

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

ДЕМЧЕНКО ДАРІЯ ЛЕОНІДІВНА

УДК 576.54; 571.27; 612.119; 616-03

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

03.00.09 – імунологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття
наукового ступеня кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на базі ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» в лабораторії імунології відділу клітинних та тканинних технологій

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
Нікольський Ігор Сергійович,
ДУ «Інститут генетичної та
регенеративної медицини НАМН України»,
завідувач лабораторії імунології
відділу клітинних і тканинних технологій

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Стасенко Аліна Анатоліївна,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка МОН України,
професор кафедри мікробіології та імунології
ННЦ "Інститут біології та медицини"

доктор біологічних наук, професор
Колибо Денис Володимирович,
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
головний науковий співробітник
відділу молекулярної імунології

Захист відбудеться «12» травня 2021 року о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58

Автореферат розісланий «8» квітня 2021 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Н.Г. Ракша

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. У світлі сучасних знань дослідження імунобіологічної та регенеративної активності стовбурових клітин, їх ролі у становленні і функціонуванні імунної системи, сформувалося як актуальний, важливий для теорії і практики медицини науковий напрямок. Основна увага дослідників частіше зосереджена на вивченні гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК), їх нащадків різного ступеня зрілості і мультипотентних стромальних клітин (МСК) певного органного походження, з огляду на те, що гемопоетичні клітини дають початок усім клітинам імунної системи, а МСК створюють необхідне для нормального функціонування ГСК оточення у тимусі і кістковому мозку (КМ), а також, імовірно, і в периферичних лімфоїдних органах. При цьому переважна більшість робіт присвячена МСК кісткового мозку, що формують найбільш значущі для функціонування гемопоетичних клітин структури, у вигляді так званих "ніш" [Takam Kamga P., et al., 2021].

Значно менше даних існує про роль МСК у тимусі. Відомо, що паренхіма тимуса необхідна для ембріонального морфогенезу органу. Вважається, що у тимусі також є ніші, в яких зосереджені кістково-мозкові клітини-попередники, предетерміновані прямувати по Т-лімфоїдному шляху розвитку, що певною мірою забезпечується МСК тимуса (МСКт) [Campinoti S., et al., 2020]. В долях тимуса 12-добових ембріонів мишей, що мають генетичний дефект мезенхіми, доволі помітно гальмується формування тимоцитів $-CD4^+CD8^+$ внаслідок блокування $-CD4^+CD8^-$ стадії розвитку. Отже, МСКт беруть участь у дозріванні тимоцитів. Також МСКт впливають на міграцію Т-клітин [Kreins AY., et al., 2020; Han J., et al., 2020].

МСК діють на гемопоетичні клітини і на периферії, проявляючи, перш за все, імуносупресивний вплив по відношенню до трансплантаційного імунітету [Kawashima A, et al., 2020].

In vitro МСКт пригнічують процеси пов'язані з проліферацією Т-лімфоцитів в різних системах. Окрім того, МСКт стимулюють антитілогенез *in vivo* [Xiaomo Wu, et al., 2020]. Відомо, що МСК різного походження досить гетерогенні і відрізняються своєю активністю [Mucientes A., et al., 2021; Lee W., et al., 2021], певною мірою за рахунок зв'язків з мікрооточенням. Таким чином, сукупність властивостей саме МСКт, центрального органу імунітету, може відігравати ключову роль у відновленні імунної системи.

Вважається, що дія МСКт може бути опосередкована контактною взаємодією з гемопоетичними клітинами, що підтверджується формуванням фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР) [Nikolska KI., et al., 2018]. Тому створення контакту між ГСК та МСКт *in vitro*, імовірно, може суттєво змінити властивості клітин, що обумовлює актуальність досліджень в цьому напрямку з метою застосування в клітинній терапії.

Для вивчення впливу на регенерацію імунної системи різних типів гемопоетичних клітин і МСКт зручним є використання моделі циклофосфанового імунодефіциту, що характеризується не лише глибоким ураженням кровотворення, а

і мобілізацією ГСК із КМ на периферію, що розглядається як необхідний для регенерації процес [Mills A., et al., 2019].

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

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

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

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Визначити особливості контактної взаємодії МСКт та їх диференційованих форм з гемопоетичними клітинами різного походження.
2. Вивчити вплив контактної взаємодії МСКт з гемопоетичними клітинами на лінійний диференціювальний потенціал стромальних клітин.
3. Оптимізувати модель постциклофосфанового імунодефіциту у мишей для вивчення регенеративної активності клітинних препаратів.
4. Дослідити вплив трансплантації клітин кісткового мозку на постциклофосфанову регенерацію органів та відновлення функцій імунної системи.
5. Провести порівняльну оцінку відновлення імунної системи після ураження циклофосфаном трансплантацією клітин кісткового мозку, активованих контактом з МСКт, у порівнянні з неактивованими.
6. Вивчити інтенсивність регенерації клітинного складу органів імунної системи, функціональної активності адаптивного і природного імунітету після введення циклофосфану в результаті трансплантації МСКт.
7. Визначити можливість регенерації імунної системи при циклофосфановому імунодефіциті котрансплантацією МСКт та клітин кісткового мозку.

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

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

Методи дослідження: імунологічні (імунізація тварин, визначення кількості антитілоутворювальних клітин (АУК) методом локального гемолізу в гелі, реакція гіперчутливості сповільненого типу (РГСТ), визначення проліферативної активності лімфоцитів в реакції бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) та функціональної активності природних кілерів МТТ-методом, бактерицидної активності перитонеальних макрофагів НСТ методом, реакція утворення ФЛР), культуральні

(культивування МСКт, кокультивування мезенхімальних та гемопоетичних клітин, направлене остеогенне та адипогенне диференціювання клітинних культур), біохімічні (спектрофотометричні), цитофлуориметричні (визначення спонтанного апоптозу, поглинальної активності перитонеальних макрофагів, функціональної активності природних кілерів) і статистичні методи.

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

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

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

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

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

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником розроблено концепцію дисертаційної роботи, сформульовано мету та завдання дисертаційного дослідження, проведено планування схем експериментів та розробка методичних підходів до виконання комплексу лабораторних досліджень, обговорення отриманих

результатів, формулювання висновків. Автором самостійно проведений інформаційний пошук, аналіз та статистичне опрацювання результатів дослідження. Дисертантом виконані експериментальні дослідження *in vitro* та *in vivo*. Самостійно зібрані літературні дані, на основі яких проаналізовані власні результати.

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

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи були представлені на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Іноваційні напрямки в генетичній та регенеративній медицині» (Київ, 9–10 листопада 2017), V ювілейному міжнародному медичному конгресі «Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України» (Київ, 2016), XI, XII і XIII міжнародних наукових конференціях студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2015-2017), I Євразійському конгресі «Трансплантація стволових кліток» (Мінськ, 2013).

