

УДК 57.085.23:611.018.46:611.018.26
doi:10.22494/cot.v5i2.77

Деякі біологічні властивості мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку та жирової тканини мишей лінії FVB/N



Родніченко А. Є.

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», Київ, Україна

e-mail: arodnichenko@ukr.net

РЕЗЮМЕ

Для клітинної терапії пошкоджень різного генезу використовуються мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК). Найбільш широко застосовуються ММСК з двох джерел: кісткового мозку та жирової тканини.

МЕТОЮ РОБОТИ було провести порівняльну оцінку біологічних властивостей ММСК кісткового мозку та жирової тканини мишей.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Культуру ММСК отримували з кісткового мозку та жирової тканини самців мишей лінії FVB/N (генотип H-2q) віком 6 місяців згідно стандартних протоколів. Проводили фенотипування, спрямоване остеогенне та адипогенне диференціювання, визначення імуномодуючих властивостей *in vitro* отриманих культур клітин.

РЕЗУЛЬТАТИ. Культивовані ММСК кісткового мозку та жирової тканини експресують характерні для ММСК маркери (CD44, CD73, CD90 та Sca-1). Відмінною особливістю культур клітин кісткового мозку 2-го пасажу був високий рівень експресії гемопоетичних маркерів CD45 і CD117. ММСК з обох тканинних джерел здатні до диференціації в остеогенному та адипогенному напрямках. Водночас, були виявлені відмінності при диференціації в остеогенному напрямку – ММСК-ЖТ володіли меншим остеогенним потенціалом. ММСК проявляють інгібуючий вплив на мітоген-індуковану проліферацію спленоцитів *in vitro*, вираженість якого не залежить від тканинного походження ММСК з істотним інгібування мітоген-індукованого проліферативного потенціалу спленоцитів при додаванні високої дози ММСК.

ВИСНОВКИ. ММСК кісткового мозку та жирової тканини експресують подібний рівень поверхневих маркерів, які є характерними для клітин з мультипотентними властивостями; здатні диференціюватися в остео- та адипогенному напрямку з відмінностями у ступені мінералізації позаклітинного матриксу; незалежно від тканинного походження виявляють імуномодуючу дію *in vitro*.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини; кістковий мозок; жирова тканина; направлене диференціювання клітин; імуномодуляція

Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини – примітивні попередники, які дають початок різним типам сполучної тканини, загальна риса яких є в тому, що в процесі ембріонального розвитку вони утворюються з мезенхіми. На сьогоднішній день вони виявлені в багатьох органах і тканинах організму, таких як кістковий мозок [1], жирова тканина [2], волоссяний фолікул [3], плацента [4], пуповинна кров [5,6], синовіальна оболонка [7], окістя [8], скелетні м'язи [9], шкіра [10], периферична кров [11].

Завдяки своїй доступності, простоті культивування, високому проліферативному потенціалу, здатності диференціюватись у тканини мезенхімального та немезенхімального походження, трофічному впливу на ушкоджені органи та тканини, ММСК є перспективним біоматеріалом у регенеративній медицині. Так, в експерименті та клініці показана їх ефективність при лікуванні ряду захворювань: тривало незагоїні рани, інфаркт міокарда, пошкодження кісткової тканини, діабет, хронічна ішемія нижніх кінцівок тощо [12, 13].

Досліджується можливість використання ММСК для лікування аутоімунних захворювань, зниження ризику розвитку реакції «трансплантат проти хазяїна» та підвищення виживання трансплантованого матеріалу завдяки їх імуномодуючим властивостям [5, 14-17].

Слід зазначити, що до теперішнього часу найбільш широко використовуються ММСК з двох тканинних джерел: кісткового мозку та жирової тканини. З моменту ідентифікації стовбурових клітин кісткового мозку [18] вони стали стандартом у тканинній інженерії та регенеративній медицині. Що стосується жирової тканини – вперше виділення зрілих адипоцитів та клітин попередників жирової тканини щурів було описане Rodbell [19]. В подальшому процедура виділення клітин жирової тканини була модифікована [20, 21].

На даний час виявлені як спільні, так і відмінні риси цих типів клітин. Так, показано, що ММСК кісткового мозку та жирової тканини експресують подібний набір поверхневих антигенів, ростуть як адгезуюча популяція в мінімальних по складу поживних середовищах та здатні до мультилінійної диференціації [22, 23]. В той же час ці клітини мають певні відмінності в потенціалі до проліферації та диференціації. Є дані, які вказують на те, що на відміну від ММСК кісткового мозку, ММСК жирової тканини мають вищий проліферативний потенціал. Час подвоєння популяції у логарифмічній фазі росту складає від 40 до 120 годин (в залежності від віку донора, типу та локалізації жирової тканини, умов культивування) [24, 25]. ММСК жирової тканини зберігають довжину теломер протягом довготривалого культивування, в той же час не відомо, чи зберігається активність теломерази на постійному рівні, чи зменшується з пасажами [26]. Разом з тим, є дані, що вказують на відсутність експресії теломерази ММСК жирової тканини [27].

