



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

АДЕЛИНА ДАНИЕЛОВА ЙОРДАНОВА

**ВЛИЯНИЕ НА СЕКРЕТОМ ОТ МЕЗЕНХИМНИ
СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ВЪРХУ В ЛИМФОЦИТИ**

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Докторска програма „Имунология“

Научен ръководител:

доц. д-р Екатерина Иванова Иванова-Тодорова, дм

София, 2024

СЪДЪРЖАНИЕ

| | |
|--|-----|
| ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ | 4 |
| I. ВЪВЕДЕНИЕ | 8 |
| II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР | 9 |
| 1. МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ | 9 |
| 1.1 ХАРАКТЕРИСТИКА НА МЕЗЕНХИМНИТЕ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ | 10 |
| 1.2 РОЛЯ НА МСК ЗА ХОМЕОСТАЗАТА НА ОРГАНИЗМА | 13 |
| 1.3 РОЛЯ НА КЛЕТЪЧНИЯ КОНТАКТ НА МСК В ИМУННАТА МОДУЛАЦИЯ..... | 15 |
| 2. СЕКРЕТОМ ОТ МСК | 15 |
| 2.1 РОЛЯ НА СЕКРЕТОМ ОТ МСК ПРИ АВТОИМУННИ ЗАБОЛЯВАНИЯ..... | 15 |
| 2.2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ IN VITRO, IN VIVO ИЗСЛЕДВАНИЯ И КЛИНИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ СЪС СЕКРЕТОМ ОТ МСК В ОБЛАСТТА НА АВТОИМУНИТЕТА | 22 |
| 3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ МСК И В ЛИМФОЦИТИ | 27 |
| 4. СИСТЕМЕН ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС – “ВЕЛИКИЯТ ИМИТАТОР” | 39 |
| 4.1 ЕПИДЕМИОЛОГИЯ..... | 40 |
| 4.2 ЕТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗА | 40 |
| 4.3 РОЛЯ НА В ЛИМФОЦИТИТЕ ПРИ СЛЕ | 43 |
| 4.4 ДРУГИ КЛЕТКИ, УЧАСТВАЩИ В ПАТОГЕНЕЗАТА НА СЛЕ | 47 |
| 4.5 КЛИНИЧНА КАРТИНА НА СЛЕ | 49 |
| 4.6 ТЕРАПЕВТИЧЕН ПОТЕНЦИАЛ НА МСК ПРИ СЛЕ | 49 |
| 5. АНКИЛОЗИРАЩ СПОНДИЛИТ – БОЛЕСТ НА БЕХТЕРЕВ | 51 |
| 5.1 ЕПИДЕМИОЛОГИЯ..... | 51 |
| 5.2 ЕТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗА | 52 |
| 5.3 ГЕНЕТИЧНИ И ЕПИГЕНЕТИЧНИ ФАКТОРИ..... | 52 |
| 5.4 РОЛЯ НА В КЛЕТКИТЕ ПРИ АС..... | 56 |
| 5.5 КЛИНИЧНА КАРТИНА | 59 |
| 5.6 ТЕРАПЕВТИЧЕН ПОТЕНЦИАЛ НА МСК ПРИ АС | 60 |
| 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 61 |
| III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ | 62 |
| IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ | 63 |
| 1. МАТЕРИАЛИ: | 63 |
| 1.1 ИЗСЛЕДВАНИ ЛИЦА..... | 63 |
| 1.2 БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ, НЕОБХОДИМ ЗА ЦЕЛИТЕ НА НАСТОЯЩИЯ ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД | 72 |
| 2. МЕТОДИ: | 73 |
| 2.1 КЛЕТЪЧНО КУЛТИВИРАНЕ | 73 |
| 2.1.1 ИЗОЛИРАНЕ И КУЛТИВИРАНЕ НА ЧОВЕШКИ ПВ-МСК..... | 73 |
| 2.1.2 ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ИЗОЛИРАНИТЕ ОТ ПЪПНА ВРЪВ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ..... | 78 |
| 2.1.3 ИЗОЛИРАНЕ И КУЛТИВИРАНЕ НА МОНОУКЛЕАРНИ КЛЕТКИ ОТ ПЕРИФЕРНА ВЕНОЗНА КРЪВ..... | 82 |
| 2.2 ФЛОУЦИТОМЕТРИЧЕН МЕТОД..... | 85 |
| 2.2.1 ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПОВЪРХНОСТНАТА ЕКСПРЕСИЯ НА СПЕЦИФИЧНИ В- КЛЕТЪЧНИ МАРКЕРИ, СВЪРЗАНИ С ТЯХНАТА АКТИВАЦИЯ, АНТИГЕН-ПРЕДСТАВЯЩА ФУНКЦИЯ И ПРЕЖИВЯВАНЕ | 85 |
| 2.2.2 ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНО ДЕТЕКТИРАНЕ НА АПОПТОТИЧНИ И НЕКРОТИЧНИ CD19 ⁺ В ЛИМФОЦИТИ | 89 |
| 2.3 ИМУНОЕНЗИМНИ МЕТОДИ: | 93 |
| 2.4 ГРАФИЧНО ПРЕДСТАВЯНЕ И СТАТИСТИЧЕСКА ОБРАБОТКА НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ | 100 |
| V. РЕЗУЛТАТИ | 102 |

| | |
|---|------------|
| 1. ОБОБЩЕНИЕ НА ДЕМОГРАФСКИТЕ, КЛИНИЧНИТЕ И ИМУНОЛОГИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ И ЗДРАВИ ДОБРОВОЛЦИ | 102 |
| 2. ИЗОЛИРАНЕ, КУЛТИВИРАНЕ И ПОЛУЧАВАНЕ НА КОНДИЦИОНИРАНА СРЕДА ОТ ЧОВЕШКИ ПВ-МСК | 106 |
| 3 ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ИЗОЛИРАНИТЕ ОТ ПЪПНА ВРЪВ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ | 108 |
| 4 ИЗОЛИРАНЕ И КУЛТИВИРАНЕ НА РВМС ОТ ЗДРАВИ ДОБРОВОЛЦИ, ПАЦИЕНТИ СЪС СЛЕ И АС | 113 |
| 5 ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПРОМЯНАТА НА ПОВЪРХНОСТНАТА ЕКСПРЕСИЯ НА СПЕЦИФИЧНИ В-КЛЕТЪЧНИ МАРКЕРИ, СВЪРЗАНИ С ТЯХНАТА АКТИВАЦИЯ, АНТИГЕН-ПРЕДСТАВЯЩА ФУНКЦИЯ И ПРЕЖИВЯВАНЕ, ПОД ВЛИЯНИЕ НА СЕКРЕТОМ ОТ МСК | 114 |
| 5.1 ВЛИЯНИЕ НА СЕКРЕТОМ ОТ МСК ВЪРХУ В-КЛЕТЪЧНАТА ЕКСПРЕСИЯ НА CD80..... | 114 |
| 5.2 ВЛИЯНИЕ НА СЕКРЕТОМ ОТ МСК ВЪРХУ В-КЛЕТЪЧНАТА ЕКСПРЕСИЯ НА CD86..... | 116 |
| 5.3 ВЛИЯНИЕ НА СЕКРЕТОМ ОТ МСК ВЪРХУ В-КЛЕТЪЧНАТА ЕКСПРЕСИЯ НА BR3..... | 118 |
| 5.4 ВЛИЯНИЕ НА СЕКРЕТОМ ОТ МСК ВЪРХУ В-КЛЕТЪЧНАТА ЕКСПРЕСИЯ НА CD40..... | 121 |
| 5.5 ВЛИЯНИЕ НА СЕКРЕТОМ ОТ МСК ВЪРХУ В-КЛЕТЪЧНАТА ЕКСПРЕСИЯ НА HLA-DR..... | 123 |
| 5.6 ВЛИЯНИЕ НА СЕКРЕТОМ ОТ МСК ВЪРХУ В-КЛЕТЪЧНАТА ЕКСПРЕСИЯ НА PD-1..... | 126 |
| 6 ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНО ДЕТЕКТИРАНЕ НА АПОПТОТИЧНИ И НЕКРОТИЧНИ CD19⁺ В ЛИМФОЦИТИ ОТ ПЕРИФЕРНИ МОНОНУКЛЕАРНИ КЛЕТКИ | 128 |
| 7 ВЛИЯНИЕ НА СЕКРЕТОМ ОТ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ВЪРХУ ЦИТОКИНОВАТА СЕКРЕЦИЯ ОТ ПЕРИФЕРНИ МОНОНУКЛЕАРНИ КЛЕТКИ | 130 |
| 7.1 ВЛИЯНИЕ НА СЕКРЕТОМ ОТ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ВЪРХУ СЕКРЕЦИЯТА НА СПЕЦИФИЧНИЯ ЗА В КЛЕТКИТЕ ЛИГАНД VAFF/BLYS ОТ ПЕРИФЕРНИ МОНОНУКЛЕАРНИ КЛЕТКИ..... | 131 |
| 7.2 ВЛИЯНИЕ НА СЕКРЕТОМ ОТ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ВЪРХУ СЕКРЕЦИЯТА НА IDO ОТ ПЕРИФЕРНИ МОНОНУКЛЕАРНИ КЛЕТКИ..... | 131 |
| 7.3 ВЛИЯНИЕ НА СЕКРЕТОМ ОТ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ВЪРХУ СЕКРЕЦИЯТА НА PGE2 ОТ ПЕРИФЕРНИ МОНОНУКЛЕАРНИ КЛЕТКИ..... | 131 |
| 8 КОРЕЛАЦИОНЕН АНАЛИЗ НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ | 134 |
| VI. ОБСЪЖДАНЕ | 146 |
| 1. ХАРАКТЕРИСТИКА НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ И ЗДРАВИ ДОБРОВОЛЦИ..... | 146 |
| 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НА МСК И ПОЛУЧАВАНЕ НА КОНДИЦИОНИРАНА СРЕДА..... | 151 |
| 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДИЗАЙН..... | 155 |
| 4. ВЛИЯНИЕ НА СЕКРЕТОМ ОТ МСК ВЪРХУ СПЕЦИФИЧНИ В-КЛЕТЪЧНИ МАРКЕРИ, СВЪРЗАНИ С ТЯХНАТА АКТИВАЦИЯ, АНТИГЕН-ПРЕДСТАВЯЩА ФУНКЦИЯ И ПРЕЖИВЯВАНЕ..... | 158 |
| 5. ВЛИЯНИЕ НА СЕКРЕТОМ ОТ МСК ВЪРХУ АПОПТОЗАТА НА В ЛИМФОЦИТИ..... | 173 |
| 6. СЕКРЕЦИЯ НА РАЗТВОРИМИ ФАКТОРИ ОТ РВМС ПОД ВЛИЯНИЕ НА СЕКРЕТОМ ОТ МСК..... | 176 |
| VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И БЪДЕЩИ НАСОКИ | 183 |
| VIII. ИЗВОДИ | 185 |
| IX. ПРИНОСИ | 186 |
| <input type="checkbox"/> ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР..... | 186 |
| <input type="checkbox"/> ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР..... | 186 |
| <input type="checkbox"/> ПРИНОСИ С ДИСКУТАБИЛЕН ХАРАКТЕР..... | 186 |
| X. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ | 187 |
| <input type="checkbox"/> ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД..... | 187 |
| <input type="checkbox"/> УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД..... | 187 |
| <input type="checkbox"/> УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД..... | 188 |
| XI. ПРИЛОЖЕНИЯ | 189 |
| XII. БЛАГОДАРНОСТИ | 199 |
| XIII БИБЛИОГРАФИЯ | 200 |

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Използвани съкращения на кирилица:

| | |
|--|--|
| <i>АНА</i> - анти-нуклеарни антитела | <i>МС</i> - множествена склероза |
| <i>АТ-МСК</i> – мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан | <i>МСК</i> – мезенхимни стволови клетки |
| <i>АПК</i> - антиген-представящи клетки | <i>МСП</i> - мускулно-скелетни прояви |
| <i>АС</i> - анкилозиращ спондилит | <i>НПП</i> - невро-психиатрични прояви; |
| <i>БМАРЛ</i> - болест-модифициращи антиревматични лекарства | <i>НСПВС</i> - нестероидни противовъзпалителни средства |
| <i>БУ</i> - бъбречно увреждане | <i>ОЕ-МСК</i> - обонятелни ектомезенхимни стволови клетки |
| <i>ВЛО</i> – вторични лимфоидни органи | <i>ПВ-МСК</i> – мезенхимни стволови клетки от пъпна връв |
| <i>двДНК</i> - двуверижна ДНК | <i>ПВ-МСКкс</i> – кондиционирана среда на мезенхимни стволови клетки от пъпна връв |
| <i>ЕДТА</i> - етилендиаминтетраоцетна киселина | <i>РА</i> - ревматоиден артрит |
| <i>ЕВ</i> - екстрацелуларни везикули | <i>СЛЕ</i> - системен лупус еритематозус |
| <i>ЕПР</i> – ендоплазмен ретикулум | <i>СпА</i> – спондилоартропатии |
| <i>ЕАЕ</i> - експериментален автоимунен енцефаломиелит | <i>СРП</i> - С-реактивен протеин |
| <i>ИИФ</i> - индиректна имунофлуоресценция | <i>ССк</i> – системна склероза |
| <i>ИС</i> - имуносупресивни лекарства | <i>СУЕ</i> – скорост на утаяване на еритроцитите |
| <i>КЛП</i> - кожно-лигавични прояви | <i>ХО</i> - хематологични отклонения |
| <i>КМ-МСК</i> - костно-мозъчни мезенхимни стволови клетки | <i>ХСК</i> – хематопоеични стволови клетки |
| <i>МАФ</i> – макрофаги | <i>ЦНС</i> – централна нервна система |

Използвани съкращения на латиница:

| | |
|--|---|
| <i>ABC</i> – атипични В клетки | <i>ASDAS - СРП</i> - Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score with CRP |
| <i>ACR</i> - Американския Колеж по Ревматология | <i>BAFF/Bl_ys</i> - В-клетъчен активационен фактор/ В-лимфоцитен стимулатор |
| <i>ALP</i> – алкална фосфатаза | <i>BANK1</i> - B Cell Scaffold Protein With Ankyrin Repeats 1 |
| <i>aP2</i> - адипоцитен протеин 2 | <i>BASDAI</i> - Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index |
| <i>APRIL</i> - a proliferation-inducing ligand | <i>BASFI</i> - Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index |
| <i>ASAS</i> - Международното дружество за оценка на спондилоартрит | |

Bcl-6 - B-cell lymphoma 6

BCMA - B-cell maturation antigen

BCR - B-клетъчен мембранен рецептор

Blimp-1 - B-lymphocyte-induced maturation protein 1

BLK - B-lymphoid tyrosine kinase

BMP-9 - костен морфогенен протеин

BR3/BAFF-R – рецептор за B-клетъчен активационен фактор

Bregs - регулаторни B клетки

CFU-F – фибробласт колония-образуваща единица

circRNAs – кръгови РНК

CMV – Цитомегаловирус

COX – циклооксигеназа

CTL – цитотоксични Т лимфоцити

CTLA-4 - cytotoxic T lymphocyte associated protein 4

DC - дендритни клетки

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – диметилсулфоксид

DSS - декстран натриев сулфат

EBI3 - EBV-индуциран ген 3

EBV – вирус на Епщайн-Бар

EGF - епидермален растежен фактор

ELISA – ензимно-свързан имуносорбентен тест

ERAPs - endoplasmic reticulum aminopeptidases

FBS – фетален телешки серум

FCGR - Fc Gamma Рецептор

FGF - фибробластен растежен фактор

Flt-3L - Fms-свързан тирозин киназен 3 лиганд

Gal-9 - галектин-9

GAPDH - глицералдеhid 3-фосфат дехидрогеназа

G-CSF/GM-CSF - гранулоцит/гранулоцит-макрофагиален колония-стимулиращ фактор

GPCR - G-протеин свързващи рецептори

GVHD - болест на присадката срещу гостоприемника

HB-EGF - хепарин-свързващ EGF-подобен растежен фактор

HBV - вирус на хепатит Б

HGF - хепатоцитен растежен фактор

HIV-1- човешки имунодефицитен вирус 1

HO-1 - хем оксигеназа-1

HRP - horse-radish peroxidase

HSP - протеини на топлинния шок

IBD – възпалителни заболявания на червата

IBMX – 3-изобутил-1-метилксантин

ICAM-1 - междуклетъчна адхезионна молекула-1

ICAP - International consensus on ANA Patterns

IDO - индоламин 2,3-диоксигеназа

IFN-γ - интерферон-γ

IGF-1 - инсулин-подобен растежен фактор 1

IL – интерлевкин

ILC - лимфоидни клетки на вродения имунитет

iPSC-MCK - индуцирани плурипотентни MCK

IRAK1 - interleukin-1 receptor-associated kinase 1

IRF-1 - interferon regulatory factor 1

ISCT - Международно дружество за клетъчна терапия

ITGAM - integrin subunit alpha M

JAK - Janus кинази

JNK - c-Jun N-terminal kinase signaling pathway

KGF - кератиноцитен растежен фактор

KIRs - killer cell immunoglobulin-like receptors

LIRs - leukocyte immunoglobulin-like receptors

LL-37 - човешки кателицидин

LPL - липопротеин липаза

LPS – липополизахарид

MAPK - p38 mitogen activated protein kinase signaling pathway

MBL - манан-свързващ лектин

MCP - моноцитен хемоатрактантен протеин

MHC – главен комплекс на тъканна съвместимост (*HLA* – човешки левкоцитен антиген)

MIF - инхибиторен фактор на миграцията на макрофагите

miRNAs – микро РНК

MMPs - матриксни металопроотеинази

MUC2 – муцин 2

MZ – маргинална зона

ncRNAs – некодиращи РНК

NET – неутрофилни екстрацелуларни капани

NF-kB - nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells signaling pathway

NIH - Национална медицинска библиотека на САЩ

NK – клетки естествени убийци

NKT - естествени Т клетки-убийци

NOD - миши модели на автоимунен диабет

NOS - азотен оксид синтаза

OAZ - olfactory 1/early B-cell factor-associated zinc-finger protein

OCN – остеокалцин

OSX - остерикс

PAX-5 - paired box 5 protein

PBMC - периферни мононуклеарни клетки

PBS – Phosphate buffered saline

PD-1/PD-L1 - programmed cell death protein 1/programmed death ligand 1

pDC – плазмацитогидни дендритни клетки

PDGFs - тромбоцитни растежни фактори

PGE2 - простагландин E2

PGK1 - фосфолицерат киназа 1

PPARγ - peroxisome proliferator activated receptor gamma

PS - фосфотидил серин

PTGER - простагландин E рецептор

PTPN22 - protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22

Rab - Ras-асоциирани свързващи протеини

RNP - рибонуклеопротеини

ROS - реактивни кислородни субстанции

RTK - рецепторна тирозин киназа

RUNX2 - runt-related transcription factor 2

SAP - signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) associated protein

SCF - stem cell factor

SDF1 - stromal cell-derived factor 1

SHP-2 - src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2

SLEDAI - Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

SLICC - Systemic Lupus International Collaborating Clinics

SOCS-1 - супресор на цитокиновата сигнализация 1

STATs - signal transducer and activator of transcription proteins

TAC1 – transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand (CAML) interactor

TCR – Т-клетъчен мембранен рецептор

TGF-β - трансформиращ растежен фактор-β

TIMP - тъканен инхибитор на металопроотеиназа

TLR - Toll-подобен рецептор

TNF – тумор некротизиращ фактор

TNFSF4 - TNF Superfamily Member 4

TPO - тромбопоетин

TRAIL - лиганд-индуциращ апоптоза, свързан с
тумор некротизиращ фактор алфа

Tregs – регулаторни Т клетки

TREX1 - three prime repair exonuclease 1

TSG-6 - тумор некротизиращ фактор (TNF)-
стимулиращ ген-6

UPR - The unfolded protein response

VEGF - васкуларен ендотелен растежен фактор

WJ - Wharton's Jelly

WJ-MCK - мезенхимни стволови клетки от
Wharton's jelly

Xbp-1 - X-boxed свързващ протеин 1

β 2m - β 2-микроглобулина

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Напредъкът на науката в областта на биологията на стволовите клетки предоставя познание за тяхното поведение и взаимодействие с други клетъчни типове не само при физиологични, но и при патологични условия. Мезенхимните стволови клетки (*МСК*) са обект на задълбочени изследвания и дискусии с давност вече повече от 30 години. Доказан е ползотворният ефект на този вид стволови клетки от клинични проучвания след трансплантация при пациенти с хронични, автоимунни, невродегенеративни и сърдечно-съдови заболявания. Липсват достатъчно убедителни експериментални и клинични данни в тази насока, по отношение на **секретома от МСК** - празнина в научното знание, която предстои да бъде запълнена.

Поради комплексната имунопатогенеза на автоимунните заболявания настоящият дисертационен труд е фокусиран върху изследване влиянието на секретом от *МСК* върху имунни клетки с важно биологично значение за възникването и разгръщането на автоимунната патогенеза, а именно **В лимфоцитите**. Този вид лимфоцити са натоварени с изключително важната задача, като едни успешно реализирали се плазматични клетки в хода на автоимунния отговор, да продуцират и **секретират автоантитела**. Далеч обаче функциите на В клетките не се ограничават само и единствено с продукцията на антитела, тъй като успешно **представят антигени** и могат да бъдат едновременно **медиатори и супресори на органното възпаление**.

Оскъдните данни в областта пораждаат въпроса, дали множеството паракринни молекули, освободени от *МСК*, част от които с мощно **имуносупресивно действие**, биха могли да повлияят на биологията и цялостната функционална активност на тези, ключови за автоимунните пациенти, В клетки? С цел да се даде ясен отговор на поставения по-горе въпрос, се проследява *in vitro* влиянието на секретом от *МСК*, под формата на кондиционирана среда, върху молекули на В-клетъчната мембрана, свързани с активирането, антиген-представящата функция и преживяването на В клетките на пациенти със системен лупус еритематозус, анкилозиращ спондилит, както и на здрави доброволци. Проследява се и промяната в концентрацията на лиганди, които са функционално ангажирани в оцеляването и пролиферацията на В клетките, както и на други имуносупресивни ензими и протеини, за да могат да се обогатят и разширят знанията в областта.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Мезенхимни стволови клетки

Възможността за терапевтично приложение на стволови клетки при множество заболявания, включително хематологични, неврологични, метаболитни, имуномедиирани и аутоимунни, успява да привлече значителен интерес през последните години в областта на съвременната експериментална медицина (Aly 2020). Светът на стволовите клетки обаче е огромен и изборът на подходящия тип стволови клетки за приложение при дадено заболяване е от съществено значение. В зависимост от способността им да се диференцират или т.нар. “пластичност”, стволовите клетки биват: *тотипотентни* (дават началото на всяка клетка на ембриона, но също така и на клетки от извънембрионалната тъкан), *плюрипотентни* (дават началото на клетки от трите ембрионални зародишни слоя), *мултипотентни* (могат да се диференцират само в една тъкан от зародишната линия), *олигопотентни* (могат да се диференцират в ограничен брой клетъчни линии) и *унипотентни* (диференцират се само в една клетъчна линия) (Khan 2021; Poliwoda et al. 2022). Повечето изследвания се провеждат с мултипотентни стволови клетки поради различни етични причини, както и такива, свързани с тяхната ефективност, тъй като използването им е евтино и не нарушават моралните и етични права (Lo and Parham 2009).

Мултипотентните стволови клетки могат да се диференцират в клетки от един зародишен слой (ектодерма, ендодерма или мезодерма) и се класифицират като хематопоеични (*ХСК*) и мезенхимни стволови клетки (*МСК*) (Khan 2021). *ХСК* успешно се прилагат в медицинската практика за лечение, но все пак предизвикателство пред приложението на този вид стволови клетки е свързано с относително ниския брой първоначално изолирани клетки. Ето защо, в допълнение на това трябва да се добави и необходимостта от развитието на нови подходи за размножаването им, за да може да се постигне успеваемост по отношение на терапевтичното им приложение при възрастни и пациенти с наднормено тегло (Schuster et al. 2012). От друга страна, обектът на настоящия дисертационен труд – *МСК*, са най-разпознаваемите мултипотентни стволови клетки и, за разлика от *ХСК*, могат да бъдат успешно размножени *in vitro* до необходимата доза за клинично приложение (Beyer Nardi and da Silva Meirelles 2006).

Поради тази причина, сериозно внимание се обръща на възможността за приложение на *МСК* като подход за терапия при множество заболявания, в основата на която стоят техните имуномодулиращи свойства, голяма пластичност, способност за тъканно възстановяване и регенерация (Merimi et al. 2021). Всички тези качества са необходими на *МСК* за успешното им приложение при автоимунните заболявания.

Още повече, ключът към голямата терапевтична ефективност се крие в това, че *МСК* могат да упражняват споменатите по-горе ефекти както чрез механизмите на междуклетъчния контакт, така и посредством секрецията на множество разтворими молекули с важни биологични действия (Planat-Benard et al. 2021). Съвкупността от всички молекули, секретирани от *МСК*, може да се нарече с общото наименование "*секретом*" (González-González et al. 2020). Подробна информация относно *МСК*, съставът на техния секретом и неговият потенциал да повлиява имунните клетки са нагледно представени в настоящия дисертационен труд.

1.1 Характеристика на мезенхимните стволови клетки

Пътешествието в света на *МСК* започва далеч назад във времето, когато благодарение на един изследователски екип начело с *A.J. Friedenstein* за първи път светът на науката разбира за съществуването на клетки с фибробластно-подобна морфология, които впоследствие стават известни като *МСК*. През 60-те години на ХХ век *A.J. Friedenstein* и сътр. демонстрират, че костен мозък на плъх съдържа клоногенни прогениторни клетки, които при култивиране дават началото на фибробласти и други мезодермални клетки с много висок потенциал за репликация *in vitro* (Stefańska et al. 2020). Може би, откритието е било продиктувано от едно друго изследване през далечната 1867г., когато патологът с немски произход *Cohnheim* установява в костен мозък наличието на нехематопоеични клетки, от които произлизат клетки с фибробластна морфология и с потенциал за възстановяване на тъканни увреждания (Chamberlain et al. 2007). Въпреки това, *A.J. Friedenstein* се смята за официалния откривател на *МСК* и пионер в областта (Andrzejewska et al. 2019), защото поставя началото на упорития научен труд на няколко поколения вдъхновени изследователи по целия свят, целящи да научат повече за биологията и функционалните свойства на *МСК*. Резултатът до днес са над 1000 клинични проучвания с *МСК* на различен етап в области като неврология, онкология, имунология, в това число и автоимунитет, според *Националната медицинска библиотека (NIH)* на САЩ (*clinicaltrials.gov*). Важно е да се отбележи, че преобладават

клиничните проучвания в академичната област спрямо тези в индустриалната (Naji et al. 2019).

От историческа гледна точка за първи път *Arnold Caplan* изолира и култивира *МСК* от човешки тъкани през 1991г. (Caplan 1991). На този изследовател се дължи и внедряването на термина “мезенхимни стволови клетки” през същата година, като оттогава до сега наименованието на стволовите клетки с мезодермален произход предизвиква значителни дебати и дискусии. Действително, днес терминът “мезенхимни стволови клетки” се е наложил сред научното общество, макар да не е напълно акуратен. *МСК* са били известни първоначално като „костно-мозъчни мултипотентни стромални клетки“, „мултипотентни стволови клетки“, „мезенхимни стромални клетки“ (Stefańska et al. 2020). Самият *A. Caplan* впоследствие предлага терминът “мезенхимни стволови клетки” да бъде заменен от „медицинско сигнализиращи клетки“, тъй като могат да бъдат изолирани от различни тъкани и в същото време да изпълняват множество функции с терапевтично значение посредством секрецията на различни медиатори на местата на нараняване или възпаление (Caplan 2017). Въпреки всички тези предложения, терминът “мезенхимни стволови клетки”, както беше споменато, вече се е наложил значително сред научната общност и повсеместно бива използван сред нея.

В контекста на гореизложената информация, трябва да се отбележи, че за да се определят изолирани човешки клетки като *МСК* според *Международното дружество за клетъчна терапия (ISCT)* клетките трябва да отговарят на минимални критерии, като (1) способност за прилепване към пластмасовата повърхност или стената на съда за клетъчно култивиране след изолиране на клетките; (2) $\geq 95\%$ от популацията на *МСК* трябва да експресират повърхностни маркери като *CD73* (екто-5'-нуклеотидаза), *CD90* (Thy-1), *CD105* (ендоглин), но да бъдат отрицателни за експресията на маркери, специфични за хематопоетичната линия, като *CD34* (трансмембранен сиаломуцин, експресиран върху хематопоетични и ендотелни клетки), *CD45* (общ левкоцитен антиген), *CD14* (липополизахарид-свързващ протеин, продуциран предимно от макрофаги - *МАФ*), *CD11b* (интегрин алфа М, ITGAM), *CD79a* (алфа верига на В-клетъчен антиген-рецепторен комплекс-асоцииран протеин или *MB-1* мембранен гликопротеин), *CD19* (В-клетъчен маркер) и *HLA-DR* (повърхностен рецептор на главния комплекс за тъканна съвместимост (МНС) клас II, кодиран от човешки левкоцитен антигенен комплекс-*HLA* на хромозома 6); и не на последно място (3) третият критерии е свързан с потенциала на *МСК* да диференцират *in vitro* в

остеобласти, адипоцити и хондробласти след стимулация със специфични фактори за диференциация (Dominici et al. 2006).

От многобройните експериментални изследвания това, което днес е известно за *МСК* е, че представляват хетерогенна популация на възрастни мултипотентни стволови клетки (Costa et al. 2021). Принадлежат към адхерентен тип стволови клетки с фибробластно-подобна морфология и с голям терапевтичен потенциал в клетъчни терапии на имуномедиирани, възпалителни и дегенеративни заболявания поради техните имуномодулиращи и регенеративни свойства (Merimi et al. 2021). *In vivo* *МСК* се разполагат в специализирана микросреда, известна като клетъчна “ниша”. Това специално микрообкръжение обединява освен стволовите клетки и т.нар. стромални клетки или подкрепящи клетки, заедно със заобикалящия ги екстрацелуларен матрикс (Ferraro et al. 2010). Всички тези компоненти на специализираната среда успешно контролират съдбата на *МСК*. Нишата е отговорна за поддържането на стволовостта и мултипотентността на *МСК*, като посредством множество хормони, растежни фактори и други сигнални молекули определя кога да бъде нарушено състоянието на покой на стволовите клетки и кои от тези клетки да бъдат насочени към пролиферация и последващата я диференциация (Kolf et al. 2007; Ferraro et al. 2010).