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

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів дослідження та їх обговорення, узагальнення, висновків та списку використаних джерел, що включає 237 найменувань. Дисертація викладена на 140 сторінках, містить 21 рисунок і 2 таблиці.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження

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

З метою направленою остеогенного та адипогенного диференціювання МСКт мишей лінії C57BL 8-го пасажу сіяли в 24-лункові плашки (Costar, США) в концентрації 4×10^4 /лунку або в культуральні флакони (25 cm^2) в концентрації 2×10^5 /флакон. Через добу після посіву їх інкубували в остеогенному, що містило DMEM/F12 з додаванням 15% ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 10 мМL-глутаміну (Sigma, США), 50 мкг/мл L-аскорбінової кислоти (Sigma, США),

10 мМβ-гліцерофосфату (Sigma, США), 0,1 мкМ дексаметазону (Sigma, США) та по 100 МО/мл пеніциліну та стрептоміцину (Дарниця, Україна), або адипогенному, що містило DMEM-HG з високим вмістом глюкози – 4,5 г/л (РАА, Німеччина) з додаванням 10% конячої донорської сироватки (РАА, Німеччина), 10 мМL-глутаміну (Sigma, США), 0,5 мкМ дексаметазону (Sigma, США), 6 мкг/мл інсуліну (Sigma, США) та по 100 МО/мл пеніциліну та стрептоміцину (Дарниця, Україна), диференціювальних середовищах в CO₂-інкубаторі (Jouan, Франція) при 37°C і 5 % CO₂. Зміну середовищ проводили кожну 3-4-ту добу культивування. Фарбування остеоіндукованих культур на мінеральні відкладення проводили 1% розчином алізаринового червоного S (Sigma, США), на ліпідні вакуолі - 0,2% розчином масляного червоного O (Sigma, США) [Gregory CA., et al., 2004]. Для кількісної оцінки вимірювали оптичну щільність розчину екстрагованих барвників за допомогою спектрофотометра за довжини хвилі 520 нм.

Для визначення контактної взаємодії МСКт з лімфоїдними клітинами суспензію з сумішшю МСКт (10⁵/мл, 50 мкл) і клітин різних лімфоїдних органів (10⁷/мл, 50 мкл) (тимус, селезінка, лімфатичні вузли, кістковий мозок) у співвідношенні 1:100 центрифугували при 250g, осад тут же ресуспендували енергійним піпетуванням і далі здійснювали мікроскопіювання в камері Горяєва. Проводили підрахунок поодиноких фібробластоподібних клітин і таких, що приєднали три і більше лімфоцитів [Никольский ИС., и др., 2011].

Для перевірки впливу контактної взаємодії на диференціювальний потенціал стромальних клітин в лунки 24-лункового планшету вносили по 4×10⁴ МСКт на 8 пасажі, в яких не спостерігали ознаки старіння. Через 1 добу клітини утворювали моношар, до якого додавали тимоцити або ККМ (10⁶ на лунку). Через 24 год. їх видаляли шляхом промивання культури та продовжували культивувати МСКт в звичайному поживному середовищі. Ще через 1 добу у відповідних групах лунок середовище замінювали або на звичайне, або на остеогенне чи адипогенне для направленої диференціювання. Контролем були культури МСКт з поживним, остеогенним або адипогенним середовищем, до якого тимоцити або ККМ не вносили. Через 10 днів культури МСКт фарбували та оцінювали інтенсивність забарвлення спектрофотометрично.

Для вивчення впливу клітинних препаратів на регенерацію імунної системи сингенних мишей було сформовано шість груп: I (контрольна) нормальні тварини (n=10), II- миші, що отримували циклофосфан (ЦФ) (n=8), III - тварини, що отримували ЦФ і ККМ (n=7), IV - тварини, що отримували ЦФ і ККМ, активовані попереднім 2 годинним контактом з МСКт (ККМа) (n=7), V - тварини, що отримували ЦФ і через 2 години МСКт (n=7), VI - тварини, що отримували ЦФ і послідууючу котрансплантацію ККМ разом з МСКт (n=7). З метою моделювання імунодефіциту мишам лінії C57BL масою 18-20 г внутрішньочеревно вводили водний розчин ЦФ (200 мг/кг маси тіла). Через 2 години вводили в ретроорбітальний синус досліджувані клітинні препарати в об'ємі 0,1 мл. Через тиждень імунізували тварин внутрішньочеревно еритроцитами барана (10⁸), через 4 дні проводили повторну інєкцію в подушечку лапи (10⁸) і ще через добу оцінювали стан імунної системи. Визначали загальну кількість еритроцитів,

гематокрит, концентрацію гемоглобіну в периферичній крові, фази клітинного циклу та апоптоз клітин лімфатичних вузлів брижі, кількість антитілоутворюючих клітин у селезінці, оцінювали РГСТ, проліферативну мітоген-активовану активність спленоцитів і цитотоксичну активність природних кілерних лімфоцитів, поглинальну активність та рівень бактерицидної активності перитонеальних макрофагів.

Обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення MS Office Excel (Microsoft, США), використовуючи критерій Шовене [Викулин ИМ., и др., 2007] для виявлення аномальних результатів вимірювань, критерій Стюдента (t) та непараметричний критерій Вілкоксона–Мана–Уїтні (U) для виявлення достовірності відмінностей.

Результати дослідження та їх обговорення

Контактна взаємодія гемопоетичних і мультипотентних стромальних клітин *in vitro*. Відомо, що МСКт здатні взаємодіяти з різними клітинами вродженого та адаптивного імунітету. Переважна більшість робіт приділяє увагу секретії розчинних факторів в МСК-імуномодуляції. В нашій роботі ми вивчаємо саме роль контактної рецепторної взаємодії клітин.

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

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

Оскільки в процесі того чи іншого диференціювання здатність клітин до контактної взаємодії може змінюватись і тим самим характеризувати результати цієї взаємодії, серед завдань роботи було вивчити здатність МСКт та їх диференційованих нащадків до утворення ФЛР з лімфоїдними клітинами різного походження (timoцити, ККМ, лімфатичних вузлів та селезінки). Були використані МСКт 8 пасажу і диференційовані з них остеобласти та адипоцити.

Всі типи диференційованих стромальних клітин і всі типи лімфоїдних клітин взаємодіяли з утворенням значної кількості ФЛР (рис. 1).

