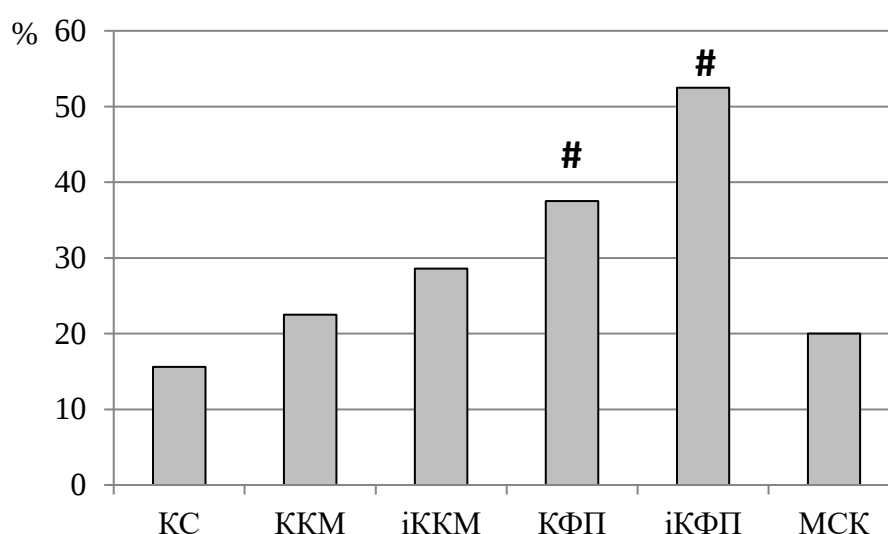


Рисунок 5.2. 30-денна виживаність летально опромінених мишей, що отримували різні препарати ГСК і прогеніторів, а також МСК тимуса. # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС.

Таким чином, нормальні ККМ проявляли лише тенденцію до реалізації радіозахисної активності у даному експерименті, також, як і ККМ, преінкубовані з МСК тимуса, і самі МСК тимуса. Більш виражена і достовірна

радіозахисна дія виявлялася при введенні нормальних КФП, і ще більших значень вона набувала в результаті ін'єкції КФП, преінкубованих з МСК тимуса. Але між останніми двома групами різниця була не суттєвою.

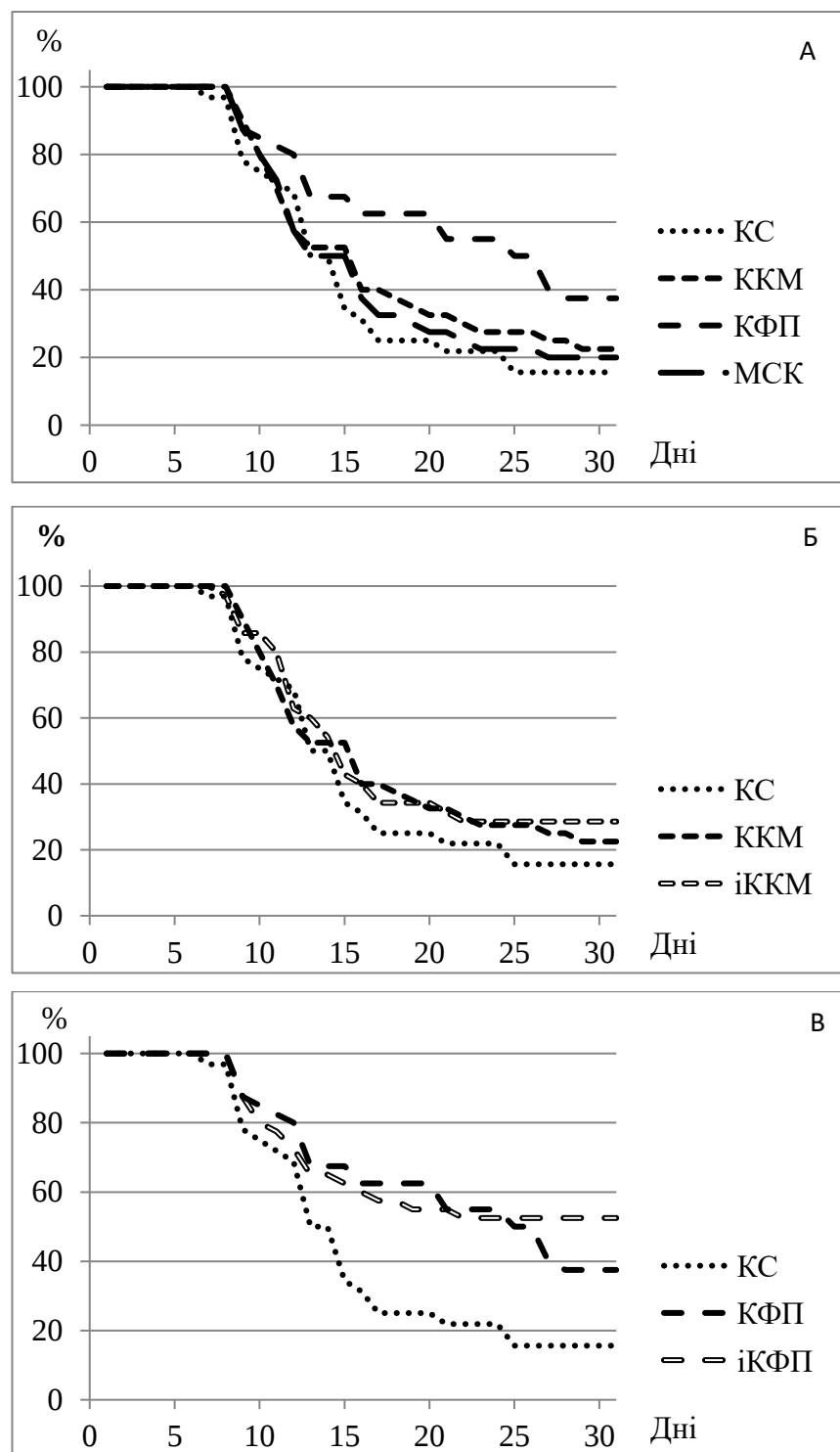


Рисунок 5.3 Динаміка 30-денної виживаності летально опромінених мишей, захищених ККМ, КФП, МСК тимуса (А), iККМ (Б) або iКФП (В).

Видно, що виживаність тварин у цьому експерименті принципово повторює динаміку, що була отримана в експерименті розділу 4. Більш високу активність проявляли КФП і іКФП.

Можна припустити, що радіозахисна активність ККМ і КФП обумовлена певним відновленням деяких функцій імунної системи з наступним подоланням кістковомозкового інфекційного синдрому, а контактна взаємодія з МСК ГСК і прогеніторів і кісткового мозку, і фетальної печінки стимулює ці процеси. Дані також підтверджують відомості про різну реакцію ГСК і прогеніторів кісткового мозку, і фетальної печінки на мембранну взаємодію з МСК тимуса, отримані у розділі 4. Але питання про вплив трансплантованих клітин на імунну систему потребує експериментального вивчення, чому і присвячені подальші дослідження.

5.3 Вивчення імунобіологічної активності різних препаратів ГСК і прогеніторів, а також МСК тимуса

Оскільки у попередніх експериментах було встановлено, що введення летально опроміненим мишам преінкубованих з МСК сингенних ГСК і прогеніторів сприяє значному підвищенню СТЖ загиблих тварин та виживаності мишей, було необхідно з'ясувати, наскільки цей ефект може бути пов'язаний із впливом трансплантованих клітин на імунну систему, тому що саме від її функціонування залежить ефективність захисту організму від біологічної агресії при радіаційному кістковомозковому та кишковому інфекційному синдромах [2, 314].

Імунну систему досліджували через 30 днів після опромінення.

У опромінених мишей, які отримували КС, суттєво знижувалася маса тіла (рис. 5.4), що, мабуть, свідчить про катаболічний вплив опромінення. Трансплантація КФП достовірно збільшувала цей показник. Ін'єкція преінкубованих з МСК тимуса КФП, у той же час, практично нормалізувала

масу тіла, що, мабуть, свідчить про ефективну нейтралізацію інтоксикаційних впливів на організм в цілому саме преінкубованими КФП, скоріш за все, завдяки гальмуванню інфекційного процесу. Необхідно відмітити, що у порівнянні з ефектом нормальних КФП суттєво більшу активність проявляють саме преінкубовані КФП.

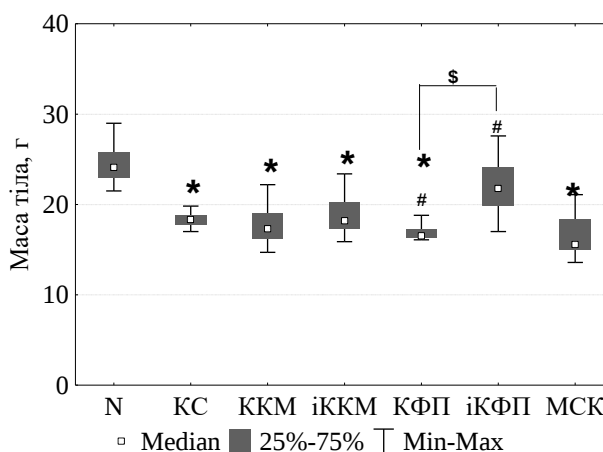


Рисунок 5.4. Маса тіла опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; \$ – $p < 0,05$ порівняння між групами.

На рисунках 5.5-5.7 наведені дані про масу і клітинність тимуса, селезінки та кісткового мозку.

В результаті опромінення маса тимуса (рис. 5.5, А) відносна маса тимуса (рис. 5.5, Б), кількість тимоцитів (рис. 5.5, В) і клітинність тимуса (рис. 5.5, Г) драматично зменшувалися. Введення як нормальних ККМ, так і іККМ, а також іКФП призводило до значного відновлення тимуса. Якщо відновлення тимуса здійснюється завдяки колонізації органу клітинами-попередниками, що генеруються трансплантованими клітинами, то можна припустити, що нормальні ККМ більш ефективні, ніж нормальні КФП за даних умов експерименту. іККМ та іКФП або краще мігрують у тимус, або індукція супроводжується підвищенням їх потенціалу до проліферації і диференціювання. Причому взаємодія з МСК значно помітніше впливає на

КФП, ніж на ККМ, тому під дією іКФП всі показники достовірно підвищувалися у порівнянні з показниками мишей, що отримували нормальні КФП,

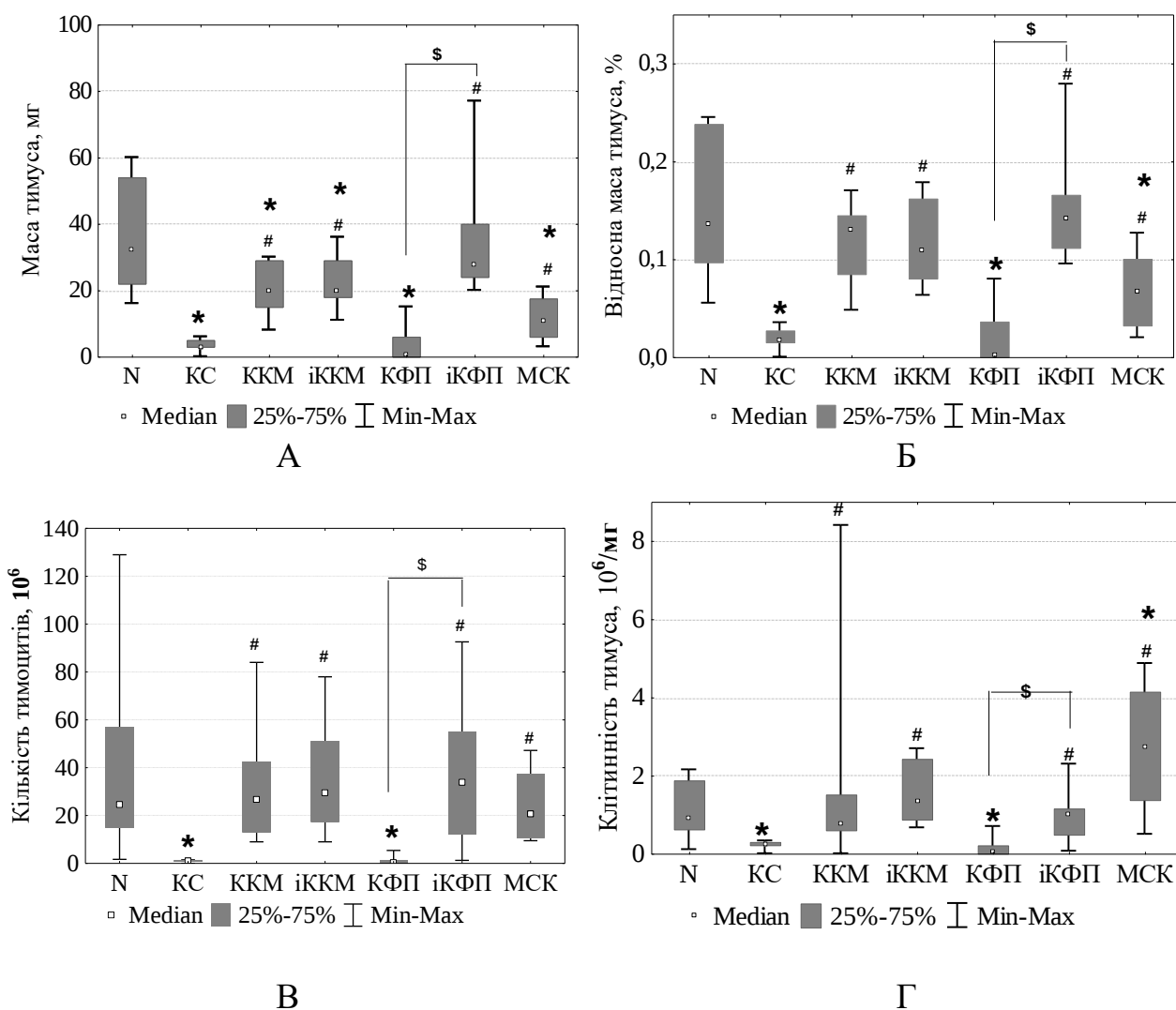


Рисунок 5.5. Маса тимуса (А), відносна маса тимуса (Б), кількість тимоцитів (В), клітинність тимуса (Г) опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; \$ – $p < 0,05$ порівняння між групами.

Особливо треба відмітити, що всі показники тимуса були суттєво більшими у мишей, що отримували тільки самі МСК, що свідчить про регенеративну дію МСК тимуса відносно цього органу при опроміненні.

Маса селезінки у опромінених мишей суттєво знижувалася (рис. 5.5, А). Під впливом ККМ, іККМ, КФП і іКФП она суттєво зростала. Також суттєво збільшувалася і відносна маса селезінки під впливом цих клітин (рис. 5.5, Б). Кількість спленоцитів (рис. 5.6, В) після опромінення суттєво зменшувалася по відношенню до норми тільки у тварин, які отримували ККМ. В результаті введення іККМ показник суттєво збільшувався і достовірно не відрізнявся від норми. Кількість спленоцитів була суттєво більшою, не відрізняючись від норми, і в результаті введення іКФП. Показник клітинності селезінки у реципієнтів клітин практично не відрізнявся від того, що був у опромінених тварин і у нормі (рис. 5.6, Г). В цілому отримані дані свідчать про суттєве підвищення маси селезінки в результаті трансплантації опроміненим мишам клітинних препаратів. Видно також позитивний вплив на загальну кількість спленоцитів і клітинність селезінки преінкубованих ККМ. На рівні тенденції у цьому напрямку проявляли себе і преінкубовані КФП.

Клітинність кісткового мозку у опромінених мишей значно зменшувалася, а трансплантація всіх клітинних препаратів ГСК і прогеніторів, а також самих МСК тимуса сприяла її відновленню (рис. 5.7, А).

Кількість КУО-Ф у стегновій кістці у опромінених мишей також значно зменшувалася (рис. 5.7, Б), а у мишей, що отримували різні препарати ГСК і прогеніторів та МСК тимуса, їх чисельність суттєво підвищувалася.

Таким чином, трансплантація всіх клітинних препаратів значно сприяла відновленню і клітинності кісткового мозку, і однієї із найважливіших клоногенних функцій МСК у кістковому мозку.

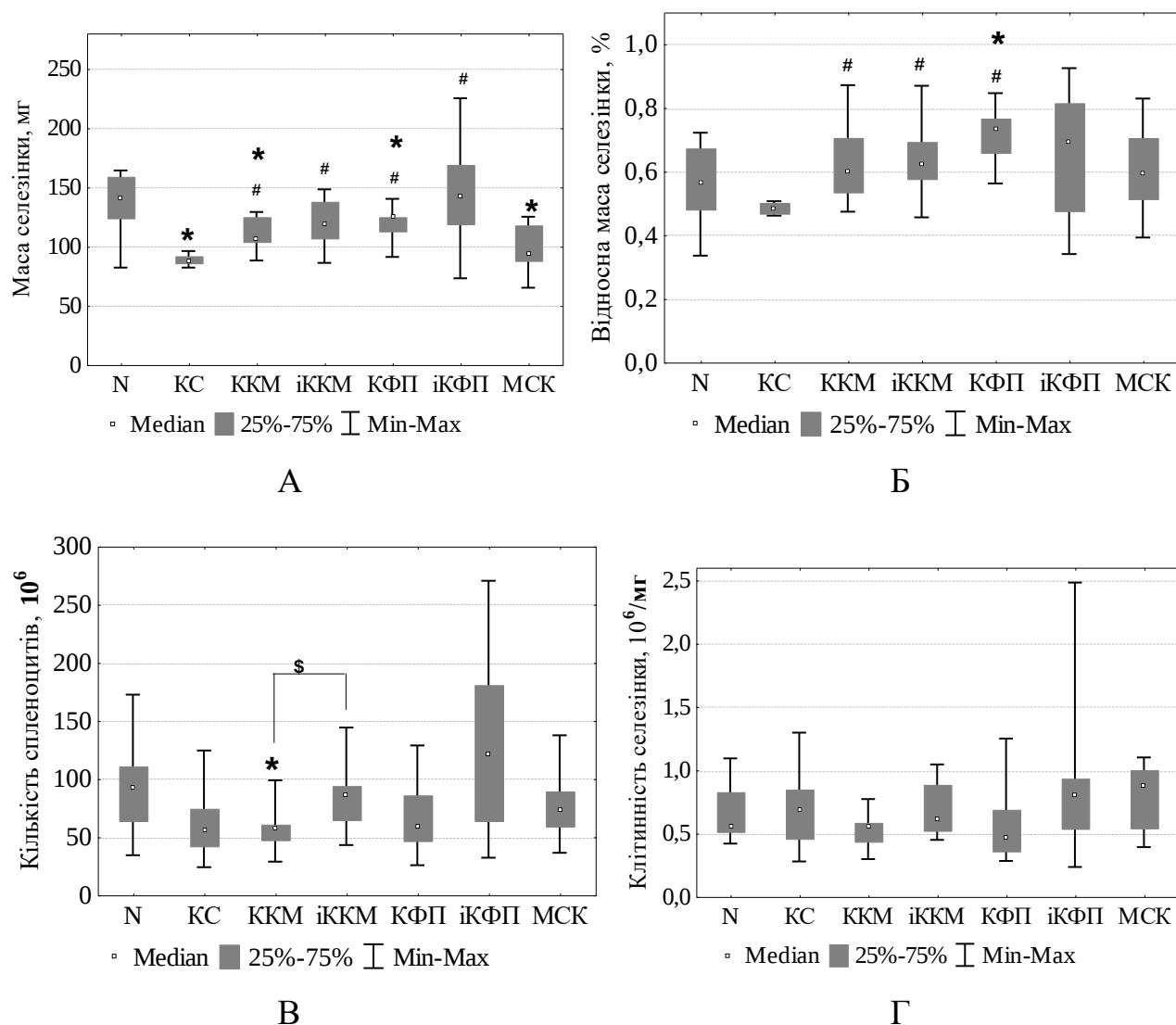


Рисунок 5.6. Маса селезінки (А), відносна маса селезінки (Б), кількість спленоцитів (В), клітинність селезінки (Г) опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; \$ – $p < 0,05$ порівняння між групами.

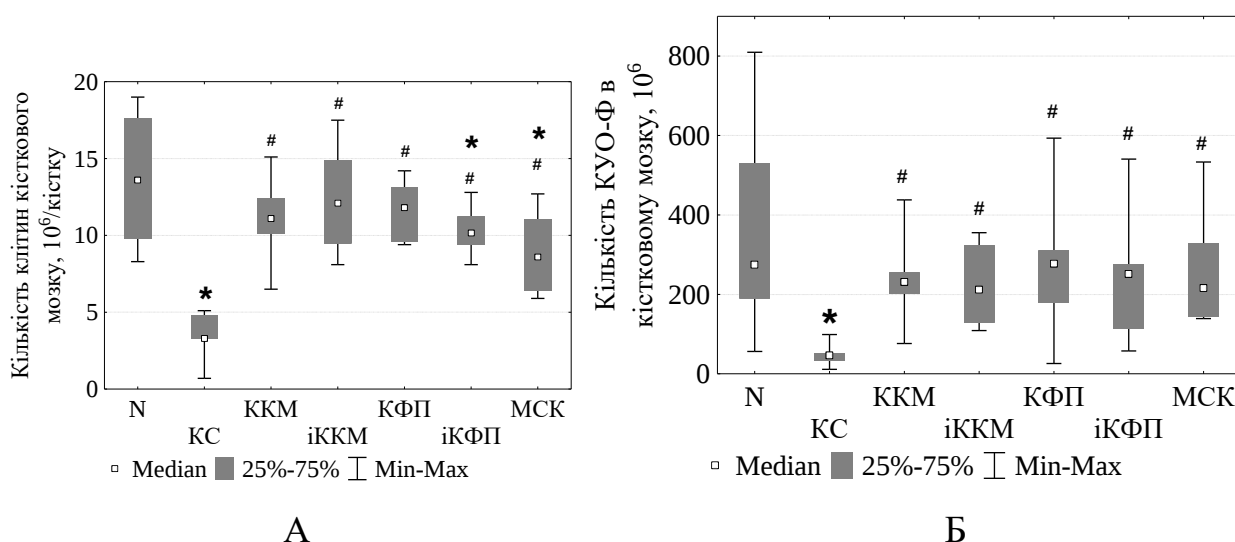


Рисунок 5.7. Кількість клітин (А) та кількість КУО-Ф (Б) в кістковому мозку опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС.

Як можна побачити з табл. 5.1, кількість лейкоцитів у опромінених мишей суттєво зменшувалася, як і вміст нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів. Кількість лейкоцитів у опромінених мишей зростала після введення іКФП, а зворотній ефект давало введення іККМ. Абсолютна кількість нейтрофілів достовірно знижувалася теж після введення іККМ. А от кількість лімфоцитів суттєво збільшувалася у мишей, що отримували індуквані ГСК і прогенітори ККМ і КФП. Причому кількість лімфоцитів більш суттєво зростала саме під впливом індукованих клітин. Рівень моноцитів під впливом різних клітин практично не змінювався.

Таким чином, можна побачити, що преінкубовані з МСК тимуса КФП і ККМ підвищують абсолютну кількість лімфоцитів, а останні знижують вміст нейтрофілів. Мабуть тому після введення преінкубованих ККМ зменшується кількість лейкоцитів. Таким чином, індуквані ГСК і прогенітори із обох джерел, стимулюють лімфоцити, а індуквані ККМ ще і негативно впливають на нейтрофіли.

