

УДК: 616-089.843:612.419-018.4
doi:10.22494/cot.v6i2.89

Вплив трансплантації клітин кісткового мозку, індукованих контактом з мультипотентними стромальними клітинами тимуса, на імунну систему мишей в умовах її регенерації після введення циклофосфану



Демченко Д. Л.

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

e-mail: chekhdaria@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Досліджено вплив трансплантації сингенних клітин кісткового мозку (ККМ) після їх контакту *in vitro* з мультипотентними стромальними клітинами (МСК) тимуса на регенерацію пошкодженої циклофосфаном імунної системи мишей.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. МСК отримували з тимусів мишей лінії C57BL/6 методом експлантатів. Кістковий мозок отримували шляхом вимивання зі стегнової кістки. ККМ індукували протягом 2 годин на моношарі МСК тимуса. Імунодефіцит мишей моделювали введенням циклофосфану, після чого проводили трансплантацію клітин та оцінювали показники 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; реакцію гіперчутливості сповільненого типу; проліферативну і цитотоксичну активність природних кілерних лімфоцитів; поглинальну активність, рівень спонтанної та індукованої бактеріцидної активності перитонеальних макрофагів.

РЕЗУЛЬТАТИ. Показано, що на відміну від інтактних ККМ, клітини кісткового мозку, індуковані МСК тимуса, забезпечували підвищену спонтанну проліферативну активність лімфоцитів зі зменшенням кількості клітин лімфовузлів в G_0/G_1 фазі на 6,2 % і збільшенням кількості лімфоцитів у фазі S+ G_2/M на 28 % у порівнянні з групою мишей, що отримували циклофосфан, а також відновлення клітинності кісткового мозку, лімфатичних вузлів і селезінки. При цьому в лімфатичних вузлах зростала кількість клітин в апоптозі. Індуковані МСК клітини кісткового мозку проявляли виражений негативний вплив на природну цитотоксичність, знижуючи її показники в 3 рази в порівнянні з групою мишей, що отримували циклофосфан, і адаптивний імунітет: показники гіперчутливості сповільненого типу знижувались в 1,7 разу, кількість антитілоутворюючих клітин – в 1,8 разу. Регенерацію еритропоезу стимулювали інтактні ККМ, що проявлялось нормалізацією показників гематокриту та гемоглобіну і підвищенням кількості ретикулоцитів в крові в 2,2 разу, в порівнянні з групою мишей, що отримували циклофосфан.

ВИСНОВКИ. Трансплантовані ККМ покращують еритропоез у мишей після введення циклофосфану, а клітини кісткового мозку, попередньо культивовані з МСК тимуса, цю здатність втрачають. ККМ після співкультивування виражено активуються в напрямку дії на імунну систему, що може пояснюватись впливом контактної взаємодії з МСК тимуса, які, як відомо, ефективно впливають на гемопоетичні клітини та володіють імуномодулюючими властивостями.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гемопоетичні клітини кісткового мозку; мультипотентні стромальні клітини тимуса; регенерація імунної системи; циклофосфановий імунодефіцит

Трансплантація клітин кісткового мозку, що містить гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК), застосовується для регенерації імунної та кровотворної систем. Історично, саме трансплантація кісткового мозку була першим методом трансплантації ГСК.

ГСК – це родоначальні клітини, які, головним чином, перебувають у спеціалізованих «нішах» кісткового мозку в умовах контактної взаємодії з мезенхімальними мультипотентними стромальними клітинами (МСК) і їх похідними [1]. Вплив мікрооточення забезпечує реалізацію закладених в ГСК програм самопідтримки, поліпотентності та проліферації [2]. Це дозволяє виводити необхідну кількість клітин в диференціювання за різними напрямками при збереженні константної кількості ГСК, функціонування яких необхідне для нормального гемопоезу. Відомо, що мультипотентні стромальні клітини є основою кісткомозкових ніш ГСК і в значній мірі визначають вищезазначені прояви активності ГСК та запобігають дії на них проапоптичних чинників [3].

