УДК: 616-089.843:612.419-018.4
doi: 10.22494/cot.v7i1.95

Вплив ко-трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку та мультипотентних стромальних клітин тимуса на імунну систему мишей в умовах її регенерації після введення циклофосфану

Демченко Д. Л., Нікольський І. С.

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

e-mail: chekhdariia@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Мультипотентні стромальні клітини (МСК) розглядають як один з найбільш перспективних інструментів для регенерації імунної системи завдяки потужній секреції ними репаративних факторів та імуномодулюючим властивостям.

МЕТА РОБОТИ. *Дослідити вплив спільної трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) кісткового мозку та мультипотентних стромальних клітин тимуса на регенерацію пошкодженої циклофосфаном імунної системи мишей.*

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. *МСК отримували з тимусів мишей лінії C57BL методом експлантів. Клітини кісткового мозку (ККМ) отримували шляхом вимивання зі стегнової кістки. Імунодефіцит мишей моделювали введенням внутрішньочеревно 200 мг циклофосфану. Після цього проводили ко-трансплантацію клітинних препаратів та 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; реакцію гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ); проліферативну і цитотоксичну активність природних кілерних лімфоцитів; поглинальну активність, рівень спонтанної та індукованої бактерицидної активності перитонеальних макрофагів.*

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. *Показано, що, на відміну від ККМ, застосування МСК та ко-трансплантація цих клітин підвищували спонтанну проліферативну активність лімфоцитів з достовірним зменшенням кількості клітин лімфовузлів в G0/G1 – фазі на 9,2 % і збільшенням кількості лімфоцитів у фазі G2-M+S на 35 %, а також відновлювали клітинність кісткового мозку, тимуса і лімфатичних вузлів у мишей після введення циклофосфану. Регенерацію еритропоезу стимулювали клітини КМ, 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. Ко-трансплантація проявляла менш виражений, але подібний вплив. Трансплантація МСК тимуса стимулювала природну цитотоксичність спленоцитів в 2,7 раз і суттєво збільшувала кількість антитілоутворюючих клітин у селезінці в 1,7 разу в порівнянні з групою мишей, що отримували циклофосфан. Ко-трансплантація мала більш виражений пригнічуючий вплив на реакцію бласттрансформації індуковану фітогемаглютиніном в 1,7 разу та проявляла стимулюючий ефект на реакцію ГСТ в 1,46 разу. Стимулюючи еритропоез трансплантація ККМ не впливала на вивчені показники активності імунної системи.*

ВИСНОВКИ. *Ефекти ко-трансплантації клітин кісткового мозку і МСК тимуса реалізуються у вигляді кількох складових: стимуляції відновлення гематологічних показників (як при дії окремо клітин КМ), нормалізації клітинних показників лімфоїдних органів (як при дії лише МСК); пригнічення активності РБТЛ і стимуляція формування ГСТ є проявами дії, притаманної саме ко-трансплантації.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА*: клітини кісткового мозку; мультипотентні стромальні клітини тимуса; ко-трансплантація клітин; регенерація імунної системи; циклофосфановий гемоімунодефіцит*

Регенерація імунної системи після впливу деструктивних факторів залишається актуальною проблемою сучасної біології та медицини Відомо, що активація компенсаторних механізмів після впливу екстремальних факторів може сприяти відновленню специфічних функцій цієї тканини [1]. Особливий інтерес викликає функціональне відновлення швидко регенеруючих тканин, оскільки часто необхідно підтримувати їх високий проліферативний потенціал. Використання клітинних технологій для активізації регенерації тканин є новою актуальною тенденцією в медицині. Біологічні характеристики мультипотентних стромальних (МСК) та гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) знаходяться у фокусі уваги в цьому контексті. МСК розглядаються як одні з найбільш перспективних мультипотентних клітин для досягнення мети через потужну секрецію ними репаративних факторів та імуномодулюючі властивості, а ГСК є родоначальниками всіх гемопоетичних клітин [2]. Ряд досліджень показав, що хіміотерапія, променева терапія або їх поєднання пошкоджує мікросередовище кісткового мозку (КМ) і може призвести до затримки кровотворення [3]. Пошкоджена строма кісткового мозку повинна відновити себе, щоб забезпечити оптимальне середовище для регенерації гемопоезу. Якраз МСК при спільній трансплантації з ГСК, ймовірно, могли б забезпечити відновлення пошкодженого мікросередовища, продукцією цитокінів та факторів росту сприяти хоумінгу та диференціюванню ГСК, а також підтримали б трансплантовані клітини завдяки міжклітинним контактам, паракринній дії і продукції екзосом і позаклітинних мікровезикул [4].