Таблиця 5.1

Кількість лейкоцитів в периферичній крові опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати

Показ- ники	Статис- тичні показ- ники	Миши						
		нор- мальні	опроміненні, що отримували					
			КС	ККМ	іККМ	КФП	іКФП	МСК
Лейко- цити ($\times 10^6/\text{мл}$)	Median	6,58	1,19	1,29	1,08	1,15	1,34	1,30
	(25%- 75%)	5,30- 7,12	1,16- 1,21	1,24- 1,40	1,03- 1,09	1,11- 1,19	1,29- 1,38	1,29- 1,32
	n	11	5	9	10	10	10	8
	p ₁	-	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	p ₂	-	-	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05
	p ₃	-	-	-	<0,01	-	<0,05	-
Нейт- рофіли ($\times 10^6/\text{мл}$)	Median	1,51	0,87	0,93	0,66	0,77	0,79	1,01
	(25%- 75%)	1,34- 2,18	0,82- 0,90	0,86- 1,09	0,61- 1,68	0,71- 0,81	0,74- 0,84	1,00- 1,05
	n	11	5	9	10	10	10	8
	p ₁	-	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001
	p ₂	-	-	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	p ₃	-	-	-	<0,05	-	>0,05	-
Лімфо- цити ($\times 10^6/\text{мл}$)	Median	3,74	0,26	0,30	0,35	0,31	0,48	0,22
	(25%- 75%)	3,45- 4,51	0,24- 0,27	0,25- 0,32	0,33- 0,38	0,27- 0,35	0,42- 0,50	0,16- 0,24
	n	11	5	9	10	10	10	8
	p ₁	-	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	p ₂	-	-	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05
	p ₃	-	-	-	<0,05	-	<0,01	-
Моно- цити ($\times 10^6/\text{мл}$)	Median	0,16	0,05	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06
	(25%- 75%)	0,08- 0,24	0,04- 0,06	0,04- 0,08	0,03- 0,06	0,03- 0,07	0,04- 0,07	0,04- 0,07
	n	11	5	9	10	10	10	8
	p ₁	-	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	p ₂	-	-	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	p ₃	-	-	-	>0,05	-	>0,05	-

p₁ – порівняно з групою нормальних мишей; p₂ – порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; p₃ – порівняння між нормальними та індукованими клітинами.

Під впливом МСК тимуса змін у кількості лейкоцитів і нейтрофілів не спостерігалось. Хоча є дані, що мезенхімально-мієлоїдна взаємодія позитивно впливає на розвиток клітин мієлоїдного ряду [235, 250, 315].

Виявлені відмінності є, мабуть, наслідком відомої різної чутливості до опромінення мієлоїдної і лімфоїдної ліній клітин, а також природної швидкості

відновлення цих клітин. Підвищення кількості лімфоцитів під впливом преінкубованих ККМ і КФП та зниження вмісту нейтрофілів може бути і наслідком стимуляції ГСК і прогеніторів з наступним позитивним їх впливом на лімфоїдний і негативним на мієлоїдний ріст. Контактна взаємодія може реалізувати свій вплив на лімфоїдні клітини також зміною їх здатності до рециркуляції або підсиленням темпу проліферації лімфоцитів.

Важливі результати отримані при вивченні природного і адаптивного імунітету. Поглинальна активність макрофагів (рис. 5.8) мишей під впливом опромінювання достовірно не змінювалася. Проглядалася тенденція її підвищення во всіх групах тварин, а після трансплантації нормальних КФП і МСК тимуса показник набував достовірності по відношенню до показника у нормальних мишей. Однакова тенденція до збільшення поглинальної активності макрофагів у опромінених тварин всіх груп може бути пояснена подразненням макрофагів продуктами бактеріальної агресії, що йде в результаті розвитку кістковомозкового і кишкового синдромів. При загибелі клітин, обумовленій радіацією, вивільняється багато клітинних продуктів, які сприяють модуляції функцій клітин уродженої імунної системи [316–318]. Стимулююча дія МСК може бути пов'язана із стимуляцією лігандами Toll-подібних рецепторів МСК, що активують синтез прозапальних цитокінів [319], стимулюючи макрофагальну реакцію.

В цілому виходить, що поглинальна стадія фагоцитозу мало ушкоджується опроміненням, а ГСК і прогенітори за цих умов практично її не змінюють, за виключенням нормальних КФП, що мають певні особливості і по клітинному складу, і по активності. Про це може свідчити позитивний вплив на поглинальну активність введених *in vivo* МСК тимуса. Тут ще раз треба наголосити, що у склад КФП входять фетальні МСК, які стимулюють поглинальну активність макрофагів, і тому можна припустити, що виявлена активність КФП залежить саме від наявних серед них МСК. Є дані, що ефероцитоз апоптотичних клітин МСК стимулює поляризацію M2 протизапальних макрофагів [320].

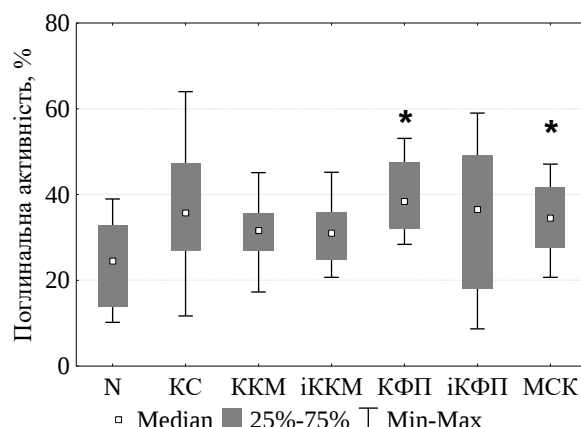


Рисунок 5.8. Поглинальна активність перитонеальних макрофагів опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей.

У опромінених мишей збільшувалася відносно норми бактерицидна активність (рис. 5.9), мабуть, з тих же причин, що і поглинальна. В усіх групах опромінених мишей, що отримували різні клітинні препарати, середні значення також мали чітку тенденцію до збільшення. Але різниця між ними була досить малою і статистично достовірні проти нормальних тварин були тільки показники у групі мишей, які отримували преінкубовані з МСК КФП, що як часто і в інших дослідках, виділяє ці клітини по активності.

Таким чином, при опроміненні бактерицидна активність перитонеальних макрофагів суттєво підвищувалася, а трансплантація клітин мало впливала на неї.

Природна цитотоксичність спленоцитів опромінених мишей значно знижувалася (рис. 5.10), що відповідає високій чутливості до опромінення природних кілерів, а трансплантація iKKM та iKФП сприяла суттєвому її збільшенню. Причому суттєве збільшення показника було при введенні iKФП по відношенню до групи, що отримувала нормальні КФП, що підкреслює роль контактної взаємодії з МСК тимуса в стимуляції природної цитотоксичності КФП.

Трансплантація самих МСК тимуса також приводила до стимуляції природної цитотоксичності.

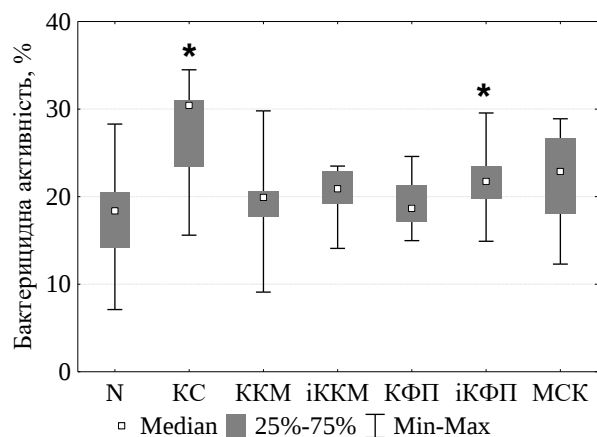


Рисунок 5.9. Бактерицидна активність перитонеальних макрофагів опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС.

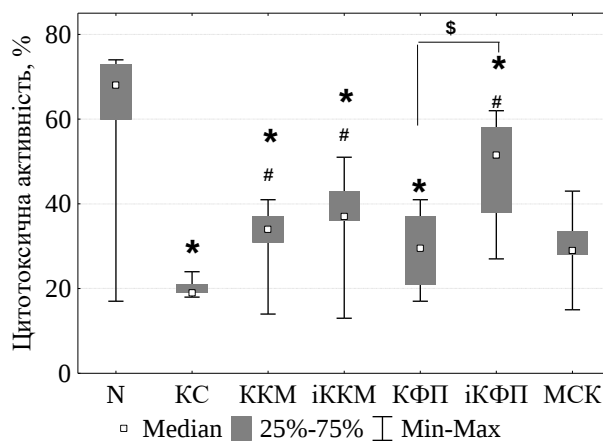


Рисунок 5.10. Природна цитотоксична активність спленоцитів опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; \$ – $p < 0,05$ порівняння між групами.

Індекс РБТЛ, яка здійснювалася клітинами лімфатичних вузлів опромінених мишей сильно зменшувався в усіх досліджених групах (рис. 5.11). Реакція суттєво підсилювалася в результаті трансплантації індукованих ККМ, нормальних і індукованих КФП. Статистично достовірна різниця спостерігалася також між групами мишей, що отримували нормальні і індуковані ККМ на користь останніх, що також свідчить про позитивний вплив контакту ККМ з МСК тимуса. Введення МСК не впливало на РБТЛ, що, мабуть, відображає відомі дані про антипроліферативну активність МСК, а також довготривалу відміну вторинної міграції Т-клітин у лімфатичні вузли в результаті опромінення [314].

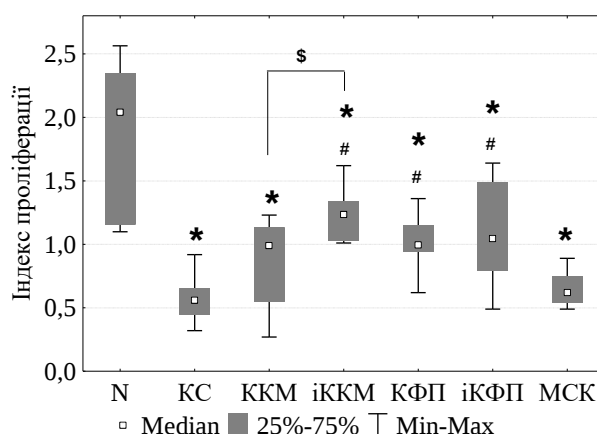


Рисунок 5.11. Проліферативна активність клітин лімфатичних вузлів опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; \$ – $p < 0,05$ порівняння між групами.

Спленоцити летально опромінених мишей *in vitro* продукували значно меншу кількість вірусіндукованого α/β - (рис. 5.12, А) і КонА-індукованого γ -інтерферонів (рис. 5.12, Б). Суттєве зниження продукції вказаних типів інтерферонів спостерігалася і в культурах спленоцитів тварин, які одержували нормальні ККМ і КФП. Навпаки, введення мишам обох препаратів ГСК і прогеніторів, індукованих МСК тимуса, сприяло значному відновленню

здатності спленоцитів до синтезу α/β - і γ -інтерферонів, щ також свідчить на користь контактної взаємодії.

Тут необхідно відмітити, що сталі уявлення про антипроліферативну дію ІФН α можуть бути доповнені дещо іншими даними. Так показано *in vivo*, що ІФН α стимулює проліферацію і диференціювання ГСК [321].

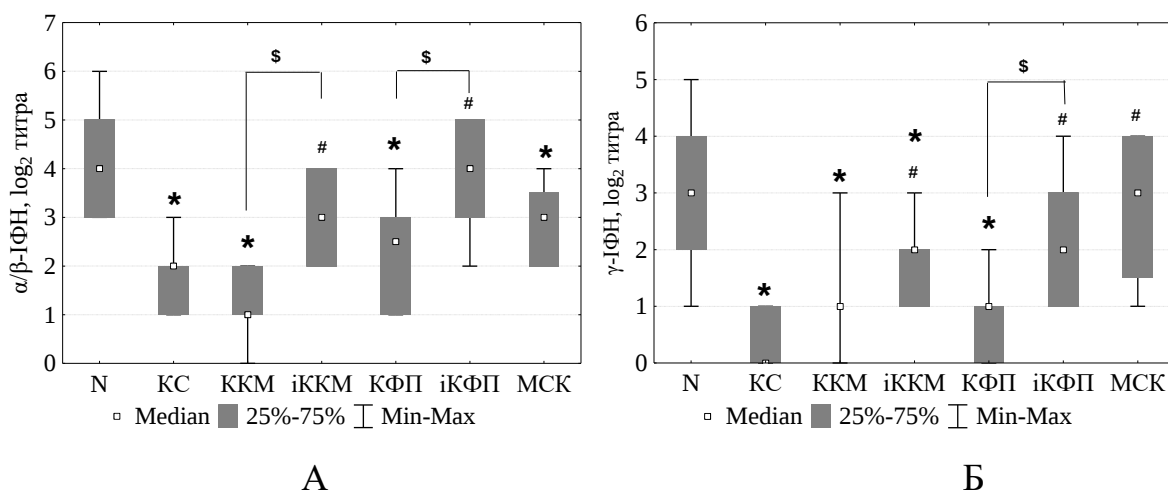


Рисунок 5.12. Кількість α/β - (А) і γ -інтерферону (Б) в кондиційному середовищі спленоцитів опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; \$ – $p < 0,05$ порівняння між групами.

Про ІФН γ відомо, що за певних умов цитокін може гальмувати проліферативну активність різних клітин і активно впливати на клітинний фенотип [322], особливо, коли сприяє експресії МНС I і МНС II [323]. Оброблені ІФН γ МСК пригнічують продукцію ІЛ-10 активованими В-лімфоцитами, залучаючи їх до міжклітинних контактів [324]. Інтерферонові фактори регуляції забезпечують також лімфоцито-стромальну контактну взаємодію з експресією ІЛ-7 [325].

Окремо треба відмітити дані по вивченню інтерфероностимулюючої функції МСК тимуса. У спленоцитів мишей, що отримували МСК, здатність до синтезу γ -інтерферону практично нормалізувалася.

«Спонтанний» ФНПа в культурі спленоцитів нормальних мишей визначався у слідових кількостях (табл. 5.2). Навпаки, цитокін у помітній кількості продукувався клітинами опромінених тварин. Причому він виявлявся приблизно в однаково меншій кількості в групах майже незалежно від властивостей введених ГСК і прогеніторів. Достовірно менше ФНПа було і в групі з МСК тимуса. І тільки під впливом іККМ синтезувалося суттєво більше ФНПа, ніж такого зі спленоцитами мишей, які отримували інтактні ККМ, що може свідчити про менший вплив на синтез «спонтанного» ФНП індукованих ККМ у опромінених мишей.

Таблиця 5.2

Кількість «спонтанного» ФНПа в кондиційному середовищі спленоцитів опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати

Статис- тичні показ- ники	Кількість спонтанного ФНПа (log ₂ титру) в кондиційному середовищі спленоцитів						
	нормаль- них мишей	опромінених мишей, що отримували					МСК
		КС	ККМ		КФП		
			нор- мальні	індуко- вані МСК	нор- мальні	індуко- вані МСК	
Median	0,0	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0
(25%- 75%)	0 - 0	1 - 2	1 - 2	2 - 2,75	1 - 1	1 - 1	1 - 1
n	11	5	9	10	10	10	8
p ₁	-	<0,01	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	<0,01
p ₂		-	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p ₃			-	<0,05	-	>0,05	

p₁ – порівняно з групою нормальних мишей; p₂ – порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; p₃ – порівняння між нормальними та індукованими клітинами.

Можна припустити, що «спонтанна» продукція ФНПа у опромінених тварин, на відміну від нормальних, іде завдяки індукторній дії бактеріальних продуктів, які утворюються в результаті здійснення інфекційної агресії в умовах розвитку кістково-мозкового і кишкового синдромів. Можливо, такий

механізм взагалі є патогенетичною ланкою у розвитку радіаційного імунодефіциту. Відомо, що у опромінених тварин значно підвищується продукція ФНПа, ІЛ-1 і ІЛ-6 стромальними клітинами [326]. Цитокіни стимулюють імунні реакції, а ФНПа забезпечує радіопротекторну дію, коли досягає ендотеліальних клітин, де за допомогою гранулоцитів сприяє ангіогенезу і гемопоезу [327]. Мабуть, йдеться про загальний механізм розвитку інфекційної патології, який індукується дією стимуляторів синтезу цитокінів. Можливо, певні концентрації цитокінів мають радіопротекторну дію, а більший їх рівень – токсичну.

У зв'язку з цим важливо ще раз відмітити, що кількість «спонтанного» ФНПа в культурі спленоцитів мишей, що отримували МСК тимуса, була суттєво меншою, ніж у опромінених мишей. Відомо, що введення МСК підвищує рівень Трег зі зниженням такого ТН17-клітин. При таких позитивних змінах рівень сироваткового ФНПа суттєво знижувався [328]. Радіопротекторною дією володіють і сироваткові екзосоми [329].

Індукований ЛПС синтез ФНПа спленоцитами опромінених мишей *in vitro* практично не відрізнявся від того, що був у нормальних тварин (табл. 5.3). Якщо прийняти до уваги, що у опромінених тварин чинники мікробної агресії індукують синтез ФНПа разом з ЛПС, можна припустити, що питома активність синтезу ФНПа у відповідь на ЛПС у опромінених значно менша, ніж у нормальних. І таким чином, ФНПа, що вимірюється за таких умов, може складатися із двох компонентів: «спонтанного», індукованого мікробними чинниками, і індукованого ЛПС. Ймовірно, що пригнічення індукторної дії ЛПС виконують саме продукти мікробної агресії, які можуть демонструвати інтоксикаційну дію.

Таблиця 5.3

**Кількість індукованого ЛПС ФНПа в кондиційному середовищі
спленоцитів опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні
препарати**

Статис- тичні показ- ники	Кількість індукованого ЛПС ФНПа (log ₂ титру) в кондиційному середовищі спленоцитів						
	нормаль- них мишей	опромінених мишей, що отримували					
		КС	ККМ		КФП		МСК
			нор- мальні	індуко- вані МСК	нор- мальні	індуко- вані МСК	
Median	4,0	3,0	2,0	2,0	2,5	3,0	2,5
(25%- 75%)	3 - 4,5	2 - 3	1 - 2	1,25 - 2	2 - 3	3 - 4	2 - 3
n	11	5	9	10	10	10	8
p ₁	-	>0,05	<0,001	<0,001	<0,01	>0,05	<0,01
p ₂		-	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05
p ₃			-	>0,05	-	>0,05	

p₁ – порівняно з групою нормальних мишей; p₂ – порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; p₃ – порівняння між нормальними та індукованими клітинами.

Інтенсивність реакції ГСТ у опромінених мишей значно знижувалася (рис. 5.13). Також реакція ГСТ була значно зниженою у тварин, що отримували нормальні ККМ, КФП, іКФП. Інтенсивність ГСТ в групах тварин, що одержували іККМ або МСК тимуса, була вищою, оскільки показник ГСТ в цих групах статистично не відрізнявся від норми. Можна припустити, що саме ГСК і прогенітори кісткового мозку, преінкубовані з МСК, скоріше за все, набувають властивостей, що сприяють їх диференціюванню у клітини, що беруть участь у розвитку реакції ГСТ. Не виключена також опосередкована дія іККМ на інші клітини-учасники розвитку ГСТ. На формування ГСТ, мабуть, позитивно впливають і МСК.

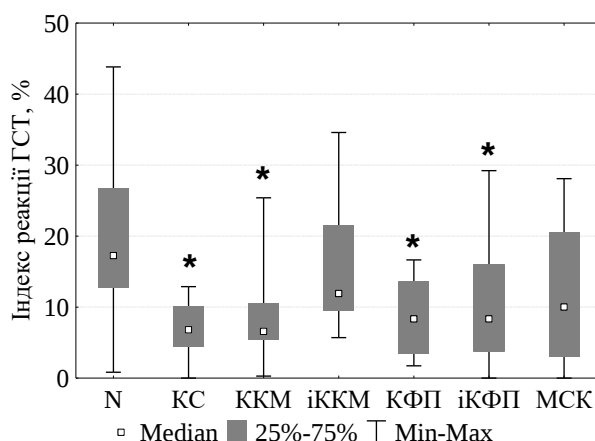


Рисунок 5.13. Індекс реакції ГСТ у опроміненних мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опроміненних мишей, що отримували КС.

Дослідження гуморального імунітету показало, що у опроміненних мишей формування АУК у відповідь на імунізацію еритроцитами барана значно пригнічено (рис.5.14), що відповідає високій чутливості В-лімфоцитів до опромінення. Їх кількість суттєво збільшувалася тільки в групах мишей, що отримували преінкубовані з МСК тимуса ГСК і прогенітори, як кісткового мозку, так і фетальної печінки.

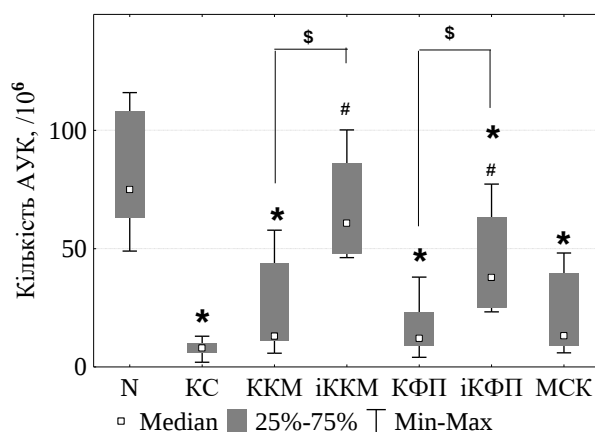


Рисунок 5.14. Кількість АУК/10⁶ спленоцитів опроміненних мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опроміненних мишей, що отримували КС; \$ – $p < 0,05$ порівняння між групами.

Аналогічна динаміка по групах спостерігалася і при визначенні гемаглютининів (рис. 5.15, А) і гемолізинів (рис. 5.15, Б).

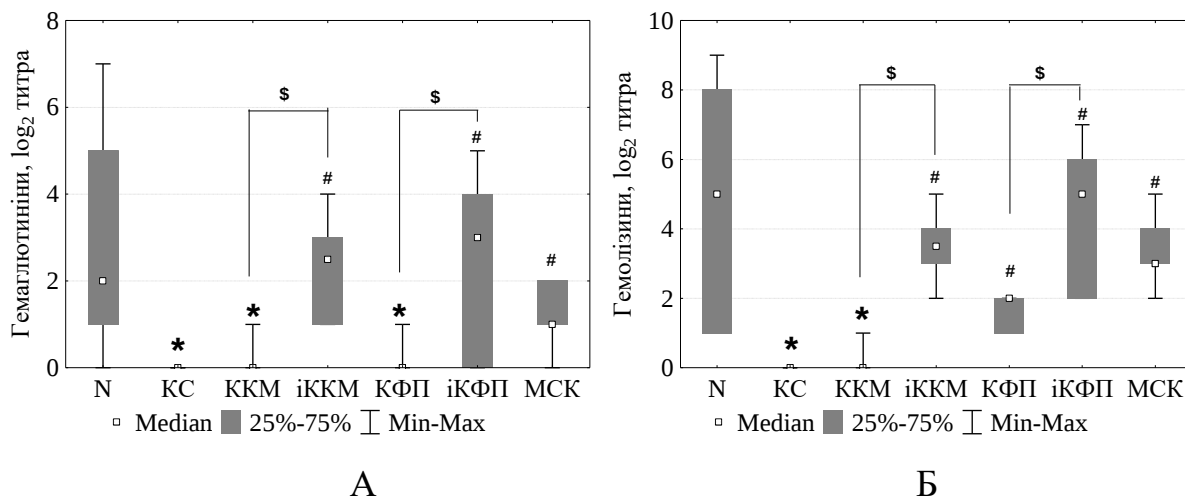


Рисунок 5.15 – Вміст гемаглютининів (А) та гемолізинів (Б) в сироватці опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; \$ – $p < 0,05$ порівняння між групами.

Результати свідчать, з одного боку, про високу чутливість гуморальної імунної відповіді до опромінення, а з іншого, про значну стимулюючу роль у процесі її формування ГСК і прогеніторів, преінкубованих з МСК тимуса.

Стимуляція синтезу гемолізинів і гемаглютининів спостерігалася і в результаті введення МСК тимуса (рис. 15, А, Б). Але вплив МСК тимуса на радіозахисну і регенеративну активність заслуговує на окремий розгляд. Ще не так давно такі дослідження не проводилися. І це не дивно, тому що МСК є стромальними елементами, і зрозуміло, що гемопоетичні клітини, які формують імунну систему, із них не утворюються. Ясно, що з огляду на зазначене, навряд чи можна було очікувати відтворення імунної паренхіми стромальними клітинами.

Між тим відомо, про що і вище згадувалося, яку важливу роль відіграють МСК у підтримці ГСК і прогеніторів. З урахуванням цього можна було

припустити, що при певних обставинах МСК все ж таки можуть проявити свою підтримуючу гемопоетичні клітини роль і дадуть позитивні стимули імунній системі опромінених мишей. Так, стало відомо про цитопротекторну дію МСК тимуса [330]. У теперішній час перспективність дослідження МСК як фактора регенерації радіаційно ураженої імунної системи стала очевидною [331, 332].