Як відомо, аспірація кісткового мозку є болючою процедурою, крім того, вихід ММСК низький – вони представляють дуже невелику фракцію (0,001-0,01 %) [28]. Для порівняння, з 1 г жирової тканини можна виділити в середньому $0,5-2,0 \cdot 10^6$ клітин SVF (stromal vascular fraction), що дає вихід 1-10 % стовбурових клітин [29-30]. Високий вміст ММСК у жировій тканині виключає необхідність довгострокового культивування *in vitro*, що в свою чергу знижує ризик хромосомних аномалій. Такі властивості роблять ММСК жирової тканини привабливим інструментом для клінічного застосування. [31-33].

Тому особливий інтерес представляє порівняння біологічних властивостей ММСК з різних джерел. Метою даної роботи було провести порівняльний аналіз експресії поверхневих маркерів, здатності до остеогенної та адипогенної диференціації, імуномодуючих властивостей ММСК кісткового мозку та жирової тканини мишей лінії FVB.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Культуру ММСК отримували з клітин кісткового мозку та жирової тканини самців мишей лінії FVB/N (генотип Н-2^q) віком 6 місяців. Тварини розводки ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН». Для евтаназії мишей застосовували передозування ефіру для наркозу. Всі роботи з експериментальними тваринами виконували з дотриманням вітчизняного і міжнародного законодавства та принципів біоетики [34]. Виділення, культивування та направлене диференціювання ММСК проводили згідно стандартних протоколів [35]. Використовували клітини 2 пасажу, приналежність яких до ММСК була визначена за відповідним фенотипом, здатності диференціюватися в остеогенному та адипогенному напрямках [36].

Первинну суспензію клітин кісткового мозку отримували шляхом промивання діафізів стегнових кісток мишей поживним середовищем RPMI-1640 з наступним перенесенням суспензії в культуральні флакони з площею поверхні 25 см². Культивування проводили у поживному середовищі RPMI-1640, яке містило 10 % СЕК, 2 мМ L-глутаміну, 100 МОд/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину.

ММСК жирової тканини отримували шляхом подрібнення жирової тканини мишей в 0,1 % розчині колагенази 1А. Отриману суміш

залишали на 2 години при +37 °С, після чого ресуспендували, додавали однаковий об'єм повного поживного середовища та центрифугували 10 хв. при 1,5 тис. об/хв. Відбирали надосадову рідину, утворений осад ресуспендували в поживному середовищі і переносили в культуральні флакони. Культивування проводили в поживному середовищі DMEM/F12, яке містило 10 % СЕК, 2 мМ L-глутаміну, 100 МОд/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину.

Культивування проводили за стандартних умов: в CO₂-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з концентрацією CO₂ 5 % при температурі +37 °С. Культури субкультивували при досягненні 80 % конфлуентності моношару.

Фенотипування отриманих культур клітин за маркерами CD44, CD45, CD73, CD90, CD117 та Sca-1 проводили з використанням моноклональних антитіл до мембранних антигенів миші, кон'югованих з флуорохромами, в робочій концентрації 0,5 мкг/мл (*Becton Dickinson*, США). Як контроль використано зразки клітин без внесення антитіл (unstaining control). Також визначали рівень флуоресценції у зразках з додаванням кожного з моноклональних антитіл окремо (single staining sample). Вимірювання проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (*Becton Dickinson*, США) за допомогою програми BD FACS Diva 6.1. Накладення гістограм проводили за допомогою програми CytoLogic v.1.2.1.

Для спрямованого остеогенного диференціювання досліджувані клітини культивували у остеоіндуктивному середовищі, яке складалося з середовища DMEM low glucose (1 г/л глюкози), що містило 10 % сироватки ембріонів корів (СЕК), 0,05 мМ L-аскорбінової кислоти 2-фосфату, 100 нМ дексаметазону та 10 мМ β-гліцерофосфату (все – *Sigma*, США). Заміну остеоіндуктивного середовища проводили кожні 3 доби. Через 21 добу моношар клітин фіксували 10 % охолодженим розчином параформальдегіду та фарбували 2 % розчином алізаринового червоного Alizarin Red S (*Sigma*, США) для виявлення відкладень солей кальцію в позаклітинному матриці [37].

Напівкількісний аналіз ступеня мінералізації фарбованих алізариновим червоним культур проводили колориметричним методом за С. Gregory [38]. Барвник, що зв'язався з кальцифікованим матриком, екстрагували оцтовою кислотою, відновлювали значення рН до 4,1 за допомогою гідроксиду амонію. Визначали показник оптичної щільності на мікропланшетному фотометрі LabSystems Multiskan EX (*Thermo Scientific*, США) при довжині хвилі 405 нм.