Клітинна терапія наразі є перспективним напрямком регенеративної медицини, коли починають використовуватись необхідні для клінічних потреб типи клітин. Але з урахуванням часто незадовільної лікувальної ефективності та ризику ускладнень від існуючих підходів є необхідність розробки нових методів використання клітин, певним чином спрямованих на відновлення конкретних пошкоджень. Одним із нових підходів ефективної і направленої зміни властивостей ГСК може бути використання контактної взаємодії МСК і ГСК, яке призводить до суттєвої активації взаємодіючих клітин [4].

Отже, метою роботи було дослідити вплив трансплантації інтактних та індукованих контактом з МСК тимуса клітин кісткового мозку на регенерацію імунної системи та кровотворення у мишей після введення циклофосфану (ЦФ), що в подальшому може бути покладено в основу розробки більш ефективних методів відновлення імунної системи.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

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

Для вивчення впливу препаратів клітин на регенерацію імунної системи сингенних мишей було сформовано чотири групи: I (контрольна) нормальні тварини (n = 10), II – миші, що отримували ЦФ (n = 9), III – тварини, що отримували ЦФ і ККМ (n = 7) та IV – тварини, що отримували ЦФ і ККМ, індуковані попереднім 2-годинним контактом з МСК (іККМ) (n = 8).

Після евтаназії тварин методом цервікальної дислокації під ефірним наркозом в стерильних умовах виділяли тимуси та стегнові кістки, селезінки і брижові лімфатичні вузли та отримували периферичну кров. Клітини кісткового мозку отримували шляхом його вимивання із кісткомозкового каналу діафіза стегнової кістки поживним середовищем. МСК тимуса отримували від самців мишей лінії C57BL/6 віком 6-8 тижнів методом експлантатів за стандартною методикою [5]. Культивування проводили в поживному середовищі DMEM/F12, (Sigma, США) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 10 мМ L-глутаміну (Sigma, США) та по 100 МО/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину (Дарниця, Україна), в CO₂-інкубаторі (Jouan, Франція) при 37 оС і 5 % атмосфері CO₂. Субкультивування клітин у співвідношенні 1:3 проводили з використанням суміші розчинів 0,05 % трипсину (Біотестмед, Україна) та 0,02 % ЕДТА (Sigma, США). Отримані клітини прикріплювали до пластику, мали фібробластоподібну морфологію і утворювали колонії. При-

належність отриманих клітин до МСК додатково встановлювали за допомогою індукції їх лінійного диференціювання за остеогенним та адипогенним напрямками у спеціальних середовищах [6, 7, 8]. Використовували 4-5 пасаж клітин для індукції ККМ.

Для моделювання імунодефіциту мишам II, III і IV групи внутрішньоочеревинно одноразово вводили ЦФ у стандартній дозі 200 мг/кг; тваринам I групи вводили фізіологічний розчин. Через 2 години, враховуючи метаболізм ЦФ в організмі [9], виконували ін'єкцію 1·10⁶ ККМ або іККМ в об'ємі 0,1 мл середовища DMEM/F12 з додаванням 5 % мишиної сироватки в ретроорбітальний синус. Індуковані ККМ отримували протягом 2 годин інкубації ККМ на моношарі МСК тимуса. Потім збирали ККМ, що від'єднались від МСК тимуса легким піпетуванням. За тиждень мишей усіх груп імунізували шляхом внутрішньоочеревинного введення 1·10⁸ еритроцитів барана, через 4 дні проводили повторну ін'єкцію аналогічної кількості клітин в подушечку задньої лапи, і ще через добу оцінювали кількість антитілоутворюючих клітин методом локального гемолізу в гелі, вираженість гіперчутливості сповільненого типу за різницею маси дослідної та контрольної лап [10]. За зазначеною схемою імунізували і контрольних мишей. Таким чином, дослідження імунної системи тварин усіх груп проводили через 12 діб після введення циклофосфану, враховуючи динаміку розвитку його імуносупресивного ефекту [11].

Кількість еритроцитів, гематокрит, концентрацію гемоглобіну в периферичній крові визначали на автоматичному гематологічному аналізаторі Particle Counter PCE-210 (ERMA Inc, Японія). Визначення фаз клітинного циклу та апоптозу проводили з суспензією забарвлених пропідіум йодидом клітин лімфатичних вузлів брижі методом проточної цитометрії на приладі FACScan (Becton Dickinson, США), підраховуючи 25·10³ клітин. Для встановлення розподілу клітин за фазами клітинного циклу використовували програму ModFit LT [12].

