

Вплив трансплантації мультипотентних стромальних клітин тимуса на імунну систему мишей в умовах її регенерації

І.С. Нікольський¹, В.В. Нікольська¹, Д.Л. Демченко¹, Л.І. Тарануха¹,
Я-М.О. Семенова¹, Т.В. Серебровська²

¹ ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ

² Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: chekhdariia@gmail.com

Досліджено вплив трансплантації мультипотентних стромальних клітин (МСК) тимуса на регенерацію пошкодженої циклофосфаном імунної системи мишей, що у майбутньому може бути покладено в основу розробки ефективних методів її відновлення. Показано, що трансплантація МСК суттєво зменшувала на 25 % кількість гранулоцитів, знижувала гематокрит на 8,1 % і кількість ретикулоцитів на 71,4 %, однак виражено стимулювала регенеративну активність імунної системи. Вплив МСК на адаптивний і природний імунітет у мишей характеризувався суттєвим підвищенням природної цитотоксичності спленоцитів в 2,7 раза та фагоцитарного індексу перитоніальних макрофагів на 72,2 %, нормалізацією бактерицидної активності в НСТ-тесті, а також значною стимуляцією антитілогенезу. Отримані результати свідчать, що трансплантація МСК тимуса мишам, у яких відбувається регенерація гемоїмунопоезу після введення циклофосфану, може проявлятися різноспрямованими ефектами: стимуляцією імунної системи та затримкою відновлення клітин гранулоцитарного і еритроцитарного ростків кровотворення. Результати можуть бути використані для розробки методів активації цілеспрямованої регенерації лімфоїдного компонента імунної системи, підсилення природного імунітету і гуморальної імунної відповіді.

Ключові слова: мультипотентні стромальні клітини тимусу; регенерація імунної системи; циклофосфановий гемоїмунодефіцит.

ВСТУП

Одним із основних напрямків регенеративної медицини є вивчення механізмів відновлення імунної системи. Нині для підсилення регенерації імунної системи використовують різні типи стовбурових клітин, особливо гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК). Між тим відома визначна роль в організмі мультипотентних стромальних клітин (МСК) [1], які і досі є найменш вивченими в аспекті, що обговорюється.

МСК є основою кістковомозкових «ніш» ГСК [2], які значною мірою визначають їх розвиток, регулюють міграцію і проліферацію та запобігають дії на них проапоптотичних чинників [3]. Кооперативна взаємодія

регуляторних МСК і ГСК є невід'ємною частиною гемопоезу. Проте як сполучнотканинні елементи, що розповсюдженні по всьому організму, МСК відіграють велику функціональну роль самі собою у різних тканинах, або впливаючи на інші клітини за допомогою контактних і паракринних механізмів [4]. Наразі найбільш вивченими є МСК кісткового мозку, а МСК тимуса, що також є органом центрального імунітету, досліджені недостатньо. Перспективність їх дослідження обґрунтовується відомими фактами про участь МСК у ембріональному морфогенезі і формуванні тимуса дорослих організмів, селекції тимоцитів, їх дозріванні і міграції. Процес розвитку тимоцитів проходить у так званих «тимусних нішах»,

© І.С. Нікольський, В.В. Нікольська, Д.Л. Демченко, Л.І. Тарануха, Я-М.О. Семенова, Т.В. Серебровська

основними елементами яких є саме МСК [5]. Таким чином, сукупність властивостей МСК тимуса може бути особливою та важливою для відновлення імунної системи, що і аргументує актуальність вивчення регенеративної активності цих клітин.

Однією з найпоширеніших та відносно добре вивчених моделей глибокого ураження гемоімуннопоезу через здійснення проапоптотичного впливу на проліферуючі клітини, відомого як основний механізм загибелі лімфоцитів [6], є індукований імунодефіцит, що виникає внаслідок введення циклофосфану. Після швидкого спустошення імунної системи введенням циклофосфану клітинність кісткового мозку завдяки наявності практично неушкоджених стовбурових клітин і «цитокіновому шторму» починає ефективно відновлюватися [7]. В результаті, загальновідома модель циклофосфанового імунодефіциту частіше використовується наразі не як модель для вивчення саме імунопатології, а досліджується як ситуація, що дає змогу виявляти механізми відновлення імунної системи та особливості регенеративної активності певних імунотропних факторів.

Метою нашої роботи було дослідити вплив трансплантації МСК тимуса на регенерацію імунної системи мишей після її руйнування введенням циклофосфану.

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на самцях мишей лінії C57BL віком 6-8 тиж 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 проводили з дотриманням вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.) та «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986).