На 30-денну виживаність (рис. 5.2; 5.3, А) і масу тіла (рис. 5.4) опромінених мишей трансплантація МСК тимуса суттєво не впливала. Але при цьому суттєво зростала абсолютна (рис. 5.5, А) і відносна маса тимуса (рис. 5.5, Б), у ньому значно підвищувалася кількість тимоцитів (рис. 5.5, А) і клітинність органу (рис. 5.5, Г).

Відомо, що після гострого опромінювання тимопоез залишався пригніченим більше року. Також довгостроковим було зниження кількості тимусних лімфоїдних попередників, яке виявлялося протягом всього життя. Але наявні дані свідчили, що провідним ураженням було зниження кількості не стільки цих клітин, а кістковомозкових попередників, дефіцит яких і обумовлював, головним чином, порушення тимопоезу [333]. Трансплантація МСК істотно підсилювала регенерацію завдяки здатності клітин мігрувати у опромінені тканини, рекрутуванню стромальних клітин реципієнта, регенеративному впливу на ендотелій і епітелій, головним чином, генерації паракринних імуномодулюючих сигналів [334]. Донорські МСК кісткового мозку мігрували після трансплантації у тимус і брали участь у позитивній селекції Т-лімфоцитів [238,239]. В результаті ураження організму ендогенні МСК мігрували із кісткового мозку у місце запалення і регенерації [335]. Велика роль мігруючих МСК полягає у репарації слизової оболонки кишківника при індукованому радіацією відповідному синдромі [336]. Автори вважають, що терапевтичний ефект МСК при регенерації тканин залежить в основному від секреції біологічно активних молекул. Особливе значення мають позаклітинні везикули (EV), які продукуються МСК. Трансплантація EV призводила до довготривалої виживаності, хоча не забезпечувала

короткочасного відновлення. Важливо відмітити, що ефект не залежав від додаткової гемопоетичної підтримки [337].

Показано, що ГСК і прогенітори ефективно підтримуються *in vivo* екзосомами фетальних МСК, що проявляється захистом від апоптозу і підвищенням виживаності і клоногенного потенціалу ГСК [338,339].

Показники маси (рис. 5.6, А, Б) і клітинності селезінки (рис. 5.6, В, Г) під впливом МСК тимуса мало змінювалися. Натомість клітинність кісткового мозку зростала суттєво (рис. 5.7, А). Важливо відмітити, що у кістковому мозку в результаті опромінення значно знижувалася кількість КУО-Ф (рис. 5.7, Б). Трансплантація МСК тимуса, як і інших досліджуваних клітин, сприяла суттєвому підвищенню кількості КУО-Ф, що, з однієї сторони, свідчило про чутливість стромальних елементів кісткового мозку до опромінення, а з іншої сторони, також свідчило про суттєве відновлення строми в результаті введення МСК тимуса, що можна сприймати як функціональну сумісність дії МСК тимуса і кісткового мозку, наразі у ситуації, що розглядається.

Поглиналина активність (рис. 5.8) після трансплантації МСК опроміненим мишам змінювалася в бік нормалізації, а на бактерицидність (рис. 5.9) клітини не впливали. Не відновлювалася і РБТЛ (рис. 5.11). Натомість природна цитотоксична активність (рис. 5.10) підвищувалася суттєво, значно зростав також рівень γ -інтерферону (рис. 5.12, Б) і активність ГСГ (рис. 5.13). Як згадувалося, в результаті трансплантації МСК тимуса у опромінених мишей значно зростала здатність до продукції гемаглютининів (рис. 5.15, А) і гемолізину (рис. 5.15, Б), що можна розглядати як позитивний радіозахисний вплив МСК при кістковомозковому синдромі.

Таким чином, виявилося, що трансплантація МСК тимуса опроміненим мишам значною мірою і позитивно впливає на багато показників імунної системи, і ці клітини, мабуть, можуть розглядатися як перспективні об'єкти для вивчення стимуляції регенерації імунної системи при радіаційному впливі, тим більше, що радіочутливість МСК навряд чи можна визначити однозначно. Так, коли отримані *ex vivo* МСК опромінювали за схемою передтрансплантаційного

режиму, клітини мали звичайні фенотипічні характеристики, властивості і функції підтримки гемопоезу. Однак у опромінених МСК виявлявся низький проліферативний і диференціювальний потенціал. Також виявлялися цитогенетичні клональні аномалії. Але канцерогенність опромінених МСК була низькою *in vitro* та *in vivo* [240]. Опромінення у низькій дозі (0,1 Гр) тільки тимчасово впливало на характеристики МСК [340].

В результаті проведених досліджень і літературних даних вимальовується велика роль, яку грають МСК в регенерації імунної системи. Природно виділяються два аспекти. По-перше, трансплантовані опроміненим мишам МСК тимуса самі по собі сприяють суттєвому відновленню імунної системи. По-друге, МСК тимуса володіють властивостями, що при контактній взаємодії з ГСК і прогеніторами кісткового мозку або фетальної печінки індукують у гемопоетичних клітин підвищену регенеративну і імуномодулюючу активність, що у подальшому може бути використано для підвищення ефективності імунотерапії стовбуровими клітинами.

Висновки до розділу 5

4. Вперше показано, що трансплантовані летально опроміненим мишам МСК тимуса суттєво підвищують регенеративні процеси в імунній системі: значно зростає абсолютна (в 3,5 раза) і відносна (в 4 раза) маса тимуса, кількість тимоцитів (в 21 раз) і клітинність тимуса (в 10,8 раза), кісткового мозку (в 2,6 раза), здатність клітин кісткового мозку до утворення фібробластних колоній (в 4,7 раза), стимулюється реакція ГСТ, природна цитотоксичність (в 1,5 раза), утворення γ -інтерферону (в 7,5 раза), та значно зростає вміст гемолізинів і гемаглютининів у сироватці крові.
5. Вперше встановлено, що в результаті введення преінкубованих з МСК тимуса КФП значно підсилюється регенерація тимуса. Відносно тварин, які отримували нормальні клітини у мишей, що отримували преінкубовані КФП, суттєво зростає кількість лейкоцитів (на 16 %) і лімфоцитів (на 54 %).

Після введення преінкубованих ККМ вміст лімфоцитів також зростає на 20 %, але кількість лейкоцитів і нейтрофілів суттєво знижується (відповідно на 16 % і 29 %), що свідчить про відмінності у дії преінкубованих ККМ і КФП на лімфоїдні і мієлоїдні клітини.

6. Вперше показано, що в результаті трансплантації летально опроміненим мишам преінкубованих ККМ і КФП у порівнянні із веденням нормальних клітин суттєво підвищується: рівень гемолізінів (відповідно до типу клітин в 16 і 2,5 рази), гемаглютинінів (в 23 і 15 разів), утворення АУК в селезінці (в 4,7 і 3,1 рази), здатність спленоцитів до синтезу α/β -інтерферону (в 3 і 1,6 рази). Проліферативна активність Т-лімфоцитів у реципієнтів преінкубованих ККМ зростає на 25 %, а в результаті введення преінкубованих КФП в 2 рази стимулюється синтез γ -інтерферону і в 1,7 рази природна цитотоксичність. Отримані дані в цілому свідчать про виражене зростання імунобіологічної і регенеративної активності ГСК і прогеніторів ККМ і КФП внаслідок їх преінкубації з МСК тимуса.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях: [302], [305], [306], [307], [308], [309], [311], [312], [341], [342], [343].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Одним із найбільш актуальних напрямків розвитку сучасної імунології стало вивчення імунобіології стовбурових клітин і створення на їх основі нових підходів до регенерації імунної системи. Основними об'єктами досліджень є ГСК і МСК [10]. Унітарна теорія гемопоезу А. А. Максимова, згідно з якою всі різноманітні клітинні елементи крові походять з єдиної стовбурової кровотворної клітини, до сьогоднішнього дня абсолютно точно доведена. У теперішній час більша увага зосереджена на різних аспектах регуляції кровотворення і можливості впливу на властивості і активність ГСК. Встановлено, що повноцінна реалізація гемоімунопоетичного потенціалу ГСК *in vivo* можлива тільки при їх контактній, за участю цитокінів, взаємодії з кровотворним мікрооточенням, в основному представленим різними типами прогеніторів МСК [11]. Кооперація МСК і ГСК забезпечує тривале кровотворення і *ex vivo* (декстеровські культури).

Для пояснення механізму гемопоезу і взаємодії ГСК і МСК у кістковому мозку запропонована гіпотеза «ніш» ГСК, що повністю виправдала себе на даний час. Морфофункціональна структура ніш забезпечує стан спокою, самопідтримки і необхідну відповідність між кількістю дормантних ГСК, що самооновлюються, і числом комітованих прогеніторів ГСК, які виходять в диференціювання і проліферацію. В результаті в кістковому мозку складається гетерогенна популяція ГСК. Найбільшою здатністю до самопідтримки і найвищу поліпотентність мають дормантні ДР-ГСК. Вони характеризуються по SLAM-маркерам як $CD150^+CD49^-CD41^-$, знаходяться у фазі G_0 та тривало зберігають мітку BrdU. У нішах функціонують і коротко репопулюючі ГСК (КР-ГСК), більш просунуті на шляху диференціювання. Значну їх долю складають $CD34^+$ -LSK-клітини, які перебувають у фазі G_1 [2].

Ніші кісткового мозку, де ГСК і МСК функціонують у контактній взаємодії, поділяють на два види: ендостальні і судинні. Перші розташовані близько до ендостальної поверхні і основними їх функціональними одиницями є незрілі остеобласти, особливо похідні з МСК клітини цієї лінії - SNO-клітини (spindle-shaped N-cadherin⁺CD45 osteoblastic cells), що експресують гомофільну молекулу N-кадгерін, яка грає важливу роль у контактній взаємодії з ГСК. Завдяки цьому, а також продукції ангіопоетину, тромбопоетину, CXCL12 і деяких інших цитокінів ГСК утримуються в ендостальній ніші переважно у дормантном стані.

Однак більша частина комітованих КР-ГСК різного ступеня диференціювання знаходиться в судинних нішах, утворених ендотеліальними і периваскулярними клітинами: МСК, CAR-клітинами (CXCL12-abundant reticular cells), Lep⁺-клітинами (з рецепторами до лептину), Nestin⁺-клітинами (містять нестин) і NG2⁺-періцитами (neural/glial antigen 2). Тут вплив на функції ГСК стромальні клітини також реалізують шляхом контактної взаємодії і секреції певного спектра біологічно активних речовин: CXCL12, SCF та інших цитокінів і впливають на ГСК за участю симпатичної іннервації, що активує стромальні елементи. Велике значення має також активність Notch-, Wnt- і Shh-сигнальних шляхів, а також численних внутрішньоклітинних регуляторів в обох типах стовбурових клітин.

Ендостальна і судинна ніші здебільшого знаходяться поруч і фактично є продовженням одна одної. Результати експериментів показують, що, наприклад, у функціонуванні ендостальної ніші, крім остеогенних клітин, беруть участь периваскулярні клітини, зокрема, CAR-клітини. При певних обставинах ГСК мігрують з ендостальної ніші в судинну (внутрішня кістковомозкова мобілізація). МСК, що несуть різні маркери, в значній мірі перекриваються по їх експресії, а досліді з умовною делецією демонструють їх часто ефективну взаємозамінність в певних ситуаціях.

У деякому роді унікальні відносно рідкісні SNO⁺- і Nestin⁺-клітини, які відіграють велику роль у функціонуванні власне ГСК. Навпаки, CAR-клітини,

що формують ретикулярну мережу головним чином судинних ніш завдяки своїм довгим відросткам і відповідній великій площі для контактів, важливі також для більш диференційованих прогеніторів, включаючи клітини імунної системи. В контакті з CAR-клітинами виявляються загальні лімфоїдні і ранні В-клітинні попередники, незрілі плазматичні клітини, плазмацитоїдні дендритні клітини (pDCs) і NK-клітини. Виснаження CAR-клітин веде до істотної втрати перерахованих елементів, що свідчить про роль ретикулярної мережі судинних ніш у контактній міжклітинній взаємодії, на основі якої розвиваються практично всі типи імунних клітин кістковомозкового походження [11, 25, 121–123].

Таким чином, накопичені експериментальні дані свідчать про те, що функціональна активність ГСК і їх комітованих прогеніторів регулюється різноманітними субпопуляціями стромальних клітин через контактні і цитокінові механізми на території ендостальних і судинних ніш кісткового мозку, що, мабуть, надає ГСК необхідні властивості і для відновлення гемопоєзу при трансплантації у клініці [344].

Але контактна взаємодія МСК і ГСК відіграє велику роль у процесі розвитку і функціонування імунної системи також у тимусі і на периферії. Тимусні МСК беруть участь уже в ембріональному органогенезі, диференціюванні тимоцитів до стадії CD4⁺CD8⁻-клітин, позитивній селекції і міграції тимоцитів [38-40, 107, 237, 238].

Відомо, що у процесі диференціювання тимоцитів в тимусі велику роль відіграє їх взаємодія з МСК на стадії CD44⁺-клітин. У її реалізації беруть участь і інші адгезивні молекули тимоцитів: CD2, LFA-1 і VLA-4, які взаємодіють з відповідними стромальними молекулами CD58, ICAM-1, VCAM-1, а також білками міжклітинного матриксу, особливо фібронектином. Причому контактна взаємодія у тимусі відбувається не тільки з МСК, а і з іншими клітинами, які традиційно розглядаються як стромальні (дендритні клітини і макрофаги), що підкреслює розповсюдженість і універсальність механізму. Із тимуса вдалося виділити існуючі *in situ* клітинні асоціації, що після переносу *in vitro* мають

вигляд розеток з центрально розташованою стромальною клітиною: макрофагом, або дендритною клітиною, оточеною 10-15 тимоцитами. Причому, міжклітинні зв'язки настільки міцні, що дозволяють ефективно переміщати асоціації із тканини *in vivo* у культуру клітин *in vitro*. Включені у розетки тимоцити кортизол- і радіочутливі і мають фенотип Thy1^+ , Lyt1^+ , Lyt2,3^+ , H-2K^+ (у мишей C3H); вони також виявляють виражену експресію рецептора PNA [345 – 348].

До МСК тимуса високий афінитет мають найменш диференційовані гемопоетичні клітини-попередники. Більш активно до МСК адгезують $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$ -клітини, ніж $\text{CD34}^+\text{CD38}^+$ -клітини. В більш адгерентних CD34^+ -клітинах спостерігається і більш виражена експресія адгезивних і матриксних молекул (фібронектин 1, кадгерин, VCAM-1, коннексин 34, інтегрин $\beta 1$ і $\text{TGF}\beta$) [349]. Транскриптомним аналізом виявлені відмінності між МСК тимуса, кістки і дерми, що висвітлює особливості функціональної активності МСК тимуса. В МСК тимуса, на відміну від МСК іншого походження, ідентифіковані у 5-кратній більшості гени DEGs (differentially expressed). Ці гени були характерними для тимусних МСК і відповідали за взаємодію з тимоцитами, підтримку епітеліальних клітин і ефероцитоз [105].

Дослідження контактної взаємодії з МСК гемопоетичних клітин показало, що найбільшу спорідненість мають незрілі Т-лімфоцити, менш вона притаманна В-лімфоцитам і ще менша – клітинам мієлоїдного ряду. До МСК адгерентні і CD4^+ - і CD8^+ -лімфоцити. Афінність активованих Т-лімфоцитів вища, ніж клітин у стані спокою [162].

МСК тимуса активно впливають на розвиток тимоцитів до подвійно негативних $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ -тимоцитів. Стадія тимоцитів з адгезивними молекулами $\text{CD25}^+\text{CD44}^+$ є останньою, що чутлива до контактного диференціувального впливу МСК [350 – 332].

Таким чином, очевидно, що у тимусі МСК однозначно необхідні для розвитку Т-лімфоцитів, що формує аргумент про можливість наявності таких функцій у МСК тимуса і на периферії. Частково таке припущення

підтримується даними про стимуляцію МСК тимуса антитілогенезу *in vivo* [245] і результатами значної стимуляції синтезу антитіл при індукції первинної імунної відповіді *in vitro* МСК тимуса, але не МСК кісткового мозку [82]. У периферичних лімфоїдних органах МСК проявляють високу і різнонаправлену активність по відношенню до різних субпопуляцій лімфоїдних і мієлоїдних клітин [219]. З іншої сторони, показано, що безпосередній контакт МСК з лімфоцитами є необхідним для реалізації імуносупресивних властивостей [353].

Отримані знання сприяли великому прогресу у вивченні імунобіології гемопоетичних і стромальних стовбурових клітин і обґрунтували виникнення нових підходів до розвитку багатьох важливих для теорії і практики медицини напрямків досліджень. Однією із таких перспективних і центральних проблем стало використання стовбурових клітин для підвищення ефективності регенерації імунної системи. Розробка цього напрямку завжди утруднювалася поліклітинністю і загальною складністю системи і високою чутливістю окремих її елементів, які виконують важливі функції в бар'єрних і центральних органах імунітету, до багатьох екзо- і ендогенних чинників.

Однією із найпоширеніших моделей експериментального вивчення регенерації імунної системи є, мабуть, радіаційний імунодефіцит. В результаті летального опромінення в організмі гинуть лімфоїдні і незрілі мієлоїдні клітини, а провідними патологічними процесами у розвитку імунодефіциту стають кістковомозковий і кишковий синдроми, тому що мікрофлора, яка долає бар'єрні структури, не зустрічає належного захисту зі сторони імунної системи, більшість клітин якої зазнає кількісних і функціональних втрат під дією іонізуючого випромінювання. У першу чергу уражуються лімфоцити, що перебувають в інтерфазі і дуже чутливі до апоптозу (інтерфазна апоптотична загибель). Також відбувається масова репродуктивна загибель, якій піддаються проліферуючі клітини, у тому числі лімфоцити, що відповідають проліферацією і на нове антигенне подразнення, яке іде від кишківника та інших бар'єрних органів. В-клітини більш чутливі, ніж Т-лімфоцити, і до того ж, більше уражується здатність $CD4^+$ -лімфоцитів до диференціювання у TH2, ніж у TH1.

Чутливі до радіації і дендритні клітини. Високочутливі до радіації проліферуючі у кістковому мозку незрілі мієлоїдні клітини і значно менше зрілі, що знаходяться у циркуляції, і тому за рахунок останніх зниження рівня гранулоцитів після опромінення дещо затримується. Дуже уразливими до опромінення є процеси, що пов'язані з клітинними контактними механізмами. МСК теж чутливі до радіації [354], а останнім часом з'явилася велика кількість робіт про досить високу радіочутливість МСК [242, 243, 355 – 357]. МСК сильно уражуються і при попередньому кондиціонуванні, необхідному для трансплантації ГСК у клініці [358].

Але залишається невідомим, чи має вплив так широко розповсюджена в організмі контактна взаємодія МСК і ГСК з її неоднозначними результатами на регенеративну активність імунної системи. Мало вивчена і можливість регенерації імунної системи за допомогою трансплантації МСК тимуса. Між тим, як уже згадувалося, багато імунологічних досліджень свідчать про велику і особливу роль МСК тимуса у розвитку Т-лімфоцитів.

Враховуючи зазначене, а також малу вивченість регенеративних властивостей МСК тимуса і значення контактної взаємодії цих клітин з ГСК і прогеніторами у функціонуванні імунної системи і її регенерації, сформульовані мета і задачі дослідження.

Дослідження виконані на мишах лінії СВА з вивченням впливу сингенної трансплантації опроміненим тваринам ГСК і прогеніторів дорослого кісткового мозку і фетальної печінки після їх інкубації з МСК тимуса *in vitro*. Увага до названих клітин саме і обумовлена вмістом у них ГСК і прогеніторів різного ступеня зрілості, їх відомими і важливими властивостями, вивчення яких може розширити спектр даних, які по-новому висвітлюватимуть імунобіологічне значення контактної взаємодії ГСК і прогеніторів з МСК тимуса, і визначити подальші перспективи досліджень. Важлива частина роботи присвячена дослідженню мало вивченої імунорегенеративної активності тимусних МСК.

Для одержання клітинних суспензій зразки печінки розділяли на дві приблизно рівні частини з використанням двох методів: механічного

ресуспендування тканини органу та м'якої ферментативної обробки. При механічному ресуспендуванні печінку переносили у чашку Петрі з 1–2 мл розчину Хенкса і руйнували паренхіму органу тонкими голками до одержання однорідної клітинної суспензії. Клітини змивали зі стінок невеликою кількістю розчину Хенкса у стерильну пробірку об'ємом 10 мл і пропускали через нейлоновий фільтр.

За іншою методикою подрібнені фрагменти органу піддавали м'якій ферментативній обробці за допомогою суміші стандартних розчинів трипсину (0,25%) та версену (0,02%) у співвідношенні 2:1. При цьому клітини витримували протягом 1 години в суміші трипсину та версену при 37°C, потім двічі відмивали в Дюльбеко-модифікованому середовищі Ігла (DMEM) і ресуспендували за допомогою піпетки.

В обох випадках, по закінченню процедури, клітини осаджували центрифугуванням та ресуспендували їх в 1 мл середовища DMEM з 10 % ЕТС. Всі маніпуляції з клітинами проводили при кімнатній температурі.

Встановлено, що, кількість життєздатних клітин була практично однакова при отриманні суспензій ГСК і прогеніторів методом механічного ресуспендування або методом м'якої ферментативної обробки.

Враховуючи те, що суспензії ГСК і прогеніторів, отримані обома методами, мають подібні кількісні та функціональні характеристики, а також те, що механічне ресуспендування практично не впливає на вміст поверхневих мембранних молекул і потребує менше часу та витрат, в подальшій роботі використовували тільки цей метод.

Вивчення властивостей тимусних МСК показало, що вони мають фібробластну морфологію, адгезивність, проявляють клоногенність, дійсно є мультипотентними і однаково ефективно диференціюються в остео- і адипогенному напрямках у спеціальних поживних середовищах. Остеогенне диференціювання індукували культивуванням у остеогенному середовищі DMEM/F12, 1:1, (Sigma, США) з додаванням 15% ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 10 мМ L-глютаміну (Sigma, США), 50 мкг/мл

L-аскорбінової кислоти (Sigma, США), 10 мМ 3-гліцерофосфату (Sigma, США), 0,1 мкМ дексаметазону (Sigma, США), 100 Од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину (Дарниця, Україна). Адипогенне диференціювання індукували культивуванням у середовищі DMEM-HG (РАА, Німеччина) з високим вмістом глюкози (4,5 г/л) з додаванням 10% конячої сироватки (РАА, Німеччина), 10 мМ L-глутаміну (Sigma, США), 0,5 мкМ дексаметазону (Sigma, США), 6 мкг/мл інсуліну (Sigma, США), 100 Од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину (Дарниця, Україна). Культивування проводили в CO₂-інкубаторі (Joan, Франція) при 37°C і 5% CO₂ протягом 10 діб.

МСК тимуса ефективно диференціювалися по обом напрямкам.

Для адаптування методики одержання і культивування МСК тимуса досліджували фрагменти тимуса мишей СВА. Вивчали особливості нарощування клітин тимуса із експлантатів:

- на поверхні целофанових пластинок;
- на скляній поверхні культуральних флаконів;
- на скляній поверхні чашок Петрі;
- на поверхні лунок пластикових 6-лункових планшетів.

Для культивування тимус подрібнювали за допомогою ножиць на шматочки розміром не більше 1 мм³, фрагменти тимуса фіксували у розрізах целофанових пластинок (10×10 мм²) і вносили у пеніцилінові флакони з 5мл культурального середовища. Пеніцилінові флакони з матеріалом витримували у термостаті при температурі 37°C. Через кожні 5 діб середовище культивування змінювали.

Для культивування клітин застосовували поживне середовище такого складу: середовище RPMI 1640, (Sigma) – 90 мл; ETC (Біосервіс) – 10 мл; L-глутамін, 200 мМ, (Sigma) – 1 мл; HEPES Na-сіль, 1М, (Sigma) – 1,00 мл; пеніцилін, 2×10⁵ Од/мл – 50 мкл; стрептоміцин, 200 мг/мл – 50 мкл; канаміцин, 200 мг/мл – 50 мкл.