Дослідження проліферативної і цитотоксичної активності природних кілерних лімфоцитів здійснювали за методом Mossman [13]. Поглинальну активність перитонеальних макрофагів щодо ФІТЦ-міченого *S. aureus* досліджували на проточному цитофлуориметрі [14]. Рівень спонтанної та індукованої бактерицидної активності перитонеальних макрофагів (у %) визначали за їхньою здатністю відновлювати нітросиній тетразолій (НСТ) [15].

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики за допомогою програми MS Office Excel (Microsoft, США). Для кількісних ознак розраховували середнє значення та стандартну похибку середнього значення (M ± m). Використовували непараметричний критерій Мана-Уїтні (U) для визначення достовірності відмінностей між групами порівняння. При інтерпретації результатів критичною величиною рівня значущості вважали p < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Через 12 днів після введення циклофосфану маса тіла у мишей була зниженою на 13 % (p < 0,01) у порівнянні з контрольною групою інтактних тварин, що вірогідно може бути результатом загально-токсичного впливу ЦФ. В результаті введення мишам як ККМ, так і іККМ маса тіла була на рівні з тваринами, які одержували тільки ЦФ. Тому можна вважати, що антитоксичним впливом клітинні препарати не володіли.

Введення ЦФ призводило до зниження клітинності кісткового мозку на 36 % (p < 0,001) у порівнянні з контрольною групою інтактних тварин. Введення ККМ викликало ще більш виражене зниження клітинності, що досягало вже 53 % (p < 0,005) у порівнянні з контрольною групою (рис. 1 А). Після введення іККМ показник вже не мав достовірних відмінностей від норми, що свідчить про позитивний вплив саме цих трансплантованих клітин на процес відновлення кісткового мозку.

Зниження клітинності кісткового мозку після введення ККМ слідом за ЦФ було неочікуваним, адже, здавалося б, ККМ мали проліферувати,