Для спрямованого адипогенного диференціювання досліджувані клітини культивували у адипоіндуктивному середовищі, яке складалося з середовища DMEM high glucose (4,5 г/л глюкози) (*Sigma*, США), що містило 10 % СЕК, 1 мкМ дексаметазону, 200 мкМ індометацину, та 500 мкМ ізобутилметилксантину та 5 мкг/мл інсуліну (*Sigma*, США). Заміну адипоіндуктивного середовища проводили кожні 3 доби. Через 14 діб клітини фіксували 10 % охолодженим розчином параформальдегіду та фарбували розчином масляного червоного (Oil Red O) для виявлення ліпідних включень [39]. Проводили підрахунок клітин, що містили та не містили ліпідні включення в 10 випадкових полях зору.

Для визначення імуномодуючих властивостей ММСК кісткового мозку та жирової тканини *in vitro* проводили сумісне культивування ММСК із сингенними спленоцитами, стимульованими Т-клітинним мітогеном фітогемаглютиніном (ФГА). ММСК в концентрації $1,5 \cdot 10^4$, $3,0 \cdot 10^4$ та $6,0 \cdot 10^4$ клітин вносили до лунки 96-лункового планшету у повному поживному середовищі та інкубували дві години для адгезії клітин. Через дві години в лунки додавали по $1 \cdot 10^6$ спленоцитів та мітоген ФГА в концентрації 0,01 мг/мл. Проліферативну активність спленоцитів без та з додаванням ММСК оцінювали через 72 год культивування [40]. За дві години до кінця інкубації в кожну лунку вносили по 0,01 мл 0,5 % розчину 3-(4,5-диметилтіазол)-2,5-дифенілтетразол бромід (*Sigma*, США). Через дві години інкубації при 37 °С утворені кристали формазану розчиняли у 0,15 мл 0,04 М розчину HCl у ізопропіловому спирті та вимірювали оптичну щільність надосаду на мікропланшетному фотометрі LabSystems Multiskan EX (*Thermo*

Таблиця 1. Фенотиповий аналіз поверхневих маркерів ММСК різного тканинного походження у мишей лінії FVB, M ± m.

ДЖЕРЕЛО ММСК	CD44, %	Sca-1, %	CD73, %	CD90, %	CD45, %	CD117, %
ММСК кісткового мозку	97,8 ± 0,7	87,7 ± 7,5	10,9 ± 0,4	93,6 ± 1,4	60,9 ± 18,4	95,5 ± 0,8
ММСК жирової тканини	93,9 ± 0,7	88,2 ± 10,5	15,0 ± 7,9	98,9 ± 0,2	1,7 ± 1,2	4,6 ± 0,1

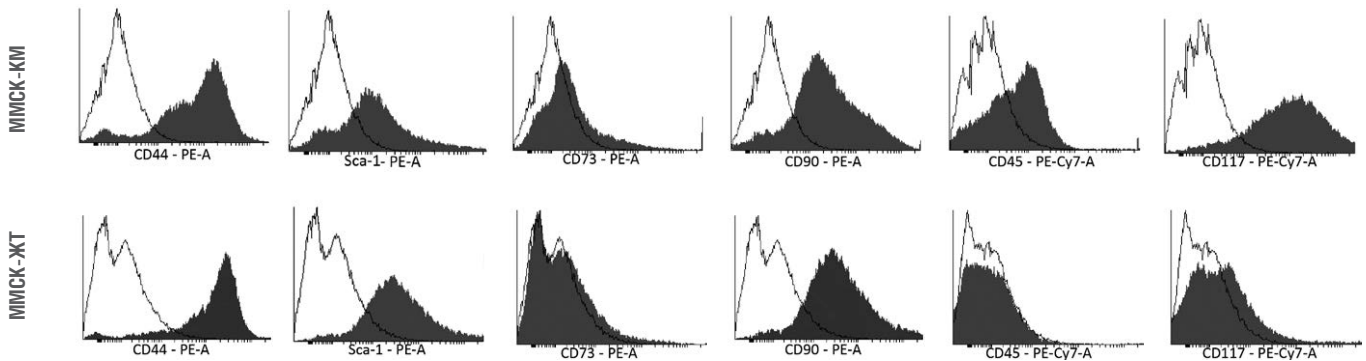


Рис. 1. Гістограми експресії поверхневих маркерів CD44, Sca-1, CD73, CD90, CD45, CD117 в культурах клітин кісткового мозку та жирової тканини мишей. Прозора гістограма – контрольні зразки без внесення антитіл, темна – рівень флюоресценції у зразку з додаванням моноклональних антитіл.