Для вивчення впливу МСК тимуса на регенерацію імунної системи мишей було сформовано три групи: I (контрольна) – нормальні тварини (n=10), II – миші, що отримували циклофосфан і були імунізовані еритроцитами барана (n=9), III – тварини, що отримували циклофосфан, потім МСК і також були імунізовані (n=7).

Для моделювання імунодефіциту мишам II групи і III групи внутрішньочеревинно вводили циклофосфан у загальноприйнятій дозі (200 мг/кг), тваринам I групи – фізіологічний розчин. Через 2 год після введення циклофосфану у ретроорбітальний синус тварин III групи робили ін'єкцію МСК тимуса ($5 \cdot 10^4$) в об'ємі 0,1 мл. Через тиждень мишей всіх груп імунізували внутрішньочеревинно еритроцитами барана (10^8), через 4 доби проводили повторну ін'єкцію аналогічної кількості клітин у подушечку задньої лапи, і ще через добу оцінювали антигенспецифічну антитільну імунну відповідь, вираженість реакції гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ) та загальний стан імунної системи. Таким чином, дослідження імунної системи тварин усіх груп проводили через 12 діб після введення циклофосфану. За зазначеною схемою імунізували і контрольних мишей.

Виділення МСК. МСК тимуса отримували методом експлантатів за стандартною методикою [8]. Отримані клітини прикріплювали до пластика, мали фібробластну морфологію і утворювали колонії. Приналежність отриманих клітин до МСК додатково встановлювали за допомогою індукції їх лінійного диференціювання за остеогенним та адипогенним напрямками [9]. Клітинність кісткового мозку та лімфоїдних органів (тимуса, селезінки, лімфатичних вузлів брижі) та вміст ретикулоцитів у крові досліджували після евтаназії тварин.

Кількість лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів, еритроцитів, тромбоцитів, гематокрит, концентрацію гемоглобіну в периферичній крові та визначали на

автоматичному гематологічному аналізаторі PARTICLE COUNTER (модель PCE-210; «ERMA INC», Японія).

Визначення фаз клітинного циклу та апоптозу проводили з суспензією клітин лімфатичних вузлів брижі, що містять переважно менш чутливі до дії циклофосфану Т-лімфоцити. Проведення дослідів на 12-й день після введення циклофосфану дало змогу оцінити стан саме цієї популяції лімфоцитів. Суспензію клітин відмивали і забарвлювали розчином йодиду пропідіуму з додаванням цитрату натрію. Клітини аналізували методом протокової цитометрії на приладі FACScan («Becton Dickinson», США). Для встановлення розподілу клітин за фазами клітинного циклу використовували програму ModFit LT. Сумарну оцінку вмісту проліферуючих клітин здійснювали через визначення відсотка клітин в ділянці гістограми, що розташована правіше від диплоїдного піку [10]. Для оцінки апоптозу на цитограмі за прямим і бічним світлорозсіюванням визначали локалізацію лімфоцитів і оцінювали червону флуоресценцію йодиду пропідіуму для 10000 клітин, серед яких розраховували відсоток гіподиплоїдних клітин [10].

Визначення кількості антитілоутворюючих клітин (АУК) у селезінці, що представлені більш чутливими до циклофосфану В-лімфоцитами, проводили методом локального гемолізу в гелі через 5 діб після внутрішньочеревної імунізації еритроцитами барана (10^8) і в цей самий термін визначали титр гемаглютининів та гемолізінів у сироватці крові. Реакцію гіперчутливості сповільненого типу вивчали у мишей, яким через 4 доби після імунізації в подушечку задньої лівої (дослідної) лапи вводили 10^8 еритроцитів барана, розчинених в 0,05 мл фізіологічного розчину (повторна ін'єкція). Реакцію ГСТ оцінювали через 24 год за різницею маси дослідної та контрольної лап [11]. Вивчення проліферативної і цитотоксичної активності природних кілерних лімфоцитів [12] здійснювали за методом Mossman [13].

Поглиняльну активність перитонеальних макрофагів відносно ФІТЦ-міченого стафілокока досліджували на протоковому цитофлуориметрі [14]. Рівень спонтанної та індукованої бактерицидної активності перитонеальних макрофагів визначали за їхньою здатністю відновлювати нітросиній тетразолій (НСТ).