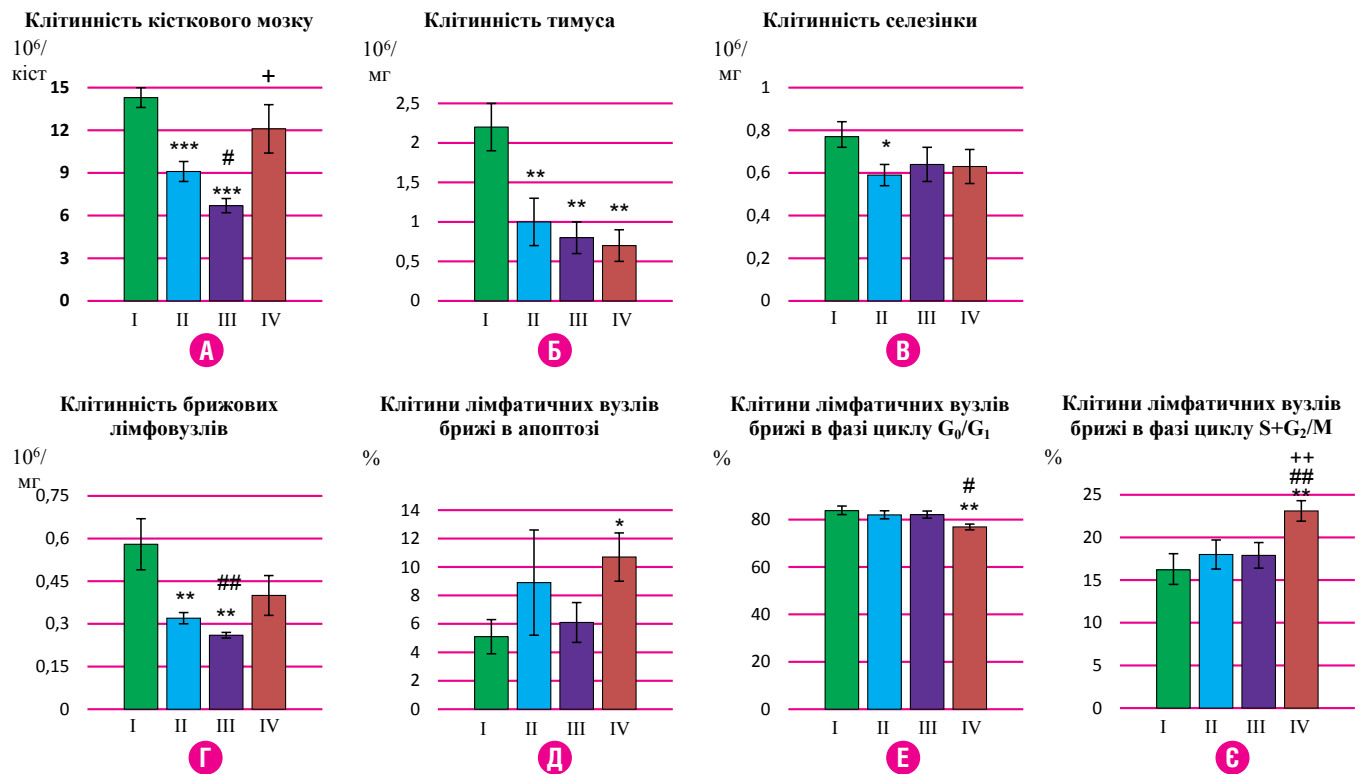


Рис 1. Показники клітинності кісткового мозку, лімфоїдних органів мишей та проліферативна активність клітин: I – контрольні тварини; II – тварини, що отримували циклофосфан; III – тварини, що отримували циклофосфан та клітини кісткового мозку; IV – тварини, що отримували циклофосфан та клітини кісткового мозку, індуковані контактом з мультипотентними стромальними клітинами.

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фізіологічний розчин; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ – порівняно з групою мишей, що отримували циклофосфан; + – $p < 0,05$, ++ – $p < 0,01$ – порівняно з групою мишей, що отримували циклофосфан і клітини кісткового мозку.

диференціюватись та забезпечити відновлення клітинності кісткового мозку, що і спостерігалось після введення іККМ, які проявили позитивний вплив на процес відновлення кісткового мозку.

Відомо, що серед популяцій гемопоетичних клітин ГСК унікально здатні мігрувати до кісткового мозку реципієнта, а також розмножуватись там та забезпечувати довготривале кровотворення. У кістковому мозку ГСК знаходяться в спеціалізованих стромальних нішах, де забезпечується їх самопідтримка та мультипотентність [16]. Однак опромінення та хіміотерапія, які використовують як з лікувальною метою, так і для кондиціонування донорських ГСК в клініці, виснажують більшу частину гемопоетичної системи, в тому числі ніші кісткового мозку [17]. Можна припустити, що трансплантовані нормальні ККМ не досягають кісткомозкових ніш, куди мігрують звичайно, оскільки мікрооточення в нішах страждає від дії ЦФ. В результаті ККМ не демонструють повноцінного відновлення кісткового мозку на відміну від іККМ, які були попередньо співкультивовані з МСК *in vitro*, і, мабуть, за рахунок цього, потрапивши в умови навіть виснажених кісткомозкових ніш, можуть повноцінно розвиватись, диференціюватись та відновлювати клітинність кісткового мозку.

Під дією ЦФ достовірно знижувалась маса тимуса на 69,3 % ($p < 0,005$), загальна кількість тимоцитів на 87,2 % ($p < 0,001$) та клітинність органу на 63,6 % ($p < 0,01$) у порівнянні з контрольної групою інтактних мишей, що свідчило про інволюцію тимуса (рис. 1 Б). Застосування клітинних препаратів не впливало на ці показники, що, можливо, можна пояснити тим, що 12 днів не достатньо для їх відновлення, тому що тимусні клітини-попередники в цей час уже вичерпані, а міграція кісткомозкових клітин-попередників кількісно і якісно порушена [18].

Маса і відносна маса селезінки мишей, що отримували ЦФ, через 12 днів суттєво була підвищена, кількість спленоцитів при цьому не

змінювалась, а клітинність органу навіть зменшувалась. Характерна зміна показників дозволяє припустити, що збільшення селезінки в результаті дії ЦФ обумовлене саме судинними розладами і набряком органу. Після введення мишам ККМ достовірно нормалізувались маса селезінки та її клітинність. Введення іККМ 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. 1 В). Таким чином, за даних умов експерименту виявляється позитивна дія на селезінку клітин кісткового мозку та ще більше виражена – індукованих ККМ.