Scientific, США) при довжині хвилі 492 нм. Результати подавали у вигляді оптичної щільності та індексу проліферації (ІП) в умовних одиницях:

ІП = оптична щільність мітогенактивованих культур спленоцитів + ММСК / оптична щільність культур спленоцитів без ММСК.

Контрольний ІП = оптична щільність мітогенактивованих культур спленоцитів / оптична щільність культур спленоцитів без мітогену.

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою методів параметричної (t-критерій Стьюдента) статистики [41]. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ФЕНОТИПОВА ХАРАКТЕРИСТИКА ММСК КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ. Міжнародне товариство клітинної терапії (International Society for Cellular Therapy) запропонувало мінімальні фенотипові та функціональні критерії для визначення ММСК, що передбачають обов'язкове дослідження експресії маркерів CD73 (екто-5'-нуклеотидаза, SH3 або SH4), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2 або ендогліпін). Слід зазначити, що жодна з цих молекул не є строго специфічною для ММСК. Тому для ідентифікації ММСК необхідно показати відсутність кровотворних клітин: маркерів моноцитів та макрофагів (CD11b або CD14), маркерів ранніх (попередників) гемопоетичних клітин та ендотеліальних клітин (CD34), лейкоцитарного маркеру (CD45), маркеру В-клітин (CD19 або CD79a) та HLA-DR [36]. Разом з тим, кожна наукова група використовує свій набір антигенів, які вважає найбільш специфічними, або більш відповідним та зручним для поставленої мети.

В наших дослідженнях ми проводили порівняльний аналіз експресії таких поверхневих маркерів: CD44 (Pgp1 – рецептор глікопротеїну/гіалуронату, який стійко експресується недиференційованими ММСК), CD45 (панлейкоцитарний маркер), CD73 (екто-5'-нуклеотидаза), CD90 (диференціальний антиген Т-лімфоцитів, який експресується проліферуючими ММСК, рівень експресії знижується на початку остеогенної диференціації), CD117 (c-kit, рецептор фактору росту стовбурових клітин) та Sca-1 (антиген стовбурових клітин) в культурі клітин кісткового мозку та жирової тканини.

Фенотиповий аналіз виявив подібний профіль експресії поверхневих маркерів, які є характерними для стромальних клітин з мульти-

потентними властивостями. Так, на клітинах 2-го пасажу була виявлена експресія CD44, CD73, Sca-1 та CD90 антигенів (табл. 1, рис. 1). Слід зазначити, що стандартні методи не дозволяють одержати чисту культуру мишачих ММСК кісткового мозку. Культура клітин кісткового мозку мишей досить гетерогенна за клітинним складом внаслідок тривалого виживання гемопоетичних компонентів. Так, спостерігалися клітини з фібробластоподібною морфологією, великі розпластані клітини та округлі клітини невеликого розміру. На відміну від ММСК жирової тканини, на ММСК кісткового мозку зберігалася експресія гемопоетичних маркерів – CD45 та CD117. Культури ММСК жирової тканини, у порівнянні з ММСК-КМ, характеризуються морфологічно однорідним клітинним складом та більшою швидкістю проліферації. ММСК жирової тканини субкультивували у співвідношенні 1:3 та 1:5. Час досягнення культурою конфлуентного стану складав 5-7 та 7-10 днів відповідно. Тоді як культури клітин кісткового мозку субкультивували у співвідношенні 1:2 або 1:3 та час росту до конфлуентності складав 7-10 або 12-14 днів відповідно. Отже, наші дослідження підтвердили дані літератури стосовно подібної експресії поверхневих антигенів та відмінності в потенції до проліферації [22-25].

ОСОБЛИВОСТІ СПРЯМОВАНОГО ДИФЕРЕНЦЮВАННЯ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ. Однією з головних характеристик ММСК є здатність до диференціації в різні типи клітин сполучної тканини. Для з'ясування відмінностей біологічних властивостей ММСК ми визначили потенціал цих клітин до спрямованого диференціювання в двох ортодоксальних напрямках: остеогенному та адипогенному.

Перші ознаки впливу остеоіндуктивного середовища на культури ММСК з'явилися на 7-му добу культивування незалежно від тканинного походження. При аналізі диференціації клітин в остеогенному напрямку ММСК набували фенотип кісткової тканини: утворювали культуру з формуванням клітинних агрегатів, синтезували щільний позаклітинний матрикс, який підлягав кальцифікації. Слід зазначити, що мінералізація позаклітинного матриксу була більш виразна у вузлах кальцифікації, а також розповсюджувалася по всій площині культури. В наших дослідженнях було встановлено, що інтенсивність мінералізації культур ММСК кісткового мозку була вища, ніж у ММСК отриманих з жирової тканини $5,1 \pm 0,2$ ум. од. та $2,8 \pm 0,5$ ум. од. оптичної щільності, відповідно (рис. 2). Можливо це пов'язано з кількістю клітин, які експресують остеобласт-специфіч-