Обикновено, всички стволови клетки се разполагат в точно определени места в тъканите на организма. Разположението на *МСК in vivo* се определя като периваскуларно, поради тази причина се смята, че във всеки васкуларизиран орган могат да бъдат открити *МСК* (Oh and Nör 2015; Costa et al. 2021). Действително, първоначално *МСК* са открити в костен мозък, но днес се знае, че съществува едно голямо разнообразие от тъканни източници на *МСК*, като освен от костен мозък този клас мултипотентни стволови клетки могат да бъдат изолирани и от плацента, пълна връв, мастна тъкан, зъбна пулпа, периферна кръв, кожа, мускули, ендометриум и други тъкани (Berebichez-Fridman and Montero-Olvera 2018). Това голямо разнообразие от източници на *МСК* е от съществено значение за възможността да се избере най-подходящия вид стволови клетки за приложение при конкретно патологично състояние, налагащо иновативен подход на терапия.

Може би в това отношение една от най-важните характеристики на *МСК* е липсата на имуногенност. Според литературни данни *МСК* нямат способността да активират имунната система след тяхното *in vivo* приложение, защото не експресират ко-стимулаторни молекули като *CD80/CD86*, *CD40*, *CD40L*, както и *МНС клас II* молекули, а относно *МНС клас I* – данните се обединяват около сравнително ниска

експресия на клас I молекули на главния комплекс на тъканна съвместимост или цялостно липсата на такава (McIntosh et al. 2006). Тези данни са в подкрепа на използването на алогенни *МСК* като терапевтичен подход при пациенти, за които се отхвърля приложението на автоложни клетки (Schu et al. 2012).

1.2 Роля на *МСК* за хомеостазата на организма

В природата на стволовите клетки са заложени свойства като самообновяване и потенциал за диференциация в други клетъчни типове (Wignall 2015). Тези две свойства са присъщи и на *МСК* като типични представители на стволовите клетки. Това ги прави изключително ценни за възстановяването на увредени тъкани и органи, и за цялостното поддържане на хомеостазата на организма, особено когато тя бъде нарушена, вследствие на стареене или налично заболяване (Vizoso et al. 2019). Посредством процесът самообновяване, в основата на който стои митотично делене, се формират колонии от идентични клетки. Всяка една колония от подобни адхерентни фибробластно-подобни клетки е с произход от единична клетка – *фибробласт колония-образуваща единица (CFU-F)* – това е и първото наименование дадено на *МСК* още през XX век (Friedenstein et al. 1976).

Забележителното е, че регенерационният потенциал на *МСК* се допълва от тяхната способност за клетъчна миграция към места в организма с все още активно възпаление или нараняване - процес, който се контролира от цитокини, хемокини и растежни фактори (Ullah et al. 2019). По отношение на миграционния потенциал на *МСК* с важно значение са хемокини като *CXCL12*, *CCL21*, *CCL27* (Hocking 2015). Трябва да се отбележи, че самите *МСК* са също източник на подобни молекули с аутокринно или паракринно влияние върху самите тях или други клетки, които експресират специфични за съответните хемокини рецептори. Според литературни данни *МСК* от костен мозък могат да бъдат източник на хемокини и хемокин-свързващи рецептори от двете семейства (*CCL* и *CXCL*), както и на фракталкин (*CX3CL1*) (Bernardo and Fibbe 2013; Hocking 2015). От тук следва, че освен да бъдат мобилизирани и насочвани, *МСК* допринасят за допълнителното привличане и понякога активиране на клетки на имунната система на местата на възпаление и тъканно увреждане (Bernardo and Fibbe 2013). Една подобна молекула, продуцирана от *МСК*, е т.нар. *RANTES* или *CCL5* хемокин, който освен с потенциал да привлича клетки, които експресират рецептори като *CCR1*, *CCR3*, *CCR5* (Murphy 2002), има и силно изразена имunosупресивна функция, изразяваща се в потискане на Т-клетъчните

отговори (Yagura et al. 2020). На мястото на увреждането *МСК* могат да диференцират във функционални клетки, които да повлияят локално наличното възпаление или да секретират фактори, които директно или индиректно посредством влиянието им върху други клетки, да стартират процесите на ангиогенеза, регенерация и тъканно ремоделиране.

Както вече беше акцентирано, важен аспект от регенерационния потенциал на *МСК* и определянето на изолирани адхерентни клетки като *МСК*, е обвързването им към определен път на диференциация. Процесът диференциация се съпровожда с активиране на ключови гени и експресия на молекули, които променят клетъчния фенотип и насочват клетките към специализиран клетъчен тип, който да изпълнява точно определена функция (Nelson 2022). За *МСК* като клетки с мезодермален произход е характерна диференциацията в остеогенна, хондрогенна и адипогенна насока, макар че не е изключена и диференциацията в немезодермални линии, процес, известен като “трансдиференциация” (Song and Tuan 2004). Обикновено комбинацията от транскрипционни фактори и задействането на определени сигнални пътища, вследствие на различни растежни фактори и условия, при които клетките се намират *in vitro/in vivo*, води до успешно контролиране на поведението и съдбата на *МСК*.

Например, при остеогенната диференциация на *МСК* се задейства експресията на серия от маркери и протеини като *алкална фосфатаза (ALP)*, *runt-related transcription factor 2 (RUNX2)*, *остеокалцин (OCN)* и *остерикс (OSX)*, което се постига посредством молекули, които индуцират остеобластна трансформация на *МСК* (Almalki and Agrawal 2016). При *in vitro* култивиране за период от 2-3 седмици в среда, обогатена с *дексаметазон*, *аскорбинова киселина*, *β-глицерофосфат* се наблюдава натрупването на калциеви отлагания в клетките (Chen et al. 2013; Hanna et al. 2018). Обикновено, визуализацията и документирането на успешната остеогенна диференциация се постига посредством оцветяване с *Alizarin Red* или оцветяване по *von Kossa*.

При задействане на механизмите на адипогенна диференциация, чрез растежни фактори като *инсулин*, *индометацин*, *дексаметазон* и *3-изобутил-1-метилксантин (IBMX)*, се съобщава за повишена експресия на *peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARγ)*, *липопротеин липаза (LPL)*, *адипоцитен протеин 2 (aP2)* и за *акмулирането на липидни вакуоли* (Ou-yang and Dai 2023). Адипогенно диференцираните *МСК* се визуализират с помощта на оцветяване с *Oil Red O*.

За да се стимулира хондрогенна диференциация, данни от *in vitro* проучвания подчертават необходимостта от фактори, част от семейството на *трансформирация растежен фактор-b (TGF-b)*. Хондрогенно диференцираните *МСК* се доказват, също хистологично, посредством оцветяване с *толуидин синьо*, индикация за наличието на изобилие от протеогликани и колаген тип II в екстрацелуларния матрикс (Koren et al. 1999; Somoza et al. 2014).

1.3 Роля на клетъчния контакт на МСК в имунната модулация

В допълнение към описаните характеристики на стволовите клетки, *МСК* се отличават и със способността си да действат върху ключови елементи на имунната система и поради силния си имunosупресивен ефект, могат да бъдат мощни инструменти за възстановяване на имунологичния баланс при имуномедиирани нарушения, като автоимунните заболявания. Първото приложение на *МСК* в клиничната практика е през 1995г. фаза I на изпитване на прогениторни стромални клетки от човешки костен мозък при пациенти с хематологични злокачествени заболявания (Lazarus et al. 1995). Оттогава клиничният потенциал на *МСК* е широко проучен при различни медицински състояния. Част от способността на *МСК* да влияят на редица имунокомпетентни клетки се дължи на формирането на клетъчни контакти и участието на специфични молекули в тези тесни взаимодействия. *Programmed cell death protein 1/Programmed cell death ligand 1 (PD-1/PD-L1)*, *Fas/Fas лиганд*, *тумор некротизиращ фактор (TNF)/рецептор на TNF (TNF-/TNF-R)*, *HLA-G/LIRB2 (ILT4/CD85d)* и *KIR2DL4 (CD158d)* са примери за подобни взаимодействия, изискващи директен контакт между клетките (Mallis et al. 2021). Благодарение на тези междуклетъчни контакти, *МСК* участват в контрола на биологични процеси, като апоптоза и ограничаване на клетъчната пролиферация (Mallis et al. 2021). Следователно, важно е да не се подценяват директните взаимодействия между *МСК* и имунните клетки, въпреки че откритията около секретото на *МСК* преобладават и са доста окуражаващи.

2. Секретом от МСК

2.1 Роля на секретом от МСК при автоимунни заболявания

Автоимунните заболявания са наречени „болести на новото време“ или „модерни епидемии“ поради относително увеличени брой докладвани автоимунни случаи и глобалното им разпространение през последните години (Wach 2018).

Всъщност, по-голямата част от автоимунните заболявания съществуват от древни времена (Margo and Harman 2016). Палеопатологични изследвания на египетски мумии идентифицират слети прешлени, признак на тежко, хронично автоимунно заболяване - анкилозиращ спондилит (АС), част от т.нар. група на спондилоартропатии (СnА) (Sieper et al. 2002). Това е един от многото примери, които показват, че предишното твърдение е неточно, въпреки че пътят на автоимунните заболявания от определението за автоимунитет до диагнозата и превенцията е доста дълъг и неравен. Още *Paul Ehrlich* през 1901г. изказва твърдение, че имунната система може да се насочи към тъканите на гостоприемника и да ги увреди, както и неговият известен термин „*horror autotoxicus*“, допринасят за прогреса на науката относно света на автоимунитета (Silverstein 2005). Въпреки че медицината успява да възприеме в средата на ХХ век, че автоимунните заболявания, заедно с алергиите, са състояния, при които организъмът е способен да се “самонарани” (Margo and Harman 2016), в продължение на много години малко се знае за имунопатогенезата на автоимунните заболявания (Comerford et al. 2014). За по-голяма точност и конкретност, една от причините за това „повишаване” на автоимунните и хроничните възпалителни заболявания е бързо развиващата се наука и методите за диагностициране на пациентите, както и съвременният начин на живот и хранене, особено на хората в урбанизираните страни (Wang et al. 2015). Резултатът от неправилния начин на живот, в комбинация с фактори на околната среда и генетичната предразположеност, са причината имунната система да не различи „своето” от „чуждото”, дали е “приятел” или “враг” на организма. Пациентите се описват като „живеещи с врага в себе си“, което съответства на факта, че организъмът им се самоатакува (Volkman and Stetson 2014; Lodha et al. 2022).

За съжаление, автоимунните заболявания са едновременно хронични и нелечими. Целите, които си поставя медицината, са постигане на ремисия и поддържането ѝ за достатъчно дълъг период от време, което се наблюдава при малък брой автоимунни пациенти (Chandrashekhara 2012). Терапевтичните подходи, прилагани за постигане на тези цели, са значително подобрени и усъвършенствани. Те включват прилагането на конвенционални имunosупресивни лекарства, с или без биологични терапевтични средства за по-целенасочено действие върху ключови молекули, участващи в имунопатогенезата на специфичните автоимунни състояния (Chandrashekhara 2012). Не всички пациенти обаче реагират на дадена конвенционална терапия (като например пациентите с рефрактерни заболявания) и много често те се описват като „безнадеждни случаи“ (Vasconcelos et al. 2011; Neunert et al. 2016). Освен

това, отрицателните странични ефекти от дългосрочната конвенционална терапия често надвишават потенциалните ползи за пациентите (Hahn and King 2014). В тези случаи прилагането на конвенционална терапия не успява да постигне таргетните цели на медикаментите, поради повишен риск от инфекции и тумори (Hahn and King 2014). Това е едно сериозно предизвикателство пред науката, което налага разработването на нови подходи за лечение на автоимунни заболявания и в същото време отваря нови хоризонти пред клетъчната терапия с *МСК*.

Класическите автоимунни и имуномедиирани заболявания с автовъзпалителни характеристики са част от т.нар. имуномедиирани възпалителни заболявания (*IMIDs*). Например: системен лупус еритематозус (*СЛЕ*), ревматоиден артрит (*РА*), множествена склероза (*МС*), псориазис и atopичен дерматит. Имуномедираните заболявания с автовъзпалителни характеристики включват *СnА*, болест на присадката срещу гостоприемника (*GVHD*), възпалителни болести на червата (*IBD*) и други (Múzes and Sipos 2022). Има над 80 автоимунни заболявания, засягащи приблизително 4.5% от човешката популация, разделени в две групи въз основа на техните целеви органи: орган-специфични (тиреоидит на Хашимото, болест на Адисън, болест на Грейвс, диабет тип 1, витилиго и др.) и системни автоимунни заболявания (*СЛЕ*, *РА*, васкулит, системна склероза (*ССк*) и др.). (Wang et al. 2015; Múzes and Sipos 2022). За съжаление, броят им нараства, а разпространението е различно при мъжете и жените, като за женския пол се съобщава по-висока честота на автоимунни случаи (Desai and Brinton 2019). Освен това, етиологията на автоимунните заболявания включва множество фактори. Наблюдава се загуба на баланс между про- и противовъзпалителните имунни отговори, като възстановяването на този баланс също изисква прилагането на комплексни и същевременно безопасни подходи (Chandrashekhara 2012).

Добре известно е, че *МСК* са източник на широка гама от разтворими фактори, включително ензими, цитокини, различни протеини, растежни фактори, хемокини, *ДНК* и *РНК* молекули, както и много вторични метаболити или крайни продукти на техния метаболизъм (*табл.1*) (Kyurkchiev et al. 2014; Caseiro et al. 2019). Някои от процесите, в които участват молекулите и факторите на *МСК*, независимо дали са в свободна форма, включват ангиогенеза, апоптоза, имуномодуляция, пролиферация, предотвратяване на смърт на невронни клетки, подкрепа за *ХСК* и инхибиране на микробното развитие (Kyurkchiev et al. 2014). Важно е обаче да не се забравя, че типът на молекулите, освободени от *МСК*, зависи от тъканния източник (костен мозък, пълпа върв, мастна тъкан и т.н.), времето за култивиране, степента на конфлуентност,

условията на средата и стимулите - физиологични или патологични, които клетките получават по време на *in vitro* култивиране (Alvites et al. 2022). Има доказателства, че в зависимост от това кой Toll-подобен рецептор (*TLR*), експресиран на тяхната повърхност се задейства, *MCK* могат да проявяват или *MCK1*, или *MCK2* фенотип (Múzes and Sipos 2022). Например, когато *MCK* се стимулират с липополизахарид (*LPS*), *TLR-4* се активира и се произвеждат провъзпалителни медиатори. В присъствието на *TNF- α* и интерферон- γ (*IFN- γ*), *TLR-3* се активира и *MCK* се поляризират към *MCK2* фенотип, който е отговорен за имунологичната хомеостаза, постигната чрез имуносупресия (Múzes and Sipos 2022). Ето защо, вече е добре известно, че *MCK* работят като „сензори“ и, за да проявят своите терапевтични ефекти, трябва да бъдат стимулирани. От това следва, че възможността за манипулиране на секретума, получен от *MCK*, е причината много изследователи да използват в своите експериментални постановки различни биохимични стимули, цитокини като *IL-1*, *TNF- α* , *IFN- γ* , хипоксично прекондициониране и триизмерно (*3D*) култивиране, главно за насочване или подпомагане на имуносупресивната активност на стволовите клетки (Múzes and Sipos 2022).

| Основни метаболити | Протеини, Ензими и Биологично активни фактори | Хемокини | Екстрацелуларни везикули (ЕВ) |
|--|---|--|---|
| Ацетат, Аланин, Холин, Етанол, Формат, Глутамат, Глутамин, Лактат, Никотинамид, Пируват, Тирозин, L-Глюкоза, B-Глюкоза | BMP-9/GDF-2, EGF, Ендоглин, Ендотелин-1, Еотаксин-1, FGF-1, FGF-2, Flt-3L, Фолиостатин, G-CSF, GM-CSF, GRO α , HB-EGF, HGF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-1B, IL-1RA, IL-12, IL-6, IL-7, IL-9, LIF, Лептин, PDGF-AA, PDGF-BB, PLGF, TGF- β 1/ β 2/ β 3, TNF- α / β , TSG-6, VEGF-A/C/D, IDO, PGE2, MIF, KGF, IGF-1, Галектини, HO-1, NOS, ICAM, MMP-1/2/7, TIMP-1/2 LL-37, TPO | CCL2 (MCP-1), CCL3, CCL4, CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL20, CCL21, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8 (IL-8), CXCL12, CXCL16, CX3CL1 (Фракталкин) | Апоптоични телца (>1000nm) Микровезикули (200-1000nm) Екзозоми (30-200 nm) MCK-екзозоми и част от тяхното съдържание: тетраспанини (CD9, CD63, CD81), RNA (mRNA, miRNA, Pre-mi-RNA, si-RNA, t-RNA, sn- RNA), DNA (mt-DNA, ds-DNA, ssDNA), ATPase, PGK1, GAPDH, Алдолаза, G протеин, синтетин, HSP60, HSP70, HSP90, RTK, анексини, GTPases, RAB протеин |

Таблица 1. Състав на секретомата от MCK

Забележка: Съставът и количеството на освободените фактори, молекули и ЕВ се различават при MCK от различен тъканен произход, както и при различни условия на култивиране (Yordanova and Ivanova-Todorova 2022)

Съкращения: костен морфогенен протеин/фактор 2 на растежа и диференциацията (BMP-9/GDF-2), епидермален растежен фактор (EGF), фибробластен растежен фактор (FGF), Fms-свързан тирозин киназен 3 лиганд (Flt-3L), гранулоцит/гранулоцит-макрофагиален колония-стимулиращ фактор (G-CSF, GM-CSF), хепарин-свързващ EGF-подобен растежен фактор (HB-EGF), хепатоцитен растежен фактор (HGF), интерферони (IFNs), интерлевкини (ILs), тромبوцитни растежни фактори (PDGFs), плацентален растежен фактор (PlGF), трансформиращи растежни фактори (TGFs), тумор некротизиращ фактор (TNF), тумор некротизиращ фактор (TNF)-стимулиращ ген-6 (TSG-6), васкуларен ендотелен растежен фактор (VEGF), индоламин 2,3-диоксигеназа (IDO), простагландин E2 (PGE2), инхибиторен фактор на миграцията на макрофагите (MIF), кератиноцитен растежен фактор (KGF), инсулин-подобен растежен фактор 1 (IGF-1), хем оксигеназа-1 (HO-1), азотен оксид синтаза (NOS), междуклетъчна адхезионна молекула-1 (ICAM-1), матриксни металопротеинази (MMPs), тъканен инхибитор на металопротеиназа (TIMP), човешки кателицидин (LL-37), тромбopoетин (TPO), моноцитен хемоатрактантен протеин (MCP), фосфоглицерат киназа 1 (PGK1), глицералдехид 3-фосфат дехидрогеназа (GAPDH), протеини на топлинния шок (HSP), рецепторна тирозин киназа (RTK), Ras-асоциирани свързващи (Rab) протеини;

Повечето от секретиранияте фактори от различни видове клетки действат като сигнални молекули, които допринасят за осъществяването на междуклетъчната комуникация. Всички клетки, независимо дали са вътре или извън организма, от който произхождат, са чувствителни към факторите на околната среда и в резултат на това реагират на тях по специфичен начин (Alberts et al. 2002). Генерираните сигнални молекули от MCK също работят на този принцип, предизвиквайки т.нар. „процес на

сигнална трансдукция“, който води до промяна във функцията и поведението на целевата клетка, поради което те могат да превключват много прецизно фенотипа на имунните клетки. Условно секретомът на *МСК* може да се раздели на секреторна част и везикуларна част, като и двете са много важни за междуклетъчната комуникация. Секреторната част вече беше описана и представена в *табл. 1*, но също така другият интригуващ аспект на секретотома, получен от *МСК*, е везикуларната фракция, която включва извънклетъчните везикули (апоптотични телца, микровезикули и екзозоми) (Múzes and Sipos 2022), от които екзозомите са с най-голямо значение и потенциал в научните изследвания. Екзозомите, обикновено съдържат *микро-РНК (miRNAs)*, липиди, протеини и вторични метаболити. Техният размер варира от 30 до 200 nm и са известни като нановезикули. Екзозомите имат липиден двоен слой, което ги прави много подходящи за освобождаване на тяхното съдържание директно в цитозола на клетките (Múzes and Sipos 2022). В действителност, съдържанието и функцията на екзозомите се считат за еквивалентни на тези на *МСК*, от които произхождат, но в същото време тези везикули имат няколко предимства пред стволовите клетки, като ниска имуногенност, непроменена функционална активност по време на замразяване и размразяване, както и липса на способност за формиране на тумори (Alvites et al. 2022). Въпреки това, изолирането и отделянето на екзозоми е отнемащ време и скъп процес, без наличен все още стандартизиран протокол (Phelps et al. 2018).

За разлика от тях, *МСК* са много лесни за изолиране, с бързи темпове на растеж при лабораторни условия, като необходимият брой клетки за дадена терапия може лесно да бъде манипулиран (Beyer Nardi and da Silva Meirelles 2006). Използването на стволови клетки, получени от пациенти (автоложна трансплантация), става все по-популярно за персонализирани терапевтични приложения. Въпросът, дали трябва да се използват автоложни или алогенни стволови клетки, все още остава отворен (Li et al. 2021a). Предполага се, че *МСК* от автоимунни пациенти са предварително „подготвени“ да произвеждат повече имуносупресивни молекули, тъй като те са пребивавали в потенциално възпалителната среда на организма, от който произхождат, и рискът от имунологично отхвърляне на транспланта също би бил предотвратен. Това обаче се оказва невярно твърдение, тъй като има данни, които показват дефектна или недостатъчна функция на *МСК*, изолирани от пациенти с автоимунни заболявания (Cirigliani et al. 2013; Popis et al. 2021). Слабата имуногенност на *МСК* от друга страна (Kyurkchiev et al. 2014) навежда на мисълта, че алогенната трансплантация, също е един добър терапевтичен вариант. В науката нещата не винаги са еднозначни и следват

логичен път. Приложението на *МСК* се счита за безопасно; съществуват обаче редки рискове от белодробна емболия, тумори и образуване на ектопична тъкан, както и възможността за несъответствие на *HLA* молекулите при трансплантация (Moll et al. 2019; Alvites et al. 2022). Освен това, не трябва да се пренебрегват обезсърчаващите доказателства, че *МСК* са кратко живеещи след тяхната инфузия *in vivo*, поради т.нар. “клирънс” или изчистването им от страна на *МАФ* (Vizoso et al. 2019), въпреки че начинът на приложение на екзогенни *МСК*, локален или системен, също е важен за ефикасността на клетъчната инфузия (Braid et al. 2018; Vizoso et al. 2019).

Друга перспектива е свързана с процеса на стареене на *МСК*. Има доказателства, че стареенето на *МСК* по време на дългосрочното им отглеждане *in vitro* е свързано с по-малко ефективен секретомен състав и намалена експресия на молекули за насочване на стволови клетки към местата на нараняване *in vivo* (Heirani-Tabasi et al. 2017). Ето защо, някои изследователи предлагат да се използват молекули, произведени от *МСК*, поради потенциалните недостатъци и ограничения на клетките, които са документирани в литературата. Това включва т.нар. биологични *МСК* продукти, като кондиционирана среда, получена след култивиране на клетките *in vitro* за определен период от време или отделни продукти от кондиционираната среда на *МСК*, като техните освободени *ЕВ*, получени чрез специфични методи, необходими за тяхното отдиференциране. Интригуващи данни в областта (L et al. 2019; Popis et al. 2021) акцентират на това, че безклетъчната терапия е алтернативна терапия, която ако не може да помогне на пациентите, то поне не би им нанесла вреда.

Има няколко предимства за прилагането на секретом, получен от *МСК*, за сравнение с приложението на самите клетки. Например, няма нужда от специфичен разтвор за изолиране на клетките, липсва опасност от предозиране и тестването им също е безопасно, наличие на удобство на приложение, както и способността за успешно манипулиране на състава на секретома, произведен от стволовите клетки (Múzes & Sipos, 2022). Едва няколко проучвания в литературата показват, че секретомът на *МСК* е свързан със странични ефекти (Ahangar et al. 2020; Múzes and Sipos 2022). Трябва, също така, да се има предвид, че различните изследователи в своите експерименти не разчитат на един общоприет протокол за получаване и изследване на ефекта на секретома, получен от *МСК*. Профилът на секретираниите фактори зависи от условията и времето, за което клетките се култивират. Тези данни са обща илюстрация на необходимостта от стандартизирана методология за получаване на

секреторните продукти от *MCK*, както и по-нататъшно изследване и изучаване на темата за *MCK* и техния секретом.

2.2 Експериментални *in vitro*, *in vivo* изследвания и клинични проучвания със секретом от *MCK* в областта на аутоимунитета

В допълнение към това, което вече беше посочено, трябва да се обърне по-сериозно внимание на потенциалната роля за терапевтично приложение на кондиционирана среда, която включва секреторни *MCK* молекули и извънклетъчни везикули. Действително, през последното десетилетие непрекъснато нарастващите литературни данни показват интересни резултати за потенциала на секретирани от *MCK* фактори, влияещи върху имунните клетки на пациенти, диагностицирани с аутоимунни заболявания (Múzes and Sipos 2022). Важен аспект на адаптивната имунна система е, че Т и В лимфоцитите, заедно с други вродени имунни клетки участват в различни механизми като част от имунопатогенезата на аутоимунните заболявания. В хода на този аспект трябва да се отбележи, че секретомът на *MCK* е свързан с потисната експресия на ключови участници в програмираната клетъчна смърт при естествените Т клетки-убийци (*NKT*), като *FASL* и лиганд-индуциращ апоптоза, свързан с тумор некротизиращ фактор алфа - *TNF- α* (*TRAIL*) (Gazdic et al. 2018b), както и трансформацията на *NKT* клетки в имуносупресивни клетки (Milosavljevic et al. 2017). Едновременно с това беше демонстрирано, че кондиционирана среда на *MCK* от адипозна тъкан (*AT-MCK*) има имуносупресивен ефект върху *Th17/Treg* оста при пациенти с *PA in vitro* (Vasilev et al. 2019). Молекули, като *IDO*, *NO*, *HO-1* и *PGE2*, инхибират Т-клетъчната пролиферация по различни начини, включително фосфорилиране на сигналния преобразувател и активатор на транскрипцията (*STAT-5*), инхибиране на *IL-2* сигналния път и активиране на циклин-зависимия киназен инхибитор *p27kip1* (Aggarwal and Pittenger 2005; Glennie et al. 2005; Milosavljevic et al. 2017). *MCK* обаче не винаги могат да потиснат пролиферацията на имунните клетки, а по отношение тази на В клетките, данните са доста противоречиви (Mallis et al. 2021). *IDO*, продуциран от *MCK* има различни ефекти върху В клетките: той може да индуцира ефект, свързан с оцеляването на *CD5⁺* В клетки, което може да предизвика диференциация на Т клетките в регулаторни Т клетки (*Tregs*) чрез производството на *IL-10* (Peng et al. 2015); освен това, *IDO*, заедно със *CCL2*, се свързва с потискане производството на антитела (Gazdic et al. 2017). Същите автори демонстрират, че *NO* и кинуренин имат потенциала да намалят производството на *IL-6* и *TNF- α* от В клетки,

като същевременно повишават регулаторния фенотип на В клетките на маргиналната зона (MZ) ($CD23^-CD21^+IgM^+$) в черен дроб (Gazdic et al. 2018a, 2018b). И това не е всичко, защото ефектът на секретирани фактори от MCK не се ограничава до клетките на адаптивния имуен отговор.

Биологично активни молекули и фактори като *IL-8*, *MIF*, *PGE2*, *TSG-6* и *IL-6* стимулират функцията на фагоцитиращи клетки като неутрофили и МАФ, както и тяхната способност да се борят с патогенни микроорганизми (Volarevic et al. 2017; Bazzoni et al. 2020). Често в научната литература се обръща внимание на уникалната способност на MCK да изместват фенотипната поляризация на МАФ от M1 (провъзпалителни) към M2 (противовъзпалителни) МАФ, с помощта на вещества като *PGE2*, *TSG-6*, *IL-6*, *KGF* и *IGF-1* (Volarevic et al. 2017). Не може да не се отбележи, че получените екзозоми от MCK могат дори да повлияят на трансформацията на дендритни клетки (DC) в толерогенни, а именно DC са известни като мостът между вродените и адаптивни имунни отговори (Shahir et al. 2020). Също съществен факт е, че разтворими фактори на MCK имат способността да потискат пролиферацията, активирането и производството на ко-стимулаторни молекули от DC. Всичко това води до нарушено антигенно представяне и неспособност за активиране на наивните Т лимфоцити (Harrell and Volarevic 2021). И накрая, интересно е да се отбележи, че молекулите на MCK могат да инхибират функционалната активност на цитотоксичните Т лимфоцити (CTL) и клетките естествени убийци (NK), както и експресията на активиращи рецептори от NK клетките (*NKp30*, *NKp44* и *NKG2D*) (Gazdic et al. 2017; Harrell and Volarevic 2021). Тези констатации са само малка част от *in vitro* проучванията, проследяващи ефекта на секретирани фактори от MCK върху някои имунни клетки, но те са фундаментални за последващите предклинични изследвания в областта.