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики за допомогою програми Excell (MS Office XP). Для кількісних ознак розраховували середнє значення (M) та стандартну похибку середнього значення ($\pm m$). Використовували непараметричний критерій Мана-Уїтні (U). При інтерпретації результатів критичною величиною рівня значущості вважали $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Через 12 діб після введення циклофосфану маса тіла мишей була зниженою на 13 % ($19,3 \pm 0,4$ г відносно $16,8 \pm 0,8$ г; $P < 0,02$), що свідчить про загальнотоксичний вплив циклофосфану. Після введення таким мишам МСК тимуса цей показник залишався практично незмінним ($16,3 \pm 0,2$ г), і тому можна вважати, що антитоксичну дію за цих умов МСК тимуса не проявляють. Введення циклофосфану призводило до зниження клітинності кісткового мозку, яка не відновлювалася на 12-ту добу. Але у мишей, що отримували МСК, клітинність у цей термін уже достовірно не відрізнялася від норми (рис.1, а), що свідчило про позитивний вплив трансплантованих клітин. При дії циклофосфану достовірно знижувалася маса тимуса, загальна кількість тимоцитів та клітинність органа (див. рис.1, б), що свідчить про розвиток інволюції тимуса. За таких умов експерименту виявлялася позитивна дія МСК і щодо селезінки (див. рис.1, в). При введенні циклофосфану також достовірно знижувалася клітинність брижових лімфовузлів. Трансплантація МСК призводила до повного відновлення цього показника (див. рис.1, г).

Спонтанна проліферативна активність клітин лімфатичних вузлів мишей, що отримували циклофосфан і МСК, характеризувалася зниженням кількості непроліферуючих лімфоцитів (фаза G_0/G_1 , див. рис. 1, д), а також значним збільшенням проліферуючих клітин (фаза $S+G_2/M$, див. рис. 1, е), що узгоджується з отриманими в роботі результатами з активації проліферативної активності Т-лімфоцитів селезінки під впливом ФГА; внаслідок трансплантації МСК реакція бласттрансформації суттєво підсилювалася (див. рис. 1, е).

Таким чином, у разі введення МСК тимуса мишам, що отримували циклофосфан, част-

ково нормалізувалися клітинні показники в різних органах імунної системи.

Кількість лейкоцитів у крові суттєвих змін після введення циклофосфану не зазнавала, але число гранулоцитів у групі тварин, що одержували МСК, виявилось суттєво зниженим (800 ± 100 /мкл відносно 2000 ± 500 /мкл; $P < 0,02$). Вплив трансплантації МСК на вміст у крові еритроцитів і ретикулоцитів був протилежним такому на лімфоцити. Якщо кількість лімфоїдних клітин у різних органах імунодефіцитних мишей після введення МСК тимуса частково нормалізувалася, то при введенні таким тваринам МСК тимуса гема-