Перед культивуванням клітин тимуса на скляній або пластиковій поверхнях тимус подрібнювали препарувальними голками теж на шматочки

розміром не більше 1 мм^3 . При цьому більшість тимоцитів виходила із тканини в розчин. Фрагменти тимуса двічі промивали розчином Хенкса, відмивали тимоцити і потім фрагменти переносили у судини для культивування. В скляний культуральний флакон ($10 \times 4 \text{ см}^2$) або в скляну чашку Петрі (діаметром 10 см) вносили фрагменти одного тимуса, в лунку 6-лункового пластикового планшета – фрагменти половини тимуса в мінімальному об'ємі повного поживного середовища так, щоб тільки змочити поверхню дна матрацу, чашки або лунки. Культури переносили в CO_2 -інкубатор з 5 % CO_2 при 37°C . Через 2 години, коли шматочки тимуса прикріплювались до дна, додавали поживне середовище: 20 мл – в культуральний матрас, 10 мл – в чашку Петрі, 3 мл – в лунки 6-лункового планшета. Культури знов розміщали в CO_2 -інкубаторі. Кожні 3–4 доби змінювали половину середовища на свіже. За ростом клітин спостерігали у світловому інвертованому мікроскопі, фіксуючи рівень клітинного росту на кожний термін спостереження.

При культивуванні на целофанових пластинках в перші дні експлантати адаптувалися до нових умов культивування, вони мали вигляд щільних шматочків з густим скупченням клітин. Початок росту клітин навколо експлантатів відмічався на 3–4-ту добу. Клітини починали мігрувати за межі експлантатів, і в зоні контакту з поверхнею целофанової плівки відбувалась їх адгезія. Надалі спостерігалось активне розмноження клітин, вони росли на обох поверхнях плівки і могли займати всю її площу. Найбільша кількість клітин була в зонах, наближених до експлантатів, поступово їх кількість зменшувалась пропорційно відстані від експлантата. Найбільш активна проліферація відмічалась на 12–13-ту добу культивування. Щільність клітин в зоні росту була неоднакова: ті клітини, що були наближені до експлантату, тісно контактували між собою, були менших розмірів, із збільшенням відстані від експлантата до краю пласта їх розміри збільшувалися, між ними з'являлися щілини та різної величини порожнини.

При культивуванні на скляній або пластиковій поверхні навколо фрагментів тимуса в перші дні густим шаром лежали тимоцити, що не

прикріплялися. Кількість їх зменшувалась при кожній заміні середовища при практично повному зникненні на 10–12-ту добу культивування.

На 3–4-ту добу культивування серед дрібних округлих тимоцитів з'являлися окремі більші овальні фібробластоїдні клітини, що були прикріплені до поверхні. На 5–6-ту добу на цьому місці з'являлися колонії таких великих овальних клітин (до 30–50). В подальшому розміри колоній збільшувалися так, що їх можна було побачити неозброєним оком у вигляді блідої білої плями на поверхні. При цьому у складі колоній поступово з'являлися клітини більш типового фібробластоподібного типу, яких ставало все більше. Овальні більші клітини залишалися у складі сформованих колоній, але в значно меншій кількості (у співвідношенні 1:20 – 1:40).

Через 15–30 діб МСК тимуса, що культивувалися на целофанових пластинках та на пластиковій або скляній поверхнях фіксували розчином Май-Грюнвальда (3 хв) і фарбували азурII-еозином (3 хв). Пофарбовані колонії на поверхні скляного матрацу, скляній поверхні чашки Петрі, лунки пластикового 6-лункового планшету було видно неозброєним оком. При вивченні колоній МСК тимуса під мікроскопом було помітно, що клітини культур мали різноманітну форму, розміри, морфологію та характер росту.

При культивуванні фрагментів тимуса мишей на скляній або пластиковій поверхні отримані принципово подібні результати, що в цілому характеризалися утворенням колоній, які містили морфологічно різні стромальні клітини. Культивування на целофані не сприяло утворенню фібробластних колоній. Таким чином, при нарощуванні МСК тимуса на целофані відбувалося інтенсивне розмноження клітин без помітного оком утворення колоній, що може мати значення у подальшому для формування особливих умов культивування і використання їх у практичних цілях для отримання великої кількості МСК тимуса.

Кріоконсервування за програмою [207] з використанням програмного заморозувача KRYO-516 (Planer, Англія) МСК тимуса, а також ГСК і прогеніторів кісткового мозку і фетальної печінки окремо чи після

культивування з МСК тимуса забезпечувало високу життєздатність клітин на рівні 85-90% і зберігало їх здатність до ефективного формування КУО-Ф.

Таким чином, виявилось, що програму кріоконсервування [207], яка застосовувалася нами для заморожування нормальних ГСК і прогеніторів, а також МСК тимуса, можна використовувати для ефективного зберігання культивованих з МСК гемопоетичних клітин.

При культивуванні ГСК і прогеніторів у кондиційному середовищі МСК тимуса суттєвих змін у властивостях клітин не спостерігалось, як і при дослідженні ГСК і прогеніторів, культивованих з культурою МСК тимуса.

Таким чином, нами адаптовані методи одержання препаратів ГСК і прогеніторів із кісткового мозку і фетальної печінки, а також МСК тимуса мишей. Вивчено умови культивування клітин та особливості їх поведінки *ex vivo*. Оцінено вплив на життєздатність і здатність до утворення фібробластних колоній клітинами таких факторів, як кріоконсервування, склад культурального середовища і сумісного культивування ГСК і прогеніторів з МСК.

Зважаючи на дані про мембранну спорідненість МСК і ГСК, ми вивчили можливість реалізації контактної взаємодії при короткочасному зближенні клітин. Після розморожування кріоконсервовані МСК тимуса переводили в суспензію, відмивали, підраховували і змішували з тимоцитами, клітинами лімфатичних вузлів або фетальної печінки у співвідношенні 1:100, центрифугували 5 хвилин при 250 g, осад ресуспендували і суспензію вносили у камеру Горяєва.

В результаті в суспензії утворювались контактні клітинні об'єднання із центрально розташованих МСК і приєднаних до них гемопоетичних клітин. Асоціацію МСК з трьома і більшою кількістю лімфоцитів вважали фібробластолімфоцитарною розеткою (ФЛР).

МСК тимуса утворювали велику кількість ФЛР з тимоцитами. Значно меншу кількість ФЛР утворювали клітини лімфатичних вузлів і фетальної печінки, що в цілому відповідає літературним даним про більш високу спорідненість до МСК незрілих Т лімфоцитів.

Більша здатність до контактної взаємодії з МСК тимуса тимоцитів, мабуть, відображає більш велику значущість мембранної спорідненості цих типів клітин у функціонуванні тимуса і, можливо, в тимусних нішах попередників Т-клітин. Активність МСК тимуса в формуванні ФЛР в результаті кріоконсервування не змінювалася. Мабуть, відомий вплив кріоконсервування, зокрема ДМСО, на диференціювальні здатності МСК, як це показано для фетальних МСК людини [208, 225, 226], не поширюється на здатність МСК тимуса мишей до утворення ФЛР, що може пояснюватись і різним походженням, і вихідними властивостями клітин, і чутливістю певних клітинних процесів до дії ДМСО і самого процесу кріоконсервування.

Таким чином, нормальні і кріоконсервовані МСК тимуса мишей, що можуть диференціюватися по остео- і адипогенному напрямках, можливо однаково ефективно культивувати на скляній і пластиковій поверхні в чашках Петрі і лунках планшетів, де вони формують колонії, а також на пластинці целофану, коли клітини інтенсивно нарощуються моношаром з обох сторін. При змішуванні суспензій розморожених МСК тимуса з тимоцитами або клітинами лімфатичних вузлів і фетальної печінки мишей з наступним центрифугуванням і ресуспендуванням в суспензії формуються клітинні контактні об'єднання МСК і гемопоетичних клітин у вигляді ФЛР, що свідчить про наявність не порушеної кріоконсервуванням мембранної спорідненості у взаємодіючих клітин, яка забезпечує їх контактну взаємодію. Найбільшою здатністю до контактної взаємодії з МСК володіють тимоцити.

Адаптування методик отримання клітин і виявлення ефективної контактної взаємодії МСК і гемопоетичних клітин при короткочасному змішуванні клітин забезпечило можливість переходу до виконання наступного етапу досліджень і вивчення впливу контактної взаємодії ГСК і прогеніторів з МСК тимуса на радіозахисну активність гемопоетичних клітин, а також цю активність і самих МСК тимуса.

Досліджували імунологічні і радіозахисні властивості таких препаратів ГСК і прогеніторів: клітин кісткового мозку (ККМ) і клітин фетальної печінки

(КФП) мишей, цих же клітин, преінкубованих з сингенними МСК тимуса мишей СВА *in vitro*, а також досліджували відповідну активність МСК тимуса мишей, отриманих із культур, та, як контроль на дію клітин, вивчали активність кондиційного середовища з сумісної культури сингенних КФП та МСК (табл. 6.1). Клітинні препарати вводили внутрішньовенно через 24 години після опромінення у дозі 9 Гр. ККМ і КФП трансплантували у кількості $0,5 \times 10^6$ на мишу, МСК тимуса водили у кількості 5×10^4 . Спостереження проводили протягом 16 тижнів.

Таблиця 6.1

Препарати ГСК і прогеніторів

1	Кондиційне середовище від сумісного культивування сингенних КФП і МСК тимуса	КС
2	ГСК і прогенітори кісткового мозку мишей	ККМ
3	ГСК і прогенітори кісткового мозку мишей, преінкубовані з МСК тимуса	іККМ
4	ГСК і прогенітори фетальної печінки мишей	КФП
5	ГСК і прогенітори фетальної печінки мишей, преінкубовані з МСК тимуса	іКФП
6	МСК тимуса мишей СВА	МСК

Відповідно до певних клітин сформували експериментальні групи.

Опромінення у дозі 9 Гр призводило до поступової загибелі всіх контрольних мишей протягом 14 тижнів. Десять за перший місяць гинуло приблизно 70% тварин. Введення КС сумісної культури МСК тимуса і КФП не впливало на виживаність тварин.

Трансплантація сингенних нормальних ККМ мишам підвищувала виживаність в ранні терміни після опромінення; на 3 тиждень – суттєво. Далі кількість тварин, що вижили, поступово зменшувалася так, що на 15 тиждень гинули всі миши.

Доза ККМ ($0,5 \times 10^6$) за даними літератури є пороговою для летально опромінених мишей. Помітний позитивний вплив ККМ на початку експерименту, вірогідно, обумовлений наявністю серед ККМ зрілих клітин уродженого імунітету, які здатні до негайної реалізації протиінфекційних імунних реакцій. З часом доля зрілих мієлоїдних клітин зменшується, а їх розвиток із кістковомозкових короткорепопулюючих (КР-ГСК) попередників виявляється недостатнім для формування ефективної чисельності клітин уродженого і адаптивного імунітету.

Відомо, що періоди часу після опромінення і трансплантації ГСК поділяють на ранній (2-4 тижні) та пізній. У ранньому періоді відновлення імунної системи здійснюється КР-ГСК, які за функціональним станом готові до швидкого включення у формування більш зрілих клітин-прогеніторів протягом перших після трансплантації тижнів. У пізньому періоді до регенерації підключаються ДР-ГСК, які мають високий потенціал самовідновлення і забезпечують диференціювання і проліферацію лінійних нащадків тривалий час [359].

Динаміка виживаності тварин після введення ККМ, преінкубованих з МСК тимуса, спочатку мало відрізнялася від такої у мишей, що отримували нормальні ККМ. Але з 7 тижня кількість тварин, що вижили, у цій групі переставала зменшуватись, показник виходив на плато і залишався таким до кінця спостереження (16 тижнів). З 14 тижня виживаність мишей у цій групі була достовірно вища, ніж у контролі. Це, мабуть, свідчить, що сумісна інкубація МСК з ГСК і прогеніторами супроводжується підтримкою життєдіяльності останніх, можливо, за рахунок ДР-ГСК з підвищенням ефективності диференціювання їх у належний час у зрілі гемопоетичні клітини, які завдяки участі у імунологічних реакціях компенсують розвиток летального кістковомозкового синдрому, і виживаність тварин підвищується.

Динаміка виживаності мишей в результаті трансплантації КФП принципово відрізнялася від тієї, що була з ККМ, тим, що ці клітини суттєво більше підвищували виживаність мишей на різних термінах спостереження,

починаючи з ранніх, що свідчить про наявність в препаратах КФП і певної кількості зрілих клітин уродженого імунітету, і більшої кількості ГСК з прогеніторами, і, мабуть, наявності і КР-ГСК, і ДР-ГСК з відповідними відмінностями їх функціонального стану, що сприяє більш швидкому і ефективному диференціюванню у напрямку клітин імунної системи. Зокрема, відомо, що ГСК і прогенітори фетальної печінки, на відміну від таких клітин кісткового мозку, у більшій кількості знаходяться у фазі G_1 клітинного циклу, що свідчить про їх вихід із дормантного стану і більшу готовність до диференціювання.

В результаті трансплантації летально опроміненим мишам КФП, що були преінкубовані з МСК, спостерігалася інша динаміка виживаності. У першу чергу вона відрізнялася тим, що була значно вищою у перші тижні і дещо знижувалася на останніх етапах, хоча наприкінці дослідження виживаність у цій групі була достовірно більша, ніж у контролі. Наприкінці експерименту між цими двома групами, що отримували нормальні та іКФП, достовірної різниці не було. Можна припустити, що позитивний ефект на початку експерименту пов'язаний з контактною стимуляцією МСК реакцій природного імунітету з активацією КР-ГСК фетальної печінки, що, як відомо, відрізняються більш активною проліферацією, але яка може привести у подальшому до виснаження КР-ГСК і недостатньо ефективного темпу поповнення імунної системи зрілими активними клітинами імунної системи.

Заслуговує на увагу те, що трансплантація окремо сингенних МСК викликала недостовірне підвищення показників виживаності, але у всі терміни спостереження, але з 14 тижня підвищення виживаності було достовірним. В цей час загинули всі тварини в контрольній групі, а в групі мишей, що отримували МСК, залишалися живими 13% тварин. Це дещо несподіваний результат, тому що МСК зазвичай не диференціюються в гемопоетичні клітини, а сталі уявлення про лікування радіаційного кістково-мозкового синдрому полягають в необхідності трансплантації ГСК, із яких можуть розвинутиися клітини імунної системи.

Механізм імуностимулюючої дії трансплантованих МСК може бути пояснений наявністю кількох складових. По-перше, МСК відіграють велику роль у підтримці ГСК. Вони є головним клітинним компонентом кістковомозкових ніш ГСК [10]. Важливу роль МСК відіграють і в тимусних нішах, де беруть участь у диференціюванні тимоцитів і їх кістковомозкових попередників [107]. Відома спорідненість МСК до незрілих Т-клітин [37]. Можна лише припустити, що введені МСК певною мірою заміщають ушкоджені опроміненням стромальні клітини реципієнта і створюють більш адекватне мікрооточення для зберігання і виходу у проліферацію і диференціювання ГСК і прогеніторів. По-друге, за деяких умов *in vitro* і *in vivo* МСК можуть стимулювати антитілогенез. Ще одна реальна можливість полягає у виявленій недавно здатності МСК до участі у реакціях уродженого імунітету завдяки експресії Toll-рецепторів, що може бути складовою механізму нейтралізації інфекції і пригнічувати розвиток кістково-мозкового синдрому [192]. І по-четверте, показана наявність у МСК метаболічної і адаптогенної активності, яка сприяє постстресовій регенерації імунної системи. Одним із важливих механізмів дії МСК є продукція ними цитокінів, екзосом і екстрацелюлярних везикул [130,131].

Таким чином, є підстави думати, що імунорегенеративна і радіозахисна активність трансплантованих МСК може реалізовуватись паракринними механізмами ними самими, або завдяки позитивному диференціювальному і підтримуючому їх впливу на ГСК і прогенітори, що збереглися після опромінення.

Для більш чіткого відображення і кращої демонстрації імунорегенеративної і радіозахисної дії досліджуваних клітин був використаний метод визначення середньої тривалості життя загиблих тварин (СТЖ), що дає можливість більш детально охарактеризувати вплив на виживаність. Виявилося, що, практично всі типи клітин проявляли тенденцію до подовження СТЖ загиблих мишей. Але значне її подовження було тільки в групі мишей, що отримували іКФП. Відмінності в дії контакту МСК з ККМ і

КФП можуть бути пояснені, як уже, наголошувалося, різним ступенем зрілості фетальних і дорослих ГСК і прогеніторів, а також інших чутливих до міжклітинної взаємодії елементів.

Одержані дані свідчать, що МСК тимуса проявляли імунорегенеративну і радіозахисну активність. Сильнішу від нормальних клітин дію проявляли преінкубовані у контакті з МСК ККМ і КФП, що сприяло підвищенню виживаності мишей, що отримували іККМ, а також виживаності і СТЖ мишей під впливом іКФП.

Скоріш за все дія розглянутих в експерименті гемопоетичних і стромальних клітин реалізується через підсилення активності імунної системи. Перевірці цього припущення були присвячені наступні дослідження.

Перш за все була розроблена відповідна експериментальна модель. На 25-й після трансплантації клітин день, коли загибель контрольних опромінених мишей вже була інтенсивною, тваринам вводили внутрішньочеревно 10^8 еритроцитів барана, а через 4 дні проводили повторну ін'єкцією такої ж кількості еритроцитів у подушечку задньої лапи. Ще через добу (30-й день після опромінення) оцінювали виживаність тварин і визначали показники імунної системи.

Виявилося, що 30-денна виживаність суттєво вища у тварин, які отримували КФП, або іКФП, що узгоджувалось з даними попередніх досліджень. Трансплантація інших клітинних препаратів не впливала на 30-денну виживаність.

Встановлено, що введення як нормальних, так і іККМ, а також іКФП призводило до значного, майже повного, відновлення тимуса. Якщо відновлення тимуса здійснювалося завдяки колонізації органу клітинами-попередниками, що генеруються трансплантованими клітинами, то треба припустити, що іКФП або краще мігрують у тимус, або індукція супроводжується підвищенням їх потенціалу до проліферації і диференціювання.

Клітинність кісткового мозку у опромінених мишей значно зменшувалася, а трансплантація всіх клітинних препаратів призводила до її відновлення. Кількість КУО-Ф на стегову кістку у опромінених мишей теж значно знижувалася, а у тварин, що отримували різні препарати ГСК і прогеніторів та МСК тимуса, їх чисельність суттєво підвищувалася.

Кількість лейкоцитів крові опромінених мишей також суттєво зменшувалася. Більш драматично у опромінених тварин зменшувалася абсолютна кількість лімфоцитів. Вміст лейкоцитів у опромінених мишей зростав лише після введення іКФП; зворотній ефект давало введення іККМ. Абсолютна кількість нейтрофілів також достовірно знижувалася після введення іККМ. А от кількість лімфоцитів суттєво збільшувалася у мишей, що отримували індуковані ГСК і прогенітори ККМ і КФП.

Таким чином, індуковані ГСК і прогенітори із обох джерел, стимулювали лімфоцити, а індуковані ККМ ще і негативно впливали на нейтрофіли.

Виявлені відмінності, мабуть, пов'язані з різною чутливістю до опромінення мієлоїдної і лімфоїдної лінії клітин, а також природної швидкості відновлення цих клітин. Підвищення кількості лімфоцитів під впливом індукованих ККМ і КФП може бути і наслідком стимуляції ГСК, які контактували з МСК. Контактна взаємодія може реалізувати свій вплив на лімфоїдні клітини також зміною їх здатності до рециркуляції або підсиленням темпу проліферації лімфоцитів.

Важливі результати отримані при вивченні природного і адаптивного імунітету. Поглинальна активність макрофагів під впливом опромінювання була дещо підвищеною, але тільки після трансплантації нормальних КФП показник набував достовірності. Тенденція до збільшення поглинальної активності макрофагів у опромінених тварин всіх груп може бути пояснена подразненням цих клітин продуктами бактеріальної агресії, що йде в результаті розвитку кістковомозкового і кишкового синдромів. В цілому виходить, що поглинальна стадія фагоцитозу практично не ушкоджувалася опроміненням, а ГСК за цих умов її не змінювали, за виключенням дії нормальних КФП.

Стимулюючий вплив на поглинальну активність мали також введені *in vivo* МСК тимуса. Цією обставиною може бути пояснена і стимуліція поглинальної активності КФП, які, як відомо, мають у своєму складі суттєву кількість фетальних МСК.

У опромінених мишей збільшувалася відносно норми і бактерицидна активність макрофагів (рис. 5.10), мабуть, з тих же причин, що і поглинальна. В усіх групах опромінених мишей, що отримували різні клітинні препарати, середні значення також мали чітку тенденцію до збільшення. Але різниця між ними була досить малою і статистично достовірні проти нормальних тварин були тільки показники у групі, яка отримувала індуковані МСК КФП, що як часто і в інших дослідках, виділяє ці клітини по активності.

Природна цитотоксичність спленоцитів опромінених мишей значно знижувалася, а трансплантація всіх досліджених клітинних препаратів призводила до суттєвого її збільшення. Необхідно також зазначити, що ККМ і КФП, які були преінкубовані з МСК тимуса, показували більш суттєву стимулюючу дію, особливо і КФП.

Індекс РБТЛ, яка реалізувалась клітинами лімфатичних вузлів опромінених мишей, зменшувався в усіх досліджених групах. Реакція суттєво підсилювалася в результаті трансплантації іККМ, нормальних КФП та іКФП. Статистично достовірні різниця спостерігалася також між групами мишей, що отримували нормальні і іККМ на користь останніх.

Спленоцити летально опромінених мишей *in vitro* продукували значно меншу кількість ВХН-ндукованого α/β - і КонА-ндукованого γ -інтерферону. Суттєве зниження продукції вказаних типів інтерферонів спостерігалось і в культурах спленоцитів тварин, які одержували нормальні ККМ і КФП. Навпаки, введення мишам ГСК і прогеніторів, преінкубованих з МСК тимуса, сприяло значному відновленню здатності спленоцитів до синтезу α/β - і γ -інтерферонів.

Окремо треба відмітити дані по вивченню інтерфероностимулюючої функції МСК тимуса. У спленоцитів мишей, що отримували МСК, здатність до

продукції α/β -інтерферонів не відновлювалася, а синтез γ -інтерферону практично нормалізувався.

ФНПа в культурі спленоцитів нормальних мишей визначався у слідових кількостях. Навпаки, цитокін у помітній кількості продукувався клітинами опромінених тварин. Це так званий «спонтанний» ФНПа. Причому він виявлявся приблизно в рівній кількості незалежно від властивостей введених ГСК і прогеніторів, за виключенням групи ККМ, преінкубованих з МСК. Під впливом цих клітин синтезувалося більше ФНПа, ніж спленоцитами мишей, що отримували інтактні ККМ. Можна припустити, що «спонтанна» продукція ФНПа у опромінених тварин, на відміну від нормальних, іде завдяки індукторній дії бактеріальних продуктів, які утворюються в результаті здійснення інфекційної агресії в умовах розвитку кістковомозкового і кишкового синдромів. Можливо, такий механізм взагалі є патогенетичною ланкою у розвитку радіаційного імунодефіциту.

Індукований ЛПС синтез ФНПа спленоцитами опромінених мишей *in vitro* був менш активним, ніж у нормальних тварин. Якщо прийняти до уваги, що у опромінених тварин чинники мікробної агресії індукують синтез ФНПа разом з ЛПС, можна вважати, що питома вага активності синтезу ФНПа у відповідь на ЛПС у опромінених значно менша, ніж у нормальних. Ймовірно, що пригнічуючу роль виконують саме продукти мікробної агресії [328].

Інтенсивність реакції ГСТ у опромінених мишей значно знижувалася. Також реакція ГСТ була значно зниженою у тварин, що отримували нормальні ККМ, КФП та індуковані КФП і МСК тимуса. Під впливом індукованих ККМ показник реакції ГСТ підвищувався і суттєво не відрізнявся від показника у нормальних тварин. Можна припустити, що саме ГСК кісткового мозку, преінкубовані з МСК, набувають властивостей, що сприяють їх диференціюванню у клітини, що беруть участь у розвитку реакції ГСТ.