При введенні ЦФ також клітинність брижових лімфовузлів була знижена на 44,8 % ($p < 0,01$) порівняно з контрольної групою інтактних мишей. Трансплантація ККМ призводила до ще більшого пригнічення цього показника вже на 55,2 % ($p < 0,001$) (рис. 1 Г). Однак введення іККМ повністю відновлювало клітинність лімфовузлів. Відповідна різниця впливу клітинних препаратів вже спостерігалась по відношенню до показників кісткового мозку і ще раз демонструє, що контактна взаємодія МСК з ГСК надала нових властивостей останнім.

Показники спонтанного апоптозу клітин лімфатичних вузлів під впливом іККМ достовірно збільшувались порівняно з контрольної групою інтактних мишей (рис. 1 Д), що зазвичай корелює зі стимуляцією проліферації клітин у нормальних тварин

Дані про позитивний вплив іККМ на клітини лімфовузлів та стимуляцію проліферативної активності підтверджуються результатами дослідження фаз клітинного циклу. Кількість клітин в G₀/G₁-фазах була суттєво зменшена (рис. 1 Е), а у S+G₂/M фазах достовірно збільшена (рис. 1 Є). Тоді як інтактні ККМ не мали такої активності, що знову ж таки вказує на різнонаправленість дії досліджуваних клітинних препаратів. Є дослідження, в яких при спільному культивуванні МСК

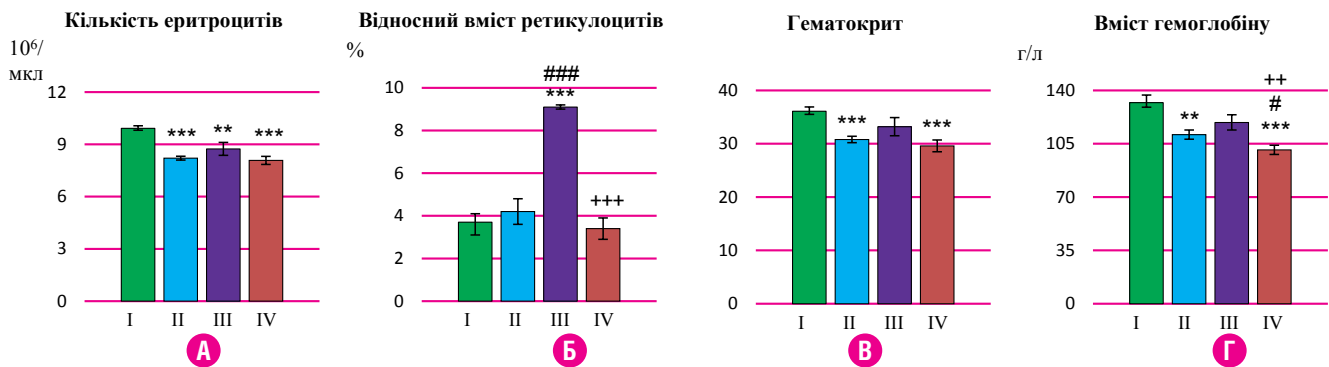


Рис 2. Показники периферичної крові мишей: I – контрольні тварини; II – тварини, що отримували циклофосфан; III – тварини, що отримували циклофосфан та клітини кісткового мозку; IV – тварини, що отримували циклофосфан та клітини кісткового мозку, індуквані контактом з мультипотентними стромальними клітинами.

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фізіологічний розчин; # – $p < 0,05$, ### – $p < 0,001$ порівняно з групою мишей, що отримували циклофосфан; ++ – $p < 0,01$, +++ – $p < 0,001$ порівняно з групою мишей, що отримували циклофосфан і клітини кісткового мозку.