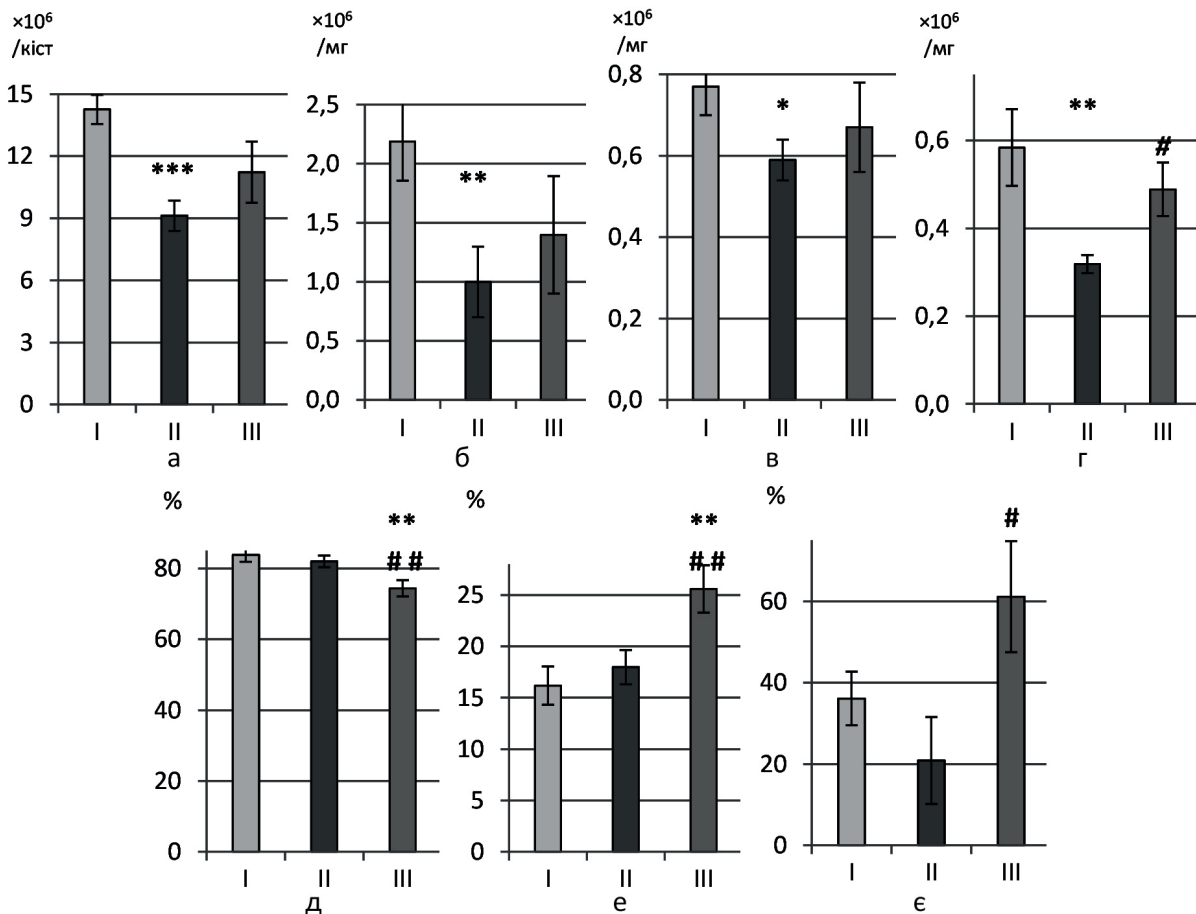


Рис 1. Значення клітинності кісткового мозку, лімфоїдних органів та проліферативна активність клітин мишей. I – контрольні тварини; II – тварини, що отримували циклофосфан; III - тварини, що отримували циклофосфан і мультипотентні стромальні клітини: а – кістковий мозок; б – тимус; в – селезінка; г – брижові лімфовузли; д - лімфатичні вузли брижі в фазі циклу G_0/G_1 ; е - клітини лімфатичних вузлів брижі в фазі циклу $S+G_2/M$; є – проліферативна активність спленоцитів у відповідь на ФГА. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фізіологічний розчин; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ порівняно з групою мишей, що отримували циклофосфан

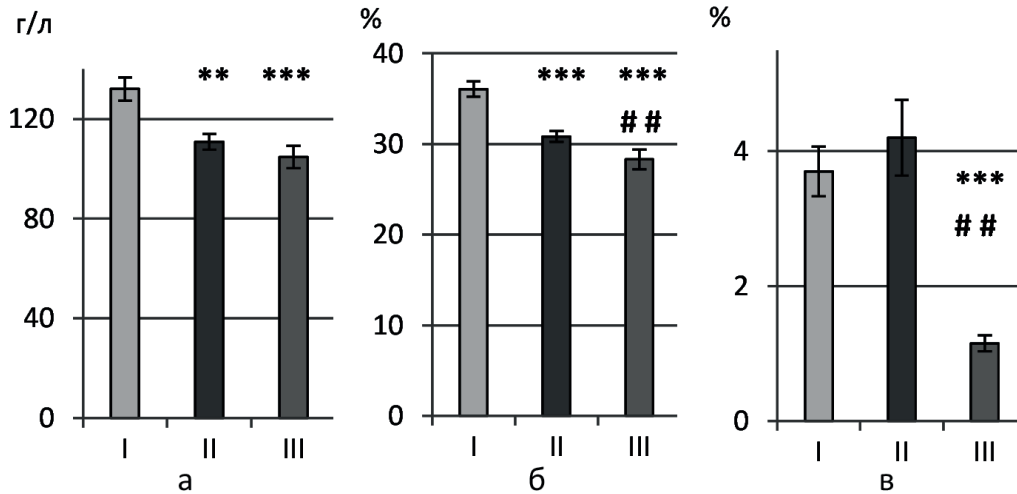


Рис 2. Гематологічні показники мишей: I – контрольні тварини; II – тварини, що отримували циклофосфан; III – тварини, що отримували циклофосфан і мультипотентні стромальні клітини. а – кількість гемоглобіну; б – гематокрит; в – кількість ретикулоцитів. ** P<0,01, *** P<0,001 порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фізіологічний розчин; ## P<0,01 порівняно з групою мишей, що отримували циклофосфан

токрит і особливо кількість ретикулоцитів суттєво знижувалися (див. рис. 2, а, б, в).

Вираженої динаміки зазнавала функціональна активність імунної системи. Якщо поглинальна активність макрофагів практично не змінювалася ні у разі введення циклофосфану, ні після дії МСК, то значення

інтенсивності світіння фагоцитуючих клітин GeoMaen (яке корелює з кількістю мікробів, фагоцитованих одним макрофагом) у мишей, що отримували МСК (див. рис.3, а), підвищувалося. Це свідчить про стимулюючий вплив трансплантованих клітин на більшість окремих фагоцитів.