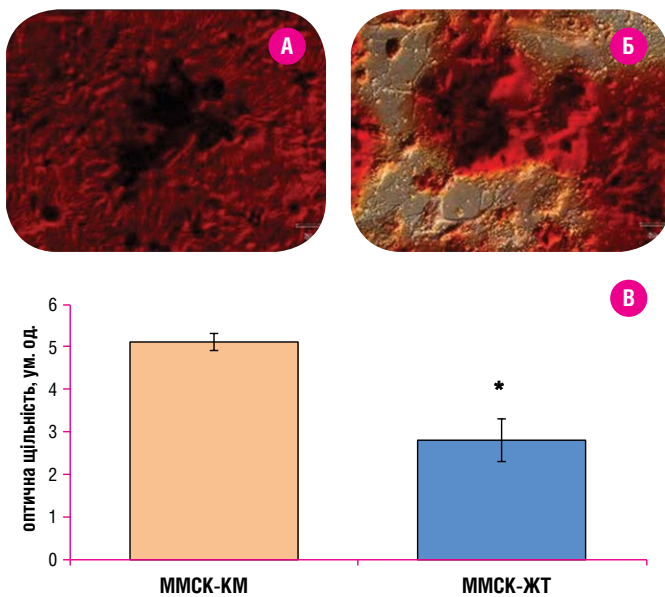


Рис. 2. Мікрофотографії культур MMCK-KM (А) і MMCK-ZH (Б) мишей, направлено диференційованих в остеогенному напрямку, фазовий контраст, $\times 400$; В – напівкількісний аналіз ступеня мінералізації культур MMCK-KM та MMCK-ZH (колориметричний метод).
Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно з MMCK кісткового мозку.

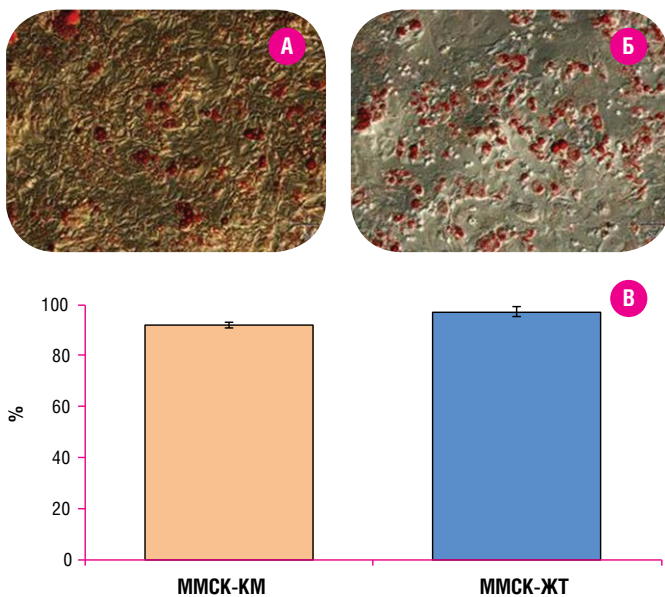


Рис. 3. Мікрофотографії культур MMCK-KM (А) і MMCK-ZH (Б) мишей, направлено диференційованих в адипогенному напрямку, фазовий контраст, $\times 200$; В – відносний вміст MMCK кісткового мозку та жирової тканини, які містили ліпідні вакуолі.

ні фактори транскрипції Runx2 (Runt-related transcription factor 2) та Dlx5 (Distal-Less Homeobox 5) [42]. Слід зазначити, що дослідження ми проводили на статевозрілих самцях. Є роботи, які вказують на те, що 17- β естрадіол стимулює експресію генів остеогенезу Cbfa1, остеокальцину, підсилює активність лужної фосфатази, синтез позаклітинного матриксу та його мінералізацію [43]. Можна припустити, що істотні зміни ступеня мінералізації позаклітинного матриксу в залежності від гендерних особливостей спостерігаються саме у MMCK-ZH.

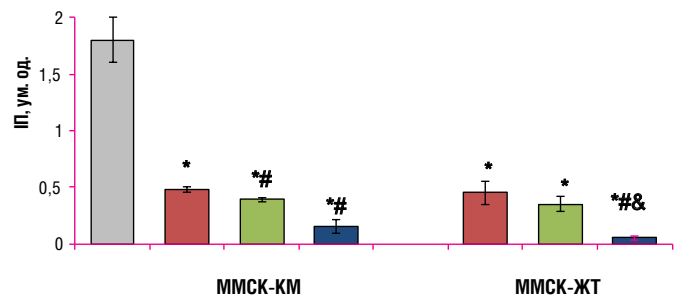


Рис. 4. Імуномодулюючий вплив MMCK-KM та MMCK-ZH на мітоген-індуковану проліферацію спленоцитів мишей (ІП).
Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з ІП спленоцитів при сумісному культивуванні $1,5 \cdot 10^4$ MMCK; & – $p < 0,05$ порівняно з ІП спленоцитів при сумісному культивуванні $3,0 \cdot 10^4$ MMCK.