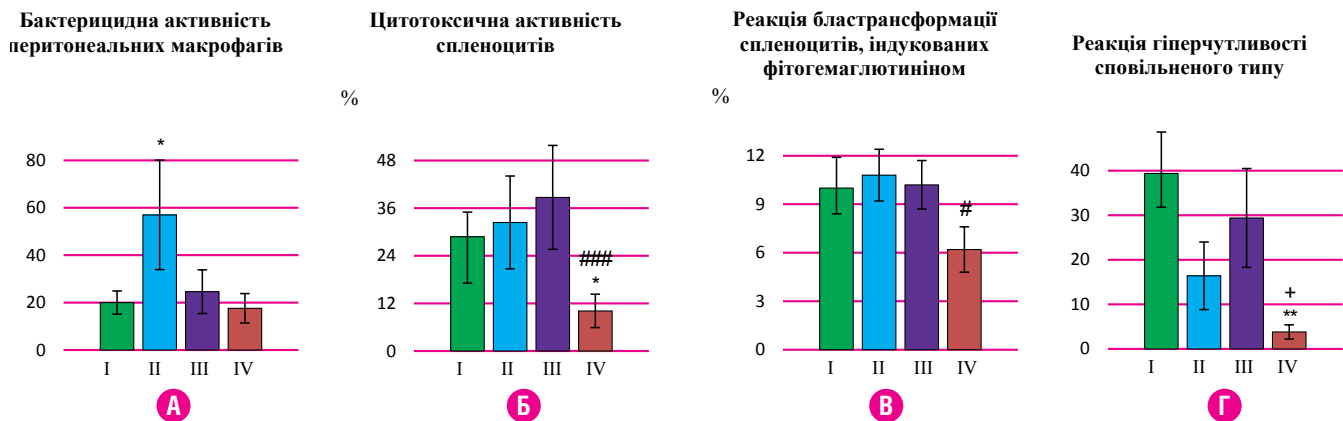
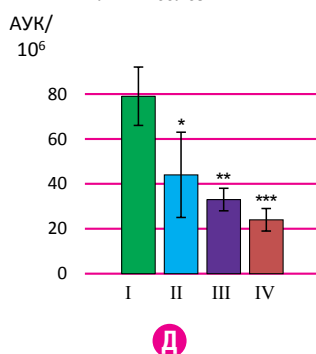


Рис 3. Показники природного імунітету мишей: I – контрольні тварини; II – тварини, що отримували циклофосфан; III – тварини, що отримували циклофосфан та клітини кісткового мозку; IV – тварини, що отримували циклофосфан та клітини кісткового мозку, індуквані контактом з мультипотентними стромальними клітинами.

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ – порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фізіологічний розчин; # – $p < 0,05$, ### – $p < 0,001$ порівняно з групою мишей, що отримували циклофосфан; + – $p < 0,05$ порівняно з групою мишей, що отримували циклофосфан і клітини кісткового мозку.

Кількість антитілоутворюючих клітин селезінки



і ГСК серед неадгезивних клітин спостерігалось значне збільшення кількості клітин в G2/M-фазі [19]. Саме такі клітини були використані в нашому експерименті.

Таким чином, в результаті введення іККМ, а не інтактних ККМ, мишам, що отримували ЦФ, відбувалась часткова нормалізація клітинних показників в різних органах імунної системи. Ефективність МСК як індуктора ГСК при їх трансплантації може пояснюватись, як вище наведено, контактною взаємодією ГСК і стромальних клітин, а також продукцією ними цитокінів та факторів росту необхідних для хоумінгу та диференціювання ГСК [20, 21].

Вплив трансплантації клітинних препаратів на червону кров був протилежним, тобто суттєво активніше діяли саме інтактні ККМ

у процесі регенерації еритропоезу. Застосування ЦФ достовірно знижувало гематокрит, кількість еритроцитів та гемоглобіну. Трансплантовані іККМ не впливали на дані показники, тоді як інтактні ККМ нормалізували гематокрит та гемоглобін і водночас достовірно підвищували кількість ретикулоцитів в крові (рис. 2).