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

Принципово відмінною є різна активність тимоцитів і ККМ. Так кількість ФЛР тимоцитів з адипоцитами була в 2,3 рази ($p < 0,05$) вище ніж ККМ з адипоцитами, а з МСКт тимоцити формували в 2,7 разів ($p < 0,05$) більше ФЛР ніж ККМ. Тому для подальших досліджень було обрано саме ці типи клітин. Виходячи з того, що

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

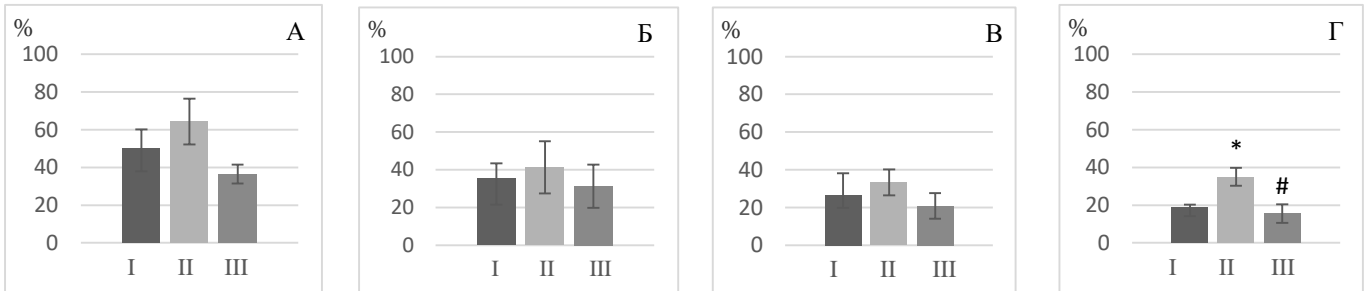


Рис. 1. Формування клітинних асоціацій мультипотентних стромальних клітин тимуса (I), остеобластів (II) та адипоцитів (III) з ≥ 3 тимоцитами (А), спленоцитами (Б), клітинами лімфатичних вузлів (В) та кісткового мозку (Г). Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n=6$). * $p < 0,05$ – порівняно з кількістю ФЛР з МСКт; # $p < 0,05$ – порівняно з кількістю ФЛР з остеобластами.

Було показано, що під впливом короткочасного попереднього співкультивування з тимоцитами ефективність диференціювання в остеогенному напрямку підвищувалась (рис. 2, табл. 1). Цього не відбувалось при співкультуванні з ККМ.

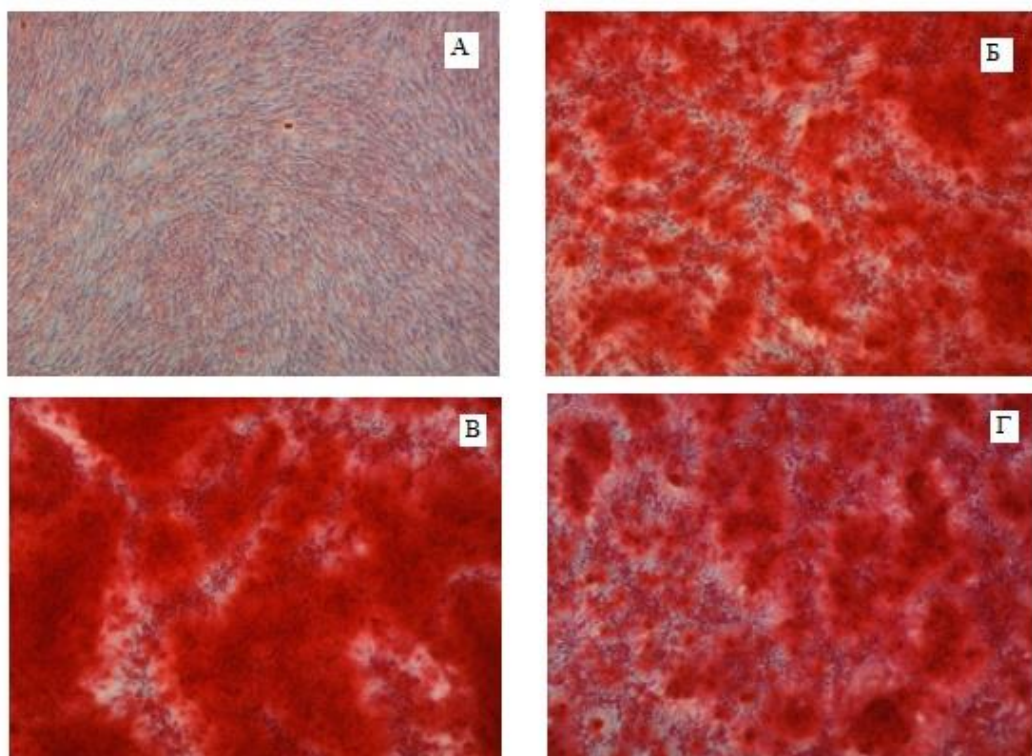


Рис. 2. Мікрофотографії цитопрепаратів культур МСКт, 10-а доба культивування у звичайному (А) або остеогенному (Б, В, Г) середовищі після контакту протягом 24 год. з тимоцитами (В) або клітинами кісткового мозку (Г). Забарвлення алізариновим червоним. Ок. x10, об. x10.

Таким чином, встановлено, що *in vitro* МСКт диференціюються в остеогенному напрямку, а тимоцити потенціюють цей процес. При цьому співкультивування МСКт з тимоцитами не впливало на інтенсивність адипогенного диференціювання (табл. 1).

Таблиця 1

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

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

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

* $p < 0,05$ – порівняно з МСКт, культивованими в звичайному поживному середовищі без додавання факторів диференціювання;

$p < 0,05$ – порівняно з МСКт, культивованими в остеогенному/адипогенному диференціювальному середовищі;

+ $p < 0,05$ – порівняно з МСКт, культивованими в диференціювальному середовищі після попереднього співкультивування з тимоцитами.

Отримані дані свідчать про велику схожість властивостей МСК, які походять із різних органів, головною з яких є можливість мультилінійного диференціювання. А потенціювання індукції остеогенного диференціювання шляхом попереднього співкультивування клітин підтверджує вагомий внесок саме контактної взаємодії в функціонування клітин.

Оптимізація моделі циклофосфанового імунодефіциту для вивчення клітинних трансплантатів. Імунодефіцит, що розвивається після ЦФ, можливо використовувати не лише як модель для вивчення імунопатології, а і у якості ситуації, що дозволяє виявляти особливості регенеративної активності певних імунотропних факторів. Завданням цієї частини роботи було підібрати оптимальну схему введення клітинних препаратів та визначити період дослідження їх впливу на регенерацію імунної системи. Під дією ЦФ у мишей спостерігалось виражене ураження тимуса, лімфовузлів, селезінки та КМ. Виникала лейкопенія, головним чином за рахунок лімфоцитопенії, знижувалась кількість еритроцитів, гемоглобіну

та гематокриту периферичної крові, пригнічувалась здатність до формування АУК. Такі зміни були вираженими на 12 добу, після чого поступово відновлювались на 19 добу дослідження, і практично нормалізувались до 40 доби. На 12 день всі досліджувані показники були достовірно зниженими, тому саме цей термін було обрано для наступних досліджень ефектів клітинних трансплантатів, з метою виявлення регенеративної активності саме клітин.

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

Введення ЦФ призводило до зниження кількості клітин кісткового мозку на 36% ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольною групою інтактних тварин. Введення ККМ викликало ще інтенсивніше зниження кількості клітин, що досягало вже 53% ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольною групою і було достовірно нижчим і по відношенню до групи тварин, що отримували ЦФ (рис.3, А).

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

Під дією ЦФ достовірно знижувалась маса тимуса на 69,3% ($p < 0,05$), загальна кількість тимоцитів на 87,2 % ($p < 0,05$) та кількість клітин на мг органу на 63,6% ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольною групою інтактних мишей, що свідчило про інволюцію тимуса (рис.3, Б). Застосування ККМ та ККМа не впливало на ці показники. Однак трансплантація МСКт та їх спільне введення з ККМ демонстрували відновлення кількості клітин органу, тоді як маса відновлювалась лише при котрансплантації.