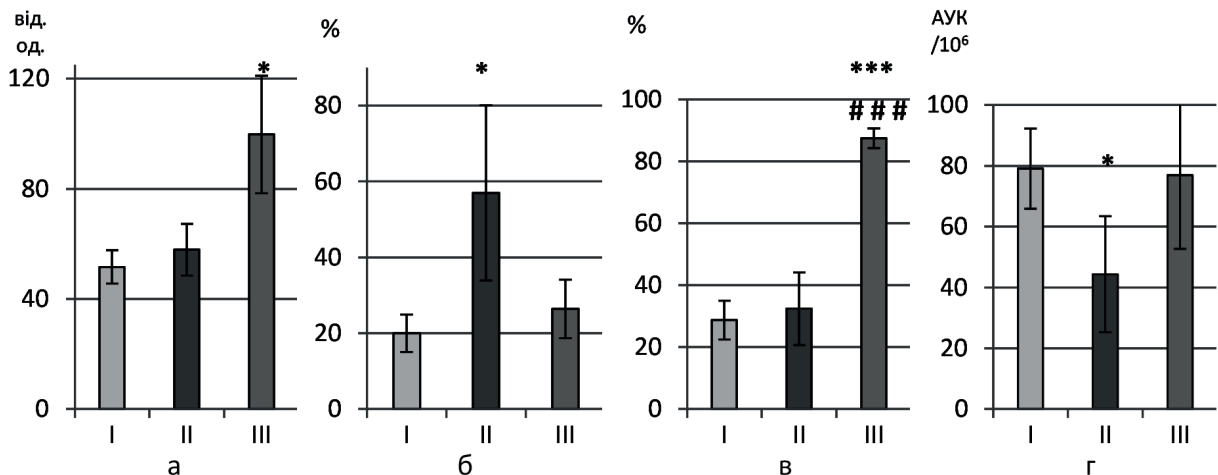


Рис. 3. Показники природного імунітету мишей. I – контрольні тварини; II – тварини, що отримували циклофосфан; III – тварини, що отримували циклофосфан і мультипотентні стромальні клітини. а – GeoMaen фагоцитуючих перитоніальних макрофагів; б – бактерицидна активність перитоніальних макрофагів; в – цитотоксична активність спленоцитів; г – кількість антитілоутворюючих клітин у селезінці. * P<0,05, *** P<0,001 порівняно з групою нормальних мишей, що отримували фізіологічний розчин; ### P<0,001 порівняно з групою мишей, що отримували циклофосфан

Бактерицидна активність перитоніальних макрофагів в НСТ-тесті під впливом циклофосфану суттєво підвищувалась і нормалізувалася при дії трансплантованих клітин (див. рис.3, б). За умов введення МСК тимуса спостерігався також виражений стимулюючий вплив на природну цитотоксичність спленоцитів (див. рис.3, в) і суттєве збільшення кількості АУК у селезінці (див. рис.3, г).

ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати і їх аналіз підтвердили імуносупресивну дію циклофосфану. Через 12 діб після моделювання імунодефіциту у мишей була суттєво зниженою маса тіла. Це може бути наслідком загальнотоксичного впливу циклофосфану, який крім проапоптотичної дії, що уражує активно проліферуючі імунні клітини, порушує діяльність організму, включаючи метаболічну, функціональну активність і регуляторні механізми [15]. У наших дослідженнях у разі введення імунодефіцитним мишам МСК тимуса маса тіла залишалася практично незмінною і була такою, що і у тварин, які одержували тільки циклофосфан. Тому можна вважати, що антитоксичного впливу за цих умов МСК тимуса не мають.

Є дані, що трансплантовані МСК здатні до міграції у кістковий мозок. Відомо також, що застосування циклофосфану може стимулювати експресію на МСК рецептора CXCR4, який забезпечує цей процес [16]. Можна припустити, що після внутрішньовенного введення МСК мишам принаймні частина з них мігрує до кісткового мозку, сприяючи відновленню мікрооточення ГСК.

При трансплантації МСК клітинність тимуса суттєво збільшувалася, що може бути пов'язано зі здатністю МСК пригнічувати активність зумовлених Fas-лігандами проапоптотичних процесів. Згідно з літературними даними, це можливо за рахунок позитивної регуляції МСК експресії антиапоптотичних протеїнів Bcl-2 і p-Akt та зниження експресії

проапоптотичного білка Вах [17]. Нами також показано, що за таких умов експерименту виявлялася позитивна дія МСК і відносно селезінки та лімфатичних вузлів, яка частково може реалізуватися тим самим антиапоптотичним механізмом.