На сьогодні загальновідома модель циклофосфанового (ЦФ) імунодефіциту [5]. Завдяки стійкості до ЦФ стовбурових клітин відновлення організму відбувається за рахунок проліферації ГСК і МСК, що зберігаються в тканинах після глибокого загального спустошення, що дуже зручно використовувати при дослідженнях механізмів впливу певних факторів на фізіологічну регенерацію. Мабуть, ефективність регенерації залежить від кількості і активності збережених стовбурових клітин. Можна припустити, що трансплантація додаткової кількості цих функціонально активних клітин може підсилити регенерацію імунної системи.

МЕТОЮ РОБОТИ було дослідити вплив спільної сингенної трансплантації ГСК та МСК тимуса на регенерацію імунної системи мишей, пошкодженої циклофосфамідом.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти проведено на самцях мишей лінії C57BL віком 6-8 тижнів і масою 18-20 г з розплідника Інституту патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, які отримували збалансоване харчування та мали вільний доступ до води. Всі роботи з експериментальними тваринами проводились з дотриманням вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.) та «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986 р.). Клітини кісткового мозку (ККМ) отримували шляхом його вимивання із кістковомозкового каналу стегнової кістки поживним середовищем. МСК тимуса отримували методом експлантатів за стандартною методикою [6]. Культивування проводили в поживному середовищі DMEM/F12, 1:1, (*Sigma*, США) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (*Sigma*, США), 10 мМ L-глютаміну (*Sigma*, США) та по 100 МО/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину (*Дарниця*, Україна), в CO_2-інкубаторі (*Jouan*, Франція) при 37 °С і 5 % атмосфері CO_2. Субкультивування клітин у співвідношенні 1:3 проводили з використанням суміші розчинів 0,05 % трипсину (*БіоТестМед*, Україна) та 0,02 % ЕДТА (*Sigma*, США). Отримані клітини прикріплялися до пластику, мали фібробластоподібну морфологію і утворювали фібробластні колонії. Приналежність отриманих клітин до МСК додатково встановлювали за допомогою індукції їх лінійного диференціювання за остеогенним та адипогенним напрямками [7, 8]. Для введення тваринам ККМ і МСК тимуса ресуспендували у поживному середовищі DMEM/F12, 1:1, (*Sigma*, США) з додаванням 5 % свіжої сингенної мишиної сироватки.

З метою вивчення впливу клітинних препаратів на регенерацію імунної системи було сформовано 5 груп: I (контрольна) – нормальні тварини (n = 10), що отримували внутрішньочеревно розчинник ЦФ – воду для ін'єкцій і через 2 години 0,1 мл поживного середовища DMEM/F12, 1:1, (*Sigma*, США) з додаванням 5 % сингенної мишиної сироватки; II – миші, що отримували внутрішньочеревно 200 мг/кг ЦФ (n = 9) і через 2 години 0,1 мл аналогічного I групі поживного середовища; III – миші, що отримували ЦФ і потім трансплантацію 10^6 ККМ в об'ємі 0,1 мл (n = 7); IV – миші, що отримували ЦФ і потім трансплантацію $5 \cdot 10^4$ МСК тимуса в об'ємі 0,1 мл (n = 7); V – миші, що отримували ЦФ з подальшою ко-трансплантацією 10^6 ККМ і $5 \cdot 10^4$ МСК тимуса (n = 7). Клітини вводили через 2 години після ЦФ в ретроорбітальний синус. При ко-трансплантації МСК тимуса вводили в один ретроорбітальний синус, а ККМ – в інший.

Через тиждень всіх тварин імунізували внутрішньочеревним введенням еритроцитів барана у кількості 10^8 клітин для визначення антитілоутворюючих клітин (АУК), і ще через 4 дні проводили повторну ін'єкцію аналогічної кількості еритроцитів барана в подушечку задньої лапи для визначення ГСТ, і ще через добу оцінювали показники імунної системи. Через добу на 12-й день після введення ЦФ оцінювали стан імунної системи, враховуючи динаміку розвитку його імуносупресивного ефекту [9].

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. 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 клітин лімфатичних вузлів брижі. Суспензію клітин відмивали і забарвлювали розчином пропідіуму йодиду з додаванням цитрату натрію. Клітини аналізували методом проточної цитометрії на приладі FACScan (*Becton Dickinson*, США). Для встановлення розподілу клітин за фазами клітинного циклу використовували програмне забезпечення ModFit (*LT*, США). Сумарну оцінку вмісту проліферуючих клітин проводили шляхом визначення відсотка клітин в ділянці гістограми, що розташована правіше від диплоїдного піку. Для оцінки апоптозу на гістограмі за прямим і бічним світлорозсіюванням визначали локалізацію лімфоцитів і оцінювали червону флуоресценцію пропідіуму йодиду для 10000 клітин, серед яких розраховували відсоток гіподиплоїдних клітин [10].