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

Після введення мишам ККМ та котрансплантації достовірно нормалізувались маса селезінки та її клітинність (рис.3, В). В результаті введення мишам МСК абсолютна кількість спленоцитів в органі дещо зростала, тому показник клітинності практично не відрізнявся від того, що був у нормальних мишей, тоді як маса

залишалась збільшеною. Введення ККМа призводило до ще більшого зростання маси органу, однак абсолютна кількість спленоцитів теж зростала, тому показник клітинності практично не відрізнявся від того, що був у нормальних мишей.

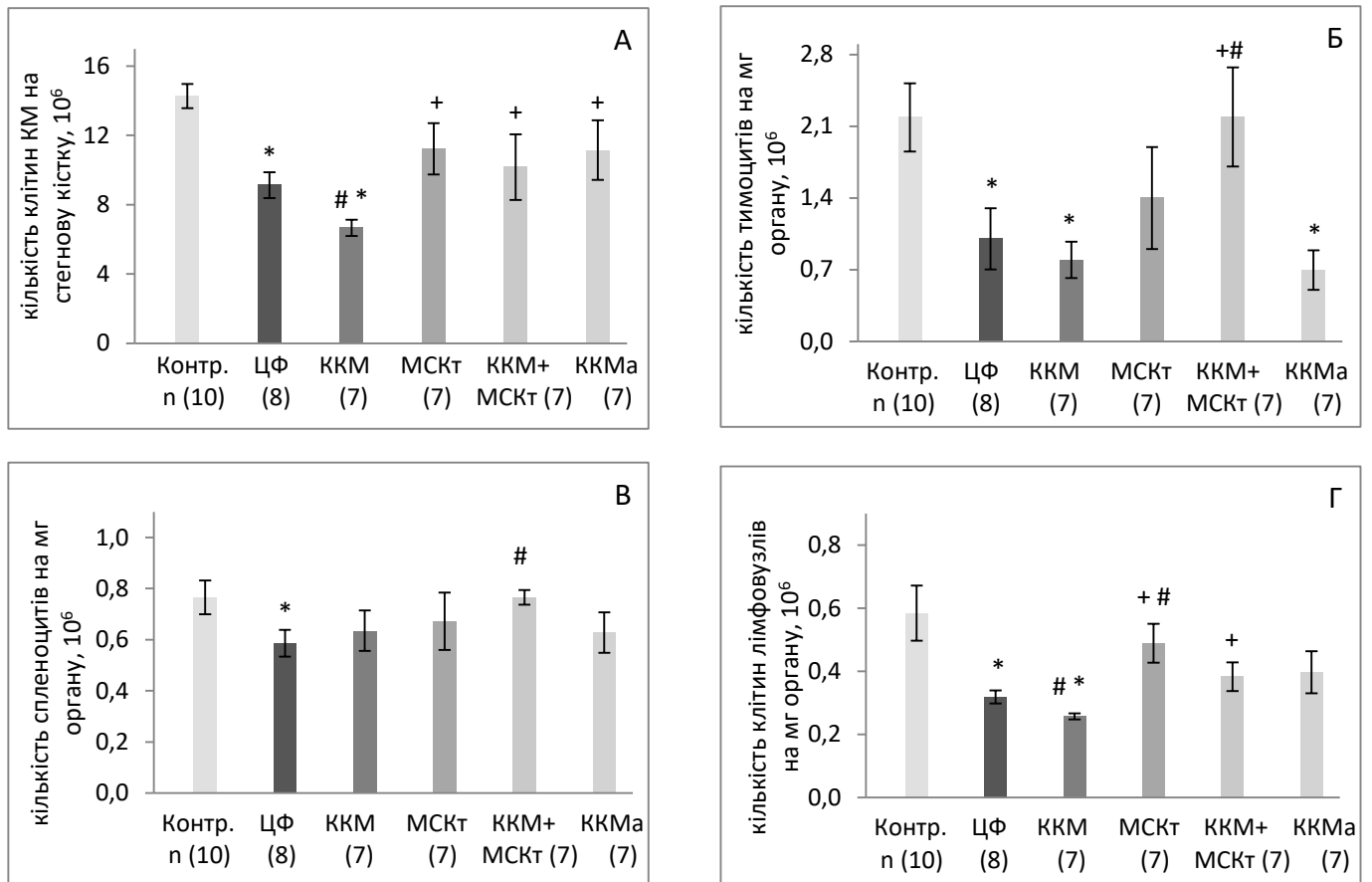


Рис. 3. Вплив клітинних препаратів на кількість клітин в органах мишей із циклофосфан-індукованою імуносупресією: А – кістковий мозок; Б – тимус; В – селезінка; Г – брижові лімфатичні вузли. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n=7-10$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фіз.розчин; # $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ; + $p < 0,5$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і ККМ.

Таким чином, за даних умов експерименту виявляється позитивна дія всіх клітинних препаратів, однак, є очевидним, що механізм впливу був різним.

При введенні ЦФ також достовірно знижувалася клітинність брижових лімфовузлів на 44,8% ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою інтактних мишей (рис.3, Г).

Трансплантація ККМ призводила до ще більшого пригнічення цього показника вже на 55,2% ($p < 0,05$). Трансплантація МСКт, ККМа та котрансплантація призводили до відновлення кількості клітин в органі. Відповідна різниця впливу клітинних препаратів вже спостерігалася по відношенню до показників кісткового мозку, і ще раз демонструє, що позитивний вплив реалізується саме завдяки МСКт, і контактна взаємодія МСКт з ККМ надала нових властивостей останнім.

При застосуванні МСКт, ККМа та котрансплантації кількість клітин в G0/G1-фазах достовірно зменшувалась з 82% у тварин після ЦФ до 74,4%, 75,7% і 76,9% ($p < 0,05$) відповідно при трансплантації цих клітинних препаратів (рис. 4), а у G2/M+S фазах достовірно збільшувалась з 18% при застосуванні ЦФ до 25,6%, 23,1% і 24,3% ($p < 0,05$) після трансплантації МСКт, ККМа та котрансплантації відповідно (рис. 4). Тоді як ККМ не мали такої активності.

Доречно відмітити, що показники спонтанного апоптозу клітин лімфатичних вузлів після введення ЦФ мали тенденцію до збільшення, а під впливом ККМа вже достовірно збільшувались в 2 рази ($p < 0,05$) порівняно з контрольної групою інтактних мишей, що зазвичай корелює із стимуляцією проліферативної активності клітин у нормальних тварин.