Вивчення гуморального імунітету показало, що у опромінених мишей формування АУК у відповідь на імунізацію еритроцитами барана дуже

пригнічено. Їх кількість значно збільшувалася тільки в групах мишей, що отримували індуковані ГСК і прогенітори, як кісткового мозку, так і фетальної печінки.

Аналогічна динаміка по групах спостерігалася і при визначенні гемолізину і гемаглютининів.

Результати свідчать, з однієї сторони, про відому високу чутливість гуморальної імунної відповіді до опромінення, а з іншої, про значну стимулюючу роль у процесі її формування ГСК і прогеніторів, преінкубованих з МСК тимуса.

Вплив МСК тимуса на радіозахисну і імунорегенеративну активність заслуговує на окремий розгляд. Ще не так давно такі дослідження не проводилися. І це не дивно, тому що МСК – це стромальні елементи, і зрозуміло, що гемопоетичні клітини, що формують імунну систему, із них не утворюються. Ясно, що з огляду не зазначене, навряд чи можна очікувати відтворення імунної паренхіми стромальними клітинами. Між тим відомо, про що і вище згадувалося, яку важливу роль відіграють МСК у підтримці ГСК і прогеніторів. З урахуванням цього можна було припустити, що при певних обставинах МСК зможуть проявити свою підтримуючу гемопоетичні та імунні клітини роль.

Дійсно, в групі мишей, що отримували МСК тимуса, виживанність суттєво підвищувалася з 14-го по 16-й тиждень. На 30-денну виживаність опромінених мишей трансплантація МСК тимуса суттєво не впливала. Але при цьому значно зростала маса і відносна маса тимуса, у ньому значно підвищувалася кількість тимоцитів і клітинність органу. Клітинність кісткового мозку теж зростала суттєво. Важливо відмітити, що у кістковому мозку в результаті опромінення значно знижувалася кількість КУО-Ф. Трансплантація МСК тимуса, як і інших досліджуваних клітин, сприяла суттєвому підвищенню кількості КУО-Ф, що, з однієї сторони, свідчить про чутливість стромальних елементів кісткового мозку до опромінення, а з іншої сторони, про високу ефективність МСК тимуса у відновленні строми. Суттєво підвищувалася

природна цитотоксична активність, стимулювалася реакція ГСТ, значно зростав рівень γ -інтерферону. В результаті трансплантації МСК тимуса у опромінених мишей суттєво зростав рівень гемаглютининів і гемолізінів у периферичній крові. Дані в цілому свідчать, що трансплантація МСК тимуса опроміненим мишам значною мірою і позитивно впливає на багато показників імунної системи.

Таким чином, МСК тимуса і гемопоетичні клітини мають мембранну спорідненість, яка *in vitro* проявляється контактною взаємодією клітин з утворенням фібробласто-лімфоцитарних розеток. Преінкубація ГСК і прогеніторів з МСК тимуса призводить до вираженої активації ГСК і прогеніторів у напрямку регенерації та стимуляції імунобіологічної та радіозахисної активності. МСК тимуса також значною мірою проявляють зазначену дію.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено актуальне наукове завдання – експериментально обґрунтована можливість підвищення імунобіологічної, регенеративної і радіозахисної активності трансплантатів ГСК і прогеніторів кісткового мозку та фетальної печінки внаслідок їх попередньої контактної взаємодії з МСК тимуса. Також встановлено, що виражену активність у зазначених напрямках мають і самі МСК тимуса. Отримані дані обумовлюють нові підходи для розробки більш ефективних клітинних трансплантатів на основі ГСК, їх прогеніторів і МСК тимуса, а також способів їх використання у клініці.

1. ГСК і прогенітори, що містяться у фетальній печінці мишей 14 діб гестації можуть бути отримані шляхом механічної або м'якої ферментативної обробки. Життєздатність отриманих КФП і їх здатність до контактної взаємодії з МСК тимуса не порушується в результаті кріоконсервування, культивування з МСК тимуса і кондиційним середовищем МСК тимуса.
2. МСК тимуса мишей ефективно, з утворенням фібробластних колоній, нарощуються із експлантатів тимуса на скляній і пластиковій поверхні культуральних посудин. На поверхні целофанових пластинок спостерігається зливний рост МСК тимуса з обох сторін мембрани без колонієутворення. Проявляючи мультипотентність, кріоконсервовані МСК тимуса диференціюються по остео- і адипогенному напрямкам у спеціальних середовищах. Клітини зберігають життєздатність після кріоконсервування.
3. Вперше встановлено, що МСК тимуса і гемопоетичні клітини мають виражену мембранну спорідненість, яка забезпечує їм можливість контактної взаємодії *in vitro*, що проявляється формуванням клітинних поєднань з центрально розташованою МСК і кількома приєднаними до неї гемопоетичними клітинами – фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР). Найбільшу спорідненість до МСК тимуса мають тимоцити (кількість

утворених ФЛР – 84%) і, суттєво меншу, клітини лімфатичних вузлів (кількість утворених ФЛР – 52%) і КФП (кількість утворених ФЛР – 24%), що відображає наявність найвищої мембранної спорідненості до МСК тимуса у незрілих Т-клітин.

4. Вперше показано, що трансплантовані летально опроміненим мишам МСК тимуса суттєво підвищують виживаність тварин (на 13 %) і регенеративні процеси в імунній системі: значно зростає абсолютна (в 3,5 раза) і відносна (в 4 раза) маса тимуса, кількість тимоцитів (в 21 раз) і клітинність тимуса (в 10,8 раза), кісткового мозку (в 2,6 раза), здатність клітин кісткового мозку до утворення фібробластних колоній (в 4,7 раза), стимулюється реакція ГСТ, природна цитотоксичність (в 1,5 раза), утворення γ -інтерферону (в 7,5 раза), та значно зростає вміст гемолізинів і гемаглютининів у сироватці крові.
5. Трансплантація опроміненим мишам нормальних і преінкубованих з МСК тимуса ККМ сприяє тимчасовому підвищенню виживаності (на 30 %) на короткий термін раннього після опромінення періоду. Тільки преінкубовані з МСК тимуса ККМ суттєво підвищують виживаність тварин (на 13%) і наприкінці досліду.
6. Нормальні КФП суттєво (на 27–40 %) підвищують виживаність в основному у пізньому після опромінення періоді. Навпаки, в результаті трансплантації преінкубованих з МСК тимуса КФП виживаність значно підвищується (на 39–52 %), головним чином протягом раннього періоду. Зазначена динаміка виживаності узгоджується зі значним підвищенням середньої тривалості життя загинув тварин (в 4,7 раза) виключно у групі реципієнтів преінкубованих КФП.
7. Вперше встановлено, що в результаті введення преінкубованих з МСК тимуса КФП значно більше, ніж у мишей, які отримували нормальні КФП, підсилюється регенерація тимуса. Відносно тварин, які отримували нормальні клітини, у мишей, що отримували преінкубовані КФП, суттєво зростає кількість лейкоцитів (на 16 %) і лімфоцитів (на 54 %) у периферичній крові. Після введення преінкубованих ККМ вміст лімфоцитів

також зростає на 20 %, але кількість лейкоцитів і нейтрофілів суттєво знижується (відповідно на 16 % і 28 %) проти рівня тварин, які отримували нормальні ККМ, що свідчить про відмінності у дії преінкубованих ККМ і КФП на лімфоїдні і мієлоїдні клітини.

8. Вперше показано, що в результаті трансплантації летально опроміненим мишам преінкубованих ККМ і КФП у порівнянні із веденням нормальних клітин суттєво підвищується: рівень гемолізінів (відповідно до типу клітин в 16 і 2,5 рази), гемаглютинінів (в 23 і 15 разів), утворення АУК в селезінці (в 4,7 і 3,1 рази), здатність спленоцитів до синтезу α/β -інтерферону (в 3 і 1,6 рази). Проліферативна активність Т-лімфоцитів у реципієнтів преінкубованих ККМ зростає на 25 %, а в результаті введення преінкубованих КФП в 2 рази стимулюється синтез γ -інтерферону і в 1,7 рази природна цитотоксичність. Отримані дані в цілому свідчать про виражене зростання імунобіологічної і регенеративної активності ГСК і прогеніторів ККМ і КФП внаслідок їх преінкубації з МСК тимуса.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Всі проведені дослідження виконані в рамках фундаментальних НДР. Тим не менше, завдяки отриманим даним можна запропонувати практичні рекомендації.

За отриманими результатами розроблено два патенти на корисну модель стосовно підвищення ефективності регенерації імунної системи завдяки трансплантації ГСК, попередньо проінкубованих з МСК тимуса. Цей принцип може бути покладений в основу нового біотехнологічного підходу для отримання трансплантатів ГСК з більш високою імунорегенеративною і радіозахисною активністю. Для корекції імунодефіцитів може бути рекомендовано також застосування МСК. Для довгострокового збереження і накопичення клітинного матеріалу в кріобанках можна рекомендувати кріоконсервування преінкубованих ГСК, що, як встановлено у роботі, не впливає на життєздатність і здатність клітин до контактної взаємодії.

У лабораторній практиці рекомендується використання нових підходів, які застосовані в роботі для дослідження міжклітинної контактної взаємодії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Чернишов А. В. Субпопуляції лімфоцитів і дія на організм іонізуючого випромінювання. *Український медичний часопис*. 2004. № 5. С. 120-123.
2. Кирик В.М. Особливості розселення і диференціювання гемопоетичних стовбурових клітин різного ступеня зрілості та їх вплив на функцію імунної системи у мишей різного віку: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.08 / Національний медичний ун-т ім. О.О.Богомольця. Київ, 2009. 171 с.
3. Бутенко Г.М. Применение стволовых клеток в геронтологических исследованиях. *Проблемы старения и долголетия*. 2008. Т. 17, № 2. С. 144-149.
4. Recent biomedical applications on stem cell therapy: A brief overview / M. Agrawal et al. *Current stem cell research & therapy*. 2019. Vol. 14, No 2. P. 127-136.
5. Bozdağ S.C., Yüksel M.K., Demirer T. Adult Stem Cells and Medicine. *Adv Exp Med Biol*. 2018. Vol. 1079. P. 17-36. doi: 10.1007/5584_2018_184.
6. Adult Stem Cells for Regenerative Therapy / N.Gurusamy et al. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2018. Vol. 160. P. 1-22. doi: 10.1016/bs.pmbts.2018.07.009.
7. Miura Y. Current basic understanding and clinical application of mesenchymal stromal/stem cells. *Rinsho Ketsueki*. 2018. Vol. 59(10). P. 1935-1941. doi: 10.11406/rinketsu.59.1935.
8. Mesenchymal Stromal Cells Based Therapy in Systemic Sclerosis: Rational and Challenges / J.Peltzer et al. *Frontiers in immunology*. 2018 Vol. 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.02013. eCollection 2018.
9. Taketani T. Clinical application of mesenchymal stem cells for hematological diseases. *Rinsho Ketsueki*. 2018. Vol. 59(10). P. 2362-2372. doi: 10.11406/rinketsu.59.2362.
10. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Физиологическая система соединительной ткани и онкогенез. IV. Мезенхимальная стволовая клетка: что определяет неоднозначность ее действия? *Онкология*. 2018. Т. 20, № 2. С. 77-92.

11. Nikolskaya K. I., Butenko G. M. Structural-functional organisation of the bone marrow hematopoietic stem cells niches. *Cell and Organ Transplantology*. 2016. Vol. 4, No 1. P. 101-117.
12. Chacón-Martínez C.A., Koester J., Wickström S.A. Signaling in the stem cell niche: regulating cell fate, function and plasticity. *Development*. 2018. Vol. 145, No 15. P. dev165399. doi: 10.1242/dev.165399.
13. Stem cell niche-specific Ebf3 maintains the bone marrow cavity / M.Seike et al. *Genes & development*. 2018. Vol. 32, No 5-6. P. 359-372. doi: 10.1101/gad.311068.117.
14. Wei Q., Frenette P.S. Niches for hematopoietic stem cells and their progeny. *Immunity*. 2018. Vol. 48. No4. P. 632-648. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.024.
15. N-Cadherin-expressing bone and marrow stromal progenitor cells maintain reserve hematopoietic stem cells / M.Zhao et al. *Cell reports*. 2019. Vol. 26, No 3. P. 652-669. doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.093.
16. A revised road map for the commitment of human cord blood CD34-negative hematopoietic stem cells / K.Sumide et al. *Nature communications*. 2018. Vol. 9, No 1. P. 2202. doi: 10.1038/s41467-018-04441-z.
17. Marzilli A. Stem cell research and cloning. New York: Chelsea House, 2007. 144 p.
18. Wobus A., Boheler K. Stem cells / Ed. by A.Wobus, K. Boheler. Berlin: Springer-Verlag, 2006. 424 p.
19. Enrichment of hematopoietic stem cells with SLAM and LSK markers for the detection of hematopoietic stem cell function in normal and Trp53 null mice / J.Chena et al. *Experimental Hematology*. 2008. Vol. 36, P. 1236-1243.
20. Steady state peripheral blood provides cells with functional and metabolic characteristics of real hematopoietic stem cells / A.Bourdieu et al. *Journal of cellular physiology*. 2018. Vol. 233, No 1. P. 338-349. doi: 10.1002/jcp.25881.
21. Identification of Lin⁻Sca1⁺kit⁺CD34⁺Flt3⁻ short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients / L.Yang et al. *Blood*. 2005. Vol. 105, No 7. P. 1472- 1479.

22. CD150 side-population cells represent a functionally distinct population of long-term hematopoietic stem cells / D.Weksberg et al. *Blood*. 2008. Vol. 111, No 4. P. 2444-2451.
23. CD133-Positive hematopoietic stem cell "Stemness" genes contain many genes mutated or abnormally expressed in leukemia / A.Torena et al. *Stem Cells*. 2005. Vol. 23, No 8. P. 1142-1153.
24. Kumar B., Madabushi S.S. Identification and Isolation of Mice and Human Hematopoietic Stem Cells. *Methods in molecular biology*. 2018. Vol. 1842. P. 55-68. doi: 10.1007/978-1-4939-8697-2_4.
25. Никольская Е.И. Клеточная композиция костномозговых ниш гемопоэтических стволовых клеток (обзор литературы). *Журнал Національної Академії медичних наук України*. 2015. Т. 21, № 3-4. С. 272-286.
26. Stem cell homeostasis by integral feedback through the niche / N.B.Becker et al. *Journal of theoretical biology*. 2019. Vol. 481. P. 100-109. doi: 10.1016/j.jtbi.2018.12.029.
27. Isolation and Analysis of Mesenchymal Progenitors of the Adult Hematopoietic Niche / M.Garcia et al. *Somatic Stem Cells*. Humana Press, New York. 2018. P. 43-54.
28. Nguyen T.S., Lapidot T., Ruf W. Extravascular coagulation in hematopoietic stem and progenitor cell regulation. *Blood*. 2018. Vol. 132(2). P. 123-131. doi: 10.1182/blood-2017-12-768986.
29. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978. No 1-2. P. –25.
30. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells-- modeling the niche compartments in vitro / D.Jing et al. *Haematologica*. 2010. No 4. P. 542-550.
31. In vitro biomimetic engineering of a human hematopoietic niche with functional properties / P.E.Bourgine et al. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*. 2018. Vol. 115(25). P. E5688-E5695. doi: 10.1073/pnas.1805440115.
32. Bernardo M.E., Fibbe W.E. Mesenchymal stromal cells and hematopoietic stem cell transplantation. *Immunology letters*. 2015. Vol.168(2). P.215-21. doi: 10.1016/j.imlet.2015.06.013.
 33. The Differential Expression of Adhesion Molecule and Extracellular Matrix Genes in Mesenchymal Stromal Cells after Interaction with Cord Blood Hematopoietic Progenitors / L.B.Buravkova et al. *Doklady. Biochemistry and biophysics*. 2018. Vol. 479(1). P. 69-71. doi: 10.1134/S1607672918020047.
 34. Mesenchymal stromal cells induce a permissive state in the bone marrow that enhances G-CSF-induced hematopoietic stem cell mobilization in mice / E.F.M.de Kruijf. *Experimental hematology*. 2018. Vol. 64. P. 59-70. doi: 10.1016/j.exphem.2018.05.002.
 35. TGFBI Expressed by Bone Marrow Niche Cells and Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Regulates Hematopoiesis / S.E.Klamer et al. *Stem cells and development*. 2018. Vol. 27(21). P. 1494-1506. doi: 10.1089/scd.2018.0124.
 36. Intercellular Transfer of Microvesicles from Young Mesenchymal Stromal Cells Rejuvenates Aged Murine Hematopoietic/ R.Kulkarni et al. *Stem Cells*. 2018. Vol. 36, No 3. P. 420-433. doi:10.1002/stem.2756.
 37. Suniara R.K., Jenkinson E.J., Owen J.J. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *The Journal of experimental medicine*. 2000. Vol. 191. P. 1051–1056.
 38. Contribution of Neural Crest-Derived Cells in the Embryonic and Adult Thymus / K.Foster et al. *The Journal of Immunology*. 2008. Vol. 180. P. 3183–3189.
 39. Contact-mediated maturational effects of thymic stromal cells on murine thymocytes in culture / S.Savion et al. *Immunology*. 1989. Vol. 67, No 4. P. 496-501.

40. Expression of VLA-4 on thymocytes. Maturation stage-associated transition and its correlation with their capacity to adhere to thymic stromal cells / M.Sawada et al. *J Immunol*. 1992. Vol. 149, No 11. P. 3517-24.
41. Tavassoli M., Maniatis A., Crosby W.H. Induction of sustained hemopoiesis in fatty marrow. *Blood*. 1974. No 1. P.33-38.
42. The Miracle of Stem Cells: How Adult Stem Cells Are Transforming Medicine Hardcover / R.J.Howe et al. Rancho Santa Fe: Stemmeddica Cell Technologies, 2011. 282 p.
43. Чертков И.Л., Гуревич О.А. Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение. Москва: Медицина, 1984, 240 с.
44. Dexter T.M., Moore M.A.S., Sheridan A.P.C. Maintenance of hemopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semi-allogeneic bone marrow chimeras in vitro. *The Journal of experimental medicine*. 1977. 145, No 6. P.1612-1616.
45. Direct contact with mesenchymal stromal cells affects migratory behavior and gene expression profile of CD133⁺ hematopoietic stem cells during ex vivo expansion / N.Alakel et al. *Experimental hematology*. 2009. No 4. P.504-513.
46. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size / J.Zhang et al. *Nature*. 2003. Vol. 425, No 6960. P.836-841.
47. Human bone marrow mesenchymal progenitors: perspectives on an optimized in vitro manipulation / E. Cordeiro-Spinetti et al. *Front Cell Dev Biol*. 2014. Vol. 2, Article 7. doi: 10.3389/fcell.2014.00007.
48. Taichman R.S., Reilly M.J., Emerson S.G. The Hematopoietic Microenvironment: Osteoblasts and the Hematopoietic Microenvironment. *Hematology*. 2000. No. 5. P. 421–426.
49. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche / L.M.Calvi et al. *Nature*. 2003. Vol. 425, No 6960. P. 841–846.
50. Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche / F.Arai et al. *Cell*. 2004. No 2. P. 149–161.

51. Osteoblast ablation reduces normal long-term hematopoietic stem cell self-renewal but accelerates leukemia development / M.Bowers et al. *Blood*. 2015. No 17. P.2678-2688.
52. The essential functions of adipoosteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche / Y.Omatsu et al. *Immunity*. 2010. No 3. P.387-399.
53. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance /A.Greenbaum et al. *Nature*. 2013. No 495. P.227-230.
54. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells / L.Ding et al. *Nature*. 2012. Vol. 481, No 7382. P. 457-462. doi: 10.1038/nature10783.
55. Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells / Y.Nakamura et al. *Blood*. 2010. Vol. 116, No 9. P. 1422-1432.
56. Cadherin-based adhesion is a potential target for niche manipulation to protect hematopoietic stem cells in adult bone marrow / K.Hosokawa et al. *Cell Stem Cell*. 2010. Vol. 6, No 3. P. 194–198.
57. Ablation of Wntless in endosteal niches impairs lymphopoiesis rather than HSCs maintenance / J.Cao et al. *European journal of immunology* 2015. Vol. 45, No 9. P. 2650-2660.
58. Karpova D., Bonig H. Concise Review: CXCR4/CXCL12 Signaling in Immature Hematopoiesis - Lessons From Pharmacological and Genetic Models. *Stem Cells*. 2015. Vol. 33, No 8. P. 2391-2399.
59. Goodell M. Introduction to a review series on hematopoietic stem cells. *Blood*. 2015. Vol. 125, No 17. P. 2587.
60. Osteoblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells control hematopoietic stem cell migration and proliferation in 3D in vitro model / A.P.De Barros et al. *PLoS One*. 2010. Vol. 5, No 2. e9093. doi: 10.1371/journal.pone.0009093.
61. Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells / A.T.Hooper et al. *Cell Stem Cell*. 2009. Vol. 4(3). P.263-274.

62. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells / M.J.Kiel et al. *Cell*. 2005. Vol. 121, No 7. P. 1109-1121.
63. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations / S.Mendez-Ferrer et al. *Nature*. 2008. Vol. 452, No 7186. P. 442–447.
64. Chemotherapy-induced bone marrow nerve injury impairs hematopoietic regeneration / D. Lucas et al. *Nature Medicine*. 2013. Vol. 19, No 6. P. 695–703.
65. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow / B.O.Zhou et al. *Cell Stem Cell*. 2014. Vol.15, No 2. P. 154–168.
66. CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK-cell development in adult mice / M.Noda et al. *Blood*. 2010. Vol. 117, No 2. P. 451-458.
67. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche / S.Mendez-Ferrer et al. *Nature*. 2010. Vol. 466, No 7308. P. 829-834.
68. Kfoury Y., Scadden D.T. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 2015. Vol.16, No 3. P. 239-253.
69. Control of bone development by P2X and P2Y receptors expressed in mesenchymal and hematopoietic cells / L.Y.Lenertz et al. *Gene*. 2015. Vol. 570, No 1. P. 1-7.
70. LPS-stimulated human bone marrow stroma cells support myeloid cell development and progenitor cell maintenance / P.Ziegler et al. *Annals of hematology*. 2016. Vol. 95, No 2. P. 173-178.
71. PDGFR α and CD51 mark human nestin⁺ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion / S.Pinho et al. *The Journal of experimental medicine*. 2013. Vol. 210, No 7. P.1351–1367.
72. Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation / C.K.Chan et al. *Nature*. 2009. Vol. 457, No 7228. P. 490-494.
73. Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stem cells as a model for cell-cell interaction / W.Wagner et al. *Experimental hematology*. 2007. Vol. 35, No 2. P. 314-325.

74. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal / M.Acar et al. *Nature*. 2015. Vol. 526, No 7571. P. 126-130.
75. Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche / J.Y.Chen et al. *Nature*. 2016. Vol. 530, No 7589. P.223–227.
76. Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells / H.Kobayashi et al. *Nature Cell Biology*. 2010. Vol.12, No 11. P. 1046-1056.
77. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells / J.M.Butler et al. *Cell Stem Cell*. 2010. Vol. 6, No 3. P. 251–264.
78. Endothelial Jagged-1 is necessary for homeostatic and regenerative hematopoiesis / M.G.Poulos et al. *Cell Reports*. 2013. Vol. 4, No 5. P. 1022–1034.
79. Hematopoietic stem cell mobilizing agents G-CSF, cyclophosphamide or AMD3100 have distinct mechanisms of action on bone marrow HSC niches and bone formation / I.G.Winkler et al. *Leukemia*. 2012. Vol. 26, No 7. P. 1594-1601.
80. Suda T., Takubo K., Semenza G.L. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. 2011. Vol. 9(4). P.298–310.
81. Serebrovskaya T.V., Nikolskiy I.S., Ishchuk V.A. Human adaptation to intermittent hypoxia: effects on hematopoietic stem cells and immune function. *In: Adaptive Biology and Medicine*. Canada: Narosa Publisher, 2010. Vol. 6. P. 181-191.
82. Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. *АМН СССР*. Москва: Медицина, 1980. 216 с.
83. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M.Dominici et al. *Cytotherapy*. 2006. Vol.8, No 4. P. 315-317.