Визначення кількості АУК у селезінці проводили методом локального гемолізу в гелі. Також у сироватці крові визначали титр гемаглютинінів та гемолізинів. Реакцію ГСТ оцінювали через 24 год за різницею маси зразків дослідної та контрольної лап [11]. Дослідження проліферативної активності спленоцитів (індекс РБТЛ) і цитотоксичної активності природних кілерних лімфоцитів здійснювали МТТ методом [12]. Поглинальну активність перитонеальних макрофагів, що поглинали ФІТЦ-мічений стафілокок, досліджували на проточному цитофлуориметрі [13]. Рівень бактерицидної активності перитонеальних макрофагів визначали за їхньою здатністю відновлювати нітросиній тетразолій (НСТ), спонтанно та в присутності індуктора (зимозана).

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики за допомогою програми MS Office Excel (*Microsoft*, США). Для кількісних ознак розраховували середнє значення (M) та стандартну похибку середнього значення (m). Для визначення значущих відмінностей використовували непараметричний критерій Мана-Уітні (U). 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 групи II зменшилась на 13 % (16,8 ± 0,8 г проти 19,3 ± 0,4 г; $p < 0,02$) у порівнянні з контрольною групою I. Це може бути результатом загальнотоксичного впливу циклофосфану.

У порівнянні з контрольною групою інтактних тварин введення ЦФ призводило до зниження клітинності КМ на 36 % ($p < 0,001$), яка не відновлювалась на 12-й день. Введення ККМ викликало достовірно більше зниження клітинності КМ вже на 53 % ($p < 0,001$). Показники мишей, що отримували МСК тимуса, не відрізнялися від норми і були вище таких у групі III, що свідчило про позитивний вплив. Ко-трансплантація демонструвала схожий вплив до МСК тимуса, що свідчило про позитивний вплив саме МСК тимуса на відновлення показників КМ у групі V (**рис. 1, А**).

Під дією ЦФ достовірно знижувалась кількість тимоцитів та клітинність органу, що свідчило про інволюцію тимуса. Трансплантація ККМ не впливала на клітинність тимуса, однак трансплантація МСК нормалізувала ці показники. Спільне введення МСК тимуса і ГСК також сприяло нормалізації клітинності тимуса (**рис. 1, Б**).

При введенні ЦФ також достовірно знижувалася клітинність брижових лімфовузлів порівняно з контрольною групою I. Трансплантація ККМ викликала ще більше пригнічення цього показника вже на 55,2 %. Трансплантація МСК та ко-трансплантація викликали повне відновлення клітинності (**рис. 1, В**). При введенні МСК тимуса та ко-трансплантації кількість клітин лімфатичних вузлів брижі в G0/G1-фазах зменшувалась (**рис. 1, Г**), а у S+G2/M фазах достовірно збільшувалась (**рис. 1, Д**), тоді як ККМ не викликали таких змін.

Введення ЦФ достовірно знижувало вміст гемоглобіну і гематокрит, кількість еритроцитів також зменшувалась. Застосування ККМ нормалізували гематокрит та гемоглобін і водночас достовірно підвищували кількість ретикулоцитів в крові (**рис. 2**). МСК тимуса гематокрит не відновлювали і призводили до зменшення кількості ретикулоцитів, а при ко-трансплантації вона була суттєво меншою, ніж при введенні самих ККМ.

Виражених змін зазнавала функціональна активність імунної системи. Якщо поглинальна активність макрофагів практично не змінювалась, то бактерицидна активність перитонеальних макрофагів в НСТ-тесті під впливом ЦФ суттєво підвищувалась. Під впливом трансплантованих ККМ і МСК окремо спостерігалась нормалізація бактерицидної активності (**рис. 3, А**), що не відбувалось при ко-трансплантації цих клітин.

За умов введення МСК тимуса спостерігався виражений стимулюючий вплив на природну цитотоксичність спленоцитів (**рис. 3, Б**) і суттєве відновлення кількості АУК у селезінці (**рис. 3, Д**) порівняно з групою мишей II.

В результаті ко-трансплантації спостерігався виражений пригнічуючий вплив на реакцію бласттрансформації, індукованої фітогемаглютиніном (ФГА) (**рис. 3, В**). Після введення МСК або ККМ окремо достовірних відмінностей від норми не було. Протилежний ефект мав місце при формуванні реакції ГСТ, що була суттєво підвищена після ко-трансплантації (**рис. 3, Г**). Трансплантовані ККМ не чинили впливу на ці показники імунної системи. Отримані дані свідчать про імуносупресивний і загальнотоксичний вплив ЦФ [14]. Клітинні препарати антитоксичної дії не проявляли.