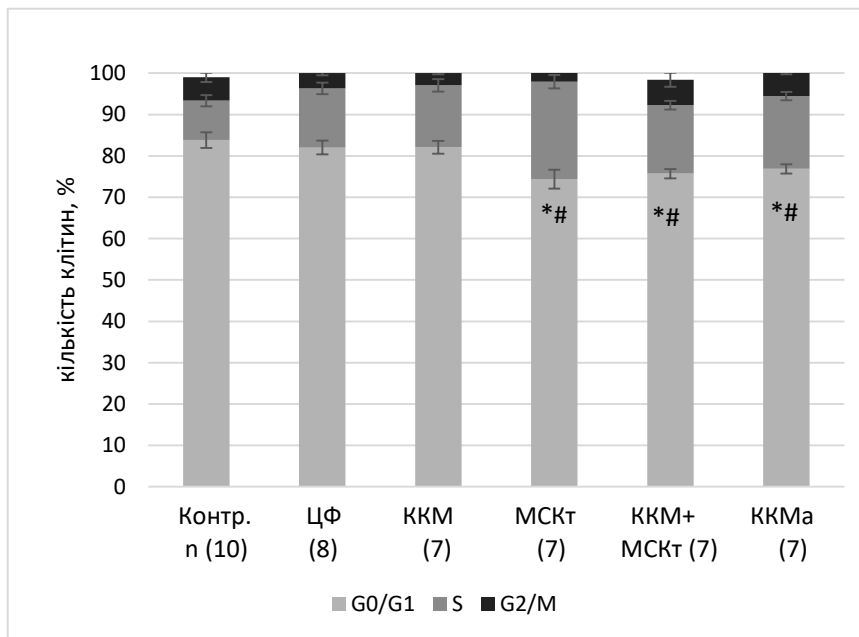


Рис. 4. Вплив клітинних препаратів на відносний вміст клітин лімфатичних вузлів, що знаходяться в G0/G1, S та G2-M фазах клітинного циклу мишей із циклофосфан-індукованою імуносупресією. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n=7-10$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фіз.розчин; # $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ.

Застосування ЦФ достовірно знижувало відносну кількість гематокриту на 14,6% ($p < 0,05$) (рис.5, Б), еритроцитів на 17% ($p < 0,05$) та концентрацію гемоглобіну на 18,4% ($p < 0,05$) (рис.5, А).

Трансплантовані МСКт, ККМа не впливали на дані показники, тоді як інтактні ККМ нормалізували гематокрит та гемоглобін, і водночас достовірно підвищували відносну кількість ретикулоцитів в крові в 2,2 рази ($p < 0,05$) (рис. 5, В). Подібний ефект спостерігався і при котрансплантації. За показниками ретикулоцитів можна чітко спостерігати різнонаправленість впливу ККМ та МСКт, так як останні знижували показник в 3,5 рази ($p < 0,05$).

Дія трансплантації клітинних препаратів на гематологічні показники була протилежною в порівнянні з впливом на відновлення лімфоїдних органів, тобто суттєво активніше впливали саме ККМ на процес регенерації еритропоезу.

Ефективність котрансплантації головним чином, мабуть, обумовлена саме за рахунок дії ККМ, однак не виключений і вплив МСКт. Те, що ККМа втрачають свій потенціал до відновлення гематологічних показників яскраво демонструє залежність властивостей МСКт та ГСК від мікрооточення та процесів кооперації в організмі.

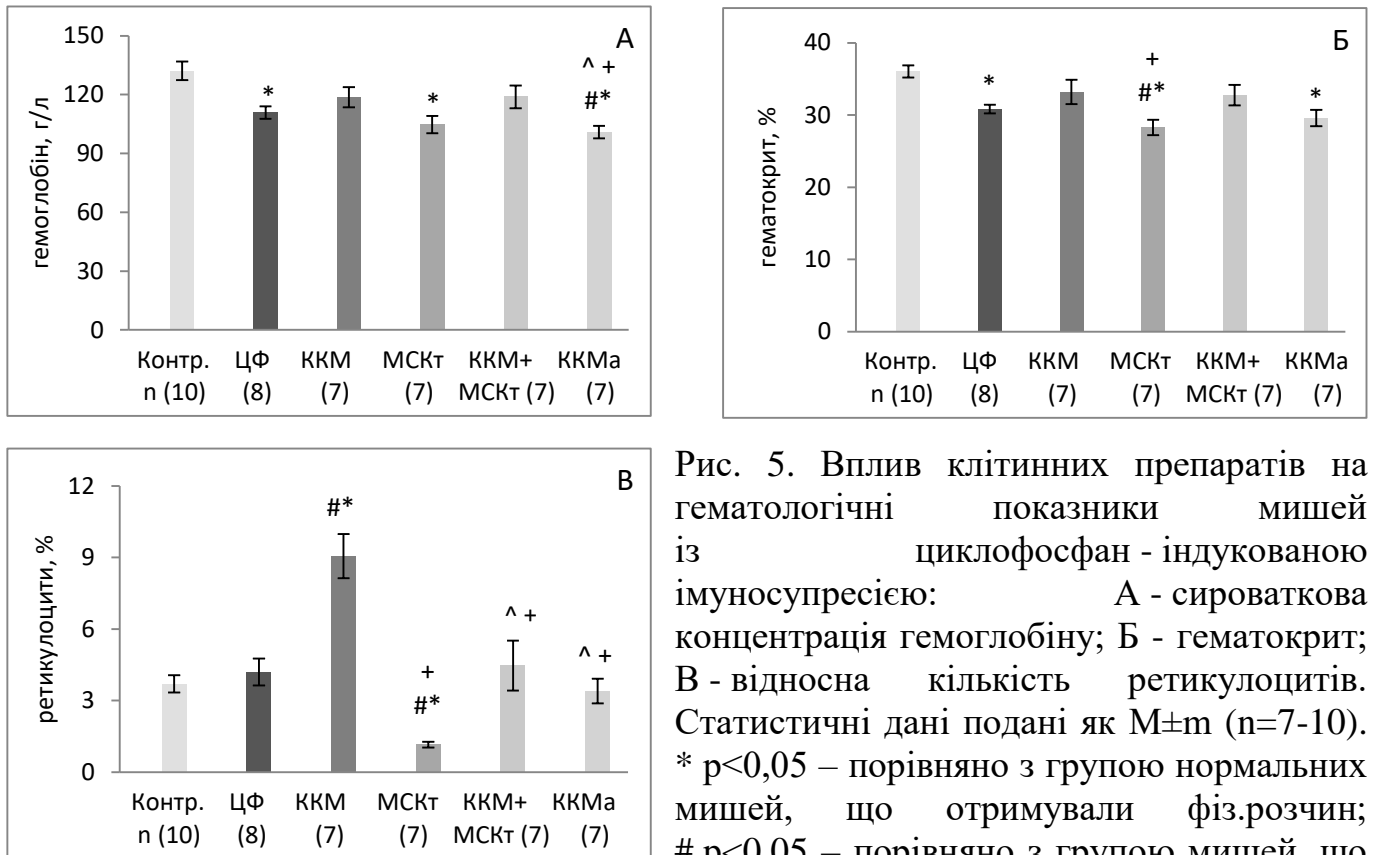


Рис. 5. Вплив клітинних препаратів на гематологічні показники мишей із циклофосфан - індукованою імуносупресією: А - сироваткова концентрація гемоглобіну; Б - гематокрит; В - відносна кількість ретикулоцитів. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n=7-10$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фіз.розчин; # $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ. + $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і ККМ. ^ $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і МСКт.

отримували ЦФ. + $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і ККМ. ^ $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і МСКт.