Виражених змін зазнавала функціональна активність імунної системи. Якщо поглинальна активність макрофагів практично не змінювалась ні після дії клітинних препаратів, ні в результаті введення ЦФ. Відомо, що ЦФ не має супресивної дії на макрофаги, а навіть навпаки, низькі дози ЦФ в онкології використовують з метою посилення антиген-специфічного клітинного імунітету, а також активації механізмів вродженого імунітету, опосередкованими секреторною

функцією макрофагів [22]. Подібний стимулюючий ефект ми спостерігали, коли бактерицидна активність перитоніальних макрофагів в НСТ-тесті під впливом ЦФ суттєво підвищувалась, що також може відбуватись за рахунок індукції бактерицидності продуктами, які утворюються в результаті проапоптотичної і токсичної дії ЦФ на тканини та, можливо, є наслідком стимулюючої дії на фагоцити умовно-патогенної мікрофлори активованої імуносупресивним ефектом циклофосфану. Під впливом трансплантованих клітин спостерігалася нормалізація бактерицидної активності (рис. 3, А), що, скоріш за все, означає, що протягом 12 діб трансплантовані клітини можуть сприяти припиненню опортуністичної інфекції.

Також в результаті введення іККМ спостерігався виражений пригнічуючий вплив на природну цитотоксичність спленоцитів (рис. 3 В) та реакцію бласттрансформації, індукованої фітогемаглютиніном (рис. 3 В), які після застосування ЦФ та ККМ не мали достовірних відмінностей від контролю. Відомо, що застосування ЦФ чинить

імуномодулюючий вплив на природну цитотоксичність спленоцитів, який може бути як пригнічуючий, так і стимулюючий залежно від умов [23]. Ймовірно, тому ЦФ в ході нашого експерименту не викликав відхилень від норми цього показника. Індуковані ККМ, набуваючи нових властивостей, відмінних від інтактних ККМ, здатні пригнічувати цитотоксичність, механізм такого впливу не вивчений, однак викликає інтерес для майбутніх досліджень.

Ці дані корелюють з показниками набутого імунітету, що показало, знову ж таки, пригнічуючий вплив іККМ на активність реакції гіперчутливості сповільненого типу у мишей (рис. 3 В), яка була нормальною при застосуванні ККМ. Між тим, кількість антитілоутворюючих клітин в селезінці мишей, яким вводили ЦФ, в цей же час була суттєво зниженою, і жоден з клітинних препаратів не нормалізував її рівня (рис. 3 Г). Відсутність впливу трансплантації гемопоетичних CD34⁺ клітин як на клітинні, так і гуморальні імунні реакції була також продемонстрована на моделі гуманізованих (RAG-hu) імунodefіцитних мишей [24].

ВИСНОВКИ

В цілому, результати свідчать, що на відміну від інтактних, клітини кісткового мозку, індуковані МСК тимуса, забезпечують підвищену спонтанну проліферативну активність лімфоцитів з відновленням клітинності кісткового мозку, лімфатичних органів, а також проявляють виражений негативний вплив на природну цитотоксичність, гіперчутливість сповільненого типу і кількість антитілоутворюючих клітин. Регенерацію еритропоезу, як і належить, забезпечують нормальні кісткомозкові клітини, а клітини кісткового мозку, індуковані МСК тимуса, цю здатність втрачають і виражено активуються в напрямку дії на імунну систему. Ймовірно, це можна пояснити впливом контактної взаємодії з МСК, які, як відомо, відіграють важливу роль у функціонуванні тимуса та володіють вираженими імуномодулюючими властивостями.