В допълнение към откритията, описани по-горе, има доста значими експериментални данни, получени от *in vivo* проучвания с експериментални животни и автоимунни пациенти. Едно от класическите автоимунни заболявания, чието лечение е обект на засилен интерес и изследвания в областта на терапиите, базирани на MCK, е СЛЕ. Няколко автора предполагат, че MCK и техните екзозоми, индуцират M2 поляризация на МАФ (Wang et al. 2020b), инхибират Т-клетъчната диференциация към *Th1* чрез процеса на гликолиза и регулиране на цитокинов път (Xu et al. 2020), инхибират *Th17*, и най-същественото е, че стимулират развитието на *Tregs* (Wang et al. 2017). Обобщените данни от обширен мета-анализ, проведен през 2020г., показват, че

лечението с *МСК* при животински модели на лупусен нефрит е довело до по-ниски нива на антитела срещу *дв-ДНК* (двуверижна ДНК), анти-нуклеарни антитела (*АНА*), серумен креатинин, урея, протеинурия и т.нар. “*renal sclerosis score*” (Zhou et al. 2020). Това знание е доказателство за противовъзпалителните и благоприятни ефекти от приложението на *МСК* в миши модели на лупус и способността на секретотома, получен от *МСК*, да регулира хроничното възпаление, една много характерна черта на заболяването. Ролята на *МСК* в имунопатогенезата на *СЛЕ* е от значение, не само поради известния дефицит или дефектна функция на *МСК*, изолирани от пациенти с лупус (Li et al. 2021b), но и поради участието на *miRNAs*, некодиращи *РНК* (*ncRNAs*) и кръгови *РНК* (*circRNAs*) молекули, в задвижването на самия автоимунен процес (Perez-Hernandez et al. 2015, 2021). Поради тези обезсърчаващи и противоречиви резултати са необходими допълнителни експериментални и клинични проучвания с *МСК* и техните секреторни продукти при *СЛЕ*.

Независимо от това, доказано е, че екзозомите на *МСК* имат благоприятни ефекти при много други автоимунни животински модели. Например, системното приложение на екзозоми от *МСК* има хепатопротективни ефекти при животински модели на автоимунен хепатит. Според две независими проучвания от 2017г. и 2019г. тези ефекти се дължат на потисната индуцирана от каспаза-3 апоптоза и индуцирана от каспаза-1 пироптоза на хепатоцитите (Chen et al. 2017a; Wu et al. 2019). В хода на изследванията за лечение на *МС*, най-често срещаното възпалително заболяване на централната нервна система (*ЦНС*), различни проучвания върху животински модели на експериментален автоимунен енцефаломиелит (*ЕАЕ*) демонстрират подобрене на невроповеденческите симптоми, намаляване на възпалението и демиелинизацията в *ЦНС*. Резултатите при експериментален автоимунен увеит (Shigemoto-Kuroda et al. 2017) и миши модели на автоимунен диабет (*NOD*) също са окуражаващи, с данни за понижена кръвна глюкоза, възстановени панкреатични острови и увеличени количества клетки, произвеждащи инсулин (Nakano et al. 2016; Nojehdehi et al. 2018).

При ревматичните заболявания резултатите са противоречиви, вероятно поради голямото участие на *МСК* в имунопатогенезата на тези състояния. Различни типове *miRNAs* от екзозоми на *МСК* участват в потискането на артрита и увреждането на костите чрез повлияване на два основни типа клетки, участващи в имунопатогенезата на *РА*, а именно т. нар. фибробластно-подобни синовиоцити и произвеждащите антитела - В лимфоцити (Chen et al. 2018). Тези открития са обнадеждаващи за хората, диагностицирани с *РА*. В същото време, подобно на *СЛЕ*, *МСК* от пациенти със *СпА*

(*CnA-MCK*) могат да имат както полезни, така и вредни ефекти. При *TNF* трансгенен миши модел на спондилоартрит, *MCK* участват във възпалението на ставите, доказателство за което е експресията на *TNF* рецептор I и наличието на ентезит (Múzes and Sipos 2022). Друго важно откритие, направено при проучване върху експериментален Синдром на Съогрен, показва, че *IL-6*, освободен от екзозомите на обонятелни ектомезенхимни стволови клетки (*OE-MCK*), води до потискане на прогресията на заболяването чрез стимулиране експресията на ензима аргиназа и последващото повишаване на нивата на реактивните кислородни субстанции (*ROS*) и *NO* (Rui et al. 2021). В подкрепа на тези данни са изследванията на *B Hai* и сътр., които показват намалена лимфоцитна инфилтрация в слюнчените жлези и намалени серумни нива на автоантитела след инфузия на *EB*, произведени от индуцирани плурипотентни *MCK* (*iPSC-MCK*) (Hai et al. 2018).

Не липсват и данни в областта на хроничните заболявания като *IBD* - болест на Крон и улцерозен колит, за които се наблюдава нарастване на случаите в световен мащаб през последните години. Проучвания върху експериментален колит с използване на екзосоми от *MCK* разкриха понижено възпаление на лигавицата, добро клинично повлияване на симптоматиката и намалена смъртност (Liu et al. 2020a; Wang et al. 2020a; Yang et al. 2021a). Металотионеин 2, *mi-RNA 146*, *TSG-6* и други все още неидентифицирани молекули са сред факторите, отговорни за тези благоприятни резултати. Според скорошно проучване на *Li-Li Qi* и сътр. (Qi et al. 2021), активирана кондиционирана среда, произведена от *AT-MCK*, предварително третирани със серум от плъши модели на колит, индуцирани от декстран натриев сулфат (*DSS*), води до значително повишена експресия на муцин 2 (*MUC2*) и плътните контакти на ентероцитите, заедно с потиснато производство на провъзпалителни цитокини в тъканите на дебелото черво. Тази работа е окуражаваща, защото не само демонстрира нов метод за “презареждане” на *MCK*, но също така показва начин за подобряване на ефективността на продуктите, които този тип стволови клетки произвеждат.

Нарастващото разнообразие от експериментални методи и набор от знания за способността на стволовите клетки да отделят вещества, които могат да повлияят на имунната система, са доказателство за силното желание на научната общност за намиране на подход за лечение и по-добро разбиране на автоимунните заболявания. Въпреки това, трябва да се отбележи, че тези експериментални подходи при мишки, например, са извършени при силно контролирани стерилни условия, в среда без патогени. Това не би могло да се постигне при клиничните изпитвания върху хора

(Popis et al. 2021). Освен това, дори в ремисия, пациентите с различни автоимунни заболявания трябва да приемат необходимите лекарства за тяхното лечение, докато при описаните миши модели често се позволява провеждането на експериментални изследвания върху нелекувани кохорти (Popis et al. 2021). Посоката на медико-биологичното знание обаче тръгва от лабораториите и стига до болничните заведения, където създадените терапевтични продукти намират безценно приложение. Поради това, предклиничните *in vivo* и *in vitro* проучванията са обещаващи и не бива да се подценяват, но е важно да се имат предвид гореспоменатите разлики.

Най-важният фактор, определящ ефикасността на една терапия е нейната способност да е от полза за нуждаещите се пациенти. Това може да се докаже само чрез провеждането на клинични изпитвания с участието на голям брой пациенти. Според *NIH (clinicaltrials.gov)*, съществуват различни данни относно клиничната употреба на *МСК* (Kyurkchiev et al. 2014; Harrell and Volarevic 2021; Popis et al. 2021), техният потенциал за трансплантация и способността им да коригират имунологичния дисбаланс, наблюдаван при автоимунни заболявания. Ефектът на секретома, получен от *МСК*, е наблюдаван в регистрирани клинични изпитвания при атрофия на алвеоларната кост на зъбите, косопад, алопеция, синдром на поликистозните яйчници, заболяване на очите, регенерация след увреждане на задната кръстна връзка, исхемичен инсулт, костни дефекти и клинични изпитвания на различни етапи при тежки случаи на *COVID-19 (clinicaltrials.gov)*. Понастоящем в областта на автоимунитета и състоянията със свърхактивен имунен отговор има само четири клинични изпитвания, при захарен диабет тип I, астма, болест на Крон и псориазис. За съжаление, все още не са налични изчерпателна информация и резултатите от тези изследвания. Един скромнен проблясък на оптимизъм е докладваният клиничен случай на пациент с псориазис, който е получил кондиционирана среда от *АТ-МСК*, в резултат на което е постигната пълна ремисия след лечение с продължителност един месец (Seetharaman et al. 2019).

Наистина, бързото развитие на науката и медицината ще доведе до натрупването на големи количества данни в областта и ще допринесе за по-доброто разбиране на предимствата и недостатъците на този терапевтичен подход. Досега не са натрупани необходимите данни, за да се даде ясен отговор на възможността секретомът, получен от *МСК*, да повлиява благоприятно имунопатогенезата и цялостното състояние на пациенти с автоимунни заболявания. *МСК* и техните секреторни продукти обаче са показали огромен потенциал да бъдат добри кандидати за пациенти с автоимунни заболявания и тепърва предстои да се види техният ефект в клиничната практика.

3. Взаимодействие между МСК и В лимфоцити

3.1 Влияние на МСК от различен тъканен произход върху развитието, пролиферацията и диференциацията на В клетките

Знанието за взаимодействието на МСК с едни от основните участници във възникването и разгръщането на аутоимунната атака – В лимфоцитите, дава солидна основа за подходи на лечение. Значително количество информация е налично в световната литература по отношение взаимодействието на МСК с други имунни клетки, но литературните данни относно влиянието на МСК върху различни аспекти от съдбата на В клетките, започвайки с ранното им развитие, тяхната пролиферация, диференциация и функционална активност, са доста ограничени и в същото време изключително противоречиви.

Първоначално развитието на В клетките започва в черния дроб на плода по време на феталното развитие и впоследствие продължава в костния мозък до края на човешкия живот (Bhattacharya 2018). За В-клетъчната линията микросредата в костния мозък е изключително значима. Костният мозък е не само съществена част от нашето тяло, където В клетките произхождат от ХСК и впоследствие узряват, като преминават през антиген-независима диференциация, но също и органът, в който се връщат плазматичните клетки, като по този начин се поддържа дълготраен хуморален имунен отговор (Bhattacharya 2018). Паракринните сигнали и молекули, произведени от стромални клетки, намиращи се в микросредата на костния мозък, са необходими за протичането на тези процеси. Обърна се вече внимание относно периваскуларната локализация на МСК *in vivo*. В костния мозък МСК са локализирани в непосредствена близост до синусоидалните съдове и в допълнение към това, взаимодействията между В-клетъчните предшественици и $IL-7^+$ мезенхимни-прогениторни клетки могат да контролират развитието на В клетките (Fistonich et al. 2018). Всъщност, мезенхималните линии на стромалните клетки в костния мозък, включително *CXCL12-ретиккуларни (CAR)* клетки и остеобласти, са източник на много трофични фактори, важни за В-клетъчната лимфопоеза, като *CXCL12 (stromal cell-derived factor 1- SDF1)*, *stem cell factor (SCF)*, известен също като *kit* лиганд, *IL-6*, *IL-7* и *IGF-1* (Day et al. 2015). Поради ролята на МСК за развитието и хомеостазата на ХСК в костния мозък не е изненадващо, че генетичен *in vivo* модел разкрива отчасти механизма, чрез който костно-мозъчни МСК (КМ-МСК) допринасят за диференциацията на ХСК в предшественици на В клетките. *ССААТ / свързващ енхансер β протеин (C/EBP β)* се експресира върху мембраната на КМ-МСК и неговият дефицит води до намалено

производство на *CXCL12*. Нивата на *Flt3-L*, *SCF* и *IL-7* също са по-ниски при *KM-MCK* с дефицит на *C/EBP β* и поради тази причина преживяването на В клетките на левкемичен предшественик се потиска (Yoshioka et al. 2014). От друга страна, *MCK* биха могли да потиснат генерирането на В клетки с помощта на активин А, член на *TGF- β* семейството, за който В клетките експресират рецептори на активин А - тип II А и тип IV (Shoham et al. 2003).

По отношение на въздействието на *MCK* върху пролиферацията на В клетките, научните доклади, които демонстрират имunosупресивния потенциал на *MCK*, са преобладаващи. При изследване на ефекта на човешки *KM-MCK* върху пречистени В клетки, стимулирани с *CpG* олигонуклеотиди, рекомбинантен *CD40L*, анти-имуноглобулинови антитела и цитокини *IL-2* и *IL-4*, се демонстрира, че инхибираната пролиферация се дължи на блокиране във фазите G0 / G1 на клетъчния цикъл (Corcione et al. 2006). Нещо повече, тези учени съобщават, че имunosупресивният ефект е резултат от освободените разтворими фактори от *MCK* и супернатантите от чисти човешки *MCK*, достигнали конфлуентност, не инхибират пролиферацията на В клетките, което показва, че прякото взаимодействие *MCK*/В клетки е необходимо за активирането и стимулирането на имunosупресивното действие на *MCK*. Всъщност, *MCK* са източник на много имunosупресивни фактори, които могат да участват в инхибирането на В лимфоцитите като *TGF- β* , *IL-10*, *PGE2* и *IDO* (Kyurkchiev et al. 2014). В тази връзка е забелязано, че в "transwell" система за култивиране хуморалните фактори, произведени от *MCK*, имат имunosупресивен ефект върху пролиферацията и крайната диференциация на *LPS*-стимулирани В клетки на далака в плазматични клетки, но тяхното действие не води до апоптоза на плазматичните клетки (Asari et al. 2009).

Изключително важно е да се отбележи също така, че ефектът на *MCK* върху В-клетъчната биология зависи от донорите на клетки, дали са здрави или не. *KM-MCK*, изолирани от здрави донори и пациенти с автоимунно заболяване, намаляват пролиферацията *in vitro* на предварително стимулирани периферни мононуклеарни клетки (*PBMC*), включително В лимфоцити по начин, зависим от клетъчната доза (Vocelli-Tyndall et al. 2007). Противоположно на това откритие обаче са данни, според които *MCK*, изолирани от пациенти със *SLE*, са по-малко склонни да потиснат пролиферацията на В клетките, отколкото *MCK* от здрави донори, а също така *MCK* от здрави донори не успяват да потиснат пролиферацията на лупусни В клетки (Maosong Qi 2015).

Една от най-важните функции на В клетките, свързана с индуцирането на хуморален имунен отговор чрез производство на антитела, също се влияе от действието на *МСК*. При *in vitro* *МСК* култури, стимулирани с *СрG*, стволовите клетки са склонни да инхибират диференциацията на В клетките, последвано от потиснатата секреция на *IgG*, *IgM* и *IgA* антитела, открити в супернатантите на културата (Rosado et al. 2015). Констатация, многократно посочвана от различни изследователи, е фактът, че в зависимост от тъканния източник *МСК* също показват функционални различия. Например, *Bochev et al., 2008* съобщават, че мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан (*АТ-МСК*) потискат диференциацията и производството на антитела на стимулирани с митоген В клетки, докато *КМ-МСК* показват по-малък потенциал в тази насока (Bochev et al. 2008). Подобни резултати за диференциацията на *ДС* се наблюдават, когато те са култивирани с *АТ-МСК* или *КМ-МСК* (Ivanova-Todorova et al. 2009).

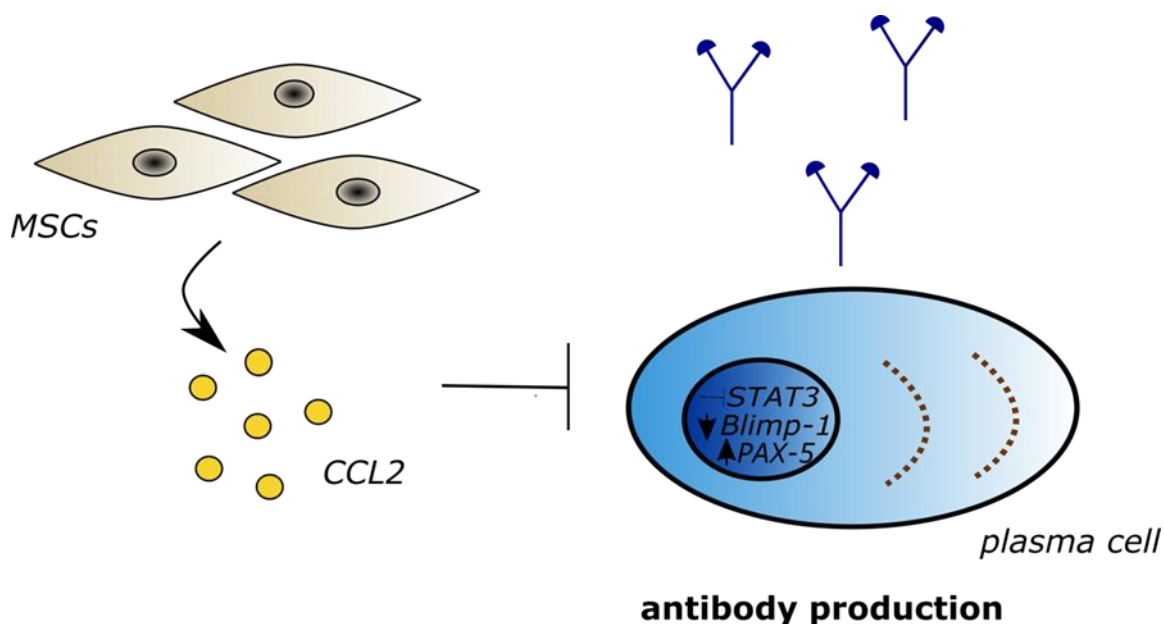
Потискането на производството на антитела от *МСК* може да се използва за лечение на редица заболявания, при които има силен патологичен В-клетъчен имунен отговор. Ползите от трансплантацията на *МСК* за лечение на аутоимунни заболявания, като *СЛЕ*, са демонстрирани в много експерименти *in vivo*, обикновено с намаляване на серумните нива на *анти-двДНК* антитела и подобряване на общата клинична картина с облекчаване на аутоимунния процес (Zhou et al. 2008; Choi et al. 2012). В тази област обаче са съобщени някои противоположни резултати, като тези от *Youd et al., 2010*, които наблюдават повишени нива на *анти-двДНК* антитела и плазматични клетки в костния мозък, заедно с повишено производство и отлагане на имунни комплекси след лечение с алогенни *МСК*, които не успяват да предотвратят развитието на лупус при мишки (Youd et al. 2010). В допълнение към стимулиращия ефект на *МСК* върху *in vitro* диференциацията на В клетките с последващо производство на имуноглобулини, трябва да се отбележи, че това може да зависи от контакта между клетките (Traggiati et al. 2008) и/или производството на разтворими фактори като *PGE2*, но не и *IL-6* (Ji et al. 2012). В действителност, *Zhang et al.* съобщават за участието на ключов отрицателен медиатор на различни цитокини в регулацията на В клетките от *МСК* (Zhang et al. 2020a). Потискането на супресора на цитокиновата сигнализация 1 (*SOCS-1*) в *МСК* е свързано с насърчаване на производството на *PGE2* и отменен инхибиторен ефект на *МСК* в последния етап от диференциацията на В клетките (Zhang et al. 2020a).

Всички тези противоречиви и разнопосочни открития сигнализират за необходимостта от допълнителни изследвания за по-добро разбиране на сложните

взаимодействия, които се случват между тези два типа клетки. Трябва обаче да се отбележи, че тези противоречиви данни вероятно се дължат на различните клетъчни източници, различната изходна популация на В клетки (метод за чистота и изолиране), стимулацията, използвана за индуциране на пролиферация и диференциация на В клетките и не на последно място, съотношението *МСК/В* клетки в различните експерименти за съвместното им култивиране. От друга страна, при проучванията за трансплантация на *МСК*, трябва да се вземе предвид източникът на *МСК* (автоложна или алогенна трансплантация), броят на инжектираните клетки, заедно с общия брой на направените инфузии и дали *МСК* се прилагат едновременно с имunosупресивно лечение (Franquesa et al. 2012).

3.2 Клетъчни и молекулярни механизми, участващи в имunosупресивния потенциал на *МСК* спрямо В лимфоцитите

МСК оказват значително влияние върху функциите на В клетките, чрез различни механизми. Това се доказва от изследването на Rafei и сътр. още през 2008г, което показва, че *CCL2 / MCP-1* и отчасти *CCL7* са ключови молекули, участващи в медираната от *МСК* имunosупресия на клетките, произвеждащи антитела (Rafei et al. 2008). В основата на този инхибиторен ефект, индуциран от *CCL2* върху плазматичните клетки, е активирането на Т-клетъчната протеин-тирозин фосфатаза (*TC-PTP*), което влияе отрицателно на *Janus*'кинази-сигнални преобразуватели и активатори на транскрипцията (*JAK-STATs* сигнализация) чрез дефосфорилиране на *STAT3*, последвано от понижена експресия на *B-lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp-1)* и повишени нива на *paired box 5 (PAX-5)*, ключов регулатор на идентичността и диференциацията на В клетките (Rafei et al. 2008) (*фиг. 1*).



Фигура 1: Ефект на *CCL2* хемокина, произведен от *MCK* върху клетките, секретирани антитела. Секреторната молекула *CCL2*, получена от *MCK*, потиска производството на антитела от плазматичните клетки чрез инактивиране на *STAT3*, последвано от намалена експресия на *Blimp-1* и повишена експресия на *PAX-5* (Yordanova and Kyurkchiev 2020).

В контекста на това, както беше споменато преди относно важноста на донорите на стволови клетки, не е изненадващо, че *KM-MCK* на лупусноподобни мишки и пациенти със *СЛЕ*, не успяват да потиснат пролиферацията и диференциацията на В клетките и често причината за това са намалените нива на *CCL2* (Che et al. 2014). Всъщност, функцията на *CCL2* зависи от действието на протеолитичния ензим матриксна-металопротеиназа-1 (*MMP-1*), освободен от *MCK*. N-крайни пептиди на *CCL2* се откриват в супернатанти на нормални човешки *MCK*, докато в супернатанти на *MCK* от пациенти със *СЛЕ* се откриват както N, така и C терминални пептиди (Che et al. 2014). Освен това, проучвания при пациенти с лупус са успели да хвърлят светлина дори на генетично ниво върху друг дефект в *MCK*. *KM-MCK* от пациенти със *СЛЕ* експресират високи нива на *olfactory 1/early B-cell factor-associated zinc-finger protein (OAZ)*. След потискане експресията на този ген, пролиферацията, диференциацията и производството на имуноглобулини, заедно с нивата на *ANA*, намаляват, докато нивата на *CCL2* се увеличават (Feng et al. 2014). Това откритие показва, че *OAZ* генът е свързан с регулацията на В клетките от *MCK* и стволови клетки, които свръхекспресират *OAZ*, се характеризират с неспособност да потиснат В клетките (Feng et al. 2014). Не е трудно да се предположи, че понижената експресия на *CCL2* в лупусни *MCK*, заедно със свръхекспресията на *OAZ* гена може да

бъде потенциален таргет за възстановяване на имуносупресивната функция на *МСК* при пациенти със *СЛЕ*.

По отношение на други транскрипционни фактори, експресията на *X-boxed свързващ протеин 1 (Xbp-1)* или протеина *B-cell lymphoma 6 (Bcl-6)* не се променя при активирани В клетки, съвместно култивирани с и без *МСК*, изолирани от пъпна връв (*ПВ-МСК*) (Che et al. 2012). По същия начин, след добавянето на *ПВ-МСК*, фосфорилирането на два протеина, участващи в пролиферацията и диференциацията на В клетките - *фосфорилирана протеин киназа В (p-PKB)*, известна също като *Akt киназа* и *фосфорилиран протеин - 38 (p-p38)*, се предотвратява от *МСК* (Che et al. 2012). Друг молекулярен път, участващ във взаимодействията между *МСК* и В клетки, зависи от контакта клетка-клетка. Сигналният път *PD-1/PD-L1* е отговорен за *МСК*-медираното нарушаване на Т- и В-лимфоцитното активиране и пролиферация (Augello et al. 2005). По този начин механизмите на действие на *МСК* са разнообразни и включват активиране и модулация на различни молекулярни пътища.

Една възможна причина е участието на въглехидрат-свързващ протеин в това сложно взаимодействие между двата клетъчни типа. Активирането на *МСК* с *IFN- γ* води до повишаване на регулацията на лектин с имунорегулаторна функция, известен като *галектин-9 (Gal-9)*, което е свързано с инхибиране на пролиферацията на В клетки и антиген-зависимото освобождаване на имуноглобулини при мишки (Ungerer et al. 2014). Предполагаме механизъм е свързване на *Gal-9* с линейните N-гликани на *CD45* молекулата върху повърхността на В клетките, което води до инхибиране на тяхното активиране (Giovannone et al. 2018). Необходими са обаче допълнителни проучвания, за да се разбере точният партньор за *Gal-9* на мембраната на В клетките, участващ в тяхното взаимодействие с *МСК*.

3.3 Влияние на *МСК* върху активирането и оцеляването на В клетките

Дисрегулацията в активирането и функционалната активност на В клетките е свързана основно с три патологични състояния, а именно туморогенеза, алергични реакции или автоимунитет. Активирането на В клетките е първата стъпка в задействането на хуморален имуен отговор, което води до пролиферация на В клетките с последваща диференциация в клетки, продуциращи антитела и В клетки на паметта. Всъщност, добре е известно, че са необходими три сигнала за активиране на наивни, но зрели В клетки (Cyster and Allen 2019). Първият сигнал идва от специфичното разпознаване на антигена от В-клетъчния мембранен рецептор (*BCR*).

Взаимодействието между *CD40* ко-рецептора, експресиран върху В-клетъчната мембрана, и *CD40L (CD154)* на Т-клетъчната повърхност е от значение за втория сигнал и се осъществява с помощта на Т лимфоцитите. Т клетките също се нуждаят от ко-стимулация, която се допълва от взаимодействието на ко-стимулаторните молекули *CD80/CD86* на мембраната на В клетките или други антиген-представящи клетки (*АПК*) с Т-клетъчната молекула *CD28*. Това взаимодействие е от съществено значение за стимулирането на имунологичния синапс и за допълнителната експресия на други активационни сигнали (Rastogi et al. 2022). От друга страна ко-стимулаторното взаимодействие е от решаващо значение за съдбата на В клетките. Ако В клетките не получат сигнал от това взаимодействие, те остават в т. нар. състояние на анергия, т.е. те са живи, но функционално неактивни (Pelanda and Zikherman 2022). Третият сигнал се получава чрез свързване на подходящите цитокини, освободени от Т клетките, към техните специфични рецептори, експресирани на В-клетъчната мембрана. В зависимост от естеството на антигена и дали е Т-зависим или Т-независим антиген, В клетките могат да се активират и без помощта на Т-клетките, чрез активиране на *TLR* от бактериални компоненти, *CpG*, *двРНК* (Hua and Hou 2013).

Активирането на В клетките като процес е изключително важен не само за поддържане на антияло-медиацията имуноен отговор и за подобряване на ефекторните клетъчни функции, но може да се използва и като таргет за бъдещи терапии на заболявания, при които В клетките играят съществена роля. Например, потискането на активирането на В клетките е изключително важно и полезно за регулирането на хиперактивните В клетки, открити при автоимунни заболявания (Musette and Bouaziz 2018). Дали обаче съдбата на В клетките, техните фенотипни и функционални характеристики могат да бъде променени или те са предварително закодирани дълбоко в генетичната програма на клетките, е въпрос, предоставящ място за размишления и допълнителни изследвания в областта? Ако отговорът е в насока генетично предопределена съдба, то в този случай приложението на стволовите клетки би било безсмислено. Оказва се обаче, че В лимфоцитите също подлежат на епигенетични промени и предизвикват все повече интерес като таргет за разработване на редица терапевтични подходи (Xiao et al. 2022).

МСК от различни тъкани имат различни имуномодулаторни ефекти дори върху активирането на В клетките, което може да бъде оценено чрез експресията на важни повърхностни активационни маркери. Данните сочат, че човешките *КМ-МСК* и *АТ-МСК* влияят отрицателно на активирането на В клетките *in vitro*, докато *ПВ-МСК* нямат

такъв ефект (Ribeiro et al. 2013). Освен това, В-клетъчната активация се повлиява и след инфузия на *MCK*, което е свързано с инхибиране експресията на ранния активационен маркер *CD69* и *CD86* (*B7-2*) ко-стимулаторната молекула, открита предимно върху донорни В лимфоцити при миши модел на остра реакция на присадката срещу гостоприемника (*aGVHD*) (Lu et al. 2019).

По отношение на активирането на В клетките трябва да се отбележи, че този процес протича във вторичните лимфоидни органи (*ВЛО*), като далак и лимфни възли. Наблюдава се съществено намаление във В-клетъчната експресия на хемокинови рецептори като *CXCR4*, *CXCR5*, *CCR7*, заедно с нарушен хемотаксис по посока на техните лиганди *CXCL12*, *CXCL13* и *CCL19* след съвместно култивиране на лимфоцитите с *MCK* (Corcione et al. 2006). По този начин, *MCK* могат да помогнат за рециркулацията на В лимфоцитите и да предотвратят косвено тяхното активиране чрез нарушен хемотаксис към *ВЛО*. Освен това, *CXCR4* е необходим за последващата локализация на плазматичните клетки в костния мозък (Cheng et al. 2018) и потискане експресията на този рецептор от *MCK* би нарушило поддържането на дългоживеещите плазматични клетки в костния мозък.

В допълнение, един от основните регулатори, участващи в активирането и оцеляването на В клетките, е разтворимия цитокин *В-клетъчен активационен фактор от семейството на TNF* (*BAFF*), известен още като *В-лимфоцитен стимулатор* (*BLyS*), и *MCK* изглежда, че могат да повлияват благоприятно състоянието на автоимунните пациенти чрез въздействие върху *DC* и понижаване на серумните нива на *BAFF* (Ma et al. 2013). *BAFF* се продуцира и секретира основно от миелоидни клетки като *DC*, моноцити, *МАФ*, неутрофили, но и от активирани Т клетки и други нелимфоидни клетки (астроцити, фибробластно-подобни синовиоцити, епителни клетки на слюнчените жлези и др.) (Ospina et al. 2016). *MCK* също са източник на този регулаторен фактор и механизмът на повишената експресия на *BAFF* при *MCK* е свързан с праймирането на рецептора ангажиран във вродения имунитет - *TLR-4* (Yan et al. 2014). В тази публикация авторите съобщават, че активирането на *TLR-4* в човешки и миши *MCK* задейства сигнални пътища, като *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells* (*NF-kB*), *p38 mitogen activated protein kinase* (*MAPK*), *c-Jun N-terminal kinase* (*JNK*), които са свързани с експресията на *BAFF*, регулирана от *TLR-4*. Възможно е също така, потенциалът за диференциация на *MCK* да повлияе и техните имунорегулаторни свойства. Според Wang et al. разтворимият фактор *BAFF*, открит в супернатантите на адипогенно-диференцирани *MCK*, може да насърчи алоантиген или

митоген-стимулираната пролиферация на Т- и В клетки, както и производството на антитела от В клетките, докато недиференцираните *MCK* водят до тяхното потискане (Wang et al. 2011).