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

Якщо поглинальна активність макрофагів практично не змінювалась ні в результаті введення ЦФ, ні після дії клітинних препаратів, то інтенсивність поглинання окремо фагоцитуючими клітинами у мишей, що отримували МСКт значно зростала в 1,9 рази ($p < 0,05$), що свідчить про стимулюючий вплив трансплантованих клітин на фагоцити (рис. 6, А).

Застосування ЦФ підвищувало бактерицидну активність перитонеальних макрофагів з 20% у інтактних тварин до 57% ($p < 0,05$), що, мабуть, відображає індукцію бактерицидності продуктами, що утворюються в результаті токсичної дії ЦФ на тканини, а також, можливо, є наслідком стимулюючої дії на фагоцити активованої імуносупресивним ефектом умовно-патогенної мікрофлори. Під впливом трансплантованих ККМ, ККМа та МСКт спостерігалась нормалізація бактерицидної активності, що, скоріш за все, означає, що протягом 12 діб трансплантовані клітини сприяють припиненню опортуністичної інфекції та дезінтоксикації організму, чого не відбувалось при котрансплантації цих клітин (рис. 6, Б).

Щодо природної цитотоксичності спленоцитів МСКт та ККМа проявляли різнонаправлений ефект (рис. 6, В) У використанні терміни дослідження введення

МСКт достовірно підвищувало природну цитотоксичність спленоцитів в 3 рази ($p < 0,05$), а ККМа знижували в 2,8 рази ($p < 0,05$).

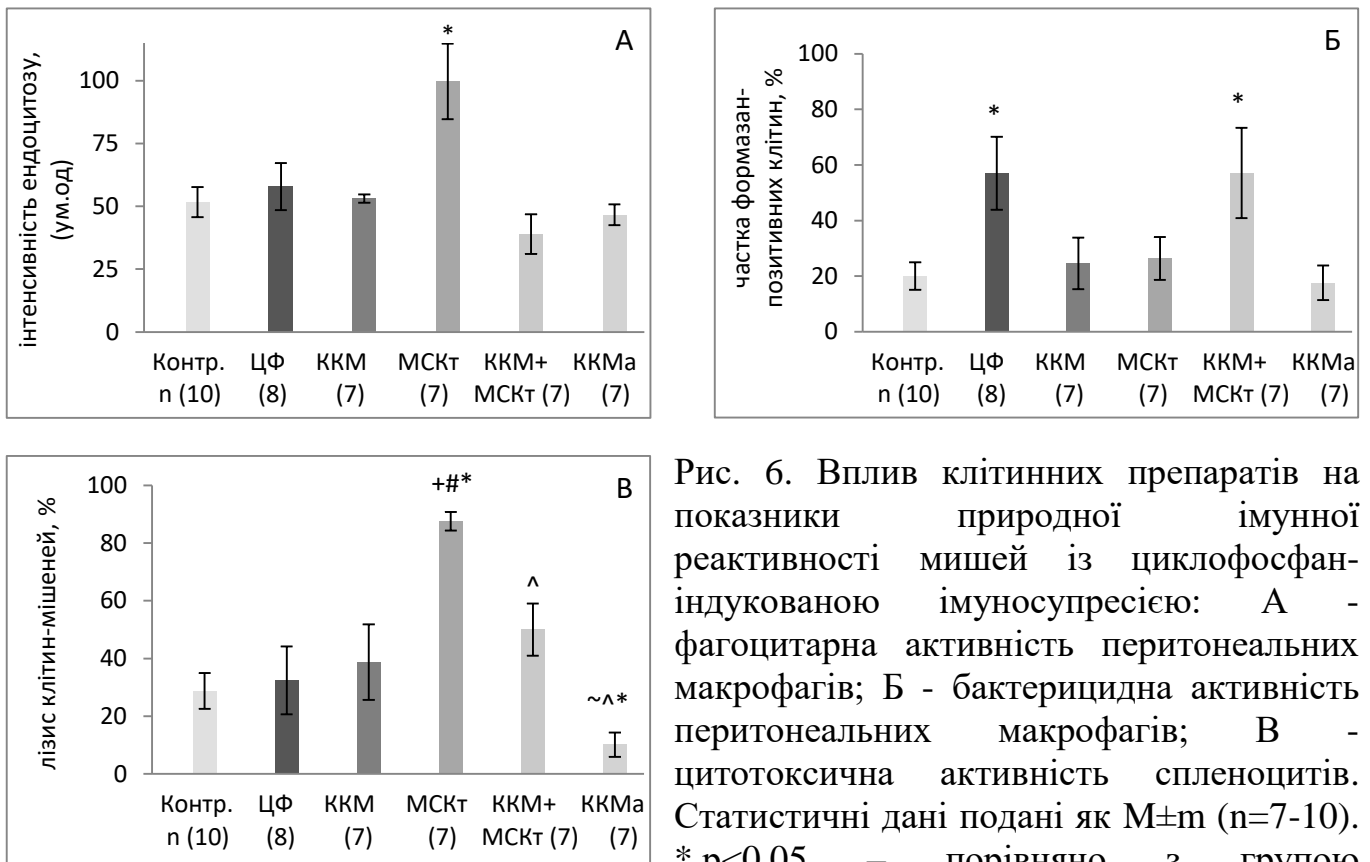


Рис. 6. Вплив клітинних препаратів на показники природної імунної реактивності мишей із циклофосфан-індукованою імуносупресією: А - фагоцитарна активність перитонеальних макрофагів; Б - бактерицидна активність перитонеальних макрофагів; В - цитотоксична активність спленоцитів. Статистичні дані подані як $M \pm m$ ($n=7-10$). * $p < 0,05$ – порівняно з групою

нормальних мишей, що отримували фіз.розчин; # $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ; + $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і ККМ; ^ $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і МСКт; ~ $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ, ККМ та МСКт.

Клітини В-ряду досить чутливі до ЦФ, і відновлення антитілогенезу після введення ЦФ затримується. Кількість АУК в селезінці мишей на 12 день після застосування ЦФ була достовірно зниженою в 1,8 рази ($p < 0,05$), і жоден із клітинних препаратів, крім МСКт, не нормалізував їх рівня. За умов введення МСКт спостерігалось суттєве збільшення кількості АУК у селезінці в 1,8 рази в порівнянні з групою тварин після ЦФ (рис.7, А), що свідчить про ефективність цього клітинного трансплантату для відновлення гуморальної імунної відповіді.

Активність РГСТ у мишей у визначені терміни є нормальною. Ймовірно, механізми регенерації ГСТ у цей час уже повністю відновлені, і введення МСК не впливає на цю реакцію. Протилежний ефект мав місце при формуванні реакції ГСТ, що була суттєво підвищена після котрансплантації в 1,6 рази ($p < 0,05$) (рис. 7, Б). Трансплантовані ККМ не чинили впливу на функціональну активність імунної системи.

В результаті введення ККМа та котрансплантації спостерігався виражений пригнічуючий вплив на РБТЛІ (в 10,4 і 4,3 рази відповідно) (рис. 7, В), що після

затосування ЦФ та ККМ, МСКт не мала достовірних відмін від норми.