84. Simultaneous harvesting of endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells from the human umbilical cord / H.Zhang et al. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018. Vol. 15, No 1. P. 806-812.
85. Стволовые клетки. Биология и потенциальное клиническое использование / Н.Я.Спивак и др. *Трансплантология*. 2005. Т. 8, № 3. С. 6-14.
86. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow / E.J.Gang et al. *Blood*. 2007. Vol. 109, No 4. P. 1743-1751.
87. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs / C.Martinez et al. *Blood*. 2007. Vol.109, No 10. P. 4245–4248.
88. Le Blanc K., Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2012. Vol.12, No 5. P. 383-396.
89. Application of mesenchymal stem cells for therapeutic agent delivery in anti-tumor treatment / D.S.Chulpanova et al. *Frontiers in pharmacology*. 2018. Vol. 9. P. 259. doi: 10.3389/fphar.2018.00259
90. Cordier A.C., Haumont S.M. Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *American Journal of Anatomy*. 1980. Vol. 157, No 3. P. 227-263.
91. A novel transgenic technique that allows specific marking of the neural crest cell lineage in mice / Y. Yamauchi et al. *Developmental biology*. 1999. Vol. 212(1). P. 191-203.
92. Bockman D. E., Kirby M. L. Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. *Science*. 1984. Vol. 223(4635). P. 498-500.
93. Kuratani S., Bockman D.E. Capacity of neural crest cells from various axial levels to participate in thymic development. *Cell and tissue research*. 1991. Vol. 263, No 1. P. 99-105.
94. Targeted disruption of the mouse homologue of the Drosophila polyhomeotic gene leads to altered anteroposterior patterning and neural crest defects / Y.Takihara et al. *Development*. 1997. Vol. 124, No 19. P. 3673-3682.

95. Manley N.R., Capecchi M.R. The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development*. 1995. Vol. 121, No 7. P. 1989-2003.
96. Dietrich S., Gruss P. Pleiotropic undulated phenotypes suggest a role for Pax-1 for growth processes in mesoderm, endoderm and neural crest derived structures. *Dev. Biol.* 1995. Vol. 167, No 2. P. 529-548.
97. Conway S.J., Henderson D.J., Copp A.J. Pax3 is required for cardiac neural crest migration in the mouse: evidence from the splotch (Sp2H) mutant. *Development*. 1997. Vol. 124, No 2. P. 505-514.
98. Amagai T., Itoi M., Kondo Y. Limited development capacity of the earliest embryonic murine thymus. *European journal of immunology*. 1995. Vol. 25, No 3. P. 757-762.
99. Shinohara T., Honjo T. Studies in vitro on the mechanism of the epithelial/mesenchymal interaction in the early fetal thymus. *European journal of immunology*. 1997. Vol. 27, No 2. P. 522-529.
100. Itoi M., Amagai T. Inductive role of fibroblastic cell lines in development of the mouse thymus anlage in organ culture. *Cellular immunology*. 1998. Vol. 183, No 1. P. 32-41.
101. Krueger A. Thymus colonization: who, how, how many? *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2018. Vol. 66, No 2. P. 81-88.
102. Sakata N., Yoshimatsu G., Kodama S. The spleen as an optimal site for islet transplantation and a source of mesenchymal stem cells. *International journal of molecular sciences*. 2018. Vol. 19, No 5. P. 1391
103. In vitro characteristics and in vivo immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells / Z.Guo et al. *Stem Cells*. 2006. Vol. 24, No 4. P. 992-1000.
104. Thymus-derived mesenchymal stem cells for tissue engineering clinical-grade cardiovascular grafts / D.Iacobazzi et al. *Tissue Engineering Part A*. 2017. Vol.24, No 9-10. P. 794-808.

105. Patenaude J., Perreault C. Thymic mesenchymal cells have a distinct transcriptomic profile. *The Journal of Immunology*. 2016. Vol. 196, No 11. P. 4760-4770.
106. Selective adhesion of immature thymocytes to bone marrow stromal cells: relevance to T cell lymphopoiesis / M.Barda-Saad et al. *Experimental hematology*. 1996. Vol. 24, No 2. P. 386-391.
107. Mesenchymal stromal cells support the viability and differentiation of thymocytes through direct contact in autologous co-cultures / S.M.R. Azghadi et al. *Histochemistry and cell biology*. 2016. Vol. 146, No 2. P. 153-165.
108. Wnt4 and LAP2alpha as pacemakers of thymic epithelial senescence / K.Kvell et al. *PloS one*. 2010. Vol. 5, No 5. e10701.
109. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium / S.W.Rossi et al. *Nature*. 2006. Vol. 441, No 7096. P. 988-991.
110. Epithelial or mesenchymal: where to draw the line? / J.Chai et al. *Bioscience trends*. 2010. Vol. 4, No 3. P. 130-142.
111. Extrinsic and intrinsic mechanisms by which mesenchymal stem cells suppress the immune system / V.J.Coulson-Thomas et al. *The ocular surface*. 2016. Vol.14, No 2. P. 121-134.
112. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates inhibition of virus-specific CD8(+) T cell proliferation by human mesenchymal stromal cells / J.Hong et al. *Cytotherapy*. 2016. Vol. 18, No 5. P. 621-629. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.01.009.
113. Denton A.E., Linterman M.A. Stromal networking: cellular connections in the germinal centre. *Curr Opin Immunol*. 2017. Vol.45. P. 103-111. doi: 10.1016/j.coi.2017.03.001.
114. Human Placenta-Derived Mesenchymal Stromal-Like Cells Enhance Angiogenesis via T Cell-Dependent Reprogramming of Macrophage Differentiation / S.He et al. *Stem Cells*. 2017. Vol. 35, No 6. P. 1603-1613. doi: 10.1002/stem.2598.

115. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation / A.Galleu et al. *Sci Transl Med*. 2017. Vol. 9, No 416. pii: eaam7828. doi: 10.1126/scitranslmed.aam7828.
116. Li N., Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci*. 2017. Vol. 74, No 13. P. 2345-2360. doi: 10.1007/s00018-017-2473-5.
117. Pistoia V., Raffaghello L. Mesenchymal stromal cells and autoimmunity. *Int Immunol*. 2017. Vol. 29, No 2. P. 49-58. doi: 10.1093/intimm/dxx008.
118. Alexandre Y.O., Mueller S.N. Stromal cell networks coordinate immune response generation and maintenance. *Immunol Rev*. 2018. Vol. 283, No 1. P. 77-85. doi: 10.1111/imr.12641.
119. Wang M., Yuan Q., Xie L. Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem Cells Int*. 2018. Vol. 2018. Article ID 3057624. doi: 10.1155/2018/3057624.
120. Human Neonatal Thymus Mesenchymal Stem Cells Promote Neovascularization and Cardiac Regeneration / S.Wang et al. *Stem Cells Int*. 2018. Vol. 2018, Article ID 8503468. doi: 10.1155/2018/8503468.
121. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Физиологическая система соединительной ткани и онкогенез. I. Роль клеточных компонентов стромы в развитии опухоли. *Онкология*. 2016. Т. 18, № 1. С. 4–14.
122. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Физиологическая система соединительной ткани и онкогенез. II. Экстрацеллюлярный матрикс и метастазирование. *Онкология*. 2016. Т. 18, № 3. С. 164–176
123. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Физиологическая система соединительной ткани и онкогенез. III. Формирование резистентности к химиопрепаратам. *Онкология*. 2017. Т. 19, № 3. С. 156–170.
124. Comparison of the effects of 17 β - estradiol treated and untreated mesenchymal stem cells on ameliorating animal model of multiple sclerosis / Heidari Barchi Nezhad R. et al. *Iran J Basic Med Sci*. 2018. Vol.21, No 9. P. 936-942. doi: 10.22038/IJBMS.2018.29438.7115.

125. Characterisation of mesenchymal stem cells from patients with amyotrophic lateral sclerosis / N.Matejkova et al.. *J Clin Pathol*. 2018. Vol. 71, No 8. P. 735-742. doi: 10.1136/jclinpath-2017-204681.
126. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages / M.K.Majumdar et al. *Journal of hematotherapy & stem cell research*. 2000. Vol. 9, No 6. P. 841-848.
127. TGF- β family signaling in mesenchymal differentiation / I.Grafe et al. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2018. Vol. 10, No 5. P. a022202.
128. Studies on the role of IL-7 presentation by mesenchymal fibroblasts during early thymocyte development / C.M.Banwell et al. *European journal of immunology*. 2000. Vol. 30, No 8. P. 2125-2129.
129. Mesenchymal stem cells overexpressing IL-35 effectively inhibit CD4⁺ T cell function / N. Zhao et al. *Cellular immunology*. 2017. Vol. 312. P. 61-66.
130. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs / T.S.Chen et al. *Nucleic acids research*. 2009. Vol. 38, No 1. P. 215-224.
131. He L., Zhang H. MicroRNAs in the migration of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2019. Vol. 15, No 1. P. 3-12.
132. Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles: a role in hematopoietic transplantation? / L.De Luca et al. *International journal of molecular sciences*. 2017. Vol. 18, No 5. P. E1022. doi: 10.3390/ijms18051022.
133. Radosinska J., Bartekova M. Therapeutic potential of hematopoietic stem cell-derived exosomes in cardiovascular disease. *Exosomes in Cardiovascular Diseases*. 2017. No 998. P. 221-235. doi: 10.1007/978-981-10-4397-0_15.
134. MSC-derived extracellular vesicles attenuate immune responses in two autoimmune murine models: type 1 diabetes and uveoretinitis / T.Shigemoto-Kuroda et al. *Stem cell reports*. 2017. Vol. 8, No 5. P. 1214-1225. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.008.

135. Exosomal miR-146a Contributes to the Enhanced Therapeutic Efficacy of Interleukin-1 β -Primed Mesenchymal Stem Cells Against Sepsis / Y.Song et al. *Stem Cells*. 2017. Vol. 35, No 5. P. 1208-1221. doi: 10.1002/stem.2564.
136. Co-Culturing of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells with Autological and Allogenic Lymphocytes / N.M.Kapranov et al. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2018. Vol. 164, No 4. P. 446-452. doi: 10.1007/s10517-018-4009-x.
137. Extracellular vesicles: a new prospective in crosstalk between microenvironment and stem cells in hematological malignancies / I.Laurenzana et al. *Stem cells international*. 2018. Vol. 2018, Article ID 9863194. doi: 10.1155/2018/9863194.
138. Interaction between mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles and immune cells by distinct protein content / S.Mardpour et al. *Journal of cellular physiology*. 2019. Vol. 234, No 6. P. 8249-8258. doi: 10.1002/jcp.27669.
139. Mesenchymal Stromal Stem Cell-Derived Microvesicles Enhance Tumor Lysate Pulsed Dendritic Cell Stimulated Autologous T lymphocyte Cytotoxicity / Rahmani Kukia N et al. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2018. Vol. 19, No 7. P. 1895-1902.
140. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles: regenerative and immunomodulatory effects and potential applications in sepsis / G.Zheng et al. *Cell and tissue research*. 2018. Vol. 374, No 1. P. 1-15. doi: 10.1007/s00441-018-2871-5.
141. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex / K.Le Blanc et al. *Scandinavian journal of immunology*. 2003. Vol. 57, No 1. P. 11-20.
142. Annunziato F: Role of the IFN-g in the immunomodulatory activity of human mesenchymal stem cells / M. Krampera. *Stem Cells*. 2005. Vol. 24. P. 386–398.

143. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms / I.Rasmusson et al. *Experimental cell research*. 2005. Vol. 305, No 1. P. 33-41.
144. Crosstalk between mesenchymal stem cells and T regulatory cells is crucially important for the attenuation of acute liver injury / M.Gazdic et al. *Liver Transplantation*. 2018. Vol. 24, No 5. P. 687-702. doi: 10.1002/lt.25049.
145. Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005. Vol. 105, No 4. P. 1815-1822.
146. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche / L.Raffaghello et al. *Stem cells*. 2008. Vol. 26, No 1. P. 151-162.
147. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells / S.Glennie et al. *Blood*. 2005. Vol. 105, No 7. P. 2821-2827.
148. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle / R.Ramasamy et al. *Transplantation*. – 2007. Vol. 83, No 1. P. 71-76.
149. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism / F.Djouad et al. *Stem cells*. 2007. Vol. 25, No 8. P. 2025-2032.
150. Contact-dependent induction of regulatory antigen-presenting cells by human mesenchymal stem cells is mediated via STAT3 signaling / D.Gur-Wahnon et al. *Experimental hematology*. 2007. Vol. 35, No 3. P. 426-433.
151. Individual Differences of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Manifesting in during Interaction with Lymphocytes / N.M.Kapranov et al. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2018. Vol. 165, No 4. P. 584-588. doi: 10.1007/s10517-018-4218-3.
152. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells / S.A.Jacobs et al. *Immunology and cell biology*. 2013. Vol. 91, No 1. P. 32-39.

153. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression / E.Klyushnenkova et al. *Journal of biomedical science*. 2005. Vol. 12, No 1. P. 47-57.
154. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2, 3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation / R.Meisel et al. *Blood*. 2004. Vol. 103, No 12. P. 4619-4621.
155. Transforming Growth Factor- β Partially Reversed the Immunosuppressive Effect of Mesenchymal Stem Cells in Mice / J.Zhao et al. *Transplantation proceedings*. 2018. Vol. 50, No 10. P. 3851-3857.
156. Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins / M.Sioud et al. *International journal of oncology*. 2011. Vol. 38, No 2. P. 385-390.
157. Dokic J.M., Tomic S.Z., Colic M.J. Cross-talk between mesenchymal stem/stromal cells and dendritic cells. *Current stem cell research & therapy*. 2016. Vol. 11, No 1. P. 51-65.
158. Contact-dependent abrogation of bone marrow-derived plasmacytoid dendritic cell differentiation by murine mesenchymal stem cells / H.Hackstein et al. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016. Vol. 476, No 1. P. 15-20.
159. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells / K.Le Blanc et al. *The Lancet*. 2004. Vol. 363, No 9419. P. 1439-1441.
160. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice / M. Sudres et al. *The Journal of Immunology*. 2006. Vol. 176, No 12. P. 7761-7767.
161. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state / F.Benvenuto et al. *Stem cells*. 2007. Vol. 25, No 7. P. 1753-1760.
162. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells / M.K.Majumdar et al. *Journal of biomedical science*. 2003. Vol. 10, No 2. P. 228-241.

163. Added effects of dexamethasone and mesenchymal stem cells on early natural killer cell activation / C. M. Michelo et al. *Transplant immunology*. 2016. Vol. 37. P. 1-9.
164. Immune regulation by mesenchymal stem cells derived from adult spleen and thymus / M.Krampera et al. *Stem cells and development*. 2007. Vol. 16, No 5. P. 797-810.
165. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells / B.Puissant et al. *British journal of haematology*. 2005. Vol. 129, No 1. P. 118-129.
166. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells / S.Jones et al. *The Journal of Immunology*. 2007. Vol. 179, No 5. P. 2824-2831.
167. Interferon- γ -stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell / J.Stagg et al. *Blood*. 2006. Vol. 107, No 6. P. 2570-2577.
168. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation / G.M.Spaggiari et al. *Blood*. 2006. Vol. 107, No 4. P. 1484-1490.
169. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2, 3-dioxygenase and prostaglandin E2 / G.M.Spaggiari et al. *Blood*. 2008. Vol. 111, No 3. P. 1327-1333.
170. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF- β / S.A.Patel et al. *The Journal of Immunology*. 2010. Vol. 184, No 10. P. 5885-5894.
171. Mesenchymal stromal cells stimulate the proliferation and IL-22 production of group 3 innate lymphoid cells / van Hoeven V et al. *The Journal of Immunology*. 2018. Vol. 201, No 4. P. 1165-1173. doi: 10.4049/jimmunol.1700901.

172. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients / E.Traggiai et al. *Stem cells*. 2008. Vol. 26, No 2. P. 562-569.
173. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions / A. Corcione et al. *Blood*. 2006. Vol. 107, No 1. P. 367-372.
174. Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis / P.Amé-Thomas et al. *Blood*. 2007. Vol. 109, No 2. P. 693-702.
175. The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells / G.Xu et al. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007. Vol. 361, No 3. P. 745-750.
176. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway / A.Augello et al. *European journal of immunology*. 2005. Vol. 35, No 5. P. 1482-1490.
177. Identification of anti-inflammatory fractions of *Geranium wilfordii* using tumor necrosis factor-alpha as a drug target on Herbochip®—an array-based high throughput screening platform / M.Huang et al. *BMC complementary and alternative medicine*. 2015. Vol. 15, No 1. P. 146. doi: 10.1186/s12906-015-0665-9.
178. Mesenchymal stem cells engineered to express selectin ligands and IL-10 exert enhanced therapeutic efficacy in murine experimental autoimmune encephalomyelitis / W. Liao et al. *Biomaterials*. 2016. Vol. 77. P. 87-97.
179. Adipose-derived mesenchymal stem cells modulate the immune response in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis model / S.M.Shalaby et al. *IUBMB life*. 2016. Vol. 68, No 2. P. 106-115. doi: 10.1002/iub.1469.
180. Gilz-Activin A as a novel signaling axis orchestrating mesenchymal stem cell and Th17 cell interplay / P.Luz-Crawford et al. *Theranostics*. 2018. Vol. 8, No 3. P. 846-859.

181. Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation / R.Tatara et al. *Cytotherapy*. 2011. Vol. 13, No 6. P. 686-694.
182. Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune-and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials / L.T.Wang et al. *Journal of biomedical science*. 2016. Vol. 23, No 1. P. 76.
183. Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury by altering ratio between interleukin 17 producing and regulatory natural killer T cells / N.Milosavljevic et al. *Liver transplantation*. 2017. Vol. 23, No 8. P. 1040-1050.
184. Okamoto K. Regulation of bone by IL-17-producing T cells. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2017. Vol. 40, No 5. P. 361-366. doi: 10.2177/jsci.40.361.
185. Mesenchymal stem cells moderate immune response of type 1 diabetes / J.Xv et al. *Cell and tissue research*. 2017. Vol. 368, No 2. P. 239-248.
186. Toll-like receptors as a key regulator of mesenchymal stem cell function: an up-to-date review / S.Shirjang et al. *Cellular immunology*. 2017. Vol. 315. P. 1-10.
187. Migration ability and Toll-like receptor expression of human mesenchymal stem cells improves significantly after three-dimensional culture / P.Zhou et al. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017. Vol. 491, No 2. P. 323-328. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.07.102.
188. Effect of TNF- α inhibition on bone marrow-derived mesenchymal stem cells in neurological function recovery after spinal cord injury via the wnt signaling pathway in a rat model / R.J.Peng et al. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017. Vol. 42, No 2. P. 743-752.
189. Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation / M.Sioud et al. *Scandinavian journal of immunology*. 2010. Vol. 71, No 4. P. 267-274.
190. Adipose-derived mesenchymal stem cells modulate CD14⁺⁺ CD16⁺ expression on monocytes from sepsis patients in vitro via prostaglandin E2 / G.Qiu et al.

- Stem cell research & therapy*. 2017. Vol. 8, No 1. P. 97. doi: 10.1186/s13287-017-0546-x.
191. TNF α -activated mesenchymal stromal cells promote breast cancer metastasis by recruiting CXCR2⁺ neutrophils / P.F.Yu et al. *Oncogene*. 2017. Vol. 36, No 4. P. 482-490. doi: 10.1038/onc.2016.217.
 192. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype / R.S.Waterman et al. *PloS one*. 2010. Vol. 5, No 4. P. e10088.
 193. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile / J.Maggini et al. *PloS one*. 2010. Vol.5, No 2. P. e9252.
 194. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils / M.A.Cassatella et al. *Stem Cells*. 2011. Vol. 29, No 6. P. 1001-1011.
 195. Mesenchymal stem cells induce suppressive macrophages through phagocytosis in a mouse model of asthma / F.Braza et al. *Stem Cells*. 2016. Vol. 34, No 7. P. 1836-1845. doi: 10.1002/stem.2344.
 196. Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by metabolic reprogramming / S.Selleri et al. *Oncotarget*. 2016. Vol.7, No 21.P. 30193-30210. doi: 10.18632/oncotarget.8623.
 197. Macrophage-Associated Osteoactivin/GPNMB Mediates Mesenchymal Stem Cell Survival, Proliferation, and Migration Via a CD44-Dependent Mechanism / B.Yu et al. *Journal of cellular biochemistry*. 2016. Vol. 117, No 7. P. 1511-1521. doi: 10.1002/jcb.25394.
 198. Carty F., Mahon B.P., English K. The influence of macrophages on mesenchymal stromal cell therapy: Passive or aggressive agents? *Article in Clinical & Experimental Immunology*. 2017. Vol. 188, No 1. P. 1-11. doi: 10.1111/cei.12929.

199. Luz-Crawford P., Jorgensen C., Djouad F. Mesenchymal stem cells direct the immunological fate of macrophages. *Macrophages*. 2017. Vol. 62. P. 61-72. doi: 10.1007/978-3-319-54090-0_4.
200. Effects of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells on polarization of peritoneal macrophages in rats with sepsis / Y.H.Zheng et al. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2017. Vol. 33, No 4. P. 217-223. doi: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2017.04.006.
201. Adipose-derived stem cells ameliorate colitis by suppression of inflammasome formation and regulation of M1-macrophage population through prostaglandin E2 / H.J.Park et al. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018. Vol. 498, No 4. P. 988-995. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.096.
202. Mesenchymal stromal cells enhance the engraftment of hematopoietic stem cells in an autologous mouse transplantation model / M.Fernández-García et al. *Stem cell research & therapy*. 2015. Vol. 6, No 1. P. 165. doi: 10.1186/s13287-015-0155-5
203. Immunomodulatory properties of human placental mesenchymal smel/stromal cells / M.H.Abumaree et al. *Placenta*. 2017. Vol. 59. P. 87-95. doi: 10.1016/j.placenta.2017.04.003.
204. Нікольський І.С., Нікольська К.І. Гемопоезтичні стоволові клітини в лікуванні сахарного діабета. *Імунологія та алергологія*. 2006. № 3. С. 19-22.
205. Коляденко В.Г., Никольська Е.І. Гемопоезтичні стоволові клітини і атопічний дерматит. *Український журнал дерматології, венерології, косметології*. 2007. № 2. С. 5-7.
206. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Кожем'якін Ю.М. та ін. Київ: Авіцена; 2002. 179 с.
207. Гемопоезтичні клітини ембріональної печінки / Грищенко В.І. і др. Київ: Наук, думка, 1988. 192 с.
208. Жизнеспособность клеток эмбриональной печени человека различного фенотипа после криоконсервирования / Тарасов А.И. и др. *Проблемы криобиологии*. 2002. № 3. С. 36–41.