Відомо, що трансплантовані ГСК здатні мігрувати до КМ реципієнта, а також розмножуватись там та забезпечувати довготривале

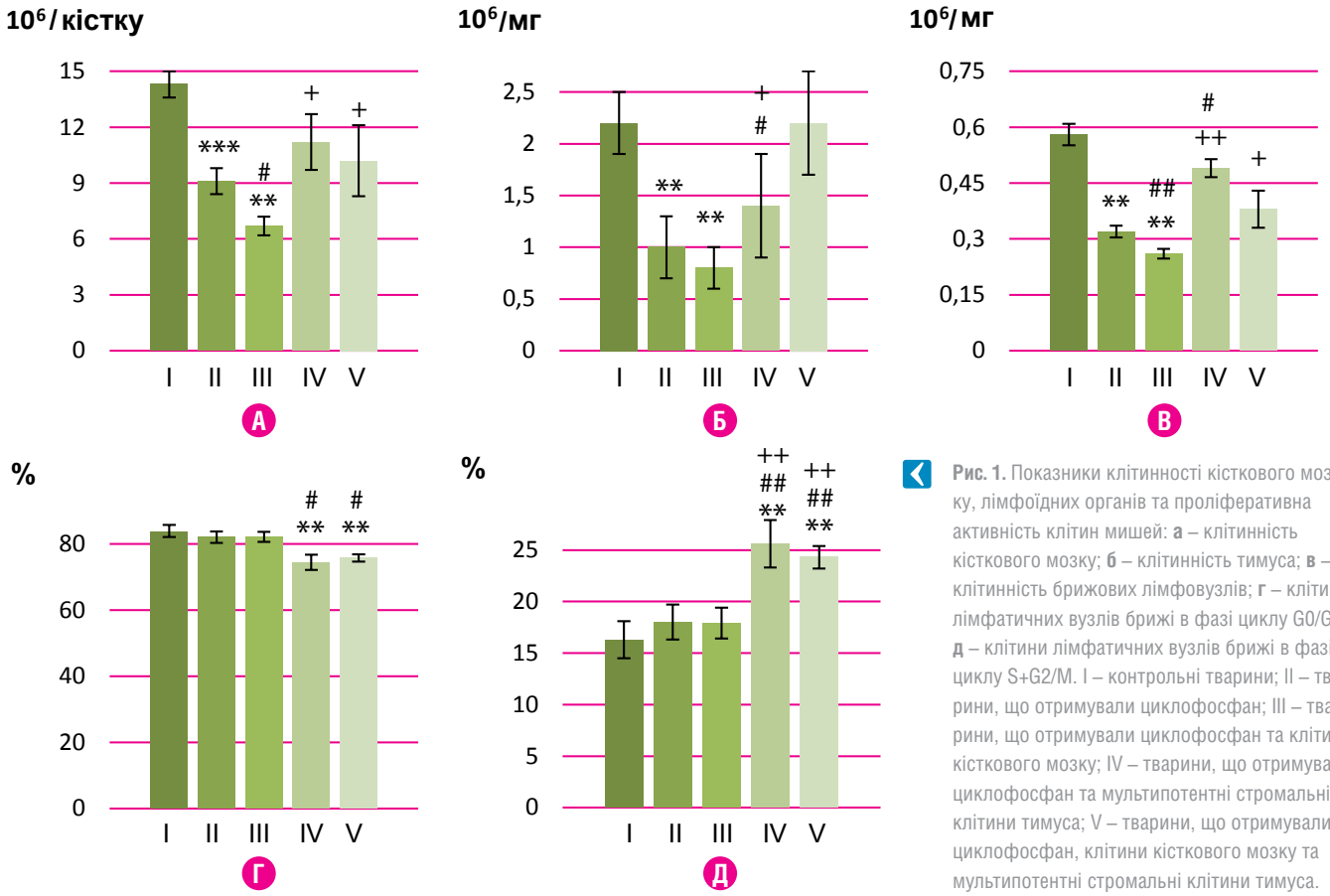

Рис. 1. Показники клітинності кісткового мозку, лімфоїдних органів та проліферативна активність клітин мишей: **а** – клітинність кісткового мозку; **б** – клітинність тимуса; **в** – клітинність брижових лімфовузлів; **г** – клітини лімфатичних вузлів брижі в фазі циклу G0/G1; **д** – клітини лімфатичних вузлів брижі в фазі циклу S+G2/M. I – контрольні тварини; II – тварини, що отримували циклофосфан; III – тварини, що отримували циклофосфан та клітини кісткового мозку; IV – тварини, що отримували циклофосфан та мультипотентні стромальні клітини тимуса; V – тварини, що отримували циклофосфан, клітини кісткового мозку та мультипотентні стромальні клітини тимуса.