При культивуванні в адипогенному напрямку в клітинах виявляли ліпідні включення, які забарвлювалися масляним червоном. Слід зазначити, що перші ліпідні вакуолі в культурах MMCK, незалежно від джерела, з'являлися через добу після додавання індукційного середовища. В наших дослідженнях не було виявлено різниці в кількості клітин, які містили ліпідні включення. Так, для MMCK кісткового мозку частка таких клітин становила $92,0 \pm 1,0$ %, для MMCK жирової тканини – $97,0 \pm 2,0$ % (рис. 3).

Отримані дані свідчать про те, що за умов спрямованого диференціювання в двох ортодоксальних напрямках відмінності спостерігалися лише у диференціюванні MMCK в остеогенному напрямку.

ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОСУПРЕСИВНОГО ВПЛИВУ MMCK КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ В РЕАКЦІЇ БЛАСТТРАНСФОРМАЦІЇ ЛІМФОЦИТІВ

Однією з властивостей MMCK різного тканинного походження є їх імуномодулююча дія, яка може бути оцінена по інгібуванню мітоген-стимульованої проліферації лімфоцитів в реакції бласттрансформації. Аналіз даних літератури показав, що при міжклітинній взаємодії MMCK та різних субпопуляцій імунокомпетентних клітин задіяні механізми як контактного, так і опосередкованого взаємного впливу. Показано, що при сумісному культивуванні з MMCK відбувається зниження проліферативної активності Т-, В- та НК-клітин, індукція анергії та апоптозу Т-клітин, пригнічення дозрівання дендритних клітин, модуляція продукції цитокінів імунокомпетентними клітинами [44–46]. В наших дослідженнях встановлено, що при активації спленоцитів дорослих інтактних мишей мітогеном в присутності MMCK кісткового мозку їх проліферативний потенціал різко зменшується (рис. 4). При цьому міра інгібування проліферації спленоцитів MMCK, які були отримані з кісткового мозку мишей, залежала від їх кількості. Із збільшенням дози MMCK від $1,5 \cdot 10^4$ до $6,0 \cdot 10^4$ при сумісному культивуванні з мітоген-стимульованими спленоцитами проліферативний індекс знижувався на 73 % та 92 % ($p < 0,05$) відповідно. Слід зазначити, що міра пригнічення проліферації спленоцитів зростала при збільшенні кількості MMCK незалежно від тканинного походження. Так, при додаванні $6,0 \cdot 10^4$ MMCK-KM спостерігалась тенденція до зменшення ІП спленоцитів в 2,6 разу порівняно з дозою $3,0 \cdot 10^4$ MMCK. Слід зазначити, що така закономірність була виявлена і при додаванні MMCK-ZH, але з більш виразним інгібуючим впливом на проліферативний потенціал спленоцитів: при дозі $6,0 \cdot 10^4$ – в 7 разів більше порівняно з дозою $3,0 \cdot 10^4$ ($p < 0,05$). Отже, імуномодулюючий вплив MMCK на мітоген-індуковану проліферацію спленоцитів миші не залежить від походження тканини.

Можна стверджувати, що MMCK незалежно від тканинного походження здатні проявляти дозозалежну інгібуючу дію на проліферативний потенціал сингенних спленоцитів мишей з істотним інгібуванням при сумісному культивуванні високої дози MMCK.

ВИСНОВКИ

1. **Культивовані ММСК кісткового мозку та жирової тканини мишей 2-го пасажу експресують характерні для ММСК маркери. Відмінною особливістю культур клітин кісткового мозку був високий рівень експресії гемопоетичних маркерів CD45 и CD117.**
2. **ММСК з обох тканинних джерел здатні до диференціації в остеогенному та адипогенному напрямках. Під час остеогенної диференціації відбувалась зміна морфології клітин, вони активно синтезували та мінералізували позаклітинний матрикс, утворювали клітинні агрегати. Напівкількісний аналіз ступеня мінералізації позаклітинного матриксу виявив, що ММСК-КМ мають більш високий остеогенний потенціал порівняно з ММСК-ЖТ. ММСК з двох джерел проявляли характерні риси адипогенного диференціювання: утворення жирових включень, які з часом перебування в культурі збільшувались та зливались.**
3. **ММСК проявляють інгібуючий вплив на мітоген-індуковану проліферацію спленоцитів *in vitro*, вираженість якого не залежить від тканинного походження ММСК. Була виявлена залежність ступеня інгібування проліферативної активності спленоцитів від співвідношення ММСК до кількості спленоцитів.**

ММСК кісткового мозку та жирової тканини є кандидатами для застосування у регенеративній медицині. Дослідження на тваринах біологічних властивостей ММСК різного походження та механізмів, які лежать в основі їх імуномодуючої дії, розширюють уявлення щодо характеристик даного типу клітин з метою оптимізації їх подальшого клінічного застосування та реалізації нових терапевтичних підходів.