209. Prockop D.J., Phinney D. G., Bunnell B. A. Mesenchymal stem cells: methods and protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. 192 p.
210. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство; пер. 5-го англ. изд. Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2010. 691 с.
211. Current protocols in immunology / J.E.Coligan et al. N.Y.: John Wiley and Sons, 2003. P. 4.1.1–4.1.5.
212. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983. Vol. 65, No 1-2. P. 55–63.
213. Ho M., Enders J.F. An inhibitor of viral activity appearing in infected cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1959. Vol. 45, No 3. P. 385-9.
214. Stewart W.E. Interferon systems. Vienna, New York: Springer. 1979, 421p.
215. Иммунологические методы / под ред. Г. Фримеля. Москва : Мир, 1987. 472с.
216. Гржибовский А.М. Сравнение количественных данных двух независимых выборок с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS: параметрические и непараметрические критерии. *Наука и здравоохранение*. 2016. № 2. С. 5-28.
217. Гржибовский А.М., Иванов С.В., Горбатова М.А. Анализ номинальных и ранговых переменных данных с использованием программного обеспечения STATISTICA и SPSS. *Наука и здравоохранение*. 2016. № 6. С. 5-39
218. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных: применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: Медиа Сфера, 2002. 312 с.
219. Immune modulation by mesenchymal stem cells / F.Bifari et al. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2008. Vol. 35, No 3. P. 194-204.
220. Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow,

- spleen, thymus and aorta wall / B.Hegy et al. *International immunology*. 2010. Vol. 22, No 7. P. 551-559.
221. Label retention identifies a multipotent mesenchymal stem cell-like population in the postnatal thymus / M.Osada et al. *PloS one*. 2013. Vol. 8, No 12. P. e83024.
222. Effect of cryopreservation on human adipose tissue and isolated stromal vascular fraction cells: in vitro and in vivo analyses / F.Zanata et al. *Plastic and reconstructive surgery*. 2018. Vol 141, No 2. P. 232e-243e. doi: 10.1097/PRS.0000000000004030.
223. Cryopreserved mesenchymal stromal cells are susceptible to T-cell mediated apoptosis which is partly rescued by IFN γ licensing / R.Chinnadurai et al. *Stem Cells*. 2016. Vol. 34, No 9. P. 2429-2442.
224. Transient isolation and autologous Transplantation of Bone Marrow Mitigates radiation-induced hematopoietic syndrome and Mortality in Mice / S.Ghosh et al. *Frontiers in immunology*. 2017. Vol. 8. P. 1180.
225. Колониеобразующая активность фибробластоподобных клеток-предшественников из эмбриональной печени человека в условиях in vitro / Грищенко В.И. и др. *Доповіди НАН України*. 2005. № 2. С. 128-141.
226. Скоробогатова Н.Г., Волкова Н.А., Петренко А.Ю. Остеогенные и адипогенные свойства фибробластоподобных клеток-предшественников фетальной печени человека. *Цитология*. 2008. № 4. С. 317-322.
227. Nikolska K. I. Peculiarities of culture and in vitro contact interaction of cryopreserved thymic multipotent stromal cells and hemopoietic cells. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018. Vol. 28, No 1. P. 5–13.
228. Нікольська В.В., Нікольська К.І. Колонієутворення стромальними клітинами тимусу // Матеріали X Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 2008 р.). *Імунологія та алергологія*. 2008. № 2. С.140.
229. Никольская Е.И. Мембранное взаимодействие ex vivo мультипотентных

- стромальных и гемопоэтических клеток // Сучасні питання клінічної та лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (Київ, Україна, 12–13 квітня 2011 р.). *Імунологія та алергологія*. 2011. № 4. С. 100–101.
230. Нікольський І.С., Нікольська В.В., Зубов Д.О., Нікольська К.І., Савінова В.О., Малишева О.О. Спосіб одержання фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР), як модельного аналогу тимічної ніши *ex vivo* // Пат. 80076 Україна, МПК C12N 5/00; Заявлено 04.12.2012; Дата публ. 13.05.2013, Бюл. № 9.
231. Effects of low-to-moderate doses of gamma radiation on mouse hematopoietic system / X.H.Li et al. *Radiation research*. 2018. Vol. 190, No 6. P. 612-622. doi: 10.1667/RR15087.1.
232. Потенціювання направленого остеогенного диференціювання мультипотентних стромальних клітин тимусу попереднім співкультивуванням з тимоцитами / І.С.Нікольський та ін. *Клітинна та органа трансплантологія*. 2016. Вип. 4 (2). С. 216-219
233. Межклеточные взаимодействия в иммунокомпетентной сфере при ревматоидном артрите после применения гемопоэтических клеток эмбриональной печени / А.Н.Гольцев и др. *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2003. Вип. 3. С. 45-53.
234. Lawrence S.M., Corriden R., Nizet V. The ontogeny of a neutrophil: mechanisms of granulopoiesis and homeostasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2018. Vol. 82, No 1. P. e00057-17.
235. Improving hematopoietic recovery through modeling and modulation of the mesenchymal stromal cell secretome / F.D.Liu et al. *Stem cell research & therapy*. 2018. Vol. 9, No 1. P. 268. doi: 10.1186/s13287-018-0982-2.
236. Extrathymic maturation of alpha beta T cells from hemopoietic stem cells / S Dejbakhsh-Jones et al. *The Journal of Immunology*. 1995. Vol. 155, No 7. P. 3338-3344.

237. Mesenchymal cells are required for functional development of thymic epithelial cells / M.Itoi et al. *International immunology*. 2007. Vol. 19, No 8. P. 953-964.
238. PDGFR α -expressing mesenchyme regulates thymus growth and the availability of intrathymic niches / W.E.Jenkinson et al. *Blood*. 2007. Vol. 109, No 3. P. 954-960.
239. Evidence for migration of donor bone marrow stromal cells into recipient thymus after bone marrow transplantation plus bone grafts: a role of stromal cells in positive selection / Y.Li et al. *Experimental hematology*. 2000. Vol. 28, No 8. P. 950-960.
240. Total body irradiation tremendously impair the proliferation, differentiation and chromosomal integrity of bone marrow-derived mesenchymal stromal stem cells / W.J.Lo et al. *Annals of hematology*. 2018. Vol. 97, No 4. P. 697-707. doi: 10.1007/s00277-018-3231-y.
241. Mesenchymal Stromal Cell Irradiation Interferes with the Adipogenic/Osteogenic Differentiation Balance and Improves Their Hematopoietic-Supporting Ability / S.Preciado et al. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2018. Vol 24, No 3. P. 443-451. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.11.007.
242. Irradiation alters the differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells / Y.Wang et al. *Molecular medicine reports*. 2016. Vol. 13, No 1. P. 213-223.
243. Non-invasive, quantitative assessment of the morphology of γ -irradiated human mesenchymal stem cells and periosteal cells using digital holographic microscopy / T.Kawase et al. *International journal of radiation biology*. 2016. Vol. 92, No 12. P. 796-805.
244. The radiation resistance of human multipotent mesenchymal stromal cells is independent of their tissue of origin / A.Rühle et al. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2018. Vol. 100, No 5. P. 1259-1269.
245. Никольский И.С., Никольская В.В., Савинова В.О. Влияние внутривенного введения мультипотентных стромальных клеток тимуса на иммунный ответ.

Вестник Уральской медицинской академической науки. 2012. № 4. С. 55-56.

246. Alcayaga-Miranda F., Cuenca J., Khoury M. Antimicrobial activity of mesenchymal stem cells: current status and new perspectives of antimicrobial peptide-based therapies. *Frontiers in immunology*. 2017. Vol. 8. P. 339. doi: 10.3389/fimmu.2017.00339.
247. Keane C., Jerkic M., Laffey J.G. Stem Cell-based Therapies for Sepsis. *Anesthesiology*. 2017. Vol. 127, No 6. P. 1017-1034. doi: 10.1097/ALN.0000000000001882.
248. An in vitro potency assay for monitoring the immunomodulatory potential of stromal cell-derived extracellular vesicles / K.Pachler et al. *International journal of molecular sciences*. 2017. Vol. 18, No 7. P. 1413. doi: 10.3390/ijms18071413.
249. Thomas J. G. et al. Ionizing radiation augments glioma tropism of mesenchymal stem cells / J.G.Thomas et al. *Journal of neurosurgery*. 2018. Vol. 128, No 1. P. 287-295.
250. Cheung T.S, Dazzi F. Mesenchymal-myeloid interaction in the regulation of immunity. *Semin Immunol*. 2018. Vol. 35. P. 59-68. doi: 10.1016/j.smim.2018.01.002.
251. Efficacy of human umbilical cord derived-mesenchymal stem cells in treatment of rat bone marrow exposed to gamma irradiation / H.S.E.Mousa et al. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 2017. Vol. 210. P. 64-75. doi: 10.1016/j.aanat.2016.12.002.
252. сравнительная характеристика влияния мультипотентных стромальных клеток костного мозга на развитие острого и пролонгированного стресса / И.С.Никольский и др. *Актуальные вопросы трансплантации стволовых клеток: сборник материалов I Евразийского конгресса «Трансплантация стволовых клеток»* (Минск, 25-27 сентября 2013 г.). Минск, 2013. С.111-113.

253. Roles of mesenchymal stem cells in tissue regeneration and immunomodulation / A.P.Ayala-Cuellar et al. *Biomolecules & therapeutics*. 2019. Vol. 27, No 1. P. 25. doi: 10.4062/biomolther.2017.260.
254. The conditioned medium of human mesenchymal stromal cells reduces irradiation-induced damage in cardiac fibroblast cells / Z.Y.Chen et al. *Journal of radiation research*. 2018. Vol. 59, No 5. P. 555-564. doi: 10.1093/jrr/rry048.
255. Ichim T.E., O’Heeron P., Kesari S. Fibroblasts as a practical alternative to mesenchymal stem cells. *Journal of translational medicine*. 2018. Vol. 16, No 1. P. 212. doi: 10.1186/s12967-018-1536-1.
256. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells prevents radiation-induced artery injury by suppressing oxidative stress and inflammation / Y.Shen et al. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018. Vol. 2018, Article ID 5942916 doi: 10.1155/2018/5942916. eCollection 2018.
257. Mesenchymal stem cell-based therapy for radiation-induced lung injury / T.Xu et al. *Stem cell research & therapy*. 2018. Vol. 9, No 1. P. 18. doi: 10.1186/s13287-018-0776-6.
258. McGrath K., Palis J. Ontogeny of erythropoiesis in the mammalian embryo. *Current topics in developmental biology*. 2008. Vol. 82. P. 1-22.
259. Orkin S.H., Zon L.I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008. Vol. 132, No 4. P. 631-44. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.025.
260. Hollands P. Differentiation and grafting of haemopoietic stem cells from early postimplantation mouse embryos. *Development*. 1987. Vol. 99. P. 69-76.
261. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow / C.Campagnoli. *Blood*. 2001. Vol. 98. P. 2396–2402.
262. Koller M., Palsson B., Masters J. Human Cell Culture Vol. IV: Primary hematopoietic cells / Ed. by M. Koller, B. Palsson, J. Masters. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002. 349 p.

263. Evidence of alloreactive T lymphocytes in fetal liver: implications for fetal hematopoietic stem cell transplantation / M.C.Renda et al. *Bone marrow transplantation*. 2000. Vol. 25, No 2. P. 135-141.
264. Kikuchi K., Kondo M. Developmental switch of mouse hematopoietic stem cells from fetal to adult type occurs in bone marrow after birth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. Vol. 103, No 47. P. 17852-17857.
265. Влияние криоконсервирования на иммунологическую активность и фенотипический состав лимфоидных клеток эмбриональной печени человека / Петренко Ю.А. и др. *Проблемы криобиологии*. 2002. № 4. С. 76-79.
266. Базыка Д.А., Беляева Н.В., Лукаш Л.Л. Экспрессия мембранных антигенов нативных и криоконсервированных эмбриональных клеток-предшественников. *Лікарська справа*. 2006. № 1/2. С. 61-65.
267. Kim I., Yilmaz O.H., Morrison S.J. CD144 (VE-cadherin) is transiently expressed by fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood*. 2005. Vol. 106, No 3. P. 903-905.
268. Phenotypic and Functional Evidence for the Expression of CD4 by Hematopoietic Stem Cells Isolated From Human Fetal Liver / Marcus O. et al. *Blood*. 1997. Vol. 89, No 4. P. 1364-1375.
269. Фенотипическая гетерогенность популяции гемопоэтических прогениторных клеток ткани плаценты: сравнительный анализ с пуповинной кровью и фетальной печенью / М.Д.Кучма и др. *Клітинна та органна трансплантологія*. 2013. Т. 1, № 1. С. 66-69.
270. Криворучко Н.А. Основные свойства и перспективы применения фетальных стволовых клеток. *Клиническая медицина Казахстана*. 2012. № 2 (25). С.133-136.
271. Allogenic fetal liver cells have a distinct competitive engraftment advantage over adult bone marrow cells when infused into fetal as compared with adult severe combined immunodeficient recipients / P.A.Taylor et al. *Blood*. 2002. Vol. 99, No 5. P. 1870-1872.

272. Molecular evidence that in situ-transduced fetal liver hematopoietic stem/progenitor cells give rise to medullary hematopoiesis in adult rats / D.W.Clapp et al. *Blood*. 1995. Vol. 86, No 6. P. 2113-2122.
273. Lim F.T., Kanhai H.H., Falkenburg J.H. Characterization of the human CD34⁺ hematopoietic progenitor cell compartment during the second trimester of pregnancy. *Haematologica*. 2005. Vol. 90, No 2. P. 173-179.
274. Zhao J., Hao H. N., Lyman W.D. Cryopreserved fetal human liver hematopoietic progenitor cells for repopulating immune-deficient mouse bone marrow. *The Israel Medical Association journal: IMAJ*. 2002. Vol. 4, No 11. P. 989-991.
275. Quantitative aspects of fetal liver cell transplantation in animals and man / Löwenberg B. et al. *Transplantation proceedings*. 1976. Vol. 8, No 4. P. 527-532.
276. Bortin M.M., Saltzstein E.C. Graft versus host inhibition: fetal liver and thymus cells to minimize secondary disease. *Science*. 1969. Vol. 164, No 3877. P. 316-318.
277. Портер К.А. Судьба кожных трансплантатов в организме облученных кроликов после пересадки аллогенной кроветворной ткани взрослого или плода. *Диагностика и лечение острых лучевых поражений*. Женева: ВОЗ, 1962. С. 339-347.
278. Champlin R.E., Stitzel K.A., Gale R.P. Fetal liver cell transplantation (FLCT) in dogs. *Experimental hematology*. 1982. Vol. 10, No 11. P. 31.
279. Morrison S.J., Uchida N., Weissman I.L. The biology of hematopoietic stem cells. *Annual review of cell and developmental biology*. 1995. Vol. 11, No 1. P. 35-71.
280. Торубарова Н.А., Кошель И.В., Яцык Г. В. Кроветворение плода и новорожденного. Москва: Медицина, 1993. 208 с.
281. O'Donoghue K., Fisk N.M. Fetal stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2004. Vol. 18, No 6. P. 853-875.

282. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / M.F.Pittenger et al. *Science*. 1999. Vol. 284. P. 143–147.
283. Intrinsic and extrinsic regulation of mammalian hematopoiesis in the fetal liver / A.Swain et al. *Histology and histopathology*. 2014. Vol. 29, No 9. P. 1077-1082.
284. Evaluating Interaction of Cord Blood Hematopoietic Stem/Progenitor Cells with Functionally Integrated Three-Dimensional Microenvironments / S.Mokhtari et al. *Stem cells translational medicine*. 2018. Vol. 7, No 3. P. 271-282. doi: 10.1002/sctm.17-0157.
285. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study / K.Le Blanc et al. *The Lancet*. 2008. Vol. 371, No 9624. P. 1579-1586.
286. Pappa K.I., Anagnou N.P. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen. Med*. 2009. Vol. 4. P. 423–433
287. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering / P.V. Guillot et al. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2007. Vol. 11, No 5. P. 935-944.
288. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC / P.V.Guillot et al. *Stem cells*. 2007. Vol. 25, No 3. P. 646-654.
289. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells / C.Götherström et al. *Gynecol*. 2004. Vol. 190. P. 239-245.
290. Martin M.A., Bhatia M. Analysis of the human fetal liver hematopoietic microenvironment . *Stem cells and development*. 2005. Vol. 14, No 5. P. 493-504.
291. Miyauchi J., Kawaguchi H. Fetal Liver Stromal Cells Support Blast Growth in Transient Abnormal Myelopoiesis in Down Syndrome Through GM-CSF. *Journal of cellular biochemistry*. 2014. Vol. 115, No 6. P. 1176-1186.
292. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow / X.Wang et al. *Stem cells*. 2006. Vol. 24, No 3. P. 482-493.

293. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages / Y.Y.Dan et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. Vol. 103, No 26. P. 9912-9917.
294. Characterization of a Fetal Liver Cell Population Endowed with Long-Term Multiorgan Endothelial Reconstitution Potential / A.Cañete et al. *Stem Cells*. 2017. Vol.35, No 2.P. 507-521.
295. Петренко Ю.Л. Иммунорегуляторные свойства клеток фетальной печени человека. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2007. Т. 2, № 3. С. 57-61.
296. Дьомін Ю.А., Попов М.М., Романова О.А. Особливості імунної реакції реципієнта на кріоконсервований трансплантат фетальних клітин *Клін. фармація*. 2001. № 4. С. 29-32.
297. Применение клеток фетальной печени как один из возможных путей модификации иммунореактивности кріоконсервированного алломиелотрансплантата / А.Н.Гольцев и др. *Трансплантология*. 2007. Т. 9, № 1. С. 25-27.
298. Кріоконсервированный аллогенный костный мозг — новая мишень иммуномодулирующей активности клеток фетальной печени / А.Н.Гольцев и др. *Проблемы кріобиологии*. 2008. Т. 18, № 3. С. 313-315.
299. Flomerfelt F.A., Gress R.E. Bone Marrow and Fetal Liver Radiation Chimeras. *T-Cell Development*. New York, Humana Press. 2016. P. 109-115.
300. Никольский И.С., Никольская В.В., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Зубов Д.А., Никольская Е.И. Радиозащитное действие мультипотентных стромальных клеток тимуса. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2009. № 2/1 (24). С. 284-285.
301. Никольская Е.И., Тарануха Л.И., Никольская В.В., Галицкая С.Н., Никольский И.С. Сравнительная характеристика активности различных типов гемопоэтических и мультипотентных стромальных клеток в купировании костно-мозгового синдрома у летально облученных мышей.

- Российский иммунологический журнал*. 2014. Т. 8 (17), № 3. С. 354-356.
302. Nikolska K. I. The effects of the transplantation of thymus-derived multipotent stromal cells on the immune system and survival of lethally irradiated mice. *Cell and Organ Transplantation*. 2018. Vol. 6, No 2. P. 158-163.
303. Nikolska K. I. Impact of transplantation of cryopreserved and preincubated with thymic multipotent stromal cells of hemopoietic stem cells on lethally irradiated mice survival. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2019. Vol. 29, No 2. P. 115–124
304. Никольский И.С., Никольская В.В., Федорчук А.Г., Никольская Е.И., Марущенко Ю.Л. Радиозащитное действие криоконсервированных клеток эмбриональной печени в сингенной и ксеногенной комбинациях // Матеріали ІХ Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 25-26 квітня 2007 р.). *Імунологія та алергологія*. 2007. № 3. С.97–98.
305. Никольский И.С., Никольская В.В., Федорчук А.Г., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Никольская Е.И., Зубов Д.А., Лисица Н.А., Семенова Я.-М.А. Влияние преинкубированных с мультипотентными стромальными клетками тимуса сингенных клеток эмбриональной печени на иммунную систему летально облученных мышей // Матеріали ХІ Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 2009 р.). *Імунологія та алергологія*. 2009. № 2-3. С.145.
306. Никольский И.С., Никольская В.В., Зубов Д.А., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Никольская Е.И., Лисица Н.А., Семенова Я.-М.А., Федорчук А.Г. Регенерация иммунной системы облученных животных при трансплантации сингенных клеток эмбриональной печени, стимулированных контактом с мультипотентными стромальными клетками тимуса // Сучасні теорія та практика клінічної імунології та алергології: матеріали ХІІ Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та

- імунореабілітації(Київ, Україна, 2010 р.). *Імунологія та алергологія*. 2010. № 1. С.163.
307. Никольский И.С., Никольская В.В., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Никольская Е.И., Zubov D.A., Лисица Н.А., Семенова Я.-М., Федорчук А.Г., Сорокин Г.К. Повышение эффективности сингенных клеток эмбриональной печени в регенерации иммунной системы летально облученных мышей в результате контактного взаимодействия этих клеток и мультипотентных стромальных клеток тимуса // Материалы VI Съезда по радиационным исследованиям (Москва, Россия, 25–28 октября 2010 г.). Москва: изд-во Рос. ун-та Друж. Народов, 2010. Т. 1. С. 94.
308. Никольский И.С., Никольская В.В., Савинова В.О., Никольская Е.И., Тарануха Л.И., Семенова Я.-М.А., Кубицкая А.О. Иммуномодулирующая активность мультипотентных стромальных клеток тимуса // МатеріалиXIII Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 26-27 квітня 2012 р.). *Імунологія та алергологія*. 2012. Дод.1. С.45-46.
309. Nikolskaya K., Zubov D., Taranukha L., Vasyliiev R., Semenova Y.-M. Immune system regeneration with fetal liver cells stimulated by contact with thymic multipotent stromal cells in irradiated mice // Stem Cells and Clinical Application: poster presentations 7th Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research associated with Fraunhofer Life Science Symposium(Leipzig, Germany, 29-30 November 2012). Leipzig, 2012. P. 74.
310. Никольская Е.И. Повышение продолжительности жизни летально облученных мышей под влиянием мультипотентных стромальных клеток тимуса // Актуальні проблеми регенеративної медицини: матеріалинауково-практичної конференції з міжнародною участю(Київ, Україна,4–5 жовтня 2012 р.). *Журнал Національної Академії медичних наук України*. 2012. Т.18, додаток. С.107-108.
311. Никольская Е.И., Тарануха Л.И., Никольская В.В., Семенова Я.-М.А., Никольский И.С. Характеристика активности различных типов

мультипотентных клеток в лечении пострадиационного костно-мозгового синдрома у мышей // Трансплантація – сьогодні, минуле та майбутнє: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (Київ, Україна, 7 листопада 2014 р.). Київ, 2014. С.32.

312. Нікольська К.І. Потенціювання імунорегенеративної і радіозахисної активності гемопоетичних клітин-попередників контактом з мультипотентними стромальними клітинами тимусу // Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (Київ, Україна, 9–10 листопада 2017 р.). *Клітинна та органна трансплантологія*. 2017. Т.5, № 2. С. 254.
313. Нікольський І.С., Нікольська В.В., Зубов Д.О., Тарануха Л.І., Галицька С.М., Нікольська К.І., Федорчук О.Г. Спосіб підвищення радіорезистентності організму // Пат. 49204 Україна, МПК А61К 35/26; Заявлено 06.10.2009; Дата публ. 26.04.2010, Бюл. № 8.
314. Ярилин А.А., Полушкина Э.Ф., Анохин Ю.Н. Различие механизмов радиационного подавления тимусзависимого иммунного ответа в селезенке и лимфатических узлах. *Иммунология*. 1981. Т. 2, № 2. С. 25-30.
315. Bronte V. The mesenchymal and myeloid regulation of immunity: Power is nothing without control. *Seminars in immunology*. 2018. No 35. P. 1-2.
316. Honeychurch J., Illidge T.M. The influence of radiation in the context of developing combination immunotherapies in cancer. *Therapeutic advances in vaccines and immunotherapy*. 2017. Vol. 5, No 6. P. 115-122.
317. Campbell A.M., Decker R.H. Harnessing the immunomodulatory effects of radiation therap. *Oncology*. 2018. Vol. 32, No 7. P. 370-374.
318. Radiation effects on antitumor immune responses: current perspectives and challenges / T.Walle et al. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2018. Vol. 10. P. 1758834017742575.
319. Myelopoiesis in the context of innate immunity / I.Mitroulis et al. *Journal of innate immunity*. 2018. Vol. 10, No 5-6. P. 365-372.

320. Effect of efferocytosis of apoptotic mesenchymal stem cells (MSCs) on C57BL/6 peritoneal macrophages function / Ghahremani Piraghaj M et al. *Life sciences*. 2018. Vol. 212. P. 203-212.
321. Comparative long-term effects of interferon α and hydroxyurea on human hematopoietic progenitor cells / K.Y.King et al. *Experimental hematology*. 2015. Vol. 43, No 10. P. 912-918. e2.
322. B7-H1-mediated immunosuppressive properties in human mesenchymal stem cells are mediated by STAT-1 and not PI3K/Akt signaling / I.K. Jang et al. *Molecular medicine reports*. 2018. Vol. 18, No 2. P. 1842-1848.
323. Изменение свойств мультипотентных мезенхимных стромальных клеток под действием интерферона-гамма / Н. А. Петинати и др. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017. Т. 163, № 2. С. 194-199.
324. Suppression of IL-10 production by activated B cells via a cell contact-dependent cyclooxygenase-2 pathway upregulated in IFN- γ -treated mesenchymal stem cells / B.Hermankova et al. *Immunobiology*. 2016. Vol. 221, No 2. P. 129-136. doi: 10.1016/j.imbio.2015.09.017.
325. Lymphocyte–stromal cell interaction induces IL-7 expression by interferon regulatory factors / M.Sekai et al. *Molecular immunology*. 2013. Vol. 54, No 3-4. P. 378-385. doi: 10.1016/j.molimm.2013.01.002.
326. Increased tumor necrosis factor alpha mRNA after cellular exposure to ionizing radiation / D.E.Hallahan et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989. Vol. 86, No 24. P. 10104-10107.
327. Granulocyte-derived TNF α promotes vascular and hematopoietic regeneration in the bone marrow / E.Bowers et al. *Nature medicine*. 2018. Vol. 24, No 1. P. 95-102. doi: 10.1038/nm.4448.
328. The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus / D.Wang et al. *Cellular & molecular immunology*. 2017. Vol. 14, No 5. P. 423-431. doi: 10.1038/cmi.2015.89.