Освен *BAFF* и други разтворими фактори, произведени от *MCK*, могат да модулират активирането и оцеляването на В клетките. *MCK* са източник на васкуларен ендотелен растежен фактор (*VEGF*) и това е един от възможните механизми за насърчаване на активирането, пролиферацията и оцеляването на В клетките. Повишеното производство на *VEGF* от *MCK* води до повишено фосфорилиране на *Akt* киназа, предотвратявайки активирането на каспаза 3, водещо до инхибиране на В-клетъчната апоптоза (Healy et al. 2015). От друга страна, цитокин-медираната супресия на В-клетъчната апоптоза може да бъде индуцирана от *MCK*, тъй като те са източници на цитокини, свързани с клетъчното оцеляване, като *IL-6* - възпалителен и в същото време анти-апоптотичен цитокин. Друг фактор е антагонистът на интерлевкин-1 рецептора (*IL-1RA*), протеин, който потиска сигналния път на *IL-1*, като блокира *IL-1* рецепторите. Оказва се, че *IL-1RA* може да има пряка връзка с преживяването на В клетките и *MCK*-медираното инхибиране на апоптозата. Това се доказва от *knockout* миши модел, където *MCK* с неспособност да експресират *IL-1RA*, водят до увеличен брой В клетки, подложени на апоптоза (Luz-Crawford et al. 2016). Обратно, броят на мъртвите В клетки е по-нисък, когато са били култивирани в присъствието на див тип *MCK*, чиято експресия на *IL-1RA* била незасегната. Въпреки че *IL-6* е антиапоптотичен фактор, авторите стигат до извода, че тези про-оцеляващи ефекти на *MCK* се дължат по-скоро на *IL-1RA*, отколкото на цитокина *IL-6* (Luz-Crawford et al. 2016).

Друга функция, която може да бъде повлияна от действието на *MCK*, е способността на В клетките да инхибират прекомерното възпаление. Такава имунна регулация включва участието на специфична малка популация от В клетки, наречени регулаторни В клетки (*Bregs*), които заедно с *Tregs* имат потенциал да произвеждат противовъзпалителни цитокини като *IL-10*, *TGF-β* и *IL-35*. Освен това, за разлика от *Tregs*, до момента няма точно определен фенотипен маркер, който да отличава тази популация от В клетки и поради тази причина съществуват различни субпопулации на *Bregs*, според експресията на определени повърхностни маркери и производството на цитокини (Shang et al. 2020). Имуномодулиращият ефект на *MCK*, водещ до генерирането на различни субпопулации на В клетки с противовъзпалителна и регулаторна функция, се подкрепя от *in vivo* и *in vitro* експерименти. Например, нова подгрупа от *Bregs* се индуцира от *KM-MCK*, характеризиращи се с експресията на

$CD23^+CD43^+$ фенотипни маркери, заедно с повишеното производство на имуносупресивния цитокин *IL-10* (Chen et al. 2019). Освен това, според това проучване контактът между клетките и *циклооксигеназа 2 (COX2)/PGE2* пътя са включени в механизма за повишаване на $CD23^+CD43^+$ *Bregs* и след интраперитонеално инжектиране на човешки *MCK* в миши модел на експериментален колит, има облекчаване на чревното възпаление с увеличаване на тази конкретна подгрупа на *Bregs* (Chen et al. 2019). Като цяло, определянето на точния механизъм, чрез който *MCK* водят до генерирането на *Bregs*, би допълнило цялостната картина на *MCK*-медираната имуносупресия. Според други изследвания *MCK* стимулират регулаторното действие на В клетките чрез включване на различни молекули и механизми като *SDF-1 α* и *CXCR7* (Qin et al. 2015), продукцията на имунорегулаторния ензим *IDO* (Peng et al. 2015) или вирус на Епщайн-Бар (*EBV*)-индуциран ген 3 - *EBI3*, β субединицата на *IL-35* (Cho et al. 2017). Различните механизми, включени в индукцията на *Bregs* от *MCK*, наблюдавани в гореспоменатите проучвания, вероятно се дължат на генерирането на различни подгрупи *Bregs*, които могат да се различават не само по фенотипни маркери, но и по начина на индуциране на имуносупресия чрез производството на антивъзпалителни цитокини.

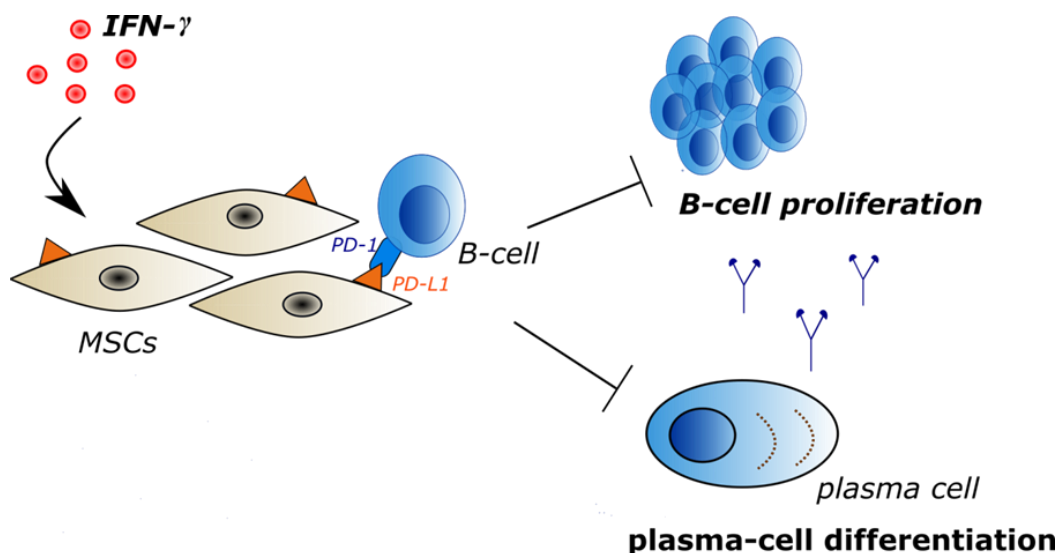
3.4 Клетки-посредници на взаимодействията между *MCK* и В лимфоцитите

Ефектите на *MCK* върху В клетките зависят до голяма степен от клетъчния източник, метода на изолиране и чистотата на В-клетъчната популация. Доста често обогатена В-клетъчна система, включваща *PBMC*, изолирани от периферна кръв или слезка, се използва в експерименти за съвместно култивиране, където освен В лимфоцити се откриват и други мононуклеарни клетки. По този начин тази експериментална система до голяма степен наподобява условията *in vivo*. Описаната система за съвместно култивиране с други имунни клетки, не само с В клетки, би могла да допринесе за по-задълбоченото разбиране на участието и на други клетки като посредници във взаимодействията на *MCK* и В клетките. Според някои изследователи наличието на функционални Т клетки и контактът между *KM-MCK* и Т клетките, но не и В клетките, са определящи за инхибирането на В клетките. Когато изолирани В клетки се култивират съвместно с *MCK* и *SpG*, се наблюдава отсъствие на имуносупресивния ефект на *MCK* и той бива възстановен след добавянето на Т клетки към културалната система (Rosado et al. 2015). Освен това, *AT-MCK* също инхибират

диференциацията на В клетките с помощта на Т клетки (Franquesa et al. 2015a). Всъщност, В клетките могат да получат допълнителна помощ не само от Т лимфоцитите, но и от *DC*. Когато В клетките са *in vitro* култивирани с плазмацитоидни дендритни клетки (*pDC*), техният диференциационен потенциал се стимулира заедно с повишеното ниво на цитоплазмен имуноглобулин и намалени нива на ключови маркери за ранната В-клетъчна диференциация, като *CD19* и *CCR7*. Въпреки това, когато *MCK* са добавени към системата за култивиране, ефектите на *DC* върху В-клетъчната биология са били премахнати (Tabera et al. 2008). Следователно, това показва, че *MCK* са в състояние да предотвратят имунорегулацията на В лимфоцитите от *DC*, но точният механизъм, участващ в тези клетъчни взаимоотношения, тепърва предстои да бъде разкрит.

3.5 Връзка между различните имунологични условия, външни сигнали, *MCK* и В клетките

Ефектът на *MCK* върху В клетките зависи до голяма степен от условията на околната среда и сигналите, които *MCK* получават при различни обстоятелства. Например, възпалителни състояния, наблюдавани *in vivo* или индуцирани в клетъчните култури *in vitro*, могат да променят имуномодулиращите функции на *MCK*. Провъзпалителният цитокин *IFN- γ* , за който е известно, че стимулира имуносупресивните свойства на *MCK*, е един от използваните стимули за активиране на *MCK*. В тази връзка експериментите, изследващи ефекта на *MCK* върху В клетките, не са изключение. При стимулиране на *AT-MCK* с *INF- γ* *in vitro* се наблюдава повишена секреция на *IDO*, което води до изчерпване на триптофана с последващо инхибиране на пролиферацията на В клетките и производството на *IgG* (Luk et al. 2017). Въпреки това, според някои други автори, инхибирането на В клетките от *MCK* зависи от *IFN- γ* , но не е свързано с влиянието на *IDO* (Schena et al., 2010). Друг възможен механизъм е регулиране експресията на *B7-H1* молекулата (*PD-L1* или *CD274*), наблюдавана след стимулиране на *MCK* с *IFN- γ* , което води до потисната пролиферация на *CD19⁺* В клетки и диференциацията им до плазматични клетки. Този ефект се медира от директното междуклетъчно взаимодействие, тъй като *B7-H1* е един от лигандите за *PD-1* (*CD279*), експресиран на повърхността на В клетките, и заедно те са част от ключов молекулярен път, както вече беше споменато преди (Wang et al. 2014). (*фиг. 2*).



Фигура 2: Контакт-зависима сигнализация между *MSC* и *B* клетки. При стимулация с *IFN-γ* експресията на *PD-L1* се увеличава при *MSC* и този лиганд директно взаимодейства с *PD-1*, експресиран върху *B*-клетъчната мембрана, което води до инхибирана пролиферация и диференциация на плазматичните клетки. (Yordanova and Kyurkchiev 2020).

От друга страна, други провъзпалителни цитокини също могат да променят имуномодулиращите свойства на *MSC* спрямо *B* клетките. Например, културална среда от стимулирани с *TNF-α* *MSC* води до потискане на производството на *IgE* и *IgG* от *B* клетките при експериментален алергичен конюнктивит (*EAC*) (Su et al. 2015). Това откритие подчертава клиничното приложение на *MSC*, дори при алергично-медиирани състояния и едни от анти-алергичните механизми на *MSC* се постигат посредством инхибиране на *B* клетките, които участват в патофизиологията на алергичните заболявания, главно чрез секреция на *IgE* антитела.

Изключително интересен е фактът, че бактериалните микроорганизми, открити в културална среда от *MSC*, могат да предизвикат значителни последици върху функционалната активност на стволовите клетки. Например, експериментални изследвания демонстрират, че *MSC* заразени с *Mycoplasma arginini* могат да секретират различни фактори, като *C3* компонента на системата на комплемента, и регулират производството на антитела от стимулирани с *IL-4/LPS* *B* лимфоцити (Lee et al. 2014). *B* допълнение, *C3* инхибира производството на антитела от *B* клетките, като блокира диференциацията им в плазматични клетки. Механизмът включва понижено регулиране на *Blimp-1* от инфектирани *MSC*. Тези резултати показват, че бактериите могат да повлияят имуномодулиращите свойства на *MSC*. Вероятно, това е част от бактериалната стратегия за избягване откриването им и тяхното последващо елиминиране.

3.6 *Екстрацелуларни везикули, МСК и В клетки*

Комуникацията на *МСК* с други клетъчни типове може да се осъществи не само чрез директен клетъчен контакт и/или секреция на разтворими фактори, но и чрез освобождаването на *ЕВ* в извънклетъчното пространство, които съставляват съществена част от секретото на *МСК*. Обикновено, такива *ЕВ* се намират в супернатантите на *МСК* и могат да се използват като терапевтични средства, които доставят лекарства на точно определени места в тялото или като източници на биомаркери за редица заболявания. До 2020г. едва няколко доклада в литературата демонстрират влиянието на *ЕВ*, получени от *МСК*, върху *В* клетките, като последните три години тенденцията продължава да бъде такава.

Резултатите от *in vitro* изследвания с човешки *КМ-МСК*, съвместно култивирани с *РВМС*, показват, че имunosупресивният ефект на *МСК* срещу *В* клетките се дължи до голяма степен на секрецията на извънклетъчни мембранни везикули от стволовите клетки (Budoni et al. 2013). Според авторите на това съобщение тези везикули съдържат *IL-6* и *IL-8*, но не е известно дали ефектът се дължи и на присъствието на други клетки в културата от *РВМС* (Budoni et al. 2013).

Освен това трябва да се отбележи, че способността на *ЕВ* да модулират *В* клетките е много по-малко успешна от тази на *МСК*, от които произхождат (Conforti et al. 2014). В действителност, едно от проучванията не подкрепя идеята, че имunosупресивният ефект на *МСК* спрямо *В* клетките се дължи на извънклетъчните везикули. Разтворимите протеинови фактори имат значение за потискането на *В* клетките като ефекта е подобен на този при ко-култивиране със стволовите клетки, а именно да стимулират производството на *IL-10* от *В* клетки, нещо което извънклетъчните везикули не са успели да постигнат (Carreras-Planella et al. 2019). От друга страна, предишни резултати показват, че *ЕВ* от *КМ-МСК*, стимулират пролиферацията и хеморезистентността на *В* лимфоцити при хронична лимфоцитна левкемия, посредством механизъм, изискващ участието на междуклетъчен контакт (Crompton et al. 2017). Всички тези противоречиви данни са доказателство за необходимостта от допълнителни проучвания, които да утвърдят приноса на *МВ* за взаимодействието между *В* клетките и *МСК*.

4. Системен лупус еритематозус – “великият имитатор”

СЛЕ е хронично мултисистемно автоимунно заболяване на съединителната тъкан. В основата на заболяването е масивно увреждане на тъкани и органи,

продиктувано от продукцията и секрецията на специфични автоантитела и сформирването на провъзпалителни имунни комплекси (Zucchi et al. 2022). Поради тази причина *СЛЕ* спада и към групата на т.нар. имуно-комплексни заболявания (Тоong et al. 2011). Характерното за автоантителата при *СЛЕ* е, че те са насочени най-често срещу ядрени компоненти и се откриват години преди да са налице клиничните прояви на заболяването, което говори за тяхната предиктивна стойност (Bizzaro and Villalta 2001).

4.1 Епидемиология

Първото описание на болестта е през 1833г., когато *Pierre Louis Alphonse Cazenave* и *Laurent Bielt*, използват термина “*erythema centrifugum*”, за да опишат характерния за болестта пеперудообразен обрив, термин, който през 1851г. бива преименуван на “*lupus erythematosus*” (Smith and Cyr 1988). Днес, два века по-късно, честотата на заболяването варира сред различните популации: 6.73 случая на 100 000 годишно при кавказката популация и 31.4 случая на 100 000 годишно при афро-американското население (Weckerle and Niewold 2011; Rees et al. 2017). Тенденцията за нарастване през последните години се дължи на по-доброто диагностициране и подобрената преживяемост на пациентите. За сравнение, средната смъртност днес е 10% в рамките на 10г. от поставянето на диагнозата, а през 60те години на *XX* век тя е била 50% в рамките на 3 години от диагнозата (Bernatsky et al. 2006). Важно е да се отбележи, че могат да бъдат засегнати и двата пола, но заболяването преобладава при жените (жени:мъже – 9:1), особено характерен е дебют на болестта в репродуктивна възраст между 20-30г. (Weckerle and Niewold 2011).

По отношение на расовата предиспозиция, всички етнически групи са податливи, но *СЛЕ* по-често се проявява и с по-висока тежест на протичане на болестта при афроамериканско, африканско, испанско и азиатско население, със значително по-ниска честота сред кавказката популация (González et al. 2013). Основно се коментира ролята на *HLA*-локуса, където част от гените са свързани с антигенното представяне, като например *HLA-DR2*, който определя ранно начало и наличието на лупусен нефрит и *HLA-DR3*, характеризиращ се с късен дебют на заболяването и с дерматит (Mageed and Prud’homme 2003).

4.2 Етиология и патогенеза

Етиологията на *СЛЕ* остава до голяма степен неизвестна и по-скоро определяна като мултифакторна. Коментира се ролята на ендокринни-метаболитни фактори, ролята

на наследствеността, факторите на околната среда, като не се отхвърлят и стохастичните фактори (Tsokos et al. 2016). Вече стана ясно, че *СЛЕ* засяга в по-голяма степен представителите на женския пол и в основата на това стоят женските полови хормони - пролактин и естроген. Скорошни доклади потвърждават тезата, че част от гените на една от *X* хромозомите не са успешно потиснати, което се дължи на аберантна експресия на дълга некодираща *PHK* молекула - *XIST*, която е отговорна за инактивирането на гени във въпросната *X* хромозома по време на ранните фази от клетъчното развитие (Zhang et al. 2020b). От друга страна, естрогенът има способността да повлиява експресията на редица гени, като се свързва към специфични естрогенови рецептори на мембраните на клетките. Нещо повече, повишените нива на естроген при мишки са асоциирани с повишена експресия на анти-апоптотичната молекула *Bcl-2*, което допринася за преживяването на автореактивни В-клетъчни клонове (Вупое et al. 2000). Противоположно на тези данни, тестостеронът и прогестеронът се свързват по-скоро с протективен ефект при пациенти с това аутоимунно заболяване (Pan et al. 2019a).

Понятието “експозом” или влиянието на факторите от околната среда обаче е по-обстойно и включва в себе си няколко подразделения. Тук се отнасят инфекциите с различни патогени, излагането на токсини, ваксинации, тютюнопушене, УВ лъчения (Ameer et al. 2022). Във връзка с гореизложеното ролята на различни инфекциозни агенти, като пусков механизъм за задвижване на аутоимунна атака, са добре известни. В основата стоят процеси като молекулярна мимикрия, епитопно разпространение, поликлонална В-клетъчна активация, продукцията на суперантигени и други механизми. Особено внимание е отделено на вируси, които имат патогенна роля като *EBV*, *цитомегаловирус (CMV)*, *парвовирус В19*, *човешки имунодефицитен вирус-1 (HIV-1)* (Ameer et al. 2022), докато инфекциозни агенти като *H.pylori*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium sp.* имат по-скоро защитен ефект при *СЛЕ* (Sawalha et al. 2004; Cainelli and Vento 2015; Pan et al. 2019b). Във връзка с ваксинациите и ролята им за задвижване на патогенезата на *СЛЕ* се коментира ваксината срещу *вирус на хепатит Б (HBV)* (Ameer et al. 2022). Въпросът обаче дали имунният отговор е към ваксината или адюванитите в нея остава все още открит.

Последното десетилетие е установено, че изключително голямо внимание се отдава на връзката на микробиома и поддържането на имунния толеранс. Според литературни данни от експериментални проучвания с мишки появата на *АНА* зависи до голяма степен от бактериалната колонизация по време на вътреутробното развитие на

плода (Van Praet et al. 2015). Тези констатации се подкрепят от едно изследване, при което пациентки със *СЛЕ* показват увеличено количество на бактерии от род *Firmicutes* спрямо род *Bacteroidetes*, в сравнение с микробиома на здрави жени (Hevia et al. 2014, p. 1).

Други фактори на околната среда като тютюнопушеното и излагането на токсини са също асоциирани с развитието на автоимунни заболявания и *СЛЕ* не е изключение. Според скорошни данни един от механизмите, по който тютюнопушеното повлиява В и Т лимфоцитите при автоимунни заболявания, е посредством повишаване експресията на *CD95 (FASL)*, правейки клетките по-чувствителни на апоптоза (Speyer and Costenbader 2018). Излагането на силиции и живак при пациенти със *СЛЕ* също водят до повишени нива на клетъчна апоптоза (Pollard 2016). Подобна асоциация се прави и с *УВ* лъченията. Пациентите със *СЛЕ* се характеризират с повишена фоточувствителност, което означава, че след излагане продължително време на слънчева светлина се наблюдават повишени нива на *ROS*, промяна в структурата на белтъчни и ДНК молекули, правейки ги имуногенни, както и повишена апоптоза на кератиноцити (Klein and Kunz 2022). Ето защо, фоточувствителността е един от 11-те критерии на *Американския Колеж по Ревматология (ACR)*, необходими за поставяне на диагноза *СЛЕ* и обикновено се доказва с наличието на *анти-Ro/La* антитела при засегнатите индивиди (Krishnamurthy and Mahadevan 2011; Kim and Chong 2013). Така се допълва порочният кръг от неконтролируема програмирана клетъчна смърт и, обикновено при този тип пациенти една от препоръките на лекуващите лекари е именно избягване излагането на слънце продължително време.

Епигенетичните промени, касаещи развитието на лупус са също многообразни. Наличното понятие “лекарствено индуциран лупус” е вследствие асоциацията на редица лекарства (*хидралазин, прокаинамид, изониазид* и др.) с наличието на антихистонови антитела и с индукцията на лупус, чиято симптоматика изчезва след прекратяване приложението на съответния медикамент (He and Sawalha 2018). Коментира се връзката между *УВ* излагането и лекарствено индуцирания лупус. Допълнителна информация идва от изследванията на авторски колектив, според който излагането на слънчева светлина води до превръщането на лекарството *пропанолол* в провъзпалителен рецепторен лиганд за арилов въглеводород (Dorgham et al. 2015). Друг механизъм, по който лекарствата участват в патогенезата на заболяването, е посредством инхибиране метилирането на *ДНК*, което води до свръхекспресия на гени, участващи в имунопатогенезата на лупуса (Chen et al. 2017b). Противоположно на тази

информация диетата стимулира метилирането на ДНК и има значение за потискане експресията на гени, предразполагащи към автоимунитет (Lim and Song 2012). Редица хистонови пост-транслационни модификации като ацетилирането на хистон H4 в местата за свързване на *interferon regulatory factor 1 (IRF-1)*, чиято експресия при СЛЕ е увеличена, са също от значение за разгръщането на автоимунната генеза на заболяването, тъй като *IRF1* гена е свързан със секрецията на интерферони тип I (Zhang et al. 2015).

Не на последно място, а по-скоро централна роля като част от етиопатогенетичните фактори имат редица гени, определящи наследствената предразположеност към СЛЕ. СЛЕ е полигенно заболяване, което само по себе си означава, че в патогенезата на заболяването роля имат много голям набор от гени. HLA системата играе централна роля за възникването на болестта. Едни от ключовите алели са *HLA-DRB1 (*1501, *0301)* и *HLA-DQB1 (*0201, *0602)*, които са свързани с представянето на антигени, включително автоантигени (Ayed et al. 2004; Harley et al. 2006).

Голяма част от засегнатите гени при СЛЕ са присъщи и за други автоимунни заболявания. Това са гени, които имат роля за вродения имунен отговор (*IRF5, three prime repair exonuclease 1 (TREX1), interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), STAT4*), Т- и В-клетъчната сигнализация (*HLA-DR, protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (PTPN22), STAT4, TNF Superfamily Member 4 (TNFSF4), IRAK, B-lymphoid tyrosine kinase (BLK), B Cell Scaffold Protein With Ankyrin Repeats 1 (BANK1), tyrosine-protein kinase-LYN*), апоптоза и изчистване на имунни комплекси (*C-reactive proteine (CRP), signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) associated protein (SAP), C1q, C2, C4, Fc Gamma Receptor (FCGR) 2A, FCGR3A, integrin subunit alpha M (ITGAM)*) (Krishnamurthy and Mahadevan 2011). Знанието за носителството на гени, предразполагащи към СЛЕ е от съществено значение, особено при пациенти с висок риск, определящи се като носители на няколко генетични фактора.

4.3 Роля на В лимфоцитите при СЛЕ

4.3.1 Клетъчната смърт като механизъм за получаване на автоантигени

Ролята на В клетките в имунопатогенезата на СЛЕ е свързана с програмираната клетъчна смърт. При нормални физиологични условия апоптозата не е случайно събитие, а по-скоро строго регулирана програма, заложена във всяка една клетка и отговорна за поддържането на клетъчната и тъканна хомеостаза (Mondello and Scovassi

2010). След образуването на т.нар. апоптотични телца те обикновено биват изчиствани с помощта на клетки част от ретикулоендотелната система като *МАФ*, моноцити, дори участие вземат неутрофилите и *DC* (Ge et al. 2022). Тези клетки притежават фагоцитираща функция и посредством различни молекули-посредници, известни като опсоними (*CRP*, *серумен амилоид Р*, *манан-свързващ лектин (MBL)*, *C1q*, *C2*, *C4* и др.), се благоприятства успешното протичане на процеса ефероцитоза в т.нар. пълна имунологична тишина. Един от ранните сигнали, на апоптозираните клетки е транслокацията от вътрешния към външния монослой на мембраната на *фосфатидил серин (PS)*, който може директно да бъде разпознат от специфични рецептори на фагоцитите, без да е необходимо участието на опсоними (Lee et al. 2013).

При пациентите със *СЛЕ* обаче поради редица етиологични фактори, на които беше обърнато внимание, често се наблюдават повишени нива или дефект в процеса апоптоза или наличието на дефицит/дефект в клетките или молекулите, участващи в изчистването на клетъчните остатъци (Kawano and Nagata 2018). В резултат на това тези вътреклетъчни антигени стават видими за имунната система, но тя не е обучена да ги разпознава като свои и да проявява “разбиране” спрямо тях.

Също така, освен в нативен вид част от освободените антигени претърпяват редица модификации, които допринасят за повишаване на тяхната имуногенност. Впоследствие антигените биват захващани от рецептори (*TLRs*) на незрелите *DC*, което води до повишаване експресията на ко-стимулаторни молекули и до тяхното съзряване в зрели *IL-12*-продуциращи *DC*. Това са основните имуногенни клетки, които са отговорни за представянето на преработените антигени и активирането на *T* лимфоцитите, които впоследствие взаимодействат с *B* клетките и също ги активират. След активация *B* лимфоцитите пролиферират и се диференцират до плазматични клетки, които продуцират и мощно секретират автоантитела, специфични срещу екстернализираните клетъчни антигени.

4.3.2 Автоантитела при СЛЕ

Автоантителата представляват високо специфични имуноглобулини, най-често от клас *IgG*, които претърпяват соматична хипермутация в герминативните центрове на лимфните възли с участието на *T* клетките, осигуряващи необходимата помощ на *B* клетките за превключване на имуноглобулиновия клас. По отношение на секретирания автоантитела при *СЛЕ*, голяма част от тях са насочени срещу ядрени компоненти -*АНА* (Li et al. 2022a). Тези антитела имат способността допълнително да се свързват към

екстернализираните нефагоцитирани антигени и да формират имунни комплекси, които да се отлагат в редица тъкани и органи. Те са отговорни за индукцията на мощни възпалителни отговори и привличането на други клетки към местата на възпаление в организма. Част от *ANA* са антителата срещу *двДНК*, които са с висока специфичност за *СЛЕ* и корелират с активността на заболяването (Narayanan et al. 2010). Други подобни антитела са антителата, насочени срещу нуклеозоми, хистони, *евДНК* (едноверижна ДНК), *евРНК* (едноверижна РНК), рибонуклеопротеини (*RNP*). Доста характерни и специфични за заболяването са *анти-Sm (Smith)* антителата, насочени срещу антиген част от *snRNP* групата, дори проследяването на титъра на *анти-Sm* антителата може да помогне за оценка на активността на заболяването (Ahn et al. 2019).

Други антитела установени при *СЛЕ* са антифосфолипидни антитела (анти-протромбин, анти-кардиолипин, анти- $\beta 2$ гликопротеин I), антитела срещу кръвни клетки, анти-невронални антитела, анти-Ro/La. Данни от проучвания докладват наличието на специфични за заболяването $9G4^+$ антитела срещу апоптотични клетки, основна част от антитяловия репертоар в серума на тези пациенти (Jenks et al. 2013). Доста интересен В клетъчен феномен, докладван преди близо 10г. е свързан с продукцията на патологични антитела, но от клас *IgE*, чиято серумна концентрация при пациенти със *СЛЕ* е повишена (Dema et al. 2014). Тези антитела разпознават *двДНК* молекули, образуват имунни комплекси и активират *pDC*, водейки до повишена продукция на *IFN I* молекули - механизъм, който е характерен и за автоантителата от клас *IgG*. Подобни иновативни открития отварят врати към нови познания и разбирания на патогенезата не само на *СЛЕ*, а на автоимунните заболявания като цяло, както и на тяхната връзка с алергичните състояния. Това е една от причините за все по-набиращият популярност термин “автоалергии” или “*IgE*-медиран автоимунитет” (Maurer et al. 2018). Един от водещите научни екипи работещи в областта показват, че *анти-двДНК* антитела от клас *IgE* корелират със стойностите на общоприетия индекс за активност на заболяването *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI-2K)* при пациенти с лупус и са асоциирани с активацията на базофили, които допринасят за разгръщането на лупусния нефрит (Fujimoto et al. 2023).

4.3.3 В-клетъчни фенотипове при СЛЕ и тяхната регулация

По време на активната фаза на заболяването е докладвана лимфопения на наивни В клетки ($CD19^+CD27^-$) и повишен брой на преходни В клетки ($CD19^+CD27^{hi}CD38^{hi}$), В клетки на паметта ($CD19^+CD27^+IgD^-$), двойно негативни В клетки ($CD19^+CD27^-IgD^-$) и плазматични клетки ($CD19^{dim}CD27^{hi}sIg^{low}CD38^+CD138^+CD20^-$) (Moulton et al. 2017). Интересна констатация е направена между инактивираната *XIST* РНК молекула и уникална В-клетъчна популация, асоциирана с процесите на стареене, имунните отговори срещу инфекции и собствени структури. Тази В-клетъчна популация се характеризира с експресията на $CD11c^+$ и често В лимфоцитите се определят като атипични В клетки (*ABCs*) (Sado 2021). Също така, съобщава се за дефект във функционалната активност или понижен брой на В клетки с регулаторна функция ($CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$), които са източник на *IL-10*, събитие което се среща и при други автоимунни състояния (Blair et al. 2010).

За поддържането на автореактивни В лимфоцити роля имат няколко важни екстрацелуларни сигнала. Под действие на освободените антигени от клетките, претърпели вторична некроза, *DC* секретират един важен за В клетките цитокин, а именно *BAFF*. Този цитокин е отговорен за поддържане на пролиферацията и преживяването на В клетките, а повишените му серумни нива при пациенти със *СЛЕ* и при миши лупусни модели, са индикатор за активността на заболяването (Marín-Rosales et al. 2019; Giordano et al. 2023). *BAFF* осъществява своите ефекти след свързването си към 3 типа рецептора: *BR3* (*BAFF-R* или рецептор за *BAFF*), *TACI* (*transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand (CAML) interactor*) и *BCMA* (*B-cell maturation antigen*), като и трите рецептора се експресират от В клетките (Smulski and Eibel 2018).