Патологічні процеси посилюють міграцію МСК у регіональні лімфовузли, що продемонстровано на мишах лінії C57BL/6 з діабетом та при пересадці рогівки ока. Цілеспрямована міграція МСК і їх паракринна дія посилює їх імуномодулювальний ефект *in vivo* [18].

Дані про позитивний вплив МСК на проліферацію клітин лімфовузлів підтримуються результатами вивчення фаз клітинного циклу. Кількість клітин у G0/G1-фазах суттєво зменшувалася, а у фазах S+G2/M достовірно збільшувалася. Отримані результати узгоджуються з даними літератури щодо проапоптотичної дії циклофосфану та антиапоптотичної дії МСК [19]. Позитивний вплив трансплантації МСК на Т-лімфоцити підтверджується і стимуляцією реакції бласттрансформації.

Зниження кількості гранулоцитів у крові через 12 діб після введення циклофосфану у групі тварин, що одержували МСК, змінювалося, можливо, внаслідок гальмування мобілізації цих клітин [20]. Негативний вплив МСК на гранулоцити, еритроцити і ретикулоцити у зазначених умовах можливо також зумовлений конкурентними взаємовідношеннями різних ростків гемопоезу у нішах ГСК [2]. Вираженої стимуляції зазнавала функціональна активність імунної системи. Якщо поглинальна активність макрофагів практично не змінювалася ні при введенні циклофосфану, ні після дії МСК, то значення GeoMaen окремо фагоцитуючих клітин у мишей, що отримували МСК, значно зростали, що свідчить про стимулювальний вплив трансплантованих клітин на більшість фагоцитів.

Бактерицидна активність перитоніальних макрофагів в НСТ-тесті за дії циклофосфану суттєво підвищувалася, що, мабуть, відобра-

жає індукцію бактерицидності продуктами, що утворюються при проапоптотичній і токсичній дії циклофосфану на тканини, а також, можливо, є наслідком стимулювальної дії на фагоцити активованої імуносупресивним ефектом умовнопатогенної мікрофлори. Під впливом трансплантованих клітин спостерігається нормалізація бактерицидної активності. Це може означати, що протягом 12 діб трансплантовані МСК тимуса сприяють припиненню опортуністичної інфекції, і що супроводжується дезінтоксикацією. Отримані результати узгоджуються з дослідженнями, які демонструють позитивний вплив МСК на бактеріальний кліренс у доклінічних моделях гострого респіраторного дистрес-синдрому та сепсису [21].

Стимуляція природної цитотоксичності спленоцитів може бути спричинена підвищенням кількості лімфоки активованих лімфоцитів за умов «цитокінового шторму», характерного для регенерації гемопоєзу і функціонування МСК.

Активність реакції ГСТ у мишей у визначені терміни була нормальною, мабуть, тому що процеси регенерації ГСТ у цей час уже повністю відновлені, і введення МСК не впливало на цю реакцію. Водночас клітини В-ряду досить чутливі до циклофосфану, і відновлення антитілогенезу після його введення затримується. Вірогідно МСК сприяють стимуляції дозрівання АУК. Із літератури відомо, що МСК тимуса стимулюють синтез антитіл *in vivo*, коли вводяться сингенним нормальним мишам до імунізації. В системі первинної імунної відповіді *in vitro* МСК кісткового мозку пригнічують антитілоутворення, а МСК тимуса значно його стимулюють [22]. Це свідчить, що напрямок впливу МСК залежить і від умов їх функціонування, і від тканинного походження.

ВИСНОВКИ

В цілому результати свідчать, що сингенна трансплантація МСК тимуса мишам, які зна-

ходяться у процесі регенерації гемоімунопоезу після введення циклофосфану, проявляється різноспрямованими ефектами: пригніченням еритроцитарного гемопоєзу, зниженням у крові кількості гранулоцитів, але суттєвим прискоренням регенерації кісткового мозку і лімфоїдних органів з вираженим позитивним впливом на природний імунітет (підвищення природної цитотоксичності і фагоцитарної функції нейтрофілів з нормалізацією бактерицидної активності) та адаптивний імунітет (стимуляція формування АУК), що дає змогу розглядати трансплантацію МСК тимуса як перспективний напрямок у розробці сучасних підходів до стимуляції регенерації імунної системи.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

И.С. Никольский, В.В. Никольская, Д.Л. Демченко, Л.И. Тарануха, Я-М.А. Семенова, Т.В. Серебровская