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

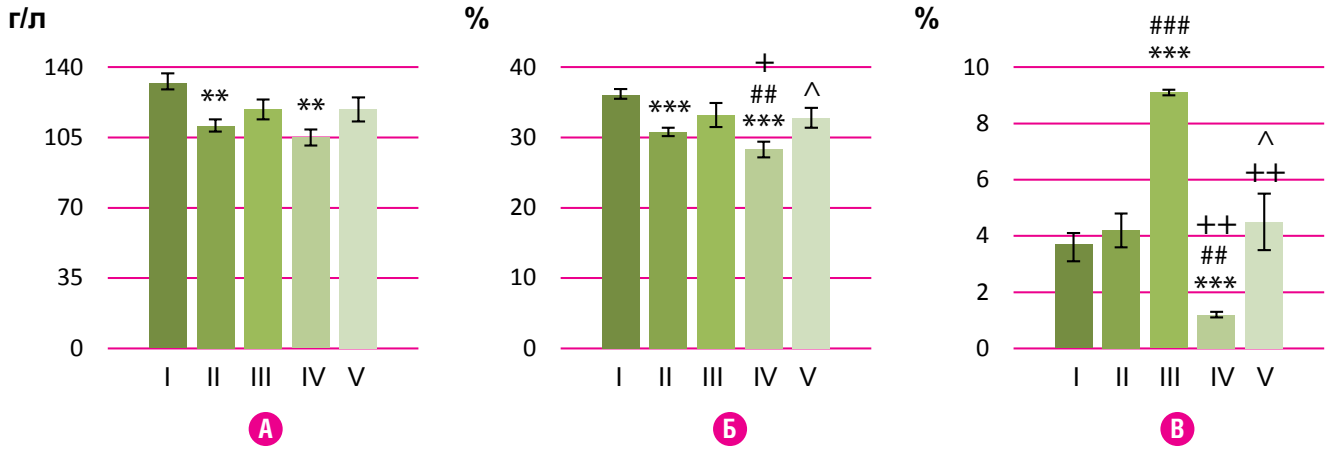

Рис. 2. Показники периферичної крові мишей: **а** – рівень гемоглобіну; **б** – гематокрит; **в** – кількість ретикулоцитів. I – контрольні тварини; II – тварини, що отримували циклофосфан; III – тварини, що отримували циклофосфан та клітини кісткового мозку; IV – тварини, що отримували циклофосфан та мультипотентні стромальні клітини тимуса; V – тварини, що отримували циклофосфан, клітини кісткового мозку та мультипотентні стромальні клітини тимуса.

*Примітки: ** – p < 0,01, *** – p < 0,001 порівняно з контрольною групою нормальних мишей; # – p < 0,05, ### – p < 0,001 порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ; ++ – p < 0,01, +++ – p < 0,001 порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і ККМ.*