Други докладвани цитокини, асоциирани пряко със съдбата на В клетките при лупус са *IL-4*, *IL-6*, *IL-21*, както и повишени нива на тип I интерферони, които пряко повлияват В-клетъчната диференциация в антитяло-продуциращи клетки (Jego et al. 2003). Тук е мястото да се спомене, че плазматичните клетки в периферна кръв често се означават като кратко-живеещи, като част от тях мигрират в костния мозък, където могат да пребибават дълги години и да са източник на патогномонични автоантитела. За поддържането на този вид дългоживеещи плазматични клетки в точно определени ниши на костния мозък значение имат *BAFF*, *IL-6*, адхезионни молекули, хемокини и един ключов лиганд, а *proliferation-inducing ligand (APRIL)* (Liu et al. 2011). *BAFF*, както

и *APRIL* са част от семейството на туморния некротизиращ фактор и имат припокриващи се ефекторни функции при В лимфоцитите. *APRIL* е отговорен също за поддържане на В-клетъчната пролиферация, диференциация и преживяване посредством сигнални пътища, които се задействат след свързването на лиганда към два от рецепторите за *BAFF - TACI* и *BCMA*. Силната асоциация на лиганда с нивата на протеинурия и степента на хистологична активност, предоставя възможността за използването му като маркер за трудно-повлияващ се терапевтично лупусен нефрит (Treamtrakapon et al. 2012).

Допълнително ролята на В лимфоцитите в патогенезата на *СЛЕ* се усложнява с участието им в сформирването на ектопични лимфоидни структури или т.нар. третични лимфоидни органи. Например, данни докладвани от *Seyed Esmaeil Dorraji* и сътр., потвърждават наличието на подобни структури в бъбреците при пациенти с лупусен нефрит (Dorraji et al. 2020). В тези ектопични структури В клетките могат да задвижват автоимунни отговори не само като представят антигени, но и като секретират различни цитокини, като например *IL-6*, *IFN-γ*, *IL-10*, *TGF-β* и *лимфотоксин-α*, за който се знае, че е важен за формирането на третични лимфоидни структури (Nashi et al. 2010).

Всички споменати механизми, посредством които В лимфоцитите допринасят за развитието на системния лупус, показват значителната роля на този клетъчен тип в патогенезата на заболяването и допълват цялостната картина на автоимунната атака, която обикновено е таргет на експериментални проучвания от страна на изследователите в областта.

4.4 Други клетки, участващи в патогенезата на *СЛЕ*

От имунологична гледна точка *СЛЕ* е известен като “великият имитатор”, поради голямото разнообразие на имунни феномени, които бяха описани в предишните точки на този раздел (Hanron and Hemmingway 1981). Ето защо заболяването представлява сериозно предизвикателство, за работещите в областта, относно създаването на иновативни терапии. Значението на В клетките в имунопатогенезата на *СЛЕ* не подлежи на съмнения, но почти толкова важни са и други клетки и събития, които допринасят за загубата на имунния толеранс и индукцията на патологична автоимунна атака. Всяка една част от имунната система при пациенти със *СЛЕ* е нарушена. Поради комплексността на патогенезата ще се обърне внимание на основни аспекти от имунните дефекти.

Например, автоимунната атака може да започне не от клетките на адаптивния имунитет, а посредством задействане на механизмите на вродените имунни отговори. Ролята на системата на комплемента за изчистването на имунните комплекси и апоптотичните остатъци за патогенезата на *СЛЕ* е безспорна и с нея са свързани редица генетични дефекти, които вече бяха коментирани (Truedsson et al. 2007). Свързването на освободени от апоптотични клетки *ДНК*, *РНК* и белтъчни молекули от *TLRs* на *pDC* и моноцити или *МАФ*, може директно да задвижи продукцията на *IFN* тип I. Този клас интерферони, с основни представители *IFN- α* и *IFN- β* , са ключова характеристика за *СЛЕ* пациентите и са свързани с активността на заболяването (Baechler et al. 2003). Според литературни данни, *IFN* тип I стимулират В-клетъчното преживяване и активация, което е свързано с повишената експресия на молекули като *CD86*, *CD69*, *CD25* (Braun et al. 2002).

Относно участието на *МАФ* в патогенезата на системния лупус основно се коментират събития, като дефекти във фагоцитозата, аберантна активация и нарушен баланс между супресивни *M2* и провъзпалителни *M1* *МАФ*, характеризиращи се с продукцията на цитокини като *IL-12*, *BAFF* и *TNF- α* (Ma et al. 2019). Специален принос за автоимунната генеза на *СЛЕ* имат и неутрофилите. Персистирането на големи количества ядрени антигени са причина за повишени нива на клетъчна смърт, характерна за неутрофилите и известна като “нетоза”. При нетозата се наблюдава формирането на *неутрофилни екстрацелуларни капани (NET)*, които съдържат имуногенни комплекси от хроматин, заедно с ядрени и цитоплазмени протеини. Този процес допълва основните механизми, свързани с нарушаването на имунологичния толеранс и индукцията на автоантитела и е един ключов елемент в протромботичния профил на пациентите със *СЛЕ* (Monzón Manzano et al. 2020). Други клетки също част от вродения имунен отговор - *NK* клетките при пациенти със *СЛЕ* са с понижена цитотоксична активност и невъзможност за унищожаване на автореактивни Т и В клетки (Krishnamurthy and Mahadevan 2011). Същевременно се наблюдава невъзможност за продукция и секреция на супресивния цитокин *TGF- β* , който е важен за развитието на *Tregs*. Тези данни са в подкрепа на научни съобщения, които докладват дефектна функция на *Tregs*, както и понижен брой на този вид регулаторни клетки при пациенти със *СЛЕ* (Chavele and Ehrenstein 2011). Една от причините е и понижената секреция на *IL-2*, също толкова важен за развитието на регулаторните лимфоцити (Lieberman and Tsokos 2010). Друг Т-клетъчен субтип с докладвана променена функция са *CD8* Т клетките, които подобно на *NK* клетките, показват дефект

в осъществяване на своята цитотоксична функция (Krishnamurthy and Mahadevan 2011). Цялостно, адаптивната имунна система при описаното автоимунно заболяване е насочена към генерирането на *Th* клетки (*Th1*, *Tfh*, *Th17*). С важно значение е *IL-17*, който регулира преживяването на В клетките и тяхната последваща диференциация в ефektorни клетки (Mitsdoerffer et al. 2010).

4.5 Клинична картина на СЛЕ

От описаната дотук комплексна патогенеза не е изненадващо, че *СЛЕ* се определя като хетерогенно заболяване, характеризиращо се с разнообразие по отношение на клиничната картина при различните пациенти. Заболяването засяга най-често кожа, стави, серозни мембрани, бъбреци, кръвни клетки, нервна система и се характеризира с периоди на внезапни пристъпи и периоди на минимална болестна активност (COJOCARU et al. 2011). В момента две класификационни системи се използват за поставянето на диагноза *СЛЕ*. Това са критериите на *Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC)* от 2012г. (*Приложение №1*) (Petri et al. 2012) и ревизираните през 2019г. класификационни критерии на *Европейската лига за ревматизъм и Американския колеж по ревматология - EULAR/ACR* (*Приложение №2*) (Aringer et al. 2019), където са представени подробни описания на клиничните прояви на заболяването. Обикновено, засегнатите органи и системи са разнообразни, поради което клиничните прояви се групират в *мускулно-скелетни, кожни, хематологични, неврологични, кардиореспираторни, бъбречни и гастроинтестинални прояви, съдови тромбози и офталмологични прояви*. Най-честата и тежка проява на болестта е лупусният нефрит, който заедно с инфекциите, са сред водещите причини за смърт през първото десетилетие на заболяването (Moroni et al. 2022).

4.6 Терапевтичен потенциал на МСК при СЛЕ

Терапевтичният план следван за лечение на пациенти болни от класическо автоимунно заболяване, каквото е *СЛЕ*, включва приложението на кортикостероиди, имуносупресивни лекарства, като *хидроксихлороквин (CHQ)*, циклофосфамид, метотрексат, азатиоприн, както и иновативни биологични препарати, като *Belimumab* (моноклонално анти-*BAFF* антитяло) и *Rituximab* (моноклонално анти-*CD20* антитяло) (Basta et al. 2020). Слабата ефективност, в комбинация с дългосрочното приложение на неспецифични имуносупресивни препарати, крие редица рискове, като заплахата от инфекции и възникването на вторични малигнени заболявания. От друга страна, цената

на биологичните агенти често е пречка за пациентите, голяма част от които не се повлияват от настоящите терапевтични подходи.

Терапията със стволови клетки остава едно от най-обещаващите нови направления в медицината за лечение на *СЛЕ*, въпреки оскъдните и противоречиви данни за взаимодействията между *МСК* и В клетките, които бяха разгледани в този раздел на настоящия дисертационен труд. В клетките са в основата на имунопатогенезата на заболяването и това е причината за нестихващия интерес на изследователите в областта. Единствено, остава все още неизвестно, дали *МСК* могат да повлияват експресията на ко-стимулаторни молекули на мембраната на В клетките, както и тяхната способност да продуцират биологично активни молекули, каквито са цитокините.

Основната информация, налична в научната литература, е съсредоточена върху експериментални данни, получени от животински модели на лупус, *in vitro* провеждани изследвания, както и експериментални лечения на този тип пациенти. За съжаление, все още няма одобрена официално терапия на основата на *МСК*, поради липсата на значителни доказателства в полза на тяхната ефективност и профил на безопасност при пациентите със *СЛЕ*. Друг интересен момент отговорен за забавеното приложение на този вид стволови клетки е тяхната асоциация с възникването на заболяването, дори част от изследователите определят *СЛЕ* като заболяване, дължащо се на дефект в стволовите клетки (Sun et al. 2007). Редица данни, в допълнение на тези разгледани по-рано, показват дефектна имуномодулаторна активност, понижен потенциал за миграция, пролиферация и диференциация на *КМ-МСК* на пациенти със *СЛЕ* (Sun et al. 2007; Geng et al. 2014). Миши модели на заболяването допринасят за по-доброто разбиране на комплексната патогенеза. Наличната до този момент информация вследствие на проведени експерименти с миши модел на лупус, показват дефектна ниша на *МСК* в костния мозък (Geng et al. 2014). Интересно е, че алогенната трансплантация на *КМ-МСК* е в състояние да възстанови остеобластната ниша в костния мозък и по-ефективно повлиява мултиорганната дисфункция в сравнение с приложената имunosупресивна терапия с циклофосфамид (Geng et al. 2014). Данни от проведен през 2019г. мета-анализ, обобщаващ 8 проспективни или ретроспективни клинични случаи и 4 рандомизирани клинични проучвания сочат, че приложението на *МСК* при пациенти със *СЛЕ* води също до понижена протеинурия, понижен *SLEDAI-2K* индекс и по-малко странични ефекти в сравнение с контролната група (Zhou et al. 2020). Друг, съвсем наскоро проведен, мета-анализ за оценка на ефективността на *МСК*

терапията за лечение на лупусен нефрит през 2023г. обобщава информацията от 12 проучвания с включени 585 пациента. Индексите за активността на заболяването значително са понижени 12 месеца от началото на терапията, заедно с подобрени лабораторни параметри за бъбречна функция, като скорост на гломерулна филтрация, серумни нива на креатинин, албумин и урея, *C3* компонента от системата на комплемента, както и нивата на белтък в урината. В допълнение, авторите заключават, че наблюдаваните редки странични ефекти не се дължат на терапията с *МСК* (Xia et al. 2023). Според базата данни *clinicaltrials.gov* до момента са проведени общо 18 експериментални лечения с *МСК* при пациенти с активен *СЛЕ* или лупусен нефрит, като едва 4 от тях са завършени, останалите са с неизвестен статус или на етап подбор на пациенти и здрави доброволци, които да вземат участие в експерименталното лечение. Важно е да се отбележи, че проведените проучвания са вследствие на клетъчна инфузия най-често интравенозно, а не на отделни клетъчни продукти, като кондиционирана среда или екстрацелуларни везикули, тъй като все още липсва информация за провеждането им.

5. Анкилозиращ спондилит – Болест на Бехтерев

АС е хронично, прогресивно, имуномедирано ревматично заболяване, част от групата на аксиалните *СпА*, което се характеризира със засягане на гръбначния стълб и сакроилиачните стави, както и с множество други извънгръбначни и извънставни прояви (Zhu et al. 2019). *АС* е древно заболяване, което през годините е описвано с различни наименования, като “ревматоиден спондилит”, болест на *Strümpell-Marie* или болест на Бехтерев. Едва през 1963г. *Американската ревматологична асоциация* приема наименованието “анкилозиращ спондилит”, разграничаващо заболяването от ревматоидния артрит (Khan and van der Linden 2019).

5.1 Епидемиология

Честотата на разпространение на болестта на Бехтерев сред човешката популация се определя като *0.5-1%*, което причислява тази болест към групата на редките заболявания. Важно е да се отбележи, че честотата варира спрямо етническата принадлежност, като най-висок дял от населението, страдащо от *АС* принадлежи към европейската популация (*0.23%*), следвана от азиатската (*0.16%*) и най-малка честота се наблюдава при представителите на африканската етническа група (*<0.1%*) (Dean et al. 2014). Заболяването се среща по-често при мъже, като съотношението варира, но най-

често е докладвано полово разпределение в съотношение 3:1 в полза на мъжете (Braun et al. 1998). Засегнатите индивиди са на млада възраст, като наличието на първи патологични признаци може да се случи по време на юношество или в млада до зряла възраст (12-45г.), като обикновено се наблюдава забавяне в поставянето на диагнозата АС.

5.2 Етиология и патогенеза

За разлика от други системни автоимунни заболявания, аксиалният спондилоартрит принадлежи в по-голяма степен към групата на автоинфламаторните, отколкото към групата на автоимунните състояния, макар че тази теория все още е обект на задълбочено дебатиране сред научната общост. Причината за това раздвоение е липсата на все още напълно убедителни данни за имунопатогенезата на болестта и фините механизми, които участват в нейната регулация (Mauro et al. 2021). Смята се, че за зараждането на болестта значение имат редица фактори, като в основата на АС стои генетичната предразположеност, заедно с епигенетичната регулация и тяхната връзка със стомашно-чревната дисбиоза. Отношение имат и редица фактори на околната среда, като инфекции, химикали и токсини. Коментират се дори събития, като травма или механично натоварване, затлъстяване, метаболитен синдром, както и вредни здравословни навици като алкохолизъм и тютюнопушене (Liao et al. 2022). Всички тези фактори поотделно или в комбинация могат да задвижат имунната патогенеза, както и да допринесат за допълване и засилване проявите на болестта.

5.3 Генетични и епигенетични фактори

Доста любопитен факт е, че от всички спондилоартропатии АС е заболяването, при което има най-силна асоциация с генетичен маркер, известен като *HLA-B27* (Bowness 2015). Този маркер представлява ген, принадлежащ към *MHC/HLA* клас I системата и кодира повърхностен гликопротеин, експресиран върху повечето човешки ядрени клетки и тромбоцити. Като типичен представител на клас I на главния комплекс за тъканна съвместимост, естествената функция на тази молекула е да представя ендогенни антигени (собствени протеини или протеини на вътреклетъчни патогени) на цитотоксичните Т лимфоцити. Според направената литературна справка 6-7% от човешката популация е позитивна за *HLA-B27*, като отново трябва да се обърне внимание на етническата принадлежност на индивидите. Едва 1-2% от носителите на генетичния маркер обаче проявяват характерната за АС симптоматика, освен при

наличие на първа линия роднина с *HLA-B27*⁺ *AC*, където този процент нараства до 15-20% (Zhu et al. 2019). Това веднага води до извода, че експресията на *HLA-B27* не е категорична присъда за пациентите и не бива да се асоциира задължително с патологични последствия. Това е така, тъй като *HLA-B27* е важен ген за патогенезата на заболяването, но не е самодостатъчен. Множество други гени и фактори имат също роля за разгръщането на механизмите, водещи до двата основни имунологични процеса, наблюдавани при *AC*, а именно – костна деструкция в резултат на възпаление и костна пролиферация и нарушение на целостта на синовията, водеща до формирането на мостове между телата на прешлените, известни като синдесмофити.

Важно е да се отбележи, че 90-94% от пациентите с *AC* са *HLA-B27* позитивни, което означава, че 6-7% от пациентите с поставена диагноза *AC* не са носители на този генетичен маркер. Силна асоциация с болестта на Бехтерев, имат гените *endoplasmic reticulum aminopeptidases (ERAPs)* - *ERAP1* и *ERAP2* (Kenna et al. 2015). Това са гени, кодиращи ензими - аминопептидази, отговорни за скъсяването на пептидите, за да могат те да се свържат към пептид-свързващото място на молекула от клас I на главния комплекс за тъканна съвместимост и да бъдат представени на Т клетките. Други гени, които имат значение за патогенезата на *AC* са гените, кодиращи рецептора за *IL-23*, простагландин Е рецептор 4 (*PTGER4*), който стимулира *DC* да освободят *IL-23* и впоследствие да повлияят експанзията на *Th17* клетки (Brown 2011). Коментира се и ролята на *STAT3* гена, ключов регулаторен фактор на *Th17* имунните отговори, както и *IL12B* генът, който кодира *IL12p40*-белтъчен компонент на *IL-12* и *IL-23* цитокините (Taurog et al. 2022). Участие имат и варианти на гена, кодиращ транскрипционния регулатор - *BACH2*, свързан с лимфоцитната диференциация и функция при *AC* (International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS) et al. 2013). Една от основните функции на този транскрипционен фактор е свързана с потискането на *Blimp-1* и последващата диференциация на В лимфоцитите в плазматични клетки (Muto et al. 2010).

Също така, пациентите с *AC* не са единствените, които експресират *HLA-B27* на мембраните на своите ядрени клетки. Експресията на *HLA-B27* е характерна и за пациенти с псориазисен артрит, реактивен артрит и възпалителни заболявания на червата (Parameswaran and Lucke 2023). Това, което свързва тази молекула с изброените патологични състояния е високата степен на полиморфизъм. При *AC* най-често се срещат единични нуклеотидни замени в екзони 2 и 3, които кодират *α1* и *α2* домените на тежката верига при *MHC* клас I. Това е така, защото именно тези два домена са

отговорни за сформирването на пептид-свързващото място на молекулата и за нейната цялостна специфичност в това отношение (Mehra and Kanga 2001). На основата на полиморфизмите се наблюдават различни *HLA-B27* субтипове (*HLA-B*27:01-HLA-B27:106*) (Khan 2013). Тези субтипове се кодират от над 100 алелни варианта и се различават един от друг с по 1 до 7 аминокиселинни остатъка в зрелия протеин и определят предразположеност към заболяването или липса на такава. Най-силна асоциация с *АС* имат субтипове *B*27:02* (Средиземноморска популация), *B*27:04* (Китай и Индия) и *B*27:05* (кавказци и азиатци) (Sheehan 2010). Като изключително рядко срещан се определя субтипът *B*27:01*, а субтипове *B*27:06* и *B*27:09* имат по-скоро протективна функция (Khan 2013).

Самата концепция за участието на *HLA-B27* в патогенезата на *АС* е описана още през 1973г., като оттогава до сега са изминали 50г., но все още не се знае точния механизъм, по който този антиген участва в патогенезата на болестта (Brewerton et al. 1973). На този етап от развитието на науката съществуват няколко теории, като теорията за свръхекспресия на *HLA-B27*, променен чревен микробиом и нарушено вътреклетъчно елимиране на патогенни микроорганизми във фагоцитиращите клетки. Три обаче са основните и най-добре подкрепени с научни данни хипотези, а именно артритогенната хипотеза, теорията за неправилното нагъване на *HLA-B27* молекулите и хипотезата за формирането на т.нар. *B27* хомодимери.

Според артритогенната пептидна хипотеза, заболяването е резултат от способността на *HLA-B27* да свързва и представя уникален набор от “артритогенни пептиди” (собствени или чужди) на $CD8^+$ Т лимфоцити, което води до тяхната активация и генериране на цитотоксичен имунен отговор, възпаление в сакроилиачните стави и гръбначния стълб (Hermann et al. 1993). Тази хипотеза се основава на добре известния процес “молекулярна мимикрия”, според който антигенни компоненти на микроорганизми, като *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella*, *Salmonella*, *Chl. Trachomatis*, *Yersinia* и други, частично или напълно наподобяват пептиди, представени от *HLA-B27* молекули или самите *HLA-B27* молекули (Tam et al. 2010). Повтарящи се инфекции с подобни патогени водят до заблуда на имунната система, последващо активиране на Т клетки, които реагират кръстосано и със собствените антигени (“кръстосана реактивност”), представени от *HLA-B27* или директно с *HLA-B27* на мембраната на клетки в стави, сухожилия и тъкани. В подкрепа на тази информация са данни, които показват наличието на последователност от 6 аминокиселини в структурата на *HLA-B27*, която е подобна на последователност в ензима нитрогеназа на коменсалния

микроорганизъм *Klebsiella* (Schwimmbeck and Oldstone 1988). Също така, има данни в подкрепа на това, че антибактериални антитела се свързват към *HLA* молекули на имунни клетки, хондроцити и фибробласти (Ryu et al. 2012). Задвижва се каскада от възпалителни реакции с производство на цитокини, компоненти от системата на комплемента, протеинази, които впоследствие водят до формирането на имунни комплекси и до артрит, екстраартикуларни и дори системни прояви на *АС*.

В сравнение с други *MHC* молекули тежката верига на *B27* има тенденция да се нагъва по-бавно и дори да се нагъва неправилно в ендоплазмения ретикулум (*ЕПП*). В резултат на това тази молекула се задържа за по-дълго време, което впоследствие води до стрес в *ЕПП* и до задвижване на реакция на неправилно нагънатия протеин (*The unfolded protein response – UPR*) (Smith 2016). Неправилно нагънатите *HLA-B27* молекули се премахват чрез *ЕПП-асоциирано разграждане (ER-associated degradation - ERAD)*. Тази реакция е част от клетъчната хомеостаза, чиято цел е да върне клетката в нейното нормално състояние посредством механизми на разграждане, както и автофагия. За съжаление, цената, която клетките трябва да заплатят е, че тези механизми водят до освобождаването на възпалителни молекули, като *TNF- α* , *IL-1*, *IL-6*, *IFN- β* , както и до активация на възлов сигнален път *IL-17/IL-23* (Colbert et al. 2009). Гените, асоциирани с тази възпалителна ос бяха коментирани преди и тя е в основата на мощния имуен отговор, костната деструкция и последваща аберантна костна пролиферация – процеси, описващи накратко патогенетичните прояви на болестта.

Третата хипотеза се основава на способността на *HLA-B27* да образува хомодимери от две тежки вериги, без участието на *β 2-микроглобулина (β 2m)*, които се откриват както вътреклетъчно, така и на повърхността на *CTL*, *NK* клетки, *V* клетки и други *АПК* (Giles et al. 2012). Хомодимерите могат да бъдат разпознавани и свързвани от рецептори представители на *KIRs (killer cell immunoglobulin-like receptors)* и *LIRs (leukocyte immunoglobulin-like receptors)*, които се експресират от *NK* и *T* клетки. Това отново е причина за стимулиране на *IL-17/IL-23* сигналния път и за началото на описаните вече възпалителни процеси. Интересното е, че само *B27* хомодимерите могат да се свързват от специфичния рецептор *KIR3DL2 (CD158K)* на мембраната на *CD4⁺ (Th17)* и *CD8⁺ (Tc17)* *T* клетки и *NK* клетки (Chan et al. 2005). Това взаимодействие между рецептора и хомодимера се асоциира с повишена преживяемост на *Th17* клетки и повишена секреция на *IL-17* и *IL-22* в кръвта и ставните капсули на засегнатите пациенти (Bowness et al. 2011). Обсъжда се и патогенетичната роля на *β 2m*, който след като дисоциира от α веригата на *HLA-B27* може да се отложи в синовиалните тъкани, да

се свърже към колаген и да се формират амилоидни депозити (Uchanska-Ziegler and Ziegler 2003). Не се изключва взаимодействието на $\beta 2m$ със синовиални фибробласти и последващата синтеза и секрецията на протеини, участващи в тъканната и костна деструкция, както и цялостната имунопатогенеза на болестта на Бехтерев.

5.4 Роля на В клетките при АС

Т лимфоцитите, заедно с клетки на вродения имунен отговор, носят основната отговорност за продукцията на описаните *IL-17*, *IL-23*, *TNF- α* и други провъзпалителни цитокини, както и за задвижването на възловите процеси на костна ерозия и ново костно формиране (Rezaeiemanesh et al. 2018). Това допълва идеята за мястото на АС на границата между автоимунитета, където основно роля имат автореактивни лимфоцити и автовъзпалението, за което допринасят клетки на вродената имунна система, като МАФ, неутрофили, DC, мастоцити и лимфоидни клетки на вродения имунитет (*ILC*). Къде обаче стои мястото на В клетките в имунопатогенезата на АС, е въпрос на който по-скоро е трудно да бъде даден напълно акуратен отговор, поне на този етап от развитието на медицината и науката. Това е така, тъй като от доста години съществува догма, че В лимфоцитите имат минорна роля в имунопатогенезата на АС, поради липсата на специфични за болестта автоантитела, както и отсъствие на ревматоиден фактор, което определя заболяването като серонегативен спондилоартрит (Wilbrink et al. 2021b). Въпреки тази догма и ограничените проучвания върху В клетки на пациенти с АС, последните няколко години бележат успех в допълване на празнините в знанието с информация, която е индикация за евентуалното им участие в патогенезата на този спондилоартрит.

Коментират се все по-задълбочено различните аспекти от В-клетъчното участие в патогенезата на аксиалния спондилоартрит и те включват не само продукцията на антитела, но и нарушен баланс на В-клетъчни субтипове, В-клетъчна инфилтрация в различни тъкани, освобождаването на патологични цитокини, както и дефект в гени, повлияващи функционалната активност на клетките в основата на хуморалния имунитет (Wilbrink et al. 2021b). Например, установени са редица антитела срещу микробни антигени, вътреклетъчни ядрени и цитоплазмни протеини, други белтъчни молекули, които участват в костния метаболизъм (склеростин, колаген) и такива, които са претърпели пост-транслационни модификации (цитрулинирани циклични пептиди) с повишена степен на имуногенност (Rosenberg et al. 1979; Lochter et al. 1999; Kim et al. 2013; Ulusoy et al. 2018). Посочените антитела обаче не се

наблюдават при всички пациенти с *АС*, а при определени субгрупи, и също така нямат висока чувствителност и специфичност. Едно от антителата предизвикало особен интерес сред изследователите е антитялото срещу инвариантната верига на *МНС II* молекулите (*анти-CD74/CLIP*), макар че точната причина за формирането на това антитяло при пациентите с *АС* все още не е известна (Baerlecken et al. 2014). Например, част от пациентите с *АС* показват дефект в ензима *SPPL2A* (*enzyme signal peptide peptidase-like 2A*), намиращ се в моноцитите, което води до натрупване на *CD74* и на продукти резултат от неговото разграждане (van Kempen et al. 2020). Обикновено, след стимулация с *IFN-γ* тези антигени се излагат на повърхността на клетките и биват разпознавани от *анти-CD74* антителата. По литературни данни нивата на тези антитела в серума на пациенти с *АС* са завишени (Abdelaziz et al. 2021). Също повишени серумни нива се установяват и на антитела срещу леката верига на *МНС I* молекулите – $\beta 2m$ (Curry et al. 1982), за който както беше вече споменато и има участие в задвижването на автоимунния отговор при *АС*.

По отношение на В лимфоцитните субпопулации, установени в периферна кръв при *АС* пациенти, няма значителна разлика между честотата на преходните В клетки ($CD24^{hi}CD38^{hi}$), наивните ($CD27^{+}IgD^{+}$) и В клетките на паметта ($CD27^{+}IgD^{-}$) спрямо същите популации, установени при здрави индивиди (Wilbrink et al. 2021b). Наличните до момента знания за В клетките с регулаторна функция са оскъдни, което от една страна се дължи на факта, че това е една малка популация от *IL-10* секретирани клетки, които споделят общ фенотип с преходните В лимфоцити ($CD24^{hi}CD38^{hi}$). Повечето изследователи са на мнение, че честотата на тези клетки при пациенти с аксиален спондилоартрит не се различава от тази на здравите контроли, но клетките са с нарушена способност да продуцират *IL-10* при болните индивиди (Chen et al. 2016).

През последните години изследователите съсредоточават своето внимание не толкова върху способността на плазматичните клетки да продуцират антитела, а по-скоро върху активацията и антиген-представящата функция на В клетките при *АС*. Има съобщения, относно понижен брой $CD27^{+}$ В клетки на паметта в периферна кръв, както и повишени нива на наивни $CD27^{-}$ В лимфоцити и такива с повишена експресия на *CD95* рецептора, отговорен за клетъчната смърт на автореактивните клетки, и *CD86* ко-стимулаторната молекула при пациентите с *АС* (Niu et al. 2013). Тези данни сочат към свръхактивационно състояние на В лимфоцити при активна фаза на заболяването. При този тип пациенти, въпреки минорната роля на хуморалния имунен отговор за разгръщане на болестта, се установяват повишен брой на плазмабласти

($CD27^{hi}/CD38^{hi}$), както и на $CD4^+$ T клетки с важна роля за активацията на В лимфоцитите (Long et al. 2018; Wilbrink et al. 2021a). Тези данни взети заедно свидетелстват за повишения брой на активирани В клетки и плазмабласти, способни въпреки всичко да секретират автоантитела. Доста интересни нови публикации са в подкрепа на повишения брой на В клетъчна субпопулация, характерна за хроничния възпалителен процес и автоимунитет. Тези В лимфоцити експресират ко-стимулаторната молекула $CD21$ ($CD21^{low}$ В клетки) важна за активацията на В клетките, заедно с експресията на *T-bet* транскрипционния фактор и *CD11c* молекулата (Wilbrink et al. 2021a). Този набор на В лимфоцити е с повишени нива при пациенти със *SLE*, *RA* и *AC*. При *SLE* повечето изследователи са на мнение, че именно тези клетки са прекурсорите на антияло-продуциращи В клетки, което при *AC* донякъде може да обясни повишения брой на плазмабласти, установени в циркулацията.