Дані демонструють не просту сумачію властивостей окремих клітинних препаратів МСКт та ГСК, а набуття індивідуальних особливостей реакцій імунної системи при котрансплантації.

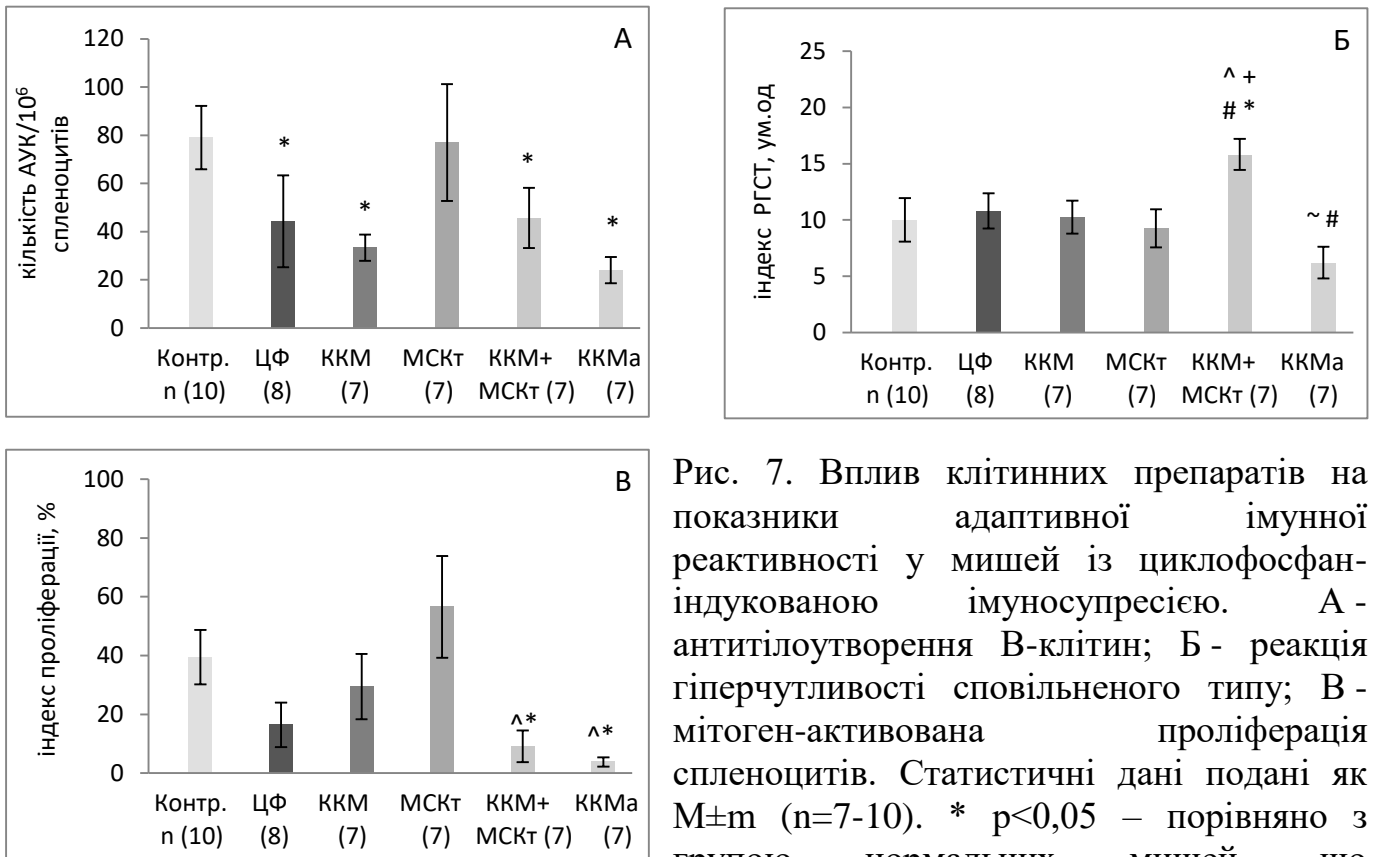


Рис. 7. Вплив клітинних препаратів на показники адаптивної імунної реактивності у мишей із циклофосфан-індукованою імуносупресією. А - антитілоутворення В-клітин; Б - реакція гіперчутливості сповільненого типу; В - мітоген-активована проліферація спленоцитів. Статистичні дані подані як $M \pm m$ (n=7-10). * $p < 0,05$ – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фіз.розчин; # $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ; + $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і ККМ; ^ $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і МСКт; ~ $p < 0,05$ – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ, ККМ та МСКт.

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

Таким чином, можна виділити наступні положення. При циклофосфановому гемоімунодефіциті:

- всі типи трансплантованих клітин істотно впливають на регенерацію імунної та кровотворної систем;

- клітини проявляють властиву їм дію, яка характеризується певним спектром змін в імунній та кровотворній системах;

- вплив котрансплантації ККМ і МСКт не є простою сумачією дії клітин, а набуває особливостей, як притаманних окремим клітинам, так і появою нових характеристик, і обумовлений, мабуть, розвитком складних кооперативних процесів у регенеруючому організмі;

- інтенсивний, часто вирішальний, вплив на активність клітин надає контактна взаємодія ККМ і МСКт;

- характерною дією ККМ можна вважати позитивний вплив на регенерацію еритропоезу;

- активовані МСКт ККМ не відновлюють гематологічні показники, однак нормалізують бактерицидну активність перитонеальних макрофагів, мають виражений негативний вплив на РБТЛ, природну цитотоксичність, збільшення кількості клітин у апоптозі;

- МСКт мають виражений позитивний вплив на поглинальну активність макрофагів, бактерицидність в НСТ-тесті, природну цитотоксичність, РБТЛ і формування АУК;

- дія котрансплантації ККМ і МСКт реалізується у вигляді кількох складових: стимуляція гематологічних показників (як при дії ККМ), пригнічення активності РБТЛ (як при впливі ККМа), нормалізація клітинності лімфоїдних органів (як при дії МСКт), стимуляція формування РГСТ, яка є рисою, притаманною саме котрансплантації.

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

ВИСНОВКИ

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

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

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

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

4. Встановлено, що трансплантація ККМ призводить до регенерації еритроїдного кровотворення з нормалізацією зниженого показника гематокриту, концентрації гемоглобіну та збільшенням кількості ретикулоцитів у крові в 2,2

рази. Нормалізує клітинність селезінки до рівня контрольних тварин та бактерицидну активність перитонеальних макрофагів, що була підвищена в 2,9 рази при дії ЦФ.

5. Показано, що на відміну від ККМ, трансплантація ККМ, активованих контактною взаємодією з МСКт, тваринам з імуносупресією спричиняє нормалізацію кількості клітин у кістковому мозку, селезінці і лімфатичних вузлах. Викликає підвищення проліферативної активності клітин лімфатичних вузлів (в 1,4 рази в G2/M+S фазах) порівняно з контролем. Нормалізує підвищену в 2,9 рази при дії ЦФ бактерицидну активність перитонеальних макрофагів. Знижує природну цитотоксичність спленоцитів в 2,9 рази та рівень РБТЛ спленоцитів в 10,4 рази порівняно з контролем.