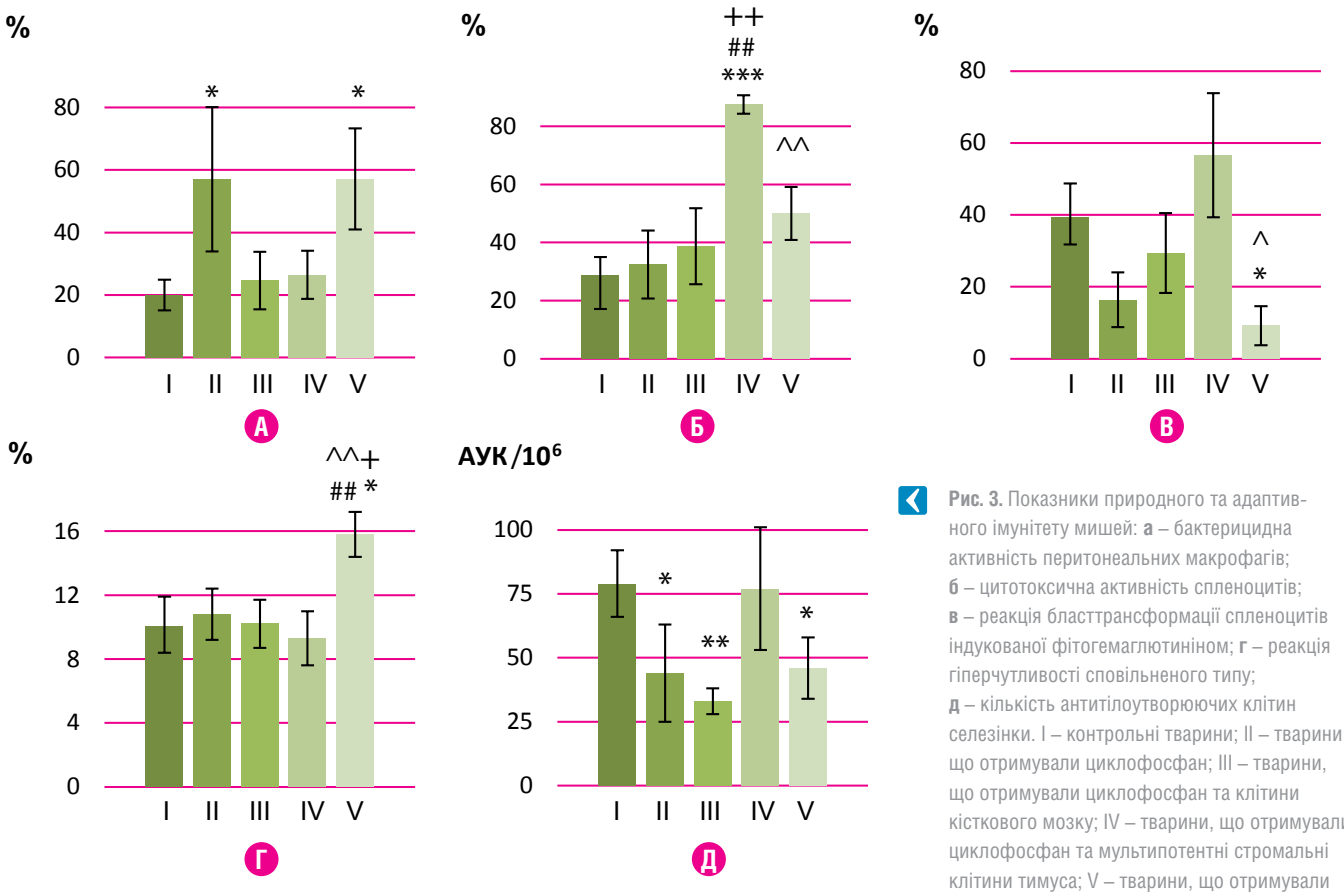

Рис. 3. Показники природного та адаптивного імунітету мишей: **а** – бактерицидна активність перитонеальних макрофагів; **б** – цитотоксична активність спленоцитів; **в** – реакція бласттрансформації спленоцитів індукованої фітогемаглютиніном; **г** – реакція гіперчутливості сповільненого типу; **д** – кількість антитілоутворюючих клітин селезінки. I – контрольні тварини; II – тварини, що отримували циклофосфан; III – тварини, що отримували циклофосфан та клітини кісткового мозку; IV – тварини, що отримували циклофосфан та мультипотентні стромальні клітини тимуса; V – тварини, що отримували циклофосфан, клітини кісткового мозку та мультипотентні стромальні клітини тимуса.

*Примітки: * – p < 0,05, ** – p < 0,01, *** – p < 0,001 – порівняно з контрольною групою нормальних мишей; # – p < 0,05, ### – p < 0,001 – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ; + p < 0,05 – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і ККМ; ^ – p < 0,05, ^^ – p < 0,01, ^^^ – p < 0,001 – порівняно з групою мишей, що отримували ЦФ і МСК.*

кровотворення. У кістковому мозку ГСК знаходяться в спеціалізованих стромальних нішах, які підтримують їх дозрівання та мультипотентність [15]. Однак застосування ЦФ виснажує більшу частину гемопоетичної системи, в тому числі КМ ніші [16]. Ймовірно, трансплантовані ККМ не отримували достатньої підтримки від мікрооточення, мігруючи до кісткового мозку, тому ми не спостерігали відновлення кістково-мозкових показників, на відміну від ситуації, що відбувалась при трансплантації МСК та ко-трансплантації.

Є дані, що і МСК здатні до міграції у кістковий мозок. А застосування ЦФ може навіть сприяти цьому, стимулюючи експресію на МСК рецептора CXCR4 [17]. Можна припустити, що після внутрішньовенного введення МСК мишам принаймні частина з них мігрує до кісткового мозку, сприяючи відновленню мікрооточення ГСК. Отже, відновлення ніш кісткового мозку забезпечують саме МСК, які або підтримують трансплантовані разом з ними ККМ, або формують умови для розвитку ГСК, що залишились в організмі.

Під дією ЦФ достовірно знижувались клітинність тимуса та лімфовузлів, та зростали показники спонтанного апоптозу клітин. Застосування ККМ не чинило впливу на дані порушення. Нормалізація клітинності лімфоїдних органів після трансплантації МСК та їх ко-трансплантації з ГСК може бути пов'язана зі здатністю МСК пригнічувати активність зумовлених Fas-лігандами проапоптотичних процесів [18], викликаних ЦФ [19]

Відновлення клітинності корелює з даними по клітинному циклу брижових лімфовузлів. При застосуванні МСК та ко-трансплантації кількість клітин в G0/G1 фазах суттєво зменшувалась, а у S+G2/M фазах достовірно збільшувалась, чого не відбувалось при трансплантації ККМ. Отже, в ході нашого експерименту показаний стимулюючий проліферацію вплив МСК *in vivo*. Хоча більшість робіт свідчить про імуносупресивну і антипроліферативну дію МСК *in vitro* [20], однак доведено залежність спрямованості дії МСК від оточуючих умов та стану реципієнта [21]. Доцільно припустити, що клітини можуть змінювати свої імуносупресивні властивості, коли стикаються з пошкодженими імунними клітинами *in vivo* після впливу ЦФ.