329. Mouse serum protects against total body irradiation-induced hematopoietic system injury by improving the systemic environment after radiation / J.Zhang et al. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019. Vol. 131. P. 382-392. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.021.
330. Mesenchymal stem cells and immune disorders: from basic science to clinical transition / S.Wang et al. *Frontiers of medicine*. 2019. Vol. 13, No 2. P. 138-151.
331. Kalmykova N.V., Alexandrova S.A. Therapeutic Effects of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells after Irradiation. *Radiatsionnaia biologiya, radioecologiya*. 2016. Vol. 56, No 2. P. 117-137.
332. Irradiation of mesenchymal stromal cells with low and high doses of alpha particles induces senescence and/or apoptosis / N.Alessio et al. *Journal of cellular biochemistry*. 2017. Vol. 118, No 9. P. 2993-3002.
333. Sublethal total body irradiation causes long-term deficits in thymus function by reducing lymphoid progenitors / S.Xiao et al. *The Journal of Immunology*. – 2017. Vol. 199, No 8. P. 2701-2712.
334. Kulkarni S., Wang T.C., Guha C. Stromal progenitor cells in mitigation of non-hematopoietic radiation injuries. *Current pathobiology reports*. 2016. Vol. 4, No 4. P. 221-230. doi: 10.1007/s40139-016-0114-6.
335. Distant mesenchymal progenitors contribute to skin wound healing and produce collagen: evidence from a murine fetal microchimerism model / E.Seppanen et al. *PLoS One*. 2013. Vol. 8, No 5. P. e62662. doi: 10.1371/journal.pone.0062662.
336. Treatment of radiation-induced acute intestinal injury with bone marrow-derived mesenchymal stem cells / K.Zheng et al. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016. Vol. 11, No 6. P. 2425-2431.
337. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles provide long-term survival after total body irradiation without additional hematopoietic stem cell support / J.S.Schoefinius et al. *Stem Cells*. 2017. Vol. 35, No 12. P. 2379-2389. doi: 10.1002/stem.2716.

338. Extracellular vesicles of stromal origin target and support hematopoietic stem and progenitor cells / G.Stik et al. *J Cell Biol.* 2017. Vol. 216, No 7. P. 2217-2230. doi: 10.1083/jcb.201601109.
339. Attenuated DNA damage responses and increased apoptosis characterize human hematopoietic stem cells exposed to irradiation / S.Biechonski et al. *Scientific reports.* 2018. Vol. 8, No 1. P. 6071. doi: 10.1038/s41598-018-24440-w.
340. Effects of acute exposure to low-dose radiation on the characteristics of human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells / A.Fujishiro et al. *Inflamm Regen.* 2017. Vol.37. P. 19. doi: 10.1186/s41232-017-0049-2.
341. Никольский И.С., Никольская В.В., Зубов Д.А., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Никольская Е.И. Восстановление иммунной системы облученных животных сингенными клетками эмбриональной печени, стимулированными контактом с мультипотентными стромальными клетками тимуса. *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2010. № 2/1 (29). С. 61-62.
342. Нікольська К.І., Бутенко Г.М. Корекція кістковомозкового синдрому у опромінених мишей трансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин. *Фізіологічний журнал.* 2019. Т.65, № 1. С.3-14.
343. Никольский И.С., Никольская В.В., Савинова В.О., Тарануха Л.И., Семенова Я.-М.А., Никольская Е.И., Чех Д.Л. Иммунобиологическая активность трансплантатов гемопоэтических и мультипотентных стромальных клеток тимуса // Актуальные вопросы трансплантации стволовых клеток: материалы I Евразийского конгресса «Трансплантация стволовых клеток» (Минск, Беларусь, 25–27 сентября 2013 г.). Минск, 2013. С. 109-111.
344. Porada C.D., Atala A.J., Almeida-Porada G. The hematopoietic system in the context of regenerative medicine. *Methods.* 2016. Vol. 99. P. 44-61. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.08.015.
345. Kyewski B.A., Rouse R.V., Kaplan H.S. Thymocyte rosettes: multicellular complexes of lymphocytes and bone marrow-derived stromal cells in the mouse

- thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982. Vol. 79, No 18. P. 5646-5650.
346. Kyewski B.A., Momburg F., Schirmacher V. Phenotype of stromal cell-associated thymocytes in situ is compatible with selection of the T cell repertoire at an "immature" stage of thymic T cell differentiation. *J Immunol*. 1987. Vol. 139, No 7. P. 961-967.
347. Nature of the thymocytes associated with dendritic cells and macrophages in thymic rosettes / K.Shortman et al. *Cell Immunol*. 1989. Vol. 119, No 1. P. 85-100.
348. Shortman K., Vremec D. Different subpopulations of developing thymocytes are associated with adherent (macrophage) or nonadherent (dendritic) thymic rosettes. *ev Immunol*. 1991. Vol. 1, No 3. P. 225-235.
349. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors / W.Wagner et al. *Stem Cells*. 2007. No 10. P.2638-2647.
350. Fibroblast dependency during early thymocyte development maps to the CD25⁺ CD44⁺ stage and involves interactions with fibroblast matrix molecules / G.Anderson et al. *Eur J Immunol*. 1997. Vol. 27, No 5. P. 1200-1206.
351. Anderson G., Jenkinson E.J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol*. 2001. Vol. 1, No 1. P. 31-40.
352. Jenkinson W.E., Jenkinson E.J., Anderson G. Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. *J Exp Med*. 2003. Vol. 198, No 2. P. 325-332.
353. Jones B.J., McTaggart J. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: From culture to clinic. *Exp. Hematol*. 2008. Vol. 36. P. 733.
354. Строма костного мозга больных, подвергшихся действию радиационных факторов после аварии на Чернобыльской АЭС / В.С.Астахова и др. *Имунологія та алергологія*. 1998. № 3. С. 38-44.

355. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Features in Patients with a History of Head and Neck Radiation / S.San-Marina et al. *Laryngoscope Investig Otolaryngol.* 2016. Vol. 1, No 3. P. 36-41.
356. Orun O., Tiber P.M., Serakinci N. Partial knockdown of TRF2 increase radiosensitivity of human mesenchymal stem cells. *Int J Biol Macromol.* 2016. No 90. P. 53-58. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.072.
357. Serial changes in the proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells after ionizing radiation / W.Jeong et al. *Stem Cell Res Ther.* 2016. Vol. 7, No 1. P. 117. doi: 10.1186/s13287-016-0378-0.
358. Long-Term Engraftment of Primary Bone Marrow Stromal Cells Repairs Niche Damage and Improves Hematopoietic Stem Cell Transplantation / Abbuehl J.P. et al. *Cell Stem Cell.* 2017. Vol. 21, No 2. P. 241-255.e6. doi: 10.1016/j.stem.2017.07.004.
359. Chen J., Astle C.M., Harrison D.E. Characterization of a hematopoietic stem cell with engraftment advantage. *Exp. Hematol.* 2000. Vol. 36, No 10. P. 1236-1243. doi: 10.1016/j.exphem.2008.04.012.

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці у наукових фахових виданнях України:

1. Нікольський І.С., Нікольська К.І. Гемопоезтические стволовые клетки в лечении сахарного диабета. *Імунологія та алергологія*. 2006. № 3. С.19-22 (*Особистий внесок здобувача: участь в обговоренні та аналізі літературних даних, їх систематизуванні, написанні статті*).
2. Коляденко В.Г., Никольская Е.И. Гемопоезтические стволовые клетки и атопический дерматит. *Український журнал дерматології, венерології, косметології*. 2007. № 2. С.5-7 (*Особистий внесок здобувача: участь в обговоренні та аналізі літературних даних, їх систематизуванні, написанні статті*).
3. Nikolskaya K. I., Butenko G. M. Structural-functional organisation of the bone marrow hematopoietic stem cells niches. *Cell and Organ Transplantology*. 2016. Vol. 4, No 1. P. 101-117 (*Особистий внесок здобувача: участь в обговоренні та аналізі літературних даних, їх систематизуванні, написанні статті*).
4. Nikolska K. I. Peculiarities of culture and in vitro contact interaction of cryopreserved thymic multipotent stromal cells and hemopoietic cells. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018. Vol. 28, No 1. P. 5–13 (Видання входить до міжнародної наукометричної бази **Scopus**).
5. Nikolska K. I. The effects of the transplantation of thymus-derived multipotent stromal cells on the immune system and survival of lethally irradiated mice. *Cell and Organ Transplantology*. 2018. Vol. 6, No 2. P. 158-163.
6. Нікольська К.І., Бутенко Г.М. Корекція кістково-мозкового синдрому у опромінених мишей трансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин. *Фізіологічний журнал*. 2019. Т.65, № 1. С.3-14. (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, проведення експериментів, статистична обробка результатів, участь в обговоренні та*

інтерпретації результатів, написання статті).

7. Nikolska K.I. Impact of transplantation of cryopreserved and preincubated with thymic multipotent stromal cells of hemopoietic stem cells on lethally irradiated mice survival. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2019.Vol. 29, No 2. P. 115–124 (Видання входить до міжнародної наукометричної бази **Scopus**).

Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:

8. Никольский И.С., Никольская В.В., Федорчук А.Г., Никольская Е.И., Марущенко Ю.Л. Радиозащитное действие криоконсервированных клеток эмбриональной печени в сингенной и ксеногенной комбинациях // Матеріали ІХ Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 25-26 квітня 2007 р.). *Імунологія та алергологія*. 2007. № 3. С.97–98 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
9. Нікольська В.В., Нікольська К.І. Колонієутворення стромальними клітинами тимусу // Матеріали Х Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 2008 р.). *Імунологія та алергологія*. 2008. № 2. С.140 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
10. Никольский И.С., Никольская В.В., Федорчук А.Г., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Никольская Е.И., Зубов Д.А., Лисица Н.А., Семенова Я.-М.А. Влияние преинкубированных с мультипотентными стромальными клетками тимуса сингенных клеток эмбриональной печени на иммунную систему летально облученных мышей // Матеріали ХІ Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології,

- алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 2009 р.). *Імунологія та алергологія*. 2009. № 2-3. С.145 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
- 11.Никольский И.С., Никольская В.В., Зубов Д.А., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Никольская Е.И., Лисица Н.А., Семенова Я.-М.А., Федорчук А.Г. Регенерация иммунной системы облученных животных при трансплантации сингенных клеток эмбриональной печени, стимулированных контактом с мультипотентными стромальными клетками тимуса // Сучасні теорія та практика клінічної імунології та алергології: матеріали XII Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 2010 р.). *Імунологія та алергологія*. 2010. № 1. С.163 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
 - 12.Никольский И.С., Никольская В.В., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Никольская Е.И., Зубов Д.А., Лисица Н.А., Семенова Я.-М., Федорчук А.Г., Сорокин Г.К. Повышение эффективности сингенных клеток эмбриональной печени в регенерации иммунной системы летально облученных мышей в результате контактного взаимодействия этих клеток и мультипотентных стромальных клеток тимуса // Материалы VI Съезда по радиационным исследованиям (Москва, Россия, 25–28 октября 2010 г.). Москва: изд-во Рос. ун-та Друж. Народов, 2010. Т. 1. С. 94 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
 - 13.Никольская Е.И. Мембранное взаимодействие ex vivo мультипотентных стромальных и гемопоэтических клеток // Сучасні питання клінічної та лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (Київ, Україна, 12–13 квітня 2011 р.). *Імунологія та алергологія*. 2011. № 4. С.100-101.

- 14.Никольский И.С., Никольская В.В., Савинова В.О., Никольская Е.И., Тарануха Л.И., Семенова Я.-М.А., Кубицкая А.О. Иммуномодулирующая активность мультипотентных стромальных клеток тимуса // МатеріалиХІІІ Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 26-27 квітня 2012 р.). *Імунологія та алергологія*. 2012. Дод.1. С.45-46 (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез).
- 15.Nikolskaya K., Zubov D., Taranukha L., Vasyliiev R., Semenova Y.-M. Immune system regeneration with fetal liver cells stimulated by contact with thymic multipotent stromal cells in irradiated mice // Stem Cells and Clinical Application: poster presentations 7th Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research associated with Fraunhofer Life Science Symposium(Leipzig, Germany, 29-30 November 2012). Leipzig, 2012. P. 74. (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез).
- 16.Никольская Е.И. Повышение продолжительности жизни летально облученных мышей под влиянием мультипотентных стромальных клеток тимуса // Актуальні проблеми регенеративної медицини: матеріалинауково-практичної конференції з міжнародною участю(Київ, Україна,4–5 жовтня 2012 р.). *Журнал Національної Академії медичних наук України*. 2012. Т.18, додаток. С.107-108.
- 17.Никольский И.С., Никольская В.В., Савинова В.О., Тарануха Л.И., Семенова Я.-М.А., Никольская Е.И., Чех Д.Л. Иммунобиологическая активность трансплантатов гемопоэтических и мультипотентных стромальных клеток тимуса // Актуальные вопросы трансплантации стволовых клеток: материалы I Евразийского конгресса «Транслантация стволовых клеток» (Минск, Беларуссия, 25–27 сентября 2013 г.). Минск, 2013. С. 109-111 (Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і

проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез).

- 18.Никольская Е.И., Тарануха Л.И., Никольская В.В., Семенова Я-М.А., Никольский И.С. Характеристика активности различных типов мультипотентных клеток в лечении пострadiaционного костно-мозгового синдрома у мышей // Трансплантація – сьогодення, минуле та майбутнє: матеріалинауково-практичної конференції з міжнародною участю (Київ, Україна, 7 листопада 2014 р.). Київ, 2014. С.32 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
- 19.Нікольська К.І. Потенціювання імунорегенеративної і радіозахисної активності гемопоетичних клітин-попередників контактом з мультипотентними стромальними клітинами тимусу // Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині: матеріалиміжнародної науково-практичної конференції (Київ, Україна, 9–10 листопада 2017 р.). *Клітинна та органна трансплантологія*. 2017. Т.5, № 2. С. 254.

Наукові праці, що додатково відображають зміст дисертації

- 20.Никольский И.С., Никольская В.В., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Зубов Д.А., Никольская Е.И. Радиозащитное действие мультипотентных стромальных клеток тимуса. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2009. № 2/1 (24). С. 284-285 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, проведення експериментів, статистична обробка результатів, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті*).
- 21.Никольский И.С., Никольская В.В., Зубов Д.А., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Никольская Е.И. Восстановление иммунной системы облученных животных сингенными клетками эмбриональной печени, стимулированными контактом с мультипотентными стромальными клетками тимуса. *Вестник Уральской медицинской академической*

науки.2010. № 2/1 (29). С. 61-62 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, проведення експериментів, статистична обробка результатів, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті*).

- 22.Никольская Е.И., Тарануха Л.И., Никольская В.В., Галицкая С.Н., Никольский И.С. Сравнительная характеристика активности различных типов гемопоэтических и мультипотентных стромальных клеток в купировании костно-мозгового синдрома у летально облученных мышей. *Российский иммунологический журнал*. 2014. Т. 8 (17), № 3. С. 354-356 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, проведення експериментів, статистична обробка результатів, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті*).

- 23.Никольская Е.И. Клеточная композиция костномозговых ниш гемопоэтических стволовых клеток (обзор литературы). *Журнал Національної Академії медичних наук України*. 2015. Т. 21, № 3-4. С. 272-286.

Патенти:

- 24.Нікольський І.С., Нікольська В.В., Зубов Д.О., Тарануха Л.І., Галицька С.М., Нікольська К.І., Федорчук О.Г. Спосіб підвищення радіорезистентності організму // Пат. 49204 Україна, МПК А61К 35/26; Заявлено 06.10.2009; Дата публ. 26.04.2010, Бюл. № 8 (*Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень та їх аналізі, написання тексту патенту, патентний пошук*).
- 25.Нікольський І.С., Нікольська В.В., Зубов Д.О., Нікольська К.І., Савінова В.О., Малишева О.О. Спосіб одержання фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР), як модельного аналогу тимічної ніши *ex vivo* // Пат. 80076 Україна, МПК С12N 5/00; Заявлено 04.12.2012; Дата публ. 13.05.2013, Бюл. № 9 (*Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень та їх аналізі, написання тексту патенту, патентний пошук*).

ДОДАТОК 2





НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

ІНФОРМАЦІЙНИЙ БЮЛЕТЕНЬ

Додаток до
«Журналу Національної академії медичних наук України»

ВИПУСК 33

Київ — 2012

Такий метод мультиплікації МСК дозволяє збереження їх поверхневих маркерів у близькому до нативного стані.

Нововведення впроваджено в роботу ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України” та Інституту молекулярної біології та генетики НАН України.

Впровадження нововведення додаткових коштів не потребує.

Необхідне обладнання: стерильний бокс, термостат, центрифуга.

Послуги розробників: курси інформації і стажування, наукові публікації, методична допомога.

4. КПКВ 6561020

Спосіб вивчення контактної взаємодії клітин гемопоетичного ряду (КГР) і мультипотентних стромальних клітин (МСК).

Автори розробки: Нікольський І.С., Нікольська В.В., Зубов Д.О.,
Нікольська К.І., Кубицька О.О.

Контактний телефон: (044) 521-33-31.

Пропонується спосіб вивчення контактної взаємодії КГР і МСК, який полягає у приведенні в контакт *in vitro* КГР та МСК з утворенням клітинних асоціацій по типу розеток з МСК в центрі і КГР по периферії.

Застосування нововведення дозволяє вивчати здібності різних типів клітин до входження у склад розеток, що є важливим з урахуванням значної ролі тимусних МСК у формуванні паренхіми цього органу, а також ролі контактної взаємодії МСК і гемопоетичних стовбурових клітин у формуванні кістково-мозкових ніш для останніх; відкриває можливість встановлення змін, що відбуваються між клітинами, що контактують, з перспективою практичного використання цього підходу, а також збагачує теоретичні уявлення про роль контактної взаємодії клітин гемопоетичного та стромального ряду.

Впровадження нововведення додаткових коштів не потребує.

Необхідне обладнання: лазерний проточний цитофлуориметр, люмінесцентний мікроскоп, ПЛР-лабораторія, імуноферментний аналізатор.

Послуги розробників: наукові публікації, курси стажування, методична допомога.

5. КПКВ 6561040

Спосіб прогнозування ризику перинатального гіпоксичного ушкодження у новонароджених (ПГУ).

Автори розробки: Горовенко Н.Г., Кир'яченко С.П., Россоха З.І.,
Подольська С.В.

Контактний телефон: (044) 205-48-13.

Пропонується спосіб прогнозування ризику ПГУ новонароджених шляхом визначення поліморфізму генів ангіотензин-перетворюючого ферменту (*ACE*) та рецептора ангіотензину II типу 1 (*AT2R1*). При наявності у новонародженого генотипу 1166CC гена *AT2R1* констатують спадкову схильність та підвищення

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

ІНФОРМАЦІЙНИЙ БЮЛЕТЕНЬ

Додаток до
«Журналу Національної академії медичних наук України»

ВИПУСК 35

Київ — 2013

Нововведення впроваджено в роботу відділу клітинних та тканинних технологій ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України", ДУ "Інститут геронтології ім.Д.Ф.Чеботарьова НАМН".

Впровадження нововведення додаткових коштів не потребує.

Необхідне обладнання: хірургічні інструменти, операційний електродріль, набір стоматологічних борів.

Послуги розробників: курси інформації та стажування, патент.

3. КПКВ 6561040

Спосіб одержання фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР), як модельного аналогу тимічної ніші *ex vivo*.

Автори розробники: Нікольський І.С., Нікольська В.В., Зубов Д.О.,
Нікольська К.І., Савінова В.О., Малишева О.О.

Контактний телефон: (044) 521-33-31.

Пропонується спосіб вивчення контактної взаємодії клітин гемопоетичного ряду і мультипотентних стромальних клітин, який полягає у приведенні в контакт *in vitro* клітин гемопоетичного ряду та МСК з утворенням клітинних асоціацій за типом розеток з МСК в центрі і клітинами гемопоетичного ряду по периферії.

Застосування нововведення дозволяє вивчати здібності різних типів клітин до входження у склад розеток, що є важливим з урахуванням значної ролі тимусних МСК у формуванні паренхіми цього органу, а також ролі контактної взаємодії МСК і гемопоетичних стовбурових клітин у формуванні кістково-мозкових ніш для останніх; відкриває можливість встановлення змін, що відбуваються між клітинами, що контактують, з перспективою практичного використання цього підходу, а також збагачення теоретичних уявлень про роль контактної взаємодії клітин гемопоетичного та стромального ряду.

На дану наукову розробку зареєстрована заявка на отримання патенту України № u2012 13866 від 04.12.12.

Нововведення впроваджено в дослідницьку роботу ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН", ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Впровадження нововведення в клінічну практику потребує 18 000 грн.

Необхідне обладнання: ламінарний бокс, CO₂-інкубатор, біокулярний мікроскоп, інвертований мікроскоп, центрифуги, дозатори.

Послуги розробників: курси інформації та стажування, наукові публікації.

4. КПКВ 6561040

Спосіб одержання живильного агарового середовища (ЖАС) для дослідження гранулоцитарно-макрофагальної колонієутворюючої активності (ГМКА) гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК).

Автори розробники: Нікольська В.В., Нікольська К.І.

Контактний телефон: (044) 521-33-31.

Пропонується спосіб одержання ЖАС для дослідження ГМКА ГСК, що полягає у заміні живильного середовища на основі середовища Mc Coy's на середовище Ігла MEM з HEPES-буфером з наступним змішуванням безпосередньо перед застосуванням однієї частини 2-кратного середовища, підігрітого до 39°C, з однією частиною розчину 0,6% агару тієї ж температури.

Застосування нововведення вдосконалює методику виявлення колонієутворюючих гранулоцитарно-макрофагальних одиниць, що дає можливість більш широко і ефективно використовувати її у роботі наукових лабораторій для вивчення імунобіології гемопоетичних стовбурових клітин.

На дану наукову розробку подана заявка на отримання патенту України № u2012 11936 від 16.10.12.

Нововведення впроваджено в дослідницьку роботу ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН", ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Впровадження нововведення в практику потребує 12 000 грн.

Необхідне обладнання: ламінарний бокс, CO₂-інкубатор, дозатори.

Послуги розробників: консультації, наукові публікації.

5. КПКВ 6561040

Застосування визначення поліморфного варіанту G1934A (алель *4) гена *Cyp2D6* для прогнозування підвищеного ризику розвитку раку грудної залози (РГЗ) у жінок з обтяженою спадковістю.

Автори розробники: Левкович Н.М., Горovenko Н.Г., Подольська С.В.

Контактний телефон: (044) 205-48-13.

Пропонується спосіб прогнозування розвитку РГЗ, що включає клініко-генеалогічний аналіз, який відрізняється тим, що після визначення обтяженості родоводу, здійснюють забір біологічної рідини та виконують молекулярно-генетичне дослідження поліморфізму G1934A гена *CYP2D6* і при наявності генотипу *4*4 (A1934A) гена *CYP2D6* свідчать про підвищення ризику розвитку РГЗ.

Застосування нововведення характеризується невисокою трудоемністю, доступною вартістю досліджень та більш високою точністю прогнозування ризику розвитку раку грудної залози у жінок з обтяженою спадковістю.

На дану наукову розробку одержано патент України № 75386 від 26.11.12.

Нововведення впроваджено в лікувально-діагностичну практику Державного Референс-центру з молекулярної діагностики МОЗ України та лекційний курс кафедри генетики НМАПО ім.П.Л.Шупика.

Необхідне обладнання: обладнання та реактиви для проведення полімеразної ланцюгової реакції та поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів.

Послуги розробників: курси стажування.

6. КПКВ 6561040

Застосування визначення поліморфного варіанту C-108T гена *PON1* для прогнозування розвитку гіпертонічної хвороби (ГХ) у жінок.