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

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

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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

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

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

4. Nikolsky IS, Nikolskaya VV, Demchenko DL, Taranukha LI, Semenova Y-MA, Serebrovska TV. Effects of multipotent stromal cell transplantation on mice immune system under conditions of its regeneration. *Fiziol. Zh.* 2018; 64(4):3-11.

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

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

6. Нікольський ІС, Нікольська ВВ, Демченко ДЛ, Зубов ДО. ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України». Спосіб потенціювання індукції диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин *in vitro* за остеогенним напрямком. Патент України UA 106592 U.2016 квіт. 26. *(Особистий внесок здобувача: виконання культуральних досліджень, проведення патентного пошуку, опис матеріалу).*

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

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

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

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

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

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

АНОТАЦІЯ

Демченко Д. Л. Міжклітинна взаємодія як механізм впливу на імунобіологічну та регенеративну активність гемопоетичних і мультипотентних стромальних клітин тимуса. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.09 – імунологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2021.

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

Виявлено спорідненість мембранних рецепторів МСКт та диференційованих з них стеобластів і адипоцитів з лімфоїдними клітинами різного походження, а саме тимоцитами, спленоцитами, клітинами лімфовузлів та кісткового мозку.

Вперше показано, що експозиція МСКт і тимоцитів, але не клітин кісткового мозку (ККМ), призводить до потенціювання ідукції диференціювання МСКт по остеогенному напрямку у відповідному диференціовальному середовищі.

З використанням оптимізованої моделі циклофосфанового імунодефіциту продемонстровано виражений стимулюючий ефект МСКт на відновлення лімфоїдних органів та формування імунологічних реакцій, тоді як ККМ більшою мірою активуються на регенерацію еритропоезу, що проявляється нормалізацією показників гематокриту та гемоглобіну і підвищенням кількості ретикулоцитів в крові. ККМ, що були у передінкубації з МСКт, цю здатність втрачають, однак, виражено активуються в напрямку дії на імунну систему, що проявляється відновленням лімфоїдних органів, бактерицидної активності, супресією проліферації *in vitro*, що характерно МСКт і може пояснюватись впливом контактної взаємодії. Ефекти котрансплантації ККМ і МСКт реалізуються у вигляді кількох складових: стимуляції відновлення гематологічних показників (як при дії окремо ККМ), нормалізації клітинних показників лімфоїдних органів (як при дії МСКт), пригнічення активності РБТЛ (як при дії активованих ККМ) та стимуляції формування РГСТ, що є проявом впливу, притаманного саме котрансплантації.

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

АННОТАЦИЯ

Демченко Д. Л. Межклеточное взаимодействие как механизм влияния на иммунобиологическую и регенеративную активность гемопоэтических и мультипотентных стромальных клеток тимуса. – Квалификационная научная работа на правах рукописи. Диссертация на соискание ученой степени кандидата

биологических наук по специальности 03.00.09 – иммунология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2021.

Диссертационная работа посвящена исследованию влияния межклеточного взаимодействия на иммунобиологическую и регенеративную активность гемопоэтических клеток и мультипотентных стромальных клеток тимуса (МСКт). Установлено, что предварительное контактное взаимодействие предоставляет клеточным трансплантатам новых иммунокорректирующих свойств.

Установлено родство мембранных рецепторов МСКт и дифференцированных из них стеобластов и адипоцитов с лимфоидными клетками различного происхождения, а именно тимоцитами, спленоцитами, клетками лимфоузлов и костного мозга.

Впервые показано, что экспозиция МСКт и тимоцитов, но не клеток костного мозга (ККМ), приводит к потенцированию идукции дифференцировки МСКт в остеогенном направлении в соответствующей дифференцирующей среде.

С использованием оптимизированной модели циклофосфанового иммунодефицита продемонстрировано выраженный стимулирующий эффект МСКт на восстановление лимфоидных органов и формирование иммунологических реакций, тогда как ККМ в большей степени активируются на регенерацию эритропоэза, что проявляется нормализацией показателей гематокрита и гемоглобина и повышением количества ретикулоцитов в крови. ККМ, что были в прединкубации с МСКт, эту способность утрачивают, однако, выражено активируются в направлении воздействия на иммунную систему, что проявляется восстановлением лимфоидных органов, бактерицидной активности, супрессией пролиферации *in vitro*, что характерно МСКт и может объясняться влиянием контактного взаимодействия. Эффекты котрансплантации ККМ и МСКт реализуются в виде нескольких составляющих: стимуляции восстановления гематологических показателей (как при воздействии отдельно ККМ), нормализации клеточных показателей лимфоидных органов (как при действии МСКт), подавлении активности РБТЛ (как при действии ККМа) и стимуляции формирования РГЗТ, что является проявлением влияния, присущего именно котрансплантации.

Ключевые слова: клетки костного мозга, котрансплантация клеток, межклеточное взаимодействие, мультипотентные стромальные клетки тимуса, регенерация иммунной системы.

SUMMARY

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

The dissertation is devoted to the study of the influence of intercellular interaction on the immunobiological and regenerative activity of hematopoietic cells and multipotent

thymic stromal cells (tMSCs). It was identified that the former physical interaction conferred new immunocorrective properties to cell grafts.

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

The physical interaction of thymic stromal cells with thymocytes but not with bone marrow cells (BMCs) after 24 hours incubation potentiates the osteogenic differentiation and has no effect on the adipogenic cells maturation.

tMSCs transplantation had a stimulating effect on lymphoid organs and on the functional activity of innate and adaptive immunity in mice after cyclophosphamide treatment: normalization increased by 2,9 times bactericidal activity of peritoneal macrophages, stimulated the natural cytotoxicity of splenocytes by 2,7 times and stimulation of normal phagocytic activity of peritoneal macrophages by 1,9 times and cytotoxic activity of splenocyte by 3 times, increase in the number of antibody-producing cells in the spleen by 1,8 times compared with the group of mice receiving CP.

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

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

The effects of co-transplantation of BMCs and tMSCs are manifested in several ways: stimulation recovery of hematological parameters - normalized the previous reduced concentration of hemoglobin and hematocrit in the blood (as the effect of separate BMCs), normalization of cell number of lymphoid organs with an increase in the proliferation index of lymph node cells by 1,4 times compared to control (as the impact of tMSCs); had suppressive effect on the blast transformation reaction induced by phytohemagglutinin by 4,3 times (as the impact of aBMCs) and stimulation of DTHR by 1,6 times the effects of co-transplantation.

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

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

ГСК	гемопоетичні стовбурові клітини
МСК	мультипотентні стромальні клітини
КМ	кістковий мозок
МСКТ	мультипотентні стромальні клітини тимуса
ФЛР	фібробласто-лімфоцитарні розетки
АУК	антитілоутворювальні клітини
РГСТ	реакція гіперчутливості сповільненого типу
РБТЛ	реакція бласттрансформації лімфоцитів
ККМ	клітини кісткового мозку
ККМа	клітини кісткового мозку, активовані попереднім контактом з мультипотентними стромальними клітинами тимуса
ЦФ	циклофосфан
КТ	клітини тимуса