Участието на В клетките при повечето автоимунни заболявания се допълва и от способността им да повлияват цялостната комуникация между клетките посредством секрецията на цитокини. Има данни, че В клетките могат да бъдат източник на *IL-17*, който повлиява различни клетки и дори по автокринен път стимулира пролиферацията, диференциацията на клетките, които го продуцират (Schlegel et al. 2013). Тези събития обаче са наблюдавани при болни с *RA*, но за патогенезата на *AC* все още не е известно дали същият механизъм има значение. Друг цитокин, който има роля за В клетъчната съдба е *IL-21*. Тази разтворима молекула се продуцира от *Th17* и *Tfh* клетки и също стимулира В-клетъчната пролиферация. При пациенти с *AC* нивата на *IL-21* са повишени спрямо тези на здравите контроли, което отново е показателно, че В клетките са обект на значителна стимулация при този вид пациенти (Andersen et al. 2012).

Не на последно място, при болните с *AC* се установяват В-клетъчни инфилтрати в местата на възпаление, като сакроилиачните стави и гръбначния стълб (Peng et al. 2017). В тези инфилтрати се откриват и други клетъчни типове, като Т клетки, и често се говори за формирането на ектопични лимфоидни структури и при това имуномедирано заболяване. Наличието на В клетки в тези ектопични структури на местата на възпаление (Feng et al. 2015) при *AC*, предполага тяхната може би не толкова незначителна роля в патогенезата на болестта, но множество допълнителни доказателства са необходими, за да се подкрепят тези предположения.

5.5 Клинична картина

Болестта на Бехтерев се характеризира с продължителна болка в долната част на гърба и сутрешна скованост, които се повлияват благоприятно от физическа активност. Наличната анкилоза се допълва от остеопороза, често водеща до вертебрални фрактури. Периферните прояви на заболяването включват артрит, дактилит, ентезит, възпаление на стомашно чревния тракт и често се свързват с преден увеит, обикновено едностранен. Поставянето на диагнозата се основава на модифицираните *Ню Йоркски критерии* от 1984г. (*Приложение №3*) (van der Linden et al. 1984) и обновените класификационни критериите на *Международното дружество за оценка на спондилоартритит (ASAS)* от 2010г. (*Приложение №4*) (Braun et al. 2011; Rudwaleit et al. 2011). Профилактиката и лечението на заболяването включва приложението на нестероидни противовъзпалителни средства (*НСПВС*) и кортикостероиди или болест-модифициращи антиревматични лекарства (*БМАРЛ*) при неповлияващите се от *НСПВС*. През последните години успешно се използват блокери на възловите цитокини, отговорни за хроничното възпаление при тези пациенти. Такива медикаменти са например блокерите на *TNF- α* или неговите рецептори (*etanercept, adalimumab, infliximab, golimumab, certolizumab*) (Ebrahimiadib et al. 2021). Друг биологичен медикамент *Secukinumab* е моноклонално антитяло срещу *IL-17A* и се прилага при пациенти, които са показали незадоволителни резултати след приложението на конвенционална терапия или биологична терапия с посочените инхибитори на *TNF- α* (Blair 2019). Данни от обширен мета-анализ акцентират върху обещаващите ефекти на друга група медикаменти - т.нар *JAK* инхибитори, насочени срещу блокиране на различни изоформи на *Janus* кинази, отговорни за предаването на сигнала от рецепторите на различни цитокини и растежни фактори към ядрото на клетката, като по този начин се модулират имунните и възпалителните отговори (Li et al. 2022b). Предстоящите новости в медикаментозното лечение, разбира се, ще бъдат обвързани и с новите проучвания в областта на клетките, участващи в патогенезата на заболяването, което налага вниманието на учените да бъде насочено в тази сфера. Фактът, че болни с *АС* се повлияват благоприятно от терапията с анти-*CD20* моноклоналното антитяло *Rituximab* е допълнителна индикация за значението на *B* лимфоцитите в патологичния процес при *АС* (Song et al. 2010). Това отваря врати към нови медицински и научни проучвания върху *B* клетките като подходящи мишени за лечение при индивиди с поставена диагноза аксиален спондилоартрит.

5.6 *Терапевтичен потенциал на МСК при АС*

Като се имат предвид посочените имunosупресивни и регенеративни свойства на *МСК* в началото на този раздел на дисертационния труд, те биха могли да повлияват активността и цялостното функционално състояние на клетките, участващи в имунопатогенезата на заболяването. *МСК* могат да мигрират към местата на възпаление и да подпомагат антивъзпалителните и възстановителни процеси локално (Rustad and Gurtner 2012). Има четири клинични проучвания проведени в Китай според *clinicaltrials.gov*, които доказват безопасността и ефективността на интравенозното приложение на *МСК* по отношение на благоприятното повлияване на симптоматиката и понижената болестна активност на пациенти с *АС*. Докладваните положителни резултати са от клинични проучвания, провеждани с *МСК*, изолирани от различни източници, като пъпна връв, плацента и костен мозък. Като недостатък на проведените изследвания е малкият брой участници, което е пречка пред одобрението на този терапевтичен подход за лечение, както и разбира се необходимостта от по-голям брой клинични изследвания и натрупани данни. Също така, внимание трябва да се обърне и на типа терапия с *МСК* – дали тя ще включва директното приложение на автоложни или алогенни клетки или по-скоро техни продукти. Допълнително предизвикателство е и един от недостатъците на тези стволови клетки, а именно тяхната роля в патогенезата на заболяването, както и липсата на данни за влиянието им върху *В* клетки при пациенти със спондилоартропатии. *МСК* допринасят за излишното костно формиране, което отчасти обяснява липсата на ефект на анти-*TNF* блокерите за инхибиране на процесите на осификация при *CnA* (Briolay et al. 2013). Нарушеният баланс между *BMP-2* и протеина *Noggin* е една от причините за увеличената диференциация на *МСК* в остеоласти и хроничното образуване на нова кост в областта на ентезите при този тип пациенти (Xie et al. 2016). Потискането на *МСК* локално или инхибиране активацията на *Wnt/β-катенин* сигналния път, който е свързан с узряването на хондроцитите и костното образуване, са едни от терапевтичните таргети за бъдещи изследвания в областта. Любопитно проучване от 2017г. акцентира върху способността на *IL-22* да стимулира миграцията, пролиферацията и патологичната остеогенеза на *МСК* при *АС* след индукцията на възпаление (El-Zayadi et al. 2017). Следователно в зависимост от условията, при които се намират *МСК*, могат да допринесат за свръх-регенеративни събития в ентезите и до тяхната осификация. Това е може би една от причините за липсата на достатъчно проучвания в областта и налага провеждането на изследвания по-скоро с алогенни *МСК* или включващи техния секретом, както и отделни негови

компоненти, вместо директното интравенозно или локално въвеждане на самите стволови клетки.

6. Заключение

Комплексната патогенеза на описаните имуномедиирани заболявания - *СЛЕ* и *АС*, заедно с липсата на дълготрайно ефективни и безопасни терапевтични подходи, без странични ефекти, налага провеждането на допълнителни изследвания в областта. В същото време, ограничените данни по отношение на *МСК* и тяхното влияние върху едни от основните клетки – В лимфоцити, участващи посредством различни механизми в патогенезата на двете състояния, е основна причина за насочване на вниманието на изследователите в тази насока. Това е все още един дълъг неутъпкан път, който предстои да бъде извървян и осветляването му да постави нов крайгълен камък в комплексната терапия на системните автоимунни заболявания.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е да се изследва влиянието на секретом от *ПВ-МСК* под формата на кондиционирана среда върху преживяването, активацията и антиген-представящата функция на В лимфоцити на три групи изследвани лица:

- Болни с поставена диагноза системен лупус еритематозус
- Болни с поставена диагноза анкилозиращ спондилит
- Здрави индивиди

Задачи:

1. Да се **изолират** и **култивират** човешки *ПВ-МСК*.
2. Да се **докажат** изолираните стволови клетки съгласно критериите на *ISCT (2006)*: **адхерентност**, **имунофенотип** и *in vitro* потенциал за остеогенна и адипогенна диференциация.
3. Да се получи и съхрани **кондиционирана среда (секретом)** от изолираните *ПВ-МСК* в количество достатъчно за осъществяване на експерименталните задачи на дисертационния труд.
4. Да се **изолират** и **култивират** *in vitro* **РВМС** от трите групи изследвани лица при стандартни условия на клетъчно култивиране в контролна среда и в кондиционирана среда на *ПВ-МСК*.
5. Да се изследва влиянието на секретом от *ПВ-МСК* върху **повърхностната експресия** на молекули, свързани с **активацията** на В лимфоцити.
6. Да се изследва влиянието на секретом от *ПВ-МСК* върху **повърхностната експресия** на молекули, свързани с **оцеляването** на В лимфоцити.
7. Да се изследва влиянието на секретом от *ПВ-МСК* върху **повърхностната експресия** на молекули, свързани с **антиген-представящата функция** на В лимфоцити.
8. Да се изследва влиянието на секретом от *ПВ-МСК* върху **програмираната клетъчна смърт** на В лимфоцити.
9. Да се изследва **цитокиновата секреция** от *РВМС* под влияние на секретом от *ПВ-МСК*.
10. Да се направи **анализ** и **статистическа обработка** на получените резултати.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали:

1.1 Изследвани лица

За целите на настоящия дисертационен труд след предварително направен подбор бяха включени **общо 44 изследвани лица** (28 жени - **64%** и 16 мъже - **36%**), разпределени в три групи:

- *Здрави доброволци (n=10; 5 жени - 50% и 5 мъже - 50%);*
- *Пациенти с поставена диагноза системен лупус еритематозус (n=17; 15 жени - 88% и 2 мъже - 12%);*
- *Пациенти с поставена диагноза анкилозиращ спондилит (n=17; 8 жени - 47% и 9 мъже - 53%);*

Направеният проспективен подбор, критериите за включване на всеки един участник в проучването, както и оценката на болестното състояние на пациентите са подробно описани и представени в следващите раздели. Важно е да се уточни, че поради непредвидено създалата се ситуация - пандемията от *COVID-19*, подборът на включените в настоящият дисертационен труд изследвани лица беше значително затруднен, което е причина за удължения период на включване на подходящите участници.

Всички участници бяха предварително информирани и запознати с целите на настоящото изследване, очакваните резултати, рискове и ползи за тях, като доброволно заявиха желание за участие и подписаха информирано съгласие според *Декларацията от Хелзинки*, приета през 1964г. Дизайнът на проучването беше одобрен от Комисията по етика на научните изследвания към *Медицински университет – София (КЕНИМУС)*. Личните данни и резултатите от изследването са съхранявани, обработвани и представяни в съответствие със Закона за защита на личните данни, в сила от 01.01.2002 г., изм. ДВ. бр.57 от 13, 2021 - 67 - юли 2007 г. и с Регламент (ЕС) 2016/679 на Европейския парламент и на Съвета, от 27 април 2016 година, относно защитата на физическите лица във връзка с обработването на лични данни и относно свободното движение на такива данни, като е спазен действащият понастоящем Кодекс на професионалната етика – Раздел IV; Лекарска тайна; чл. 51 и чл. 55.

1.1.1 Здрави доброволци

Подборът на здравите лица, доброволно заявили своето желание за съдействие и участие в научното изследване, беше извършен в *Лаборатория по клинична имунология към УМБАЛ „Св. Иван Рилски”, гр. София* за периода от юни 2020г. до септември 2021г. Селектирането на подходящите доброволци, от които на следващ етап да бъдат добити *РВМС*, част от които са и таргетните за настоящото изследване *В* лимфоцити, беше базирано на предварително зададени включващи и изключващи критерии.

❖ Критерии за включване:

- Здрави лица, способни да разберат и съгласни да дадат информирано съгласие за участие в научното изследване;
- Възраст между 18-64 години;

❖ Критерии за изключване:

- Болни лица и лица, които показват познавателни или психични увреждания не бяха включени в проучването;
- Лица на възраст под 18 години и над 64 години;

Във връзка с гореизложеното и съобразно зададените критерии за настоящия дисертационен труд, бяха определени като подходящи и последователно включени в експерименталната постановка, общо 10 здрави лица ($n=10$): 5 жени и 5 мъже (*табл. 2*) на средна възраст 33.5 ± 9.10 (*mean* \pm *SD*) години (Най-младият доброволец взел участие в научното изследване беше на възраст 23г., а най-възрастният доброволец на 49г.).

| <i>Здрава контрола №</i> | <i>Възраст</i> | <i>Пол</i> | <i>Количество взета периферна венозна кръв</i> | <i>Общ брой изолирани РВМС</i> | <i>Посяти РВМС/ямка</i> |
|--------------------------|----------------|-------------|--|--------------------------------|-------------------------|
| <i>K1</i> | 33г. | <i>мъж</i> | <i>12 ml</i> | 1.31×10^7 | 1×10^6 |
| <i>K2</i> | 40г. | <i>мъж</i> | <i>12 ml</i> | 1.60×10^7 | 1×10^6 |
| <i>K3</i> | 27г. | <i>жена</i> | <i>9 ml</i> | 1.27×10^7 | 1×10^6 |
| <i>K4</i> | 27г. | <i>жена</i> | <i>9 ml</i> | 1.35×10^7 | 1×10^6 |
| <i>K5</i> | 31г. | <i>мъж</i> | <i>9 ml</i> | 1.84×10^7 | 1×10^6 |
| <i>K6</i> | 23г. | <i>жена</i> | <i>9 ml</i> | 1.56×10^7 | 1×10^6 |
| <i>K7</i> | 49г. | <i>жена</i> | <i>9 ml</i> | 1.20×10^7 | 1×10^6 |
| <i>K8</i> | 48г. | <i>жена</i> | <i>9 ml</i> | 1.13×10^7 | 1×10^6 |
| <i>K9</i> | 29г. | <i>мъж</i> | <i>9 ml</i> | 1.21×10^7 | 1×10^6 |
| <i>K10</i> | 28г. | <i>мъж</i> | <i>12 ml</i> | 1.73×10^7 | 1×10^6 |

Таблица 2. Обобщени данни на здравите доброволци, участващи в настоящия дисертационен труд

1.1.2 Пациенти със системен лупус еритематозус

За периода от *октомври 2020г. до януари 2022г.* в *Клиниката по ревматология на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – гр. София* бяха извършени подборът и клиничната оценка на пациентите с поставена диагноза *СЛЕ*. Всички болни отговаряха на

общоприетите класификационни критерии на *ACR*, 1982г., модифицирани през 1997г. Оценката на болестната активност беше определена в деня на взимането на биологичния материал след щателен преглед от ревматолог и попълването на индивидуален въпросник (*Приложение №5*) от всеки един от пациентите, взели участие в научното изследване. Клиничните данни бяха обобщени и любезно предоставени от проф. Мариана Иванова, дм. Бяха изследвани общо 17 пациента (15 жени и 2 мъже на средна възраст 42.71 ± 8.28 години) с диагноза *СЛЕ*, на които предварително бяха събрани и обобщени пълните анамнестични, клинични характеристики и наличните лабораторни и имунологични параметри. В научното изследване бяха внимателно подбрани и включени пациенти с активно заболяване (клинична и/или имунологична активност). Селектирането на подходящите пациенти, от които на следващ етап да бъдат добити периферни мононуклеарни клетки, беше базирано на зададени включващи и изключващи критерии:

❖ **Критерии за включване на пациентите с поставена диагноза *СЛЕ*:**

- Мъже и жени на възраст над 18 години с поставена диагноза *СЛЕ* или новодиагностицирани със *СЛЕ*, съгласно класификационните критерии на *ACR*;
- Лица, желаещи и способни да подпишат информирано съгласие за участие в научното изследване, включително за вземане на биологичен материал;
- Пациенти с наличие на умерена или висока болестна активност, дефинирана като *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI-2K) ≥ 6* и/или
- Наличие на имунологична активност: завишени *анти-двДНК* (>25 U/ml), *АНА* титър ($\geq 1:160$), понижени компоненти на комплемента *C3* и *C4*;

❖ **Критерии за изключване:**

- Лица под 18г. възраст;
- Предшестваща терапия с биологичното лекарство (*Benlysta*), насочено срещу В-клетъчния активационен фактор - *BAFF*;
- Лица с активна или хронична вирусна/бактериална инфекция (включително хепатит В- или С-вирусна инфекция, *HIV* инфекция, активна или латентна туберкулозна инфекция, или друго активно инфекциозно заболяване) в момента на взимане на биологичния материал;
- Съпътстващо малигнено заболяване;

- Други соматични или психични заболявания или лабораторни отклонения, които биха могли да повлияят на интерпретацията на резултатите от проучването и по мнение на екипа правят пациента неподходящ;

1.1.2.1 Демографски и клинични характеристики на изследваните пациенти със СЛЕ

Съобразно зададените критерии, 17 болни с различни клинични прояви на СЛЕ (кожно-лигавични-КЛП, мускулно-скелетни-МСП, хематологични отклонения-ХО, бъбречни увреждания-БУ и невро-психиатрични прояви-НПП) бяха определени като подходящи и последователно включени в експерименталната постановка. Събраните данни за демографските и клиничните характеристики на заболяването при всеки пациент към момента на включване в проучването, включително давност и активност на заболяването, както и за провежданата терапия са представени на *табл. 3*.

| <i>Демографски и клинични характеристики на изследваните пациенти със СЛЕ</i> | | | | | | |
|---|----------------|------------|---|------------------------|------------------|----------------|
| <i>Пациент №</i> | <i>Възраст</i> | <i>Пол</i> | <i>Давност на заболяването (години)</i> | <i>Клинични прояви</i> | <i>SLEDAI-2K</i> | <i>Терапия</i> |
| S1 | 43г. | жена | 7г. | КЛП; МСП | 17 | <i>НСQ</i> |
| S2 | 39г. | мъж | 1г. | МСП; БУ | 20 | ИС |
| S3 | 39г. | жена | 2г. | КЛП; МСП | 10 | ИС |
| S4 | 48г. | жена | 5г. | МСП | 8 | ИС |
| S5 | 37г. | жена | 17г. | МСП | 8 | <i>НСQ</i> |
| S6 | 44г. | жена | 1г. | КЛП; БУ | 8 | ИС |
| S7 | 66г. | жена | 7г. | МСП | 6 | <i>НСQ</i> |
| S8 | 31г. | жена | 5г. | МСП; ХО; КЛП | 18 | <i>НСQ</i> |
| S9 | 39г. | жена | 2г. | МСП; ХО; КЛП; НПП | 28 | ИС |
| S10 | 39г. | жена | 1г. | КЛП; МСП | 8 | <i>НСQ</i> |
| S11 | 44г. | жена | 32г. | КЛП; МСП | 8 | ИС |
| S12 | 29г. | мъж | 8г. | КЛП | 2 | <i>НСQ</i> |
| S13 | 39г. | жена | 12г. | КЛП; МСП; НПП | 16 | <i>НСQ</i> |
| S14 | 45г. | жена | 10г. | КЛП; МСП | 14 | ИС |
| S15 | 46г. | жена | 3г. | МСП | 2 | <i>НСQ</i> |
| S16 | 48г. | жена | 2г. | МСП | 6 | <i>НСQ</i> |
| S17 | 50г. | жена | 1г. | МСП | 6 | <i>НСQ</i> |

Таблица 3. Демографски и клинични характеристики на пациентите със СЛЕ

Използвани съкращения: КЛП-кожно-лигавични прояви, МСП-мускулно-скелетни прояви, ХО-хематологични отклонения, БУ-бъбречно увреждане; НПП-невро-психиатрични прояви; НСQ – хидроксихлороквин; ИС- имуносупресивни лекарства;

- *Оценка на болестната активност на пациентите със СЛЕ:*

Оценката на болестната активност беше определена посредством индекс за болестната активност при пациенти с лупус SLEDAI-2K (Gladman et al. 2002), създаден като модификация на оригиналния SLEDAI (Bombardier et al. 1992), за да се включи

персистиращо активно заболяване в описанията, които преди това са вземали под внимание само нови или повтарящи се събития. По-конкретно, *SLEDAI-2K* позволява да бъде отбелязано персистиращо активно заболяване, алопеция, язви на лигавиците, обрив и протеинурия. Двата индекса са еквивалентни.

SLEDAI-2K се основава на наличието на 24 пункта в девет органи и системи през предходните 30/10 дни. Описанията на *SLEDAI-2K* се документират като налични или липсващи. Всеки от дескрипторите има определен брой точки, а общият резултат на *SLEDAI-2K* е сумата от точките на всичките 24 пункта. Общият резултат на *SLEDAI-2K* варира между 0 и 105, като по-високите резултати означават по-висока активност на заболяването. Болестна активност беше дефинирана при *SLEDAI-2K* ≥ 6 (Приложение № 5).

1.1.2.2 Имунологични и лабораторни характеристики на изследваните пациенти със СЛЕ

Преди включването на пациентите в проучването те бяха изследвани в Лаборатория по клинична имунология към УМБАЛ “Св. Иван Рилски” гр. София за определяне на имунологичната им активност посредством: обстоен анализ на автоантитела срещу *двДНК* и тяхната концентрация, беше определен титърът и имунофлуоресцентният образ на *АНА*, съобразно номенклатурата на *International consensus on ANA Patterns* (ICAP), посредством индиректна имунофлуоресценция (ИИФ) на *HEp-2* клетъчен субстрат, както и нивата на *C3* (референтни граници 0.81-1.57 g/L) и *C4* (референтни граници C4 0.13-0.39 g/L) компонентите от системата на комплемента, посредством турбидиметричен анализатор. Възпалителните биомаркери С-реактивен протеин – *CRP* (mg/L, норма < 6) и скорост на утаяване на еритроцитите-*SUE* (mm/h, норма < 18) бяха изследвани със съдействие на Клинична лаборатория, УМБАЛ „Св. Иван Рилски” – София. Нива на *CRP* > 6 mg/L и нива на *SUE* > 18 mm/h бяха приети за повишени. Обобщените данни за имунологичните и лабораторни характеристики на изследваните пациенти със СЛЕ са представени на табл. 4

Лабораторни и имунологични показатели на пациентите със СЛЕ

| Пациент № | АНА титър (ИИФ) | анти-двДНК U/ml | CRP mg/L | СУЕ mm/h | С3 g/L | С4 g/L | Количество взета периферна венозна кръв | Общ брой изолирани РВМС | Посяти РВМС/ямка |
|-----------|---------------------------|-----------------|----------|----------|--------|--------|---|-------------------------|-------------------|
| S1 | 1:320 (AC-4) | 18.50 | 1.00 | 4.00 | 0.90 | 0.22 | 9 ml | 3.17x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S2 | 1:3200 (AC-1; AC-21-like) | 52.00 | 1.30 | 10.00 | 0.80 | 0.14 | 9 ml | 1.07x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S3 | 1:1280 (AC-1) | 115.80 | 1.40 | 6.00 | 0.76 | 0.19 | 8.5 ml | 0.35x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S4 | 1:1280 (AC-1) | 46.40 | 8.30 | 15.00 | 1.24 | 0.18 | 12 ml | 1.73x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S5 | 1:640 (AC-4) | 41.50 | 3.60 | 6.00 | 1.05 | 0.11 | 9 ml | 2.16x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S6 | >1:1280 (AC-4; AC-5) | 32.20 | 2.30 | 5.00 | 0.90 | 0.28 | 9 ml | 1.90x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S7 | >1:1280 (AC-1) | 200.00 | 29.70 | 3.00 | 1.42 | 0.28 | 9 ml | 1.45x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S8 | 1:1280 (AC-1) | 32.00 | 80.10 | 90.00 | 0.80 | 0.26 | 12 ml | 0.52x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S9 | > 1:1280 (AC-1) | > 200.00 | 0.80 | 20.00 | 0.68 | 0.09 | 9 ml | 1.10x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S10 | 1:1280 (AC-1; AC-21-like) | 39.70 | 0.70 | 22.00 | 1.10 | 0.18 | 9 ml | 0.80x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S11 | 1:320 (AC-1; AC-4) | 11.00 | 1.80 | 2.00 | 1.32 | 0.26 | 9 ml | 0.68x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S12 | > 1:1280 (AC-4) | 7.60 | 7.60 | 16.00 | 1.72 | 0.31 | 7.5 ml | 1.17x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S13 | 1:160 | 16.80 | 0.50 | 2.00 | 1.33 | 0.26 | 9 ml | 1.20x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S14 | 1:1280 (AC-4; AC-5) | 14.80 | 2.90 | 14.00 | 2.90 | 0.25 | 9 ml | 1.20x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S15 | 1:1280 (AC-1) | 199.80 | 2.20 | 16.00 | 1.48 | 0.32 | 9 ml | 1.12x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S16 | >1:1280 (AC-1; AC-4) | 42.40 | 4.20 | 29.00 | 1.08 | 0.13 | 9ml | 0.91x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| S17 | 1:1280 (AC-1; AC-5) | 45.60 | 11.60 | 8.00 | 1.24 | 0.32 | 9ml | 0.69x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |

Таблица 4. Лабораторни и имунологични показатели на пациентите със СЛЕ

Използвани съкращения: СЛЕ- системен лупус еритематозус; АНА- анти-нуклеарни антитела; ИИФ – индиректна имунофлуоресценция; АС -anti-cell-имунофлуоресцентен образ спрямо номенклатурата на “International consensus on ANA Patterns”- ICAP; анти-двДНК – антитела срещу двуверижна ДНК; CRP – С реактивен протеин; СУЕ – скорост на утаяване на еритроцитите

1.1.3 Пациенти с анкилозиращ спондилит

За периода от юни 2021г. до април 2022г. в Клиниката по ревматология на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – гр. София бяха извършени подборът и клиничната оценка на пациентите с поставена диагноза анкилозиращ спондилит - АС, със съдействието на проф. Мариана Иванова, дм. Бяха събрани и обобщени пълните анамнестични, клинични и наличните лабораторни и имунологични параметри на пациентите. Селектирането на подходящите пациенти, от които на следващ етап да бъдат добити периферни мононуклеарни клетки, беше базирано на зададени включващи и изключващи критерии.

❖ **Критерии за включване на пациентите с АС:**

- Мъже и жени на възраст над 18 години с поставена диагноза АС, съгласно общоприетите модифицирани *Нюйоркски критерии от 1984г.*, както и новите класификационни критерии на ASAS за аксиален СпА (2009г);
- HLA-B27 носителство;

- Лица, желаещи и способни да подпишат информирано съгласие за участие в проучването, включително за вземане на биологичен материал;
- Пациенти с наличие на умерена или висока болестна активност, дефинирана като *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) ≥ 4 ; Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI) ≥ 4 ; Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score with CRP (ASDAS-CRP) > 1.3 ;*

❖ **Критерии за изключване на пациентите с АС:**

- Лица под 18г. възраст;
- Лица с активна или хронична вирусна/бактериална инфекция (включително хепатит В- или С-вирусна инфекция, *HIV* инфекция, активна или латентна туберкулозна инфекция, или друго активно инфекциозно заболяване) в момента на взимане на биологичния материал;
- Съпътстващо малигнено заболяване;
- Други соматични или психични заболявания, както и лабораторни отклонения, които биха могли да повлияят на интерпретацията на резултатите от проучването и по мнение на екипа правят пациента неподходящ;

1.1.3.1 Демографски и клинични характеристики на изследваните пациенти с АС

Събрани бяха данни за демографските и клиничните характеристики на заболяването при всеки пациент към момента на включване в проучването, включително давност и активност на заболяването, както и за провежданата терапия.

- *Средства за оценка на болестната активност на пациентите с анкилозиращ спондилит*

Преди включването в проучването на пациент с диагноза АС, всеки един участник попълни, в деня на взимането на биологичен материал, въпросник, който спомогна за определянето на моментната активност на заболяването.

✓ Въпросник за оценка на болестната активност - *BASDAI* (Garrett et al. 1994) (*Приложение №6*). Той включва 6 въпроса, свързани с характерните симптоми на болестта (болка в гърба, умора, болка в периферни стави и ентезите, скованост – тежест и продължителност) и се попълва от болните на 10 см визуални аналогови скали - *BAC* (от 0 = липсва активност до 10 = максимална активност). Общият скор на *BASDAI* се

изчислява, като сбора на стойностите от въпросите 1 - 4 и средната стойност от въпроси 5 и 6, се раздели на 5. Варира от 0 до 10, по-високата стойност показва по-голяма болестна активност. Стойности < 4 възприехме като неактивно заболяване и ≥ 4 - като сигурна болестна активност.

✓ “Оценка на пациента за болестната активност” (*BAC*), отграничена по аналогичен начин - “липсва болестна активност” - на 0 см и “много тежка активност” - на 10 см.

✓ Оценка на болестната активност чрез *ASDAS* (Lukas et al. 2009). Индексът беше калкулиран по формулата, съдържаща С-реактивен протеин (предпочитан вариант), с помощта на електронния калкулатор в следния линк: <https://asas-group1.jimdo.com/instruments/asdas-calculator/>. Стратифицирани бяха следните категории болестна активност съобразно *ASDAS-CPII*:

- **неактивно** заболяване *ASDAS* < 1.3 ;
- **умерена** болестна активност $1.3 < 2.1$;
- **висока** болестна активност $2.1 - 3.5$;
- **много висока** болестна активност > 3.5 (Machado et al. 2011)

○ *Оценка на физическата функция при болните с анкилозираш спондилит*

Оценката на физическата функция при болните с *АС* беше осъществена посредством индекса *BASFI* (Calin et al. 1994) (*Приложение № 6*). Той съдържа 8 въпроса за дейности, свързани с функционалната анатомия на болните и 2 допълнителни въпроса, оценяващи способността им да се справят с дейностите в ежедневието си. Отговорите на въпросите бяха нанесени от пациента върху 10 см *BAC*. Средното аритметично число от 10-те скали дава *BASFI* скората (0-10). По-високият резултат отразява по-тежки функционални ограничения (*табл. 5*).