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ ЕЕ РЕГЕНЕРАЦИИ

Исследовано влияние трансплантации мультипотентных стромальных клеток (МСК) тимуса на регенерацию поврежденной циклофосфаном иммунной системы мышей, что впоследствии может быть положено в основу разработки эффективных методов ее восстановления. Исследовано 3 группы иммунизированных мышей: контрольные, мыши, получавшие циклофосфан, и животные, получавшие циклофосфан и МСК. Однократное внутрибрюшинное введение циклофосфана проводили в дозе 200 мг/кг. Через 2 ч после этого в ретроорбитальный синус вводили МСК тимуса ($5 \cdot 10^4$) в объеме 0,1 мл. Через неделю после введения МСК мышей всех групп иммунизировали эритроцитами барана (10^8), еще через 4 дня проводили повторную инъекцию аналогичного количества клеток в подушечку задней лапы и через сутки оценивали состояние иммунной системы. Показано, что трансплантация МСК приводила к существенному уменьшению на 25 % количества гра-

нулоцитів і достовірно знижала гематокрит на 8,1 % і кількість ретикулоцитів на 71,4 %, однак виражено стимулювала регенеративну активність імунної системи. Вплив МСК на вроджений і адаптивний імунітет характеризувався суттєвим підвищенням естесвенної цитотоксичності спленоцитів в 2,7 рази і фагоцитарного індекса перитонеальних макрофагов на 72,2 %, нормалізацією бактеріцидної активності в НСТ-тесті, а також вираженої була стимуляцією антителогенеза. Отримані результати свідчать, що трансплантація МСК тимуса мишам, у яких іде регенерація гемоімунопоеза після введення циклофосфана може проявлятися різнонаправленими ефектами: стимуляцією імунної системи і задержкою оновлення кліток гранулоцитарного і еритроцитарного ростков кровотворення. Отримані результати можуть бути використані для розробки методів целенаправленої регенерації лімфоїдного компонента імунної системи, усилєня природного імунітета і гуморального імунного овета.

Ключові слова: мультипотентні стромальні клітки тимуса; регенерація імунної системи; циклофосфановий гемоімунодефіцит.

I.S. Nikolsky¹, V.V. Nikolskaya¹, D.L. Demchenko¹, L.I. Taranukha¹, Y.-M.A. Semenova¹, T.V. Serebrovska²

EFFECTS OF MULTIPOTENT STROMAL CELL TRANSPLANTATION ON MICE IMMUNE SYSTEM UNDER CONDITIONS OF ITS REGENERATION

The effects of thymic multipotent stromal cells (MSC) transplantation on the regeneration of mice immune system damaged by cyclophosphamide was investigated. Three groups of mice were examined: immunized control animals, immunized mice receiving cyclophosphamide, and immunized animals receiving cyclophosphamide and MSC. A single intraperitoneal injection of cyclophosphamide was performed at a dose of 200 mg / kg. Two hours later, thymic MSCs (5×10^4 , 0.1 ml) were injected into the retroorbital sinus. One week after MSC administration the mice of all groups were immunized with sheep erythrocytes (10^8), after 4 days a similar number of cells were re-injected into the hind foot pad, and the immune system was assessed after 24 hours. It was shown that transplantation of MSC led to a significant decrease in granulocyte count (by 25%), hematocrit (by 8.1%) and the number of reticulocytes (by 71.4%), however, expressed stimulation of the regenerative activity of the immune system was registered. The effect of MSC on innate and adaptive immunity was characterized by a marked increase in the natural cytotoxicity of splenocytes (by 2.7 times) and the phagocytic index of peritoneal macrophages (by 72.2%), normalization of bactericidal activity in the NCT test, and also expressed by stimulation of antibody response. The obtained results

show that transplantation of thymic MSC to mice with the regeneration of hemoimmunopoiesis after cyclophosphamide administration can manifest in multidirectional effects: stimulation of the immune system and delay in the renewal of granulocyte and erythrocyte germ cells. The data obtained can be used to develop methods for the targeted regeneration of the lymphoid component of the immune system, enhancement of natural immunity and a humoral immune response.

Key words: thymus multipotent stromal cells; immune system regeneration; cyclophosphamide heme immunodeficiency.