Таким чином, в результаті введення МСК та ко-трансплантації їх разом з ККМ мишам, що отримували ЦФ, відбувалась нормалізація клітинних показників в різних органах імунної системи за рахунок їх протиапоптичної, підтримуючої та модулюючої дії на гемопоетичні стовбурові клітини, що не спостерігалось при застосуванні лише ККМ, позбавлених підтримки донорських МСК.

В той же час, ККМ проявляли більшу активність щодо відновлення гематокриту та гемоглобіну, і, водночас, достовірно підвищували кількість ретикулоцитів в крові, що свідчить про активний процес еритропоезу. Подібний ефект спостерігався і при ко-трансплантації. Трансплантовані МСК не відновлювали дані показники, а кількість ретикулоцитів навіть знижувалась, що вказує на інгібуючий еритропоез вплив. Дані корелюють з недавніми *in vitro* дослідженнями по пригніченню еритроїдного диференціювання клітин лінії K562, співкультивованих разом з МСК [22]. Отже, можна говорити, що такі результати ко-трансплантації обумовлені, головним чином, за рахунок ККМ, однак не виключений і вплив МСК. Є дослідження, що демонструють стимулюючий вплив комбінованої трансплантації ГСК та МСК на гранулоцитопоез та еритропоез після гострої крововтрати за рахунок зниження рівня модифікованих клітини в кістковому мозку шляхом підсилення МСК продукції цитопротекторних факторів – білків теплового шоку HSP32 і HSP70 [23]. Таке різноманіття даних яскраво демонструє залежність властивостей ГСК від мікрооточення та процесів кооперації в організмі.

Цікавим і неочікуваним був той факт, що під впливом трансплантованих ККМ і МСК окремо спостерігалась нормалізація бактерицидної активності, яка могла бути спровокована продуктами розпаду клітин і підвищуватись від токсичної дії ЦФ. Однак цього не відбувалось при ко-трансплантації, що демонструє не просто поєднання властивостей окремих клітинних препаратів МСК або ГСК, а є набуттям індивідуальних особливостей реакцій імунної системи при ко-трансплантації МСК та ГСК.

Ще однією характерною ознакою саме ко-трансплантації клітин був пригнічуючий вплив на реакцію бласттрансформації, індукованої фітогемаглютиніном (ФГА), яка після застосування ККМ або МСК не мала достовірних відмінностей від норми. Це стосується і впливу на реакцію ГСТ, що була суттєво підвищена тільки після ко-трансплантації МСК та ГСК.

ВИСНОВКИ

Таким чином, всі досліджені типи трансплантованих клітин істотно впливають на регенерацію імунної та кровотворної систем при циклофосфановому гемоімунодефіциті. Клітини проявляють властиву їм дію, яка характеризується певним спектром змін в імунній та кровотворній системах.

Вплив ко-трансплантації клітин кісткового мозку і МСК тимуса не є простою адитивною дією клітин, а набуває особливостей, як притаманних окремим типам клітин, так і появою нових характеристик, що обумовлено, мабуть, розвитком складних кооперативних процесів у організмі, що регенерує. Сильний, часто вирішальний, вплив на активність клітин здійснює взаємодія клітин кісткового мозку і МСК. Характерною дією клітин кісткового мозку можна вважати позитивний вплив на регенерацію еритропоезу. В свою чергу, МСК тимуса мають виражений позитивний вплив на поглинальну активність макрофагів, бактерицидність в НСТ-тесті, РБТЛ, природну цитотоксичність і формування АУК.

Ефекти ко-трансплантації клітин кісткового мозку і МСК тимуса складаються з кількох складових: стимуляція еритропоезу (як при дії ККМ), нормалізація клітинних показників лімфоїдних органів (як при дії МСК), пригнічення активності РБТЛ і, в той же час, стимуляції реакції гіперчутливості сповільненого типу, що є рисою, притаманною саме ко-трансплантації.

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Grebnev D. Yu., Maklakova I. Yu., Yastrebov A. P.* The opportunity to use combined stem cells transplantation for haemopoesis activation in the old and mature laboratory animals under the conditions of ionizing radiation. Uspekhi Geontol. 2014. **27**, № 2. P. 348-352.
2. *Nikolskaya E. I., Butenko G. M.* Structural-functional organisation of the bone marrow hematopoietic stem cells niches. Cell and organ transplantology. 2016. **4**, № 1. P. 82-100.
3. *Lazarus H. M., Koc O. N., Devine S. M., et. al.* Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. Biol Blood Marrow Transplant. 2005. **11**, № 5. P. 389-98.