Демографски и клинични характеристики на изследваните пациенти с АС

| Пациент № | Възраст | Пол | Давност на заболяването (години) | Сутрешна скованост (минути) | BASDAI | BASFI | ASDAS-CRP | Терапия |
|-----------|---------|------|----------------------------------|-----------------------------|--------|-------|-----------|---------|
| A1 | 23г. | мъж | 4 | 20 | 3.23 | 4.41 | 3.30 | НСПВС |
| A2 | 54г. | мъж | 13 | 45 | 4.70 | 4.84 | 2.60 | БА |
| A3 | 45г. | мъж | 5 | 60 | 5.87 | 6.43 | 4.30 | НСПВС |
| A4 | 42г. | мъж | 22 | 75 | 2.28 | 0.00 | 1.80 | НСПВС |
| A5 | 35г. | жена | 5 | 30 | 2.91 | 2.65 | 1.40 | БА |
| A6 | 44г. | жена | 8 | 90 | 7.64 | 7.22 | 3.60 | БА |
| A7 | 39г. | жена | 10 | 30 | 6.35 | 4.61 | 4.10 | БА |
| A8 | 39г. | жена | 1 | 15 | 5.79 | 3.22 | 2.50 | НСПВС |
| A9 | 44г. | жена | 14 | 10 | 2.41 | 1.26 | 2.80 | БА |
| A10 | 55г. | жена | 10 | 120 | 7.80 | 9.25 | 4.50 | БА |
| A11 | 24г. | жена | 6 | 15 | 1.34 | 2.27 | 2.50 | БА |
| A12 | 47г. | жена | 13 | 10 | 2.48 | 3.99 | 2.00 | ксБМАРЛ |
| A13 | 63г. | мъж | 22 | 60 | 2.24 | 8.65 | 3.00 | НСПВС |
| A14 | 35г. | мъж | 15 | 30 | 1.28 | 2.30 | 1.40 | БА |
| A15 | 29г. | мъж | 9 | 60 | 6.56 | 6.20 | 4.80 | БА |
| A16 | 41г. | мъж | 22 | 45 | 6.08 | 3.34 | 4.80 | БА |
| A17 | 47г. | мъж | 1 | 60 | 1.55 | 0.28 | 2.50 | НСПВС |

Таблица 5. Демографски и клинични характеристики на пациентите с АС

Използвани съкращения: НСПВС – нестероидни противовъзпалителни средства; ксБМАРЛ - конвенционални синтетични болестмодифициращи антиревматични лекарства; БА – биологичен агент.

1.1.3.2 Имунологични и лабораторни характеристики на изследваните пациенти с АС

Всички пациенти бяха изследвани за носителство на *HLA-B27* антигена, непосредствено преди да бъдат включени в проучването. Стойностите за възпалителните показатели *CRP* и *SUE*, и за тези пациенти, бяха взети от Клинична лаборатория на УМБАЛ Св. Иван Рилски-ЕАД гр.София (табл. 6).

Лабораторни и имунологични показатели на пациентите с АС

| Пациент № | CRP mg/L | SUE mm/h | HLA-B27 | Количество взета периферна венозна кръв | Общ брой изолирани РВМС | Посяти РВМС/ямка |
|-----------|----------|----------|-------------|---|-------------------------|-------------------|
| A1 | 11.00 | 5.00 | Положителен | 9 ml | 1.61x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A2 | 3.70 | 27.00 | Положителен | 9 ml | 1.11x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A3 | 88.40 | 90.00 | Положителен | 9 ml | 2.50x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A4 | 1.83 | 6.00 | Положителен | 9 ml | 1.33x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A5 | 0.10 | 6.00 | Положителен | 12 ml | 1.52x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A6 | 0.60 | 30.00 | Положителен | 12 ml | 2.17x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A7 | 16.90 | 40.00 | Положителен | 12 ml | 2.19x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A8 | 0.40 | 10.00 | Положителен | 12 ml | 1.43x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A9 | 19.00 | 32.00 | Положителен | 9 ml | 1.85x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A10 | 16.00 | 55.00 | Положителен | 9 ml | 3.05x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A11 | 45.30 | 33.00 | Положителен | 9 ml | 1.28x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A12 | 6.97 | 61.00 | Положителен | 9 ml | 1.42x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A13 | 34.60 | 7.00 | Положителен | 9 ml | 0.70x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A14 | 3.00 | 11.00 | Положителен | 9 ml | 1.23x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A15 | 55.20 | 70.00 | Положителен | 9 ml | 1.34x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A16 | 74.20 | 60.00 | Положителен | 9 ml | 1.96x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |
| A17 | 17.60 | 26.00 | Положителен | 9 ml | 1.66x10 ⁷ | 1x10 ⁶ |

Таблица 6. Лабораторни и имунологични показатели на пациентите с АС

Използвани съкращения: CRP – С реактивен протеин; SUE – скорост на утаяване на еритроцитите

1.2 Биологичен материал, необходим за целите на настоящия дисертационен труд

1.2.1 Мезенхимни стволови клетки:кондиционирана среда

Изследвахме влиянието на секретом от *МСК* върху *В* лимфоцити след добиването на т.нар. кондиционирани среди от *МСК*, съдържащи голям арсенал от разтворими фактори и молекули (т.нар. секретом на *МСК*). Добиването на въпросните кондиционирани среди от *МСК*, се осъществи след изолиране и последващо култивиране на *ПВ-МСК*.

○ Информация относно донорите на човешки *ПВ-МСК*

Изолирането и култивирането на мезенхимни стволови клетки от пъпни върви на здрави донори, се проведе от *януари 2020г. до май 2020г.* в Тъканна Банка “БулГен”, в съответствие с Приложение 1-А към Договор за вземане, изследване и съхраняване на мезенхимни стволови клетки от тъкан от пъпна връв. В настоящия дисертационен труд доброволно дарили своя биологичен материал са 7 жени ($n=7$) на средна възраст 30.71 ± 3.95 години след подписване на информирано съгласие, одобрено от Етичната комисия на САГБАЛ „Д-р Щерев“, гр. София. Процедурата по пробовземането беше напълно безопасна както за майката, така и за детето. Жените, дали съгласие за даряване на биологичния материал, бяха с нормално протичане на бременността и без данни за други негинекологични хронични заболявания.

Човешките тъкани от пъпни върви бяха незабавно взети при стерилни асептични условия, непосредствено след раждането на детето и прерязването на пъпната връв, преди или след отделянето на плацентата от маточната повърхност. Само две от пробите бяха взети след оперативно раждане (*Sectio caesarea*), останалите пет проби са получени след нормално раждане (*Partus normalis*). Две от родените деца бяха от женски пол (29%), останалите от мъжки пол (71%). Пъпните върви бяха доставени в лабораторията в специални епруветки със среда за пробовземане (стерилен 0.9 % разтвор на *NaCl*) и съхранявани на 4°C до тяхната обработка в рамките на 24ч. от пробовземането.

1.2.2 Периферна венозна кръв

С цел изследване влиянието на секретом от *МСК* върху *В* лимфоцити посредством рутинна венепункция от всеки участник доброволно беше взет биологичен материал – периферна венозна кръв (обемът на взетата кръв варираше между 7 и 12 ml)

с вакутейнер (VACUTTE® TUBE 3 ml, Greiner Bio-one; Cat: 454020) за хематология с антикоагулант – етилендиаминтетраоцетна киселина (ЕДТА). Информацията относно донорите на периферна венозна кръв е подробно представена в предишния раздел “Изследвани лица”.

На следващ етап, от взетата пълна кръв, бяха изолирани необходимите за проучването РВМС по метод описан в раздел “Методи” на дисертационния труд. В деня на взимането на кръвта бяха попълнени и бланките с въпросите за пациентите, необходими за определяне на активността на заболяването им.

2. Методи:

2.1 Клетъчно култивиране

2.1.1 Изолране и култивиране на човешки ПВ-МСК

- Използвани реагенти и консумативи:

| Използвани реагенти и консумативи за изолране и култивиране на МСК | | | |
|--|--------------------------|------------------|--------------------|
| <u>Използвани реагенти</u> | | | |
| DMEM/F12 1:1 w: stab. Glutamine / w:1.2 g/L NaHCO ₃ (500 ml) | PAN Biotech, Germany | Cat: P04-41150 | 500 ml |
| FBS Good - Fetal Bovine Serum (500 ml) | PAN Biotech, Germany | Cat: P40-37500 | 10 % |
| Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B mix във 0.85% физиологичен разтвор (100 ml) | PAN Biotech, Germany | Cat: P06-07300 | 1 % |
| trypsin 0.05 % /EDTA 0.02% в PBS (100ml) | PAN Biotech, Germany | Cat: P10-023100 | 100 ml |
| Collagenase type I 140 units/mg (100 mg) | Genaxxon, Germany | Cat: C4255.0100 | 0,25 % |
| Hyaluronidase | Genaxxon, Germany | Cat: S5234.0250 | 40 mg/ml |
| Phosphate buffered saline-PBS | BioSystems, USA | Cat: 44592 | 10x |
| Trypan blue solution | Sigma-Aldrich, USA | Cat: T8154 | 0,40% |
| <u>Лабораторни консумативи</u> | | | |
| Клетъчни Сита | Greiner bio-one, Austria | Cat: 542070 | 70 µm |
| Петриев панички | Deltalab, Spain | Cat: 200209 | 90x14 mm |
| Серологични пипети | Biologix, USA | Cat: 07-5010 | 10 ml |
| Епруветки 15 ml | BD Falcon, USA | Cat: 352096 | 15 ml |
| Епруветки 50 ml | Nerbe plus, Germany | Cat: 02-572-3001 | 50 ml |
| Пастьорки | Biologix, USA | Cat: 30-0138A1 | 3 ml |
| Съд за клетъчно култивиране/фласкове | Biologix, USA | Cat: 07-8025 | 25 cm ² |

Таблица 7. Информация относно използваните реагенти и консумативи, необходими за изолране и култивиране на МСК

- Работен протокол

Изолрането на човешки мезенхимни стволови клетки от тъканта на пъпните връви, осъществихме посредством метод базиращ се на механично надробяване и ензимно разграждане. Всяка пъпна връв беше обработена, следвайки един общ алгоритъм на работа. За целта, веднага след доставянето на пробата в лабораторията, в

чист и стерилен ламинарен бокс (*Thermo Scientific клас II*), пъпната връв с дължина от ~ 15 cm беше прехвърлена от епруветката за пробовземане в нова стерилна епруветка с 70% етилов спирт и инкубирана в продължение на 1 мин. на стайна температура. След изтичане на инкубационното време, пъпната връв беше отново прехвърлена в нова епруветка с предварително поставен физиологичен разтвор за промиване на тъканта. Малко парче от пъпната връв (2.5 cm) беше отрязано и поставено в стерилна 90x14mm-Петриева паничка (*Deltalab, Spain*), където кръвоносните съдове бяха внимателно отстранени. За да се подобри дифузията на газове и хранителни вещества, както и да се осигури необходимата площ за ензимно действие, тъканта беше нарязана на дребни късчета посредством стерилни хирургически ножици. Получените късчета бяха с дължина не повече от няколко милиметра, за да бъде избегнато прекомерното смилане, тъй като то би могло да доведе до увреждане на клетките.

Парчетата пъпна връв, бяха поставени в епруветка с т.нар. *ензимен разтвор*, необходим за разграждането на екстрацелуларния матрикс и получаването впоследствие на едноклетъчна суспензия. Ензимният разтвор включва 0.25% колагеназа I (*Genaxxon, Germany*), 4 mg/ml хиалуронидаза (*Genaxxon, Germany*) и 1% смес от пеницилин/стрептомицин/амфотерицин В микс - *Pen/Strep/Amph (PAN Biotech, Germany)*. Последва инкубация на надробената тъкан в ензимния разтвор във влажен инкубатор (*Thermo Scientific Heracell 150i*) с 5% CO₂ и при 37°C температура на шейкър в продължение на 3 часа. След изтичане на инкубационния период, ензимно разградената тъкан беше смесена с физиологичен разтвор и филтрирана през 70 µm клетъчно сито (*Greiner bio-one, Austria*), за да се отстранят клетъчните агрегати или струпвания, както и парченцата тъкан, които не са били напълно разградени. Клетъчната суспензия беше центрофугирана (*Rotanta 460 Hettich Centrifugen; Germany*) при 876 × g за 10 мин. Супернатантата беше премахната, а получената клетъчна утайка беше ресуспендирана в среда *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 w: stab. Glutamine / w:1.2 g/L NaHCO₃ (PAN Biotech, Germany)*, обогатена с 10% фетален телешки серум - *FBS (PAN Biotech, Germany)* и 1 % *Pen/Strep/Amph*.

○ *Определяне на броя и виталността на изолираните клетки*

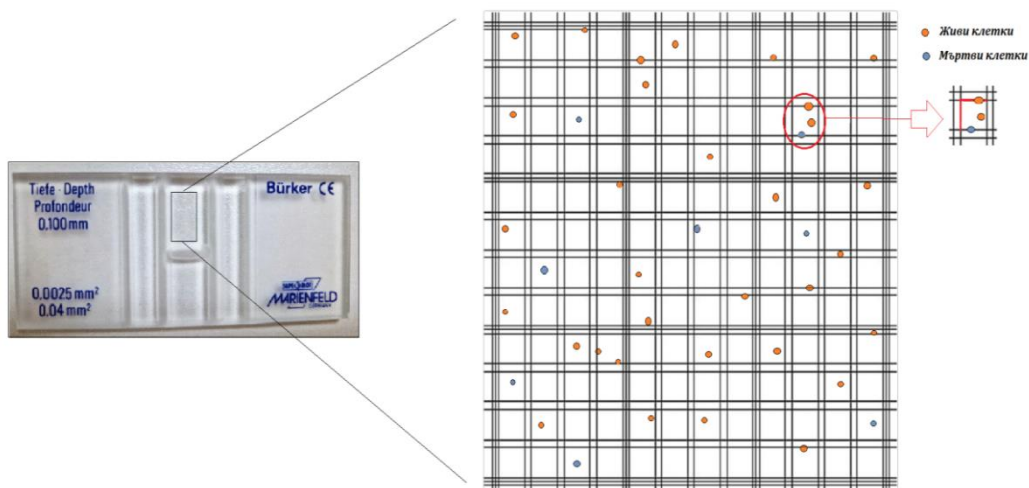
Броят на клетките беше определен посредством броителна камера - хемоцитометър ("*Камера на Bürker*"; *Marien Field, Germany*). Използваната камера представлява модифицирано предметно стъкло с две камери за броене, всяка с мрежи от пресичащи се линии с известни размери (*фиг. 3*). За целта, събраната клетъчна

суспензия беше центрофугирана (876 x g за 10 мин.), промита двукратно с фосфатен буфер/phosphate buffered saline (PBS) и смесена в съотношение 1:1 с разтвор на виталното багрило трипаново синьо (0.4% трипаново синьо разтворено в PBS) за 3-4 мин., на стайна температура. След изтичане на времето за инкубация с трипаново синьо клетъчната суспензия беше поставена в броителната камера с помощта на микропипета и камерата беше покрита с покривно стъкло, така че разстоянието между него и предметното стъкло гарантира определен обем от клетъчната суспензия в камерата.

Живите клетки с интактна мембрана не пропускат багрилото (трипаново синьо) и остават нецветени, докато мъртвите клетки се оцветяват в синьо. Следва се стриктно правилото да се преброят два диагонала от клетки (двадесет и четири малки квадратчета и едно допълнително квадратче - общо двадесет и пет), като се броят всички клетки, които са в квадратчетата и тези, които застъпват две прилежащи страни (например: както е представено на *фиг. 3* линиите в червено на лявата и горната страна на едно малко квадратче). Броенето на клетките беше осъществено на инвертен светлинен микроскоп (Leica, Germany), а клетъчната жизнест беше изчислена след преброяването на клетките в броителната камера посредством следната формула:

$$\% \text{ Живи клетки (Виталност)} = \frac{\text{Брой живи клетки/ml}}{\text{Общ брой клетки/ml}} \times 100$$

Пример: Изброени бяха 3.80×10^6 клетки/ml, от които 3.60×10^6 клетки/ml бяха живи. Следователно виталността беше определена като 95%, а броят на мъртвите клетки беше 5% (2×10^5 клетки/ml).



Фигура 3: Схематично представяне на броене на клетки (МСК/РВМС). Използваната камера на *Bürker* е двукамерна. Всяка камера е с дълбочина 0,100mm. Състои се от девет големи квадрата, разделени с тройни линии с площ от 1 mm^2 , като всеки голям квадрат е съставен от шестнадесет малки квадратчета с площ $0,0025 \text{ mm}^2$. Броят клетки в 1 ml е равен на броя изброени клетки x коефициента на *Bürker* - 10^4 .

- *Култивиране на изолираните клетки и получаване на кондиционирана среда*

След преброяването, клетките бяха посяти в $10 \times 25 \text{ cm}^2$ (T25; *Biologix, USA*) съдове за клетъчни култури в концентрация 1×10^4 клетки/ cm^2 . На следващия ден се осъществи замяна на средата с нова свежа среда (6 ml на T25) за клетъчно култивиране, за да се премахнат неадхериралите клетки. Документирана беше адхезията и фибробластната морфология на МСК посредством инвертен светлинен микроскоп (*Leica, Germany*). На този етап от култивирането на клетките те се означават като нулев пасаж (P0). Флаσκοвете бяха съхранени в инкубатор и средата на клетъчната култура беше сменяна на всеки 48 часа, докато клетките не достигнаха 80-90 % конfluентност във всеки 25 cm^2 флак.

При готовност на клетките (80-90% конfluентност) за събиране и съхраняване на техния секретом, клетъчната среда беше аспирирана и заменена с прясна нова среда, в която клетките (на P0 и P1) бяха култивирани в продължение на допълнителни 48 часа. След изтичане на периода за култивиране, събраната среда, озаглавена вече "ПВ-МСК-кондиционирана среда (ПВ-МСКкс)" беше центрофугирана при $876 \times g$ за 10 мин., за да се премахнат клетъчните дебри. Кондиционираната среда беше разпределена на порции по 3 ml в 15 ml епруветки и съхранена на -80°C за последващите изследвания, част от настоящия дисертационен труд.

- *Дисоцииране на клетките от съдовете за култивиране (Трипсинизиране)*

Като типични представители на адхерентния тип клетки, МСК трябва да бъдат дисоциирани от съда за клетъчно култивиране, за да могат да бъдат преброени, пасажирани (субкултивирани) или съхранени за дълъг период от време. Дисоциирането на клетките след формирането на плътен монослой от повърхността на съдовете за клетъчно култивиране се осъществи, посредством дисоцииращ разтвор на ензим 0.05 % *trypsin-ЕДТА* (*PAN Biotech, Germany*) в *HBSS w/o: Ca, Mg, w: Phenol red*, поради което методът на дисоциация се означава още като трипсинизиране. За целта, с помощта на аспиратор старата среда беше премахната и клетките бяха промити с добавянето на физиологичен разтвор (2 ml физиологичен разтвор/T25) за 1-2 мин. След премахването на физиологичния разтвор беше добавен дисоцииращ разтвор на трипсин и ЕДТА (1ml/T25), така че той хубаво да покрие клетките на дъното на съда за култивиране. Клетките в съда за култивиране бяха оставени на шейкър за около 4 мин., на стайна температура. Ако след изтичане на инкубационния период все още има клетки, които

не са дисоциирани те се отделят посредством леко потупване с длан по стената на съда за култивиране. След отделянето на клетките от дъното на съда за култивиране беше добавена хранителна среда (5 ml/T25), клетките бяха събрани, преброени по описания метод и готови за субкултивиране в нови съдове за клетъчно култивиране за последващите тестове, свързани с характеристика на стволовите клетки.

○ *Замразяване и съхраняване на МСК:*

Необходимите реактиви и консумативи за замразяването на МСК са представени на табл. 8.

| Използвани реактиви и консумативи | | |
|--|-----------------------------|------------------------|
| <i>FBS Good - Fetal Bovine Serum (FBS)</i> | <i>Pan Biotech, Germany</i> | <i>Cat: P04-41150</i> |
| <i>Диметил сулфоксид (CH₃)₂SO (DMSO)-100ml</i> | <i>Sigma Aldrich, USA</i> | <i>Cat: D2650</i> |
| <i>Криопруветки (2ml sterile Cryo Tubes)</i> | <i>Genaxxon, Germany</i> | <i>Cat: I2102.2000</i> |
| <i>Пастъорки (3ml)</i> | <i>Biologix, USA</i> | <i>Cat: 30-0138A1</i> |

Таблица 8. Използвани реактиви и консумативи за замразяване и съхраняване на МСК

○ *Работен протокол:*

Замразяването и съхраняването на МСК се осъществи посредством метод на замразяване при криогенни условия. Процесът по замразяване и съхраняване на живи клетки е известен като “криоконсервиране”. Замразяването или криоконсервирането на клетки цели съхраняването им при много ниски температури в течен азот или пари на течния азот (-196°C), което се постига, посредством използването на специална за целта среда за замразяване, включваща охладен FBS, съдържащ криопротектор - 10% диметил сулфоксид (DMSO; Sigma Aldrich, USA). Целта на добавянето на криопротектора - DMSO е предотвратяване образуването на ледени кристали в клетките, които в последствие биха довели до нарушаване целостта на клетъчната мембрана и клетъчните органели, и накрая до смърт на клетките по време на процеса на замразяване. Също така, това съединение е известно и със своите бактериостатични ефекти, което от друга страна осигурява допълнително стерилността на замразената и съхранена проба. Замразяването на стволовите клетки се осъществи като беше следван специфичен алгоритъм от действия:

- 1) Най-напред клетките бяха преброени и впоследствие клетъчната суспензия беше центрофугирана при 876 x g за 10мин.

- 2) Получената утайка от клетки беше ресуспендирана в средата за замразяване и клетъчната суспензия беше разпределена по 1ml/криовиалка в концентрация 1×10^6 клетки/криовиалка.
- 3) Криовиалките бяха поставени на лед за 15 мин., след което последователно поставяни, първо при условия на -20°C за 15 мин. и след това на -80°C за период от 24-48ч.
- 4) Финалната стъпка в алгоритъма беше прехвърлянето на криовиалките в специално пригодени за това криоконтейнери за дълготрайно съхранение на клетки в парите на течен азот.

Внимателното и стриктно следване на алгоритъма, подпомага постепенното понижаване на температурата по време на замразяването на клетките, което предотвратява бързото клетъчно обезводняване, следователно образуването на ледени кристали. Ако пробите от клетки са правилно съхранени, те могат да живеят дълги години в течния азот без това да има пагубен ефект върху тяхното качество.

2.1.2 Характеризиране на изолираните от пънна връв мезенхимни стволови клетки

2.1.2.1 Фенотипизиране на мезенхимни стволови клетки

- *Използвани реактиви и консумативи*

| Използвани реактиви и консумативи, необходими за фенотипизиране на МСК | | |
|---|--------------------|-------------|
| <u>Моноклонални антитела</u> | | |
| Mouse Anti-Human CD45 (FITC-маркирано)/CD34 (PE-маркирано) | BD Pharmingen, USA | Cat: 341071 |
| Mouse Anti-Human CD73 (PE-маркирано) | BD Pharmingen, USA | Cat:550257 |
| Mouse Anti-Human CD 90 (FITC-маркирано) | BD Pharmingen, USA | Cat: 555595 |
| Mouse Anti-Human CD 105 (PerCP-Cy TM 5.5) | BD Pharmingen, USA | Cat: 560819 |
| <u>Други реактиви и консумативи</u> | | |
| BD TM Cell Wash | BD Pharmigen, USA | Cat: 349524 |
| Cell Fix pH 7.4 | BD Pharmigen, USA | Cat: 340181 |
| Флуоцитометрични епруветки | BD Pharmigen, USA | Cat: 352054 |

Таблица 9. Използвани реактиви и консумативи, необходими за фенотипизиране на МСК

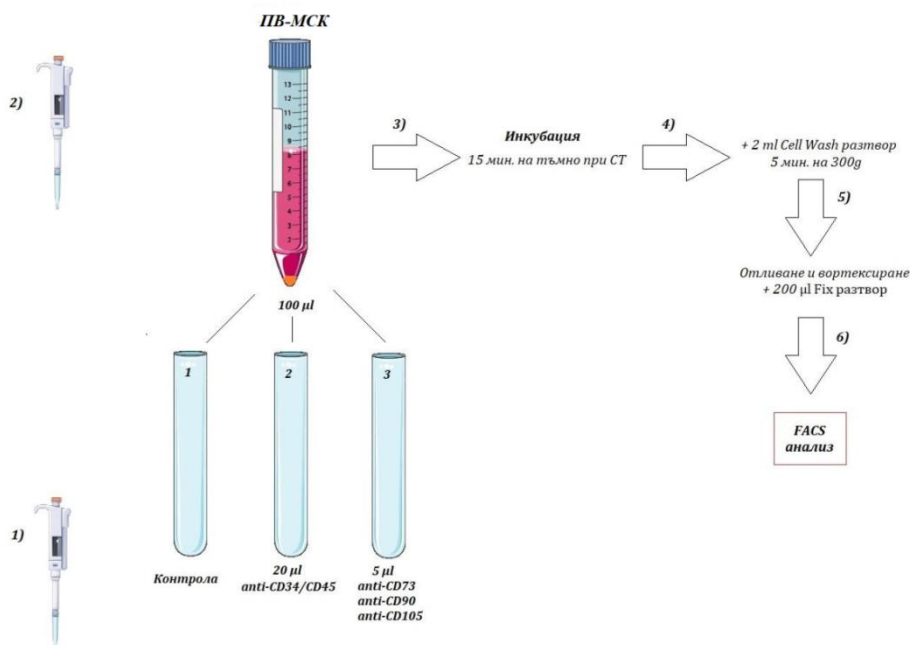
- *Маркиране на клетките с антитела срещу специфични маркери за мезенхимни стволови клетки*

След отделянето на клетките от съда за култивиране, клетъчната суспензия беше събрана в 50 ml епруветка (*Nerbe plus, Germany*) и центрофугирана при 876 x g за 10 мин. (*Rotanta 460 Hettich centrifugen*). След това, клетките бяха преброени на хемоцитометър и от всяка проба бяха отделени по 3×10^6 клетки в 15 ml епруветка и последващо центрофугирани. Супернатантата беше премахната и бяха добавени 300 μl

BD™ CellWash (BD Pharmigen, USA). След ресуспендиране на клетъчната утайка, тя беше разпределена в три флоуцитометрични епруветки (BD Pharmigen, USA), в две от които предварително бяха поставени антитела срещу изследваните маркери (фиг. 4):

- **Епруветка 1 (контрола):** Пипетирани бяха 100 µl клетъчна суспензия (1×10^6 клетки);
- **Епруветка 2:** Пипетирани бяха 20 µl anti-CD45/CD34 (BD Pharmigen, USA) антителата и 100 µl клетъчна суспензия (1×10^6 клетки);
- **Епруветка 3:** Пипетирани бяха по 5 µl от антителата anti-CD73 (BD Pharmigen, USA), anti-CD90 (BD Pharmigen, USA), anti-CD105 (BD Pharmigen, USA) и по 100 µl от клетъчната суспензия (1×10^6 клетки);

Клетките с антителата бяха вортексирани (Vortex V1 plus, BOECO; Germany) и инкубирани за 15 мин. на стайна температура и на тъмно. След изтичането на инкубационния период към трите епруветки бяха добавени по 2 ml BD™ CellWash разтвор и бяха центрофугирани на 300 x g за 5 мин. Супернатантите бяха премахнати и клетките бяха фиксирани с по 200 µl фиксиращ разтвор - Cell Fix pH 7.4 (BD Pharmigen, USA). Последва вортексирание и анализиране на пробите на FACS Calibur flowcytometer (Becton Dickinson, USA), като беше използван BD CellQuest Pro Software (Becton Dickinson, USA).



Фигура 4: Схематично представяне на експерименталната постановка по фенотипизиране на МСК. Фигурата е създадена с помощта на Servier Medical Art, лицензиран съгласно Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

2.1.2.2 Изследване на диференциационния потенциал на изолираните мезенхимни стволови клетки

- Стимулиране на диференциационния потенциал на МСК *in vitro* посредством химически-модифицирана среда

С цел доказаване на стволовостта на МСК беше извършена и химическа индукция на адипогенна или остеогенна диференциация, което беше постигнато с помощта на култивиране на клетките в предварително приготвени среди, допълнени с индуциращи агенти. Клетъчни култури от МСК от пъпна връв (*пасаж 2*), достигнали над 80% конfluентност, бяха трипсинизирани, препосяти в 6-ямкови плаки (*Greiner bio-one, Австрия*) в концентрация 5×10^4 клетки/cm² и култивирани при стандартни условия на клетъчно култивиране в специфична среда, индуцираща адипогенна или остеогенна диференциация. Съставът на използваните среди за диференциация е представен на *табл. 10* и включва *DMEM/F12*, 10% фетален телешки серум-*FBS*, 1 % *Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B mix* и специфични диференциращи фактори.

Средата, индуцираща адипогенна или остеогенна диференциация беше сменяна на всеки три дни в продължение на три седмици (21 дни). Добавянето на диференциращи фактори се осъществяваше непосредствено преди смяна на старата среда с нова свежа среда. На 21-ия ден след началото на експеримента, формирането на вакуоли с неутрални липиди или депозирането на калциеви отлагания бяха установени посредством оцветяване със специфични багрила. Контролните, недиференцирани клетки (отрицателни контроли), бяха посяти в същата концентрация и култивирани при същите условия на култивиране, но поддържани единствено в хранителна среда *DMEM/F12 + 10% FBS, Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B mix*, без наличие на диференциращи фактори.

Състав на средите, индуциращи *in vitro* диференциация на МСК

| | | | |
|--|--------------------|----------------------|--|
| <i>DMEM/F12</i> | | PAN Biotech, Germany | 500ml |
| <i>Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B mix</i> | | PAN Biotech, Germany | 1% |
| <i>Fetal Bovine Serum - FBS</i> | | PAN Biotech, Germany | 10% |
| <u>Среда, индуцираща адипогенна диференциация</u> | | | <u>Среда, индуцираща остеогенна диференциация</u> |
| Dexamethasone | Sigma-Aldrich, USA | 1 μ M | Dexamethasone Sigma-Aldrich, USA 100 nM |
| Bovine insulin | Sigma-Aldrich, USA | 5 μ g/ml | Ascorbic acid-2-phosphate Sigma-Aldrich, USA 0.2 mM |
| 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) | Sigma-Aldrich, USA | 0.25 mM | β -glycerophosphate Sigma-Aldrich, USA 10 mM |
| Indomethacin | Sigma-Aldrich, USA | 60 μ M | |

Таблица 10. Обобщен състав на средите, индуциращи *in vitro* диференциация на МСК

○ **Фиксиране на клетките**

След три-седмичния период клетките, на които им предстоеше оцветяване посредством *Oil Red O* (Адипогенна диференциация) и *Alizarin Red S* (Остеогенна диференциация), имаха допълнителна стъпка на фиксиране. Преди началото на оцветяването на клетките, средата беше премахната, клетките бяха промити с *PBS* и впоследствие фиксирани с 10% неутрален формалинов разтвор (*Merck, Germany; Cat: 104002*) в продължение на 30 мин. на стайна температура.