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Friedenstein A. J.* The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen colonies / *A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhian, K. S. Lalykina* // Cell Tissue Kinet. – 1970. – Vol. 3. – P. 393-403.
2. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / *P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, et al.* // Tissue Eng. – 2001. – Vol. 7. – P. 211-226.
3. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells / *K. J. Fernandes, I. A. Fernandes, McKenzie, et al.* // Nat Cell Biol. – 2004. – Vol. 6. – P. 1082-1093.
4. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells / *Z. Miao, J. Jin, L. Chen, et al.* // Cell Biol Int. – 2006. – Vol. 30. – P. 681-687.
5. Мезенхимные стволовые клетки и иммунопатологические состояния организма / *П. В. Круглов, Е. А. Лохматова, В. Б. Климович, и др.* // Клеточная трансплантол. и тканевая инженерия. – 2006. – № 3. – С. 36-41.
6. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC / *R. Hass, C. Kasper, S. Bohm, et al.* // Cells Communication and Signalling. – 2011. – Vol. 9. – P. 1-14.
7. Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells / *D. Harvanová, T. Tóthová, M. Sarišský, et al.* // Folia Biol (Praha). – 2011. – Vol. 57, № 3. – P. 119-124.
8. *Ferretti C.* Periosteum derived stem cells for regenerative medicine proposals: Boosting current knowledge / *C. Ferretti, M. Mattioli-Belmonte* // World J Stem Cells. – 2014. – Vol. 6, № 3. – P. 266-277.
9. *Usas A.* Muscle-derived stem cells for tissue engineering and regenerative therapy / *A. Usas, J. Huard* // Biomaterials. – 2007. – Vol. 28, № 36. – P. 5401-5406.
10. Isolation of human dermis derived mesenchymal stem cells using explants culture method: expansion and phenotypical characterization / *J. R. Park, E. Kim, J. Janf, et al.* // Cell Tissue Bank. – 2015. – Vol. 16, № 2. – P. 209-218.
11. Bone marrow mesenchymal cells: how do they contribute to tissue repair and they really stem cells? / *Y. Kuroda, M. Kitada, S. Wakao, et al.* // Arch Immunol Ther Exp – 2011. – Vol. 59. – P. 369-378.
12. *Orlic D.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium / *D. Orlic, J. Kajstura, S. Cimenti* // Nature. – 2001. – Vol. 410. – P. 701-705.
13. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs) / *I. Sekiya, B. L. Larson, J. T. Vuorio, et al.* // J Bone Miner Res. – 2004. – Vol. 2. – P. 256-264.
14. *Bommie F.* The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in Prevention or Treatment of Excessive Scars / *F. Bommie, J. Sung-No* // Stem Cells International. – 2016. - Режим доступу: <https://dx.doi.org/10.1155/2016/6937976>
15. *Tyndall A.* Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks / *A. Tyndall, A. Uccelli* // Bone marrow transplantation. – 2009. – Vol. 43, № 11. – P. 821-828.
16. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions / *A. Corcione, F. Benvenuto, E. Ferretti, et al.* // Blood. – 2006. – Vol. 107, № 7. – P. 3670-372.
17. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells / *X. X. Jiang, Y. Zhang, B. Liu, et al.* // Blood. – 2005. – Vol. 105, № 10. – P. 4120-4126.
18. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues / *A. J. Friedenstein, K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova, et al.* // Transplantation. – 1968. – Vol. 6. – P. 230-247.
19. *Rodbell M.* Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis / *M. Rodbell* // J Biol Chem. – 1964. – Vol. 239. – P. 375-380.
20. *Cawthorn W. P.* Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future / *W. P. Cawthorn, E. L. Scheller, O. A. MacDougland* // J Lipid Res. – 2012. – Vol. 53. – P. 227-246.
21. *Tsuji W.* Adipose-derived stem cells: implications in tissue regeneration / *W. Tsuji, J. P. Rubin, K. G. Marra* // World J Stem Cells. – 2014. – Vol. 6. – P. 312-321.
22. *Meirelles L. D. S.* Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues / *L. D. S. Meirelles, P. C. Chagastelles, N. B. Nardi* // Journal of Cell Science. – 2006. – Vol. 119, № 11. – P. 2204-2213.
23. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue / *S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, et al.* // Stem Cells. – 2006. – Vol. 24, № 5. – P. 1294-1301.
24. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue / *R. Izadpanah, C. Trygg, B. Patel, et al.* // J Cell Biochem. – 2006. – Vol. 99. – P. 1285-1297.

25. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers / *J. B. Mitchell, K. McIntosh, S. Zvonic, et al.* // *Stem Cells*. – 2006. – **Vol. 24**. – P. 376-385.
26. Characterization and comparison of telomere length, telomerase and reverse transcriptase activity and gene expression in human mesenchymal stem cells and cancer cells of various origins / *B. G. Jeon, B. M. Kumar, E. J. Kang, et al.* // *Cell Tissue Res*. – 2011. – **Vol. 345**. – P. 149-161.
27. Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct anatomical sites / *P. C. Sachs, M. P. Francis, M. Zhao, et al.* // *Cell Tissue Res*. – 2012. – **Vol. 349**. – P. 505-515.
28. Lindroos B. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine / *B. Lindroos, R. Suuronen, S. Miettinen* // *Stem Cell Rev*. – 2011. – **Vol. 7**. – P. 269-291.
29. Comprehensive phenotype characterization of human adipose-derived stromal/stem cells and their subsets by a high throughput technology / *P. C. Bear, S. Kuci, M. Krause, et al.* // *Stem Cells Dev*. – 2013. – **Vol. 22**. – P. 330-339.
30. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / *M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, et al.* // *Science*. – 1999. – **Vol. 284**. – P. 143-147.
31. Potential Therapeutic Applications of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells / *D. Furno, G. Mannino, V. Cardile, et al.* // *Stem Cells and Development*. – 2016. – **Vol. 25, № 21**. – P. 1615-1628. – Режим доступу: <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0135>
32. Molecular physiognomies and applications of adipose-derived stem cells / *E. Uzbas, I. D. May, A. M. Parisi, et al.* // *Stem Cell Rev Rep*. – 2015. – **Vol. 2**. – P. 298-308.
33. *Baptista L. S.* Obesity and weight loss could alter the properties of adipose stem cells? / *L. S. Baptista, K. R. Silva, R. Borojevic* // *World J Stem Cells*. – 2015. – **Vol. 7, № 1**. – P. 165-173.
34. Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации / *Под общ. ред. Ю. Б. Белоусова* — М.: Российское общество клинических исследователей, 2005. — 156 с.
35. *Prockop D. J.* Mesenchymal stem cells: methods and protocols / *D. J. Prockop, D. G. Phinney, B. A. Bunnell*. – Totowa, NJ: Humana Press, 2008. – 192 p.
36. *Dominici M.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International society for cellular therapy position statement / *M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller* // *Cytotherapy*. – 2006. – **Vol. 8, № 4**. – P. 315-317.
37. A minimal common osteochondrocytic differentiation medium for the osteogenic and chondrogenic differentiation of bone marrow stromal cells in the construction of osteochondral graft / *J. Li, S. Mareddy, D. M. Tan, et al.* // *Tissue engineering Part A*. – 2009. – **Vol. 15, № 9**. – P. 2481-2490.
38. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction / *C. A. Gregory, W. G. Gunn, A. Peister, et al.* // *Analytical biochemistry*. – 2004. – **Vol. 329**. – P. 77-84.
39. *Fernando A. A.* Isolation, culture, and differentiation potential of mouse marrow stromal cells / *A. A. Fernando, B. Dominique* // *Curr Prot Stem Cell Biol*. – 2008. – doi: 10.1002/9780470151808.sc02b03s7
40. *Mosman T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / *T. Mosman* // *J Immunol Methods*. – 1983. – **Vol. 65, № 1**. – P. 55-63.
41. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / *Г. Ф. Лакин*. – М.: Высшая школа, 1990. – 350 с.
42. *Pino A. M.* In osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis // *A. M. Pino, J. C. Rosen, R.J. Pablo* // *Biol Res*. – 2012. – **Vol. 45**. – P. 279-287.
43. *Hong L.* Modulations of 17-beta estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells // *L. Hong, A. Colpan, I. A. Peptan* // *Tissue Eng*. – 2006. – **Vol. 12, № 10**. – P. 2747-2753.
44. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli / *N. M. Di, C. Carlo-Stella, M. Magni, et al.* // *Blood*. – 2002. – **Vol. 99, № 10**. – P. 3838-3843.
45. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex / *K. Le Blanc, L. Tammik, D. Sundberg, et al.* // *Scand J Immunol*. – 2003. – **Vol. 57, № 1**. – P.11-20.
46. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing / *G. Chamberlain, J. Fox, B. Ashton, et al.* // *Stem Cells*. – 2007. – **Vol. 25, № 11**. – P. 2739-2749.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автор підтверджує відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 05.09.2017 р.

Прийнята до друку 30.11.2017 р.