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Morrison S. J., Scadden D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014. **505**, № 7483. P.327-34. DOI: 10.1038/nature12984.
- Méndez-Ferrer S., Michurina T. V., Ferraro F., Mazloom A. R., et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010. **466**, № 7308. P. 829-34. DOI: 10.1038/nature09262.
- Block G. J., Ohkouchi S., Fung F., et al. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells*. 2009. **27**, № 3. P. 670-681. DOI: 10.1002/stem.20080742.
- Nikolskaya E. I., Butenko G. M. Structural-functional organisation of the bone marrow hematopoietic stem cells niches. *Cell and organ transplantation*. 2016. **4**, № 1. P. 82-100.
- Prockop D. J., Phinney D. G., Bunnell B. A. Mesenchymal stem cells: methods and protocols. Humana Press. 2008. 192 p.
- Gregory C. A., Gunn W. G., Peister A., et al. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004. **329**, № 1. P. 77-84. DOI: 10.1016/j.ab.2004.02.002.
- Kim W. K., Jung H., Kim D. H., et al. Regulation of adipogenic differentiation by LAR tyrosine phosphatase in human mesenchymal stem cells and 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Sci*. 2009. **122**, № 22. P. 4160-7. DOI: 10.1242/jcs.053009.
- Nikolskiy I. S., Nikolskaya V. V., Demchenko D. L., Zubov D. O. Potentiation of directed osteogenic differentiation of thymic multipotent stromal cells by prior co-cultivation with thymocytes. *Cell and Organ Transplantation* 2016. **4**, № 2. P. 220-223. DOI:10.22494/cot.v4i2.59.
- Said R., Abdel-Rehim M., Sadeghi B., et al. Cyclophosphamide Pharmacokinetics in Mice: A Comparison Between Retro Orbital Sampling Versus Serial Tail Vein Bleeding. *The Open Pharmacology Journal*. 2007. 1. P. 30-35. DOI: 10.2174/1874143600701010030.
- Frimmel G. Immunological methods edited by Frimmel G. M: The world. 1987. 472 p.
- Nikolskiy I. S. Dynamic features of hemo-immune deficiency induced by cyclophosphamide Proceedings of the international forum «Clinical immunology and allergology». 2014. P. 195-196.
- Khaitov R. M., Pinegin B. V., Yarin A. A. Guide to Clinical Immunology. Diagnosis of immune system diseases: a guide for doctors. M: GEOTAR-Media. 2002. 352 p.
- Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*. 1983. **65**, № 1-2. P. 55-63.
- Sugiura H., Nishida H., Inaba R., et al. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. *J Appl Physiol*. 2001. **90**, № 3. P. 789-94. DOI: 10.1152/jappl.2001.90.3.789.
- Zhang X., Goncalves R., Mosser D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*. 2008. **14**, № 1. DOI: 10.1002/0471142735.im1401s83.
- Acar M., Kocherlakota K., Murphy S., et al. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature*. 2015. **526**, № 7571. P. 126-30. DOI: 10.1038/nature15250.
- Abbuehl J-P., Tatarova Z., Held W., et al. Long-Term Engraftment of Primary Bone Marrow Stromal Cells Repairs Niche Damage and Improves Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cell Stem Cell*. 2017. **21**, № 2. P. 241-255. DOI: 10.1016/j.stem.2017.07.004. doi: 10.1016/j.stem.2017.07.004
- Frasca D., Guidi F., Arbitrio M., et al. Hematopoietic reconstitution after lethal irradiation and bone marrow transplantation: effects of different hematopoietic cytokines on the recovery of thymus, spleen and blood cells. *Bone Marrow Transplant*. 2000. **25**, № 4. P. 427-33. DOI: 10.1038/sj.bmt.1702169.

19. *Jing D., Fonseca A. V., Alakel N., et al.* Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells--modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica*. 2010. **95**, № 4. P. 542-50.
20. *Patel D. M., Shah J., Srivastava A. S.* Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int*. 2013. 2013:496218. DOI: 10.1155/2013/496218.
21. *Rota C., Morigi M., Cerullo D., et al.* Therapeutic potential of stromal cells of non-renal or renal origin in experimental chronic kidney disease. *Stem Cell Res Ther*. 2018. **9**, № 1. P. 220. DOI: 10.1186/s13287-018-0960-8.
22. *Bryniarski K., Szczepanik M., Ptak M., et al.* Influence of cyclophosphamide and its metabolic products on the activity of peritoneal macrophages in mice. *Pharmacol Rep*. 2009. **3**. P. 550-7.
23. *Teriukova N. P., Pogodina O. N., Blinova G. I., Ivanov V. A.* Immunomodulating effect of cyclophosphamide on cytotoxic activity of rats and mice splenocytes. *Tsitologija*. 2011. **53**, № 10. P. 800-7.
24. *Tanner A., Hallam S. J., Nielsen S. J., et al.* Development of human B cells and antibodies following human hematopoietic stem cell transplantation to Rag2(-/-)γc(-/-) mice. *Transpl Immunol*. 2015. **32**, № 3. P. 144-50. DOI: 10.1016/j.trim.2015.03.002.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автор підтверджує відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 18.09.2018 р.

Прийнята до друку 30.11.2018 р.