¹ State Institute of Genetic and Regenerative Medicine National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv;
² O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine,
e-mail: chekhdariia@gmail.com

REFERENCES

1. Lisianyі MI. Mesenchymal stem cells and their immunological properties. *Fiziol Zh.* 2013;59(3):126-34. [Ukrainian].
2. Nikolskaya EI, Butenko GM. Structural-functional organisation of the bone marrow hematopoietic stem cells niches. *Cell and organ transplantology.* 2016; 4(1):82-100.
3. Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, Frenkel J, Gregory C, Pochampally R, et al. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1 Stem Cells. 2009 Mar; 27(3):670-81. doi: 10.1002/stem.20080742.
4. Liubich LD, Lisyany NI. The influence of progenitor neuro- cells supernatant on the lymphocytes cytotoxic function in rats with glioma. *Fiziol Zh.* 2015;61(4):63-70. [Ukrainian].
5. Osada M, Singh VJ, Wu K, Sant'Angelo DB, Pezzano M. Label retention identifies a multipotent mesenchymal stem cell-like population in the postnatal thymus. *PLoS One.* 2013 Dec 10; 8(12):e83024. doi: 10.1371/journal.pone.0083024.
6. Grushka NG, Pavlovych SI, Bryzgina TM, Sukhina VS, Makogon NV, Yanchiy RI. Genotoxic stress and the pathways of thymus cell death and lymph nodes of mice in conditions of immunocomplex pathology. *Fiziol Zh.* 2015;61(1):28-34. [Ukrainian].
7. Xu SF, Yu LM, Fan ZH, Wu Q, Yuan Y, Wei Y, Fang N. Improvement of ginsenoside Rg1 on hematopoietic function in cyclophosphamide-induced myelosuppression mice. *Eur J Pharmacol.* 2012 Nov 15;695(1-3):7-12. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.07.050. Epub 2012 Aug 23.
8. Prockop DJ, Phinney DG, Bunnell BA. Mesenchymal stem cells: methods and protocols. Humana Press. 2008; 192. [Russian].
9. Kim WK, Jung H, Kim DH, Kim EY, Chung JW, Cho YS, et al. Regulation of adipogenic differentiation by LAR tyrosine phosphatase in human mesenchymal stem cells and 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Sci.* 2009 Nov 15; 122(Pt 22):4160-7. doi: 10.1242/jcs.053009.

10. Khaitov RM, Pinegin BV, Yarilin AA Guide to Clinical Immunology. Diagnosis of immune system diseases: a guide for doctors. Moscow: GEOTAR-Media. 2002; 352. [Russian].
11. Frimmel G. Immunological methods edited by Frimmel G. Moscow: The world. 1987; 472. [Russian].
12. Dons'koї BV, Chernyshov VP, Sirenko VIu, Strelko HV, Osypchuk DV. Effect of hypo- and hyper- accentuated NK cell activity on embryo implantation. Fiziol Zh. 2014;60(1):56-63. [Ukrainian]
13. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Methods. 1983 Dec 16; 65(1-2):55-63.
14. Sugiura H, Sugiura H, Nishida H, Inaba R, Mirbod SM, Iwata H. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. J Appl Physiol (1985). 2001 Mar; 90(3):789-94. doi: 10.1152/jappl.2001.90.3.789.
15. Telegin L IU. Pharmacogenetics of cyclophosphamide. Moscow:INFRA-M. 2012; 80. [Russian].
16. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. Blood. 2004 Nov 1; 104(9):2643-5. doi: 10.1182/blood-2004-02-0526.
17. Li TS, Shi H, Wang L, Yan C. Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Satellite Cell Proliferation and Apoptosis in Immobilization-Induced Muscle Atrophy in Rats. Med Sci Monit. 2016 Nov 29; 22:4651-60.
18. Li H, Jiang Y, Jiang X, Guo X, Ning H, Li Y, et al. CCR7 guides migration of mesenchymal stem cell to secondary lymphoid organs: a novel approach to separate GvHD from GvL effect. Stem Cells. 2014; 32:1890-903. doi: 10.1002/stem.1656
19. Strauss G, Westhoff MA, Fischer-Posovszky P, Fulda S, Schanbacher M, Eckhoff SM, Stahnke K, Vahsen N, Kroe-mer G, Debatin KM. 4-hydroperoxy-cyclophosphamide mediates caspase-independent T-cell apoptosis involving oxidative stress-induced nuclear relocation of mitochondrial apoptogenic factors AIF and EndoG. Cell Death Differ. 2008 Feb;15(2):332-43.
20. Lapid K, Glait-Santar C, Gur-Cohen S, Canaani J, Kollet O, Lapidot T. Egress and Mobilization of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: A dynamic multi-facet process (December 10, 2012), StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stem-book.1.91.1, <http://www.stembook.org>.
21. Jackson MV, Morrison TJ, Doherty DF, McAuley DF, Matthey MA, Kissenpfennig A, et al. Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. Stem Cells. 2016 Aug; 34(8):2210-23. doi: 10.1002/stem.2372.
22. Nikolsky IS, Nikolskaya VV, Savinova VO. Influence of thymic multipotent stromal cells intravenous introduction on immune response. Bull Ural Med Acad. 2012; 4: 55-6. [Russian].

Матеріал надійшов до редакції 07.05.2018