4. *Patel D. M., Shah J., Srivastava A. S.* Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. Stem Cells Int. 2013. **2013**. ID 496218. DOI: 10.1155/2013/496218.
5. *Xu S. F., Yu L. M., Fan Z. H., Wu Q., Yuan Y., Wei Y., Fang N.* Improvement of ginsenoside Rg1 on hematopoietic function in cyclophosphamide-induced myelosuppression mice. Eur J Pharmacol. 2012. **695**, № 1-3. P. 7-12. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.07.050.
6. *Prockop D. J., Phinney D. G., Bunnell B. A.* Mesenchymalstem cells: methods and protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. 192 p.
7. *Gregory C. A., Gunn W. G., Peister A., Prockop D. J.* 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.
8. *Kim W. K., Jung H., Kim D. H., Kim E. Y., Chung J. W., Cho Y. S., 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.
9. *Nikolsky I. S.* Dynamic features of hemo-immune deficiency induced by cyclophosphamide. Proceedings of the international forum «Clinical immunology and allergology». 2014. P. 195-196.
10. *Chaitov R. M., Pinihin B. V., Jarilin A. A.* Guide to Clinical Immunology. Diagnosis of diseases of the immune system: a guide for doctors. Moskva: HEOTAR-Media, 2009. 352 p.
11. *Frimmel G.* Immunological methods edited by Frimel G. Moscow: The world, 1987. 472 p.
12. *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.
13. *Sugiura H., Sugiura H., Nishida H., Inaba R., Mirbod S. M., Iwata H.* Effects of different durations of exercise on macrophage functionsin mice. J Appl Physiol (1985). 2001. **90**, № 3. P. 789-94. DOI: 10.1152/jappl.2001.90.3.789.
14. *Telegin L. I.* Pharmacogenetics of cyclophosphamide. Moscow:INFRA-M, 2012. 80 p.
15. *Acar M., Kocherlakota K. S., Murphy M. M., Peyer J. G., Oguro H., Inra C. N., Jaiyeola C., Zhao Z., Luby-Phelps K., Morrison S. J.* Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. Nature. 2015. **526**. P. 126-130.
16. *Abbuehl J. P., Tatarova Z., Held W., Huelsken J.* Long-Term Engraftment of Primary Bone Marrow Stromal Cells Repairs Niche Damage and Improves Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Cell Stem Cell. 2017. **21**, № 2. P. 241-255.e6. DOI: 10.1016/j.stem.2017.07.004. doi:10.1016/j.stem.2017.07.004.
17. *Ponomaryov T., Peled A., Petit I., Taichman R. S., Habler L., Sandbank J., et al.* Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. J Clin Invest. 2000. **106**, № 11. P. 1331-9. DOI: 10.1172/JCI10329.
18. *Li T. S., Shi H., Wang L., Yan C.* Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Satellite Cell Proliferation and Apoptosisin Immobilization-Induced MuscleAtrophy in Rats. Med Sci Monit. 2016. **22**. P. 4651-60.
19. *Cengiz M., Cetik Yildiz S., Demir C., Şahin İ. K., Teksoy Ö., Ayhanci A.* Hepato-preventive and anti-apoptotic role of boric acid against liver injury induced by cyclophosphamide. J Trace Elem Med Biol. 2019. **53**. P. 1-7. DOI: 10.1016/j.jtemb.2019.01.013.
20. *Liu R., Wang Y., Zhao X., Yang Y., Zhang K.* Lymphocyte inhibition is compromised in mesenchymal stem cells from psoriatic skin. Eur J Dermatol. 2014. **24**, № 5. P. 560-7. DOI: 10.1684/ejd.2014.2394.
21. *Bocelli-Tyndall C., Bracci L., Schaeren S., Feder-Mengus C., Barbero A., Tyndall A., Spagnoli G. C.* Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the in vitro proliferation of lymphocytes stimulated by interleukins 2, 7 and 15. Ann Rheum Dis. 2009. **68**, № 8. P. 1352-9. DOI: 10.1136/ard.2008.094003.
22. *Saleh M., Shamsasanjan K., Movassaghpour A. A., Akbarzadehlaleh P., Molaeipour Z.* Inhibitory Effect of Mesenchymal Stem Cell Co-Culture on Erythroid Differentiation of K562 Cells Compared to The Control Group. Cell J. 2017. **19**, № 1. P. 127-136.
23. *Maklakova I. Y., Grebnev D. Y., Yastrebov A. P.* Activation of regeneration of red and white pulp of the spleen after the combined transplantation of HSC and MSCS in terms of exposure to ionizing radiation. Patol Fiziol Eksp Ter. 2017. **61**, № 2. P. 22-7.

СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 27.02.2019 р.
Прийнята до друку 31.05.2019 р.