○ **Оцветяване и визуализиране на диференцираните клетки**

- **Адипогенно диференцирани клетки:**

Фиксираните клетки бяха промити еднократно с дестилирана вода (dH_2O) и оцветени с прясно приготвен 0.6% разтвор на *Oil red O* (*Sigma-Aldrich, USA; Cat: 00625-100MG*) за 1ч. на стайна температура. Разтворът се състои от три части 1% разтвор на *Oil Red O* в изопропанол, които бяха смесени с две части dH_2O . Излишното багрило беше отстранено чрез промиване с dH_2O . Наличието на оцветяване беше наблюдавано под инвертен светлинен микроскоп (*Leica, Germany*).

- Остеогенно диференцирани клетки:

Остеогенно диференцираните клетки бяха доказани посредством два различни протокола на оцветяване: оцветяване с *Alizarin Red* и оцветяване по *von Kossa*.

➤ *Оцветяване с Ализарин ред*

След стъпката на фиксация, клетките бяха промити еднократно с dH_2O и оцветени с 2% разтвор на *Alizarin red S* (*Sigma-Aldrich, USA; Cat: A5533-25G*) за 40 мин. След края на оцветяването ямките бяха промити трикратно с дестилирана вода. При наличие на Ca^{2+} минерални отлагания се наблюдава ярко червено оцветяване. При липса на калциеви отлагания оцветяването е бледо жълто. Наличието на цветна реакция беше установено както макроскопски, така и с помощта на инвертен светлинен микроскоп (*Leica, Germany*).

➤ *Оцветяване по Von Kossa*

Минерализацията на матрикса беше наблюдавана и посредством оцветяване по *von Kossa*, което открива аниони на калциеви соли (сулфати, фосфати, карбонати) в културите за остеогенна диференциация. При интензивно осветяване/*UV* облъчване на калциев карбонат или калциев фосфат в присъствие на $AgNO_3$, сребърните катиони се свързват с карбонатните/фосфатните аниони, при което формиралите се соли (Ag_2CO_3 или Ag_3PO_4) се оцветяват в черно.

След изтичане на 21^{ия} ден на култивиране, средата на остеогенно диференцираните клетки, беше премахната, клетките бяха промити еднократно с *PBS* и третирани с 1% разтвор на сребърен нитрат ($AgNO_3$; *Sigma-Aldrich, USA*) при облъчване с ултравиолетова светлина ($\lambda = 366\text{ nm}$; трансилюминатор *Camag Reprostar 3, Switzerland*) в продължение на 60 мин. За отстраняване на остатъчното количество $AgNO_3$, клетките бяха промити с дестилирана вода. Наличието на Ca^{2+} минерални отлагания с характерно черно оцветяване беше детектирано на инвертен светлинен микроскоп (*Leica, Germany*).

2.1.3 Изолране и култивиране на мононуклеарни клетки от периферна венозна кръв

След взимане на биологичен материал (пълна кръв) от изследваните лица (здрави доброволци, пациенти със *СЛЕ* и пациенти с *АС*), изолирането на *PBMC* се осъществи, следвайки единен протокол.

- *Използвани реактиви и консумативи:*

| <i>Използвани реактиви и консумативи</i> | | |
|---|---------------------------------|------------------------|
| <i>Ficoll-Paque™ PLUS</i> | <i>GE Healthcare, USA</i> | <i>Cat: 17-1440-02</i> |
| <i>PBS (10x)</i> | <i>BioSystems, USA</i> | <i>Cat: 44592</i> |
| <i>DMEM/F12</i> | <i>Pan Biotech, Germany</i> | <i>Cat: P04-41150</i> |
| <i>FBS</i> | <i>Pan Biotech, Germany</i> | <i>Cat: P40-37500</i> |
| <i>Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B mix</i> | <i>Pan Biotech, Germany</i> | <i>Cat: P06-07300</i> |
| <i>6-well plate (9.5cm²)</i> | <i>Greiner Bio-one, Austria</i> | <i>Cat:657 160</i> |

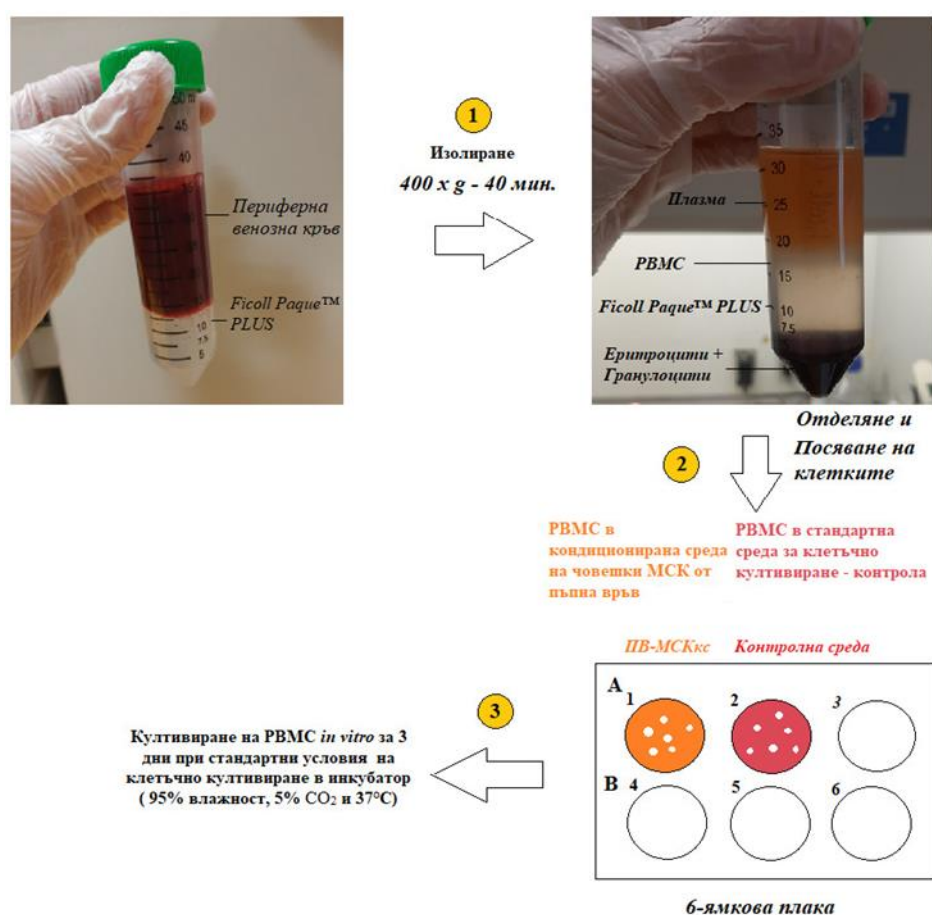
Таблица 11. Използвани реактиви и консумативи за изолиране на мононуклеарни клетки от периферна венозна кръв – *PBMC*

- *Работен протокол:*

Взетата пълна кръв беше прехвърлена с помощта на 3 ml пастърка в 50 ml епруветка при стерилни условия в специално пригоден за това ламинарен бокс. В друга стерилна 50 ml епруветка беше поставена 15 ml сепарираща среда *Ficoll Paque™ PLUS* (*GE Healthcare BioScienc, USA*). Кръвта беше разредена 1:1 със стерилен *10x PBS* (*BioSystems; Barcelona, Spain*) и внимателно наслоена върху сепариращата среда, като се следеше двата слоя да не се смесят или слоят. *PBMC* бяха изолирани чрез използване на метода “центрофугиране в плътностен градиент” (400 x g за 10 мин.). Същността на т.нар. метод на центрофугиране в плътностен градиент е, че разделянето на клетките става по време на самото центрофугиране и се дължи на различната плътност/маса на клетките и тази на използваната сепарираща среда (*Ficoll Paque™ PLUS*).

С най-висока плътност са червените кръвни клетки (еритроцитите) и гранулоцитите, които заедно сформират плътна утайка на дъното на епруветката. Над тях се разполага сепариращата среда, която е отделена от кръвната плазма чрез бял (мътен) слой от *PBMC*. На следващия етап след центрофугирането на кръвта, *PBMC* бяха събрани чрез пипетиране, измити веднъж с *PBS* и преброени на камера на Бюркер под светлинен микроскоп. Виталността на изолираните клетки беше също определена посредством оцветяване с *Tryan blue* по описания метод. *PBMC* бяха посяти в 6-ямкова плака (9,6 cm², *Greiner bio-one, Austria*) при концентрация от 1×10^6 клетки на ямка, съдържаща *PB-MCCKc* и в друга ямка отново при концентрация 1×10^6 в стандартна среда за култивиране на клетки - *DMEM/F12 Cell Culture Medium* (*PAN Biotech, Germany*), обогатена с 10% фетален телешки серум - *FBS* (*PAN Biotech, Germany*) и 1% смес от *Pen/Strep/Amph* (*PAN Biotech, Germany*).

Така посятите *PBMC* бяха култивирани в продължение на три дни (72 часа) при стандартни условия за клетъчно култивиране (37°C, 5% CO₂ и 95% влажност). След това клетките бяха ресуспендирани внимателно, събрани в 15 ml епруветки и центрофугирани при 350 x g за 10 мин. Супернатантата над утайката беше отделена, а клетките бяха подготвени за последващия флоуцитометричен анализ, описан подробно в тази глава на дисертационния труд. Отделените супернатанти бяха събрани и съхранени като аликвоти на -80°C за последващите имуноензимни анализи. Експерименталната постановка по изолирането и култивирането на *PBMC* е представена на *фиг. 5*.



Фигура 5: Схема на експерименталната постановка по изолиране и култивиране на *PBMC* от двете експериментални групи (*PBMC* + ПВ-МСКкс и *PBMC* + Контролна среда).

2.2 Флоуцитометричен метод

2.2.1 Флоуцитометрично определяне на повърхностната експресия на специфични В-клетъчни маркери, свързани с тяхната активация, антиген-представяща функция и преживяване

След отделянето на изолираните и култивирани *PBMC*, клетките бяха маркирани с антитела, белязани със специфични флуорохроми, с цел да се изследва ефекта на секретиранияте разтворими фактори в кондиционираните среди на *MCK* върху експресията на маркери, свързани с активацията, антиген-представящата функция и преживяването на В клетките.

○ Същност на метода:

Флоуцитометричният метод или *Fluorescence-activated cell sorting (FACS)* анализът е технология, която осигурява бърз многопараметричен анализ на единични клетки в разтвор. В същността на метода стои специфичното разпознаване и свързване на моноклонални антителата към молекулите, таргет на изследването, експресирани на мембраната на клетките. Всяко антитяло е маркирано със специфичен флуорохром (*FITC- Fluorescein isothiocyanate; PE- Phycoerythrin, APC-Allophycocyanin; PerCP- Peridinin-Chlorophyll-Protein* или *Per CP/Cy5.5 - Peridinin chlorophyll protein-Cyanine 5.5*). Клетките, към които са свързани специфично моноклоналните антитела с флуорохроми, се пропускат през камерата на измерителната клетка на флоуцитометъра, която фокусира клетъчната суспензия като поток от малки капчици. Всяка една капка съдържа една клетка. Клетките преминават през източник на светлина (лазарен лъч) с определена дължина на вълната и впоследствие излъчват светлина в различен спектър, в зависимост от използваните флуорохроми. Излъчената флуоресценция се улавя от специализирани фотоумножители и тези сигнали впоследствие се преобразуват в електронни сигнали, които се анализират от компютър и се записват във файл с данни.

○ Използвани реактиви и консумативи

Част от използваните реактиви за флоуцитометричния анализ на В лимфоцитите се припокриват с тези на *MCK*, с разлика единствено във вида на моноклоналните антитела, които са използвани (*табл. 12*).

Използвани моноклонални антитела

| | | |
|---|---------------------------|--------------------|
| <i>anti-Human CD19 (FITC-маркирано)</i> | <i>Biolegend, USA</i> | <i>Cat: 302206</i> |
| <i>anti-Human CD 19 (Per CP-маркирано)</i> | <i>Biolegend, USA</i> | <i>Cat: 302228</i> |
| <i>anti-Human CD80 (PE-маркирано)</i> | <i>BD Pharmingen, USA</i> | <i>Cat: 557227</i> |
| <i>anti-Human CD86 (APC-маркирано)</i> | <i>BD Pharmingen, USA</i> | <i>Cat: 555660</i> |
| <i>anti-Human CD 268 (BR3) (Per CP/Cy5.5-маркирано)</i> | <i>Biolegend, USA</i> | <i>Cat: 316918</i> |
| <i>anti-Human CD 40 (PE-маркирано)</i> | <i>BD Pharmingen, USA</i> | <i>Cat: 555589</i> |
| <i>anti-Human HLA-DR (Per CP-маркирано)</i> | <i>BD Pharmingen, USA</i> | <i>Cat: 347402</i> |
| <i>anti-Human CD 279 (PD-1) (APC-маркирано)</i> | <i>BD Pharmingen, USA</i> | <i>Cat: 558694</i> |

Таблица 12. Използвани моноклонални антитела за флоуцитометричен анализ на В лимфоцити

○ *Работен протокол:*

1) За всяка изследвана проба на здрав донор или пациент бяха необходими общо 6 флоуцитометрични епруветки, както схематично е представено на експерименталната постановка (фиг. 6).

В епруветка 1 (контрола - клетки, които са маркирани само с антитяло срещу В-клетъчния маркер CD19) бяха пипетирани по 5 μ l от *anti-CD19 (FITC)* и по 100 μ l от клетъчната суспензия на *PBMC*, култивирани в стандартна/контролна среда за клетъчно култивиране.

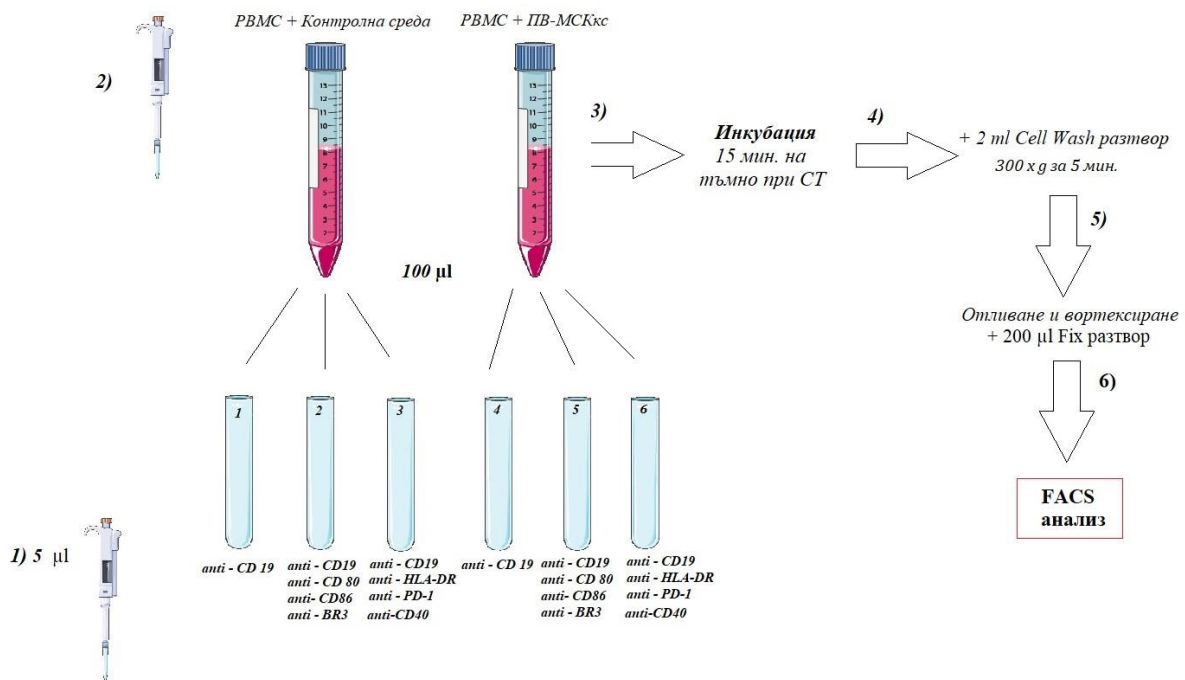
В епруветка 2 бяха пипетирани по 5 μ l от *anti-CD19 (FITC)*, *CD80 (PE)*, *CD86 (APC)*, *CD268-BR3 (PerCP-Cy5.5)* и по 100 μ l от клетъчната суспензия на *PBMC*, култивирани в стандартна среда за клетъчно култивиране.

В епруветка 3 бяха пипетирани по 5 μ l от *anti-CD19 (FITC)*, *HLA-DR (PerCP)*, *CD279 - PD-1 (APC)*, *CD40 (PE)* и по 100 μ l от клетъчната суспензия на *PBMC*, култивирани в стандартна среда за клетъчно култивиране.

В епруветка 4 (контрола - клетки, които са маркирани само с антитяло срещу В-клетъчния маркер CD19) бяха пипетирани по 5 μ l от *anti-CD19 (FITC)* и по 100 μ l от клетъчната суспензия на *PBMC*, култивирани в *PB-MCKкс*.

В епруветка 5 бяха пипетирани по 5 μ l от *anti-CD19 (FITC)*, *CD80 (PE)*, *CD86 (APC)*, *CD268-BR3 (PerCP-Cy5.5)* и по 100 μ l от клетъчната суспензия на *PBMC*, култивирани в *PB-MCKкс*.

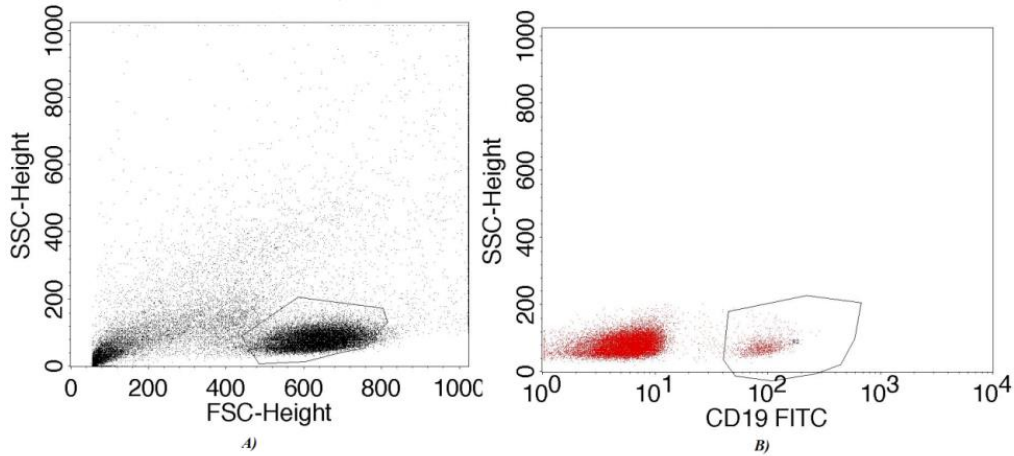
В епруветка 6 бяха пипетирани по 5 μ l от *anti-CD19 (FITC)*, *HLA-DR (PerCP)*, *CD279 - PD-1 (APC)*, *CD40 (PE)* и по 100 μ l от клетъчната суспензия на *PBMC*, култивирани в *PB-MCKкс*.



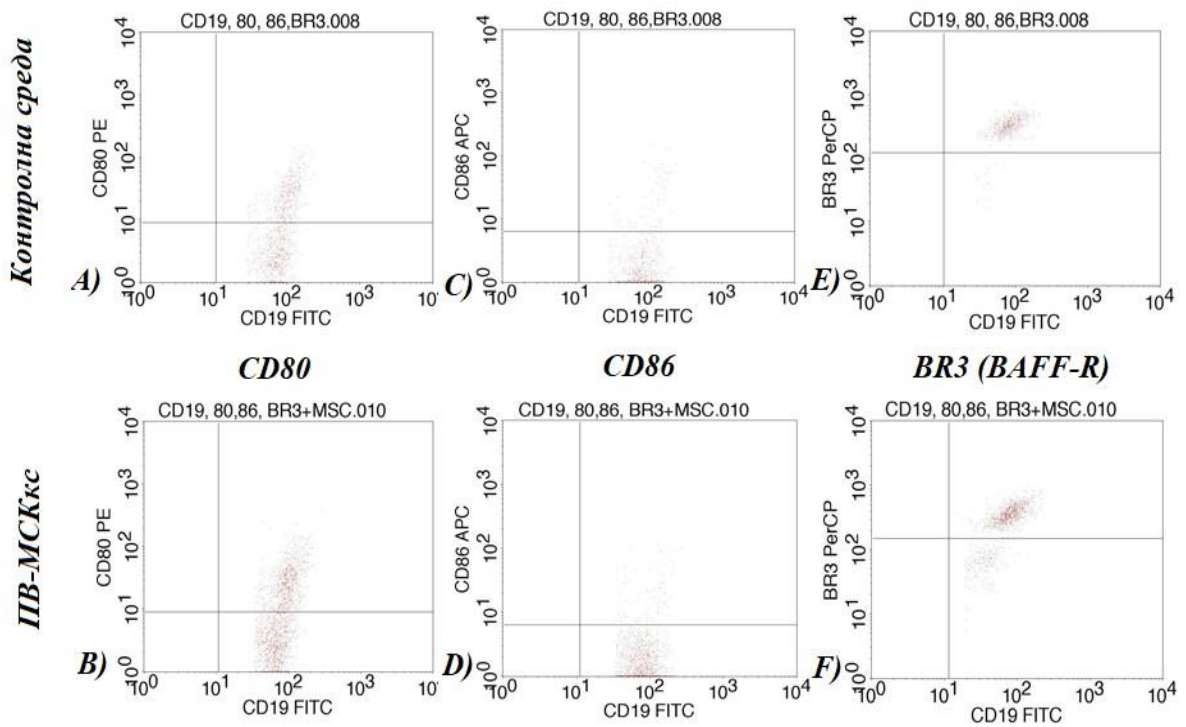
Фигура 6: Експериментална постановка на флоуцитометрично определяне на повърхностната В-клетъчна експресия на таргетните, за настоящия дисертационен труд, маркери.

Използвани означения и съкращения: **PBMC** – периферни кръвни мононуклеарни клетки; **ПВ-МСКкс** – кондиционирана среда от МСК от пълна връв; **Cell Wash** – миещ разтвор; **Fix** – фиксиращ разтвор; Фигурата е създадена с помощта на Servier Medical Art – лицензиран, съгласно Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

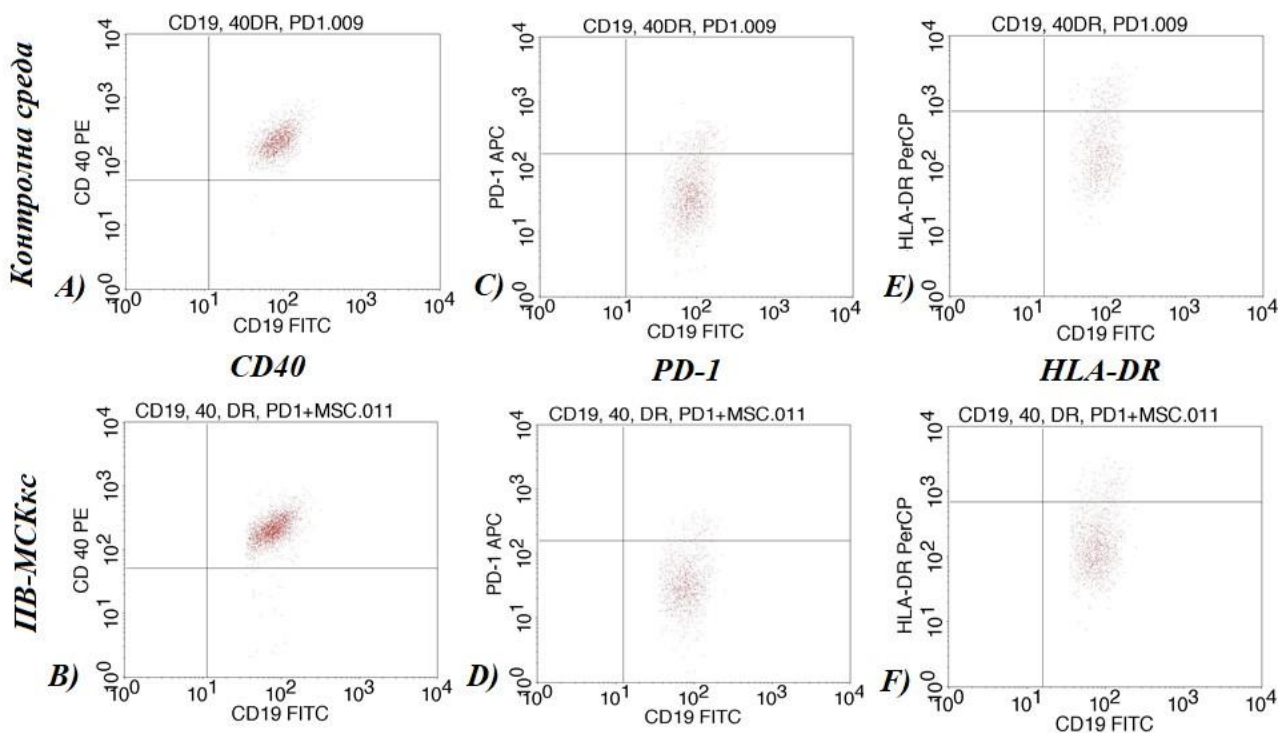
- 2) Клетките бяха инкубирани с антителата за 15 мин., на стайна температура и на тъмно.
- 3) След изтичане на инкубационния период клетките бяха промити с 2 ml миещ разтвор *BDTM CellWash* (*BD Pharmigen, USA*) и центрофугирани на 300 x g за 5 мин. Супернатантата беше отлята, а клетките внимателно вортексирани.
- 4) Във всяка епруветка с клетки бяха добавени 200 µl *Fix* разтвор.
- 5) Отчитането на клетките беше извършено на флоуцитометър *FacsCalibur* (*BD, USA*). За последващия анализ беше използвана софтуерната програма *BD Cell Quest*. На *фиг. 7* е представено разпределението на клетките по големина и гранулираност (*фиг. 7 A*), както и гейтирането на $CD19^+$ В лимфоцитите (*фиг. 7 B*). На *фиг. 8* и *фиг. 9* са представени флоуцитометрични *dot-plot* диаграми, отразяващи фенотипното определяне на повърхностната В-клетъчна експресия на изследваните маркери.



Фигура 7: Флоуцитометрично определяне на $CD19^+$ лимфоцитна популация. На фигурата е представен флоуцитометричният подход при определянето на $CD19^+$ лимфоцити. **А)** Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри – големина (FSC - forward scatter) и грануларност (SSC – side scatter) на клетките. **Б)** Вторият гейт беше поставен върху $CD19^+$ В клетките (червените клетки, оградени в кръг). Показаният флоуцитометричен подход беше използван при определянето на $CD19^+$ В лимфоцитите за всички опитни постановки. Беше измерен и сравнен процентът на $CD19^+$ В лимфоцитите във всяка от епруветките, като за всеки експеримент той беше приблизително еднакъв.



Фигура 8: Фенотипно определяне на $CD19^+$ В лимфоцити, експресиращи **CD80** (А и В), **CD86** (С и D), **BR3** (Е и F) от двете експериментални групи: контролна среда и група на РВМС, култивирани в кондиционирана среда на ПВ-МСК.



Фигура 9: Фенотипно определяне на $CD19^+$ В лимфоцити, експресиращи **CD 40** (A и B), **PD-1** (C и D), **HLA-DR** (E и F) от двете експериментални групи: контролна среда и група на ПВМС, култивирани в кондиционирана среда на ПВ-МСК.

2.2.2 Флуцитометрично детектиране на апоптотични и некротични $CD19^+$ В лимфоцити

Апоптозата често се определя като “лош” процес, водещ до смърт на клетки, който обаче в действителност е един нормален физиологичен процес, натоварен с важната задача да поддържа тъканната хомеостаза на организма. Определянето на процента В клетки в ранна и късна апоптоза е от голямо значение за оценка влиянието на секреторните фактори на МСК върху смъртта на този вид лимфоцити. В основата на използвания тест за апоптоза в настоящия дисертационен труд е оцветяването с FITC-конюгиран Анексин V, заедно с багрилото пропидиев йодид (PI), което позволява да се идентифицират клетките, които се считат за жизнеспособни (FITC-конюгиран Анексин V и PI отрицателни), клетките в ранна апоптоза (PI отрицателни, FITC-конюгиран Анексин V положителни) и клетките, които са в късна апоптоза (PE-конюгиран PI положителни) или некроза (мъртви клетки). В основата на метода са наблюдаваните морфологични промени, които настъпват при задействане на механизмите на програмираната клетъчна смърт. Един от първите признаци е загубата на мембранна асиметрия, характеризираща се с транслокацията на отрицателно заредени

фосфолипиди, какъвто е *PS*, от вътрешната към външната страна на цитоплазмената мембрана. В същото време, *Анексин V* е Ca^{2+} - зависим фосфолипид – свързващ протеин с висок афинитет за отрицателно заредени фосфолипиди. Това позволява използването на *Анексин V* - маркиран със специфичен флуорохром (*FITC*), който свързвайки се към клетки с изложен на своите мембрани *PS*, позволява да се разграничат ранно-апоптотични от късно-апоптотични клетки посредством флуоцитометричен анализ. По време на крайните фази на клетъчна смърт в резултат на апоптотичен или некротичен процес, се наблюдава загуба на мембрания интегритет. За детектирането на късно апоптотични клетки чрез *FACS* анализ приложение намира виталната боя пропидиев йодид. Жизнеспособните клетки с интактна мембрана не пропускат пропидиевия йодид, докато мембраните на мъртвите или увредени клетки са пермеабилни за него. По този начин, чрез маркиране на клетките с *Анексин V* и *PI*, беше определен процентът на апоптотични и некротични В клетки в настоящия научен труд чрез поточна цитометрия.

- *Използвани реактиви и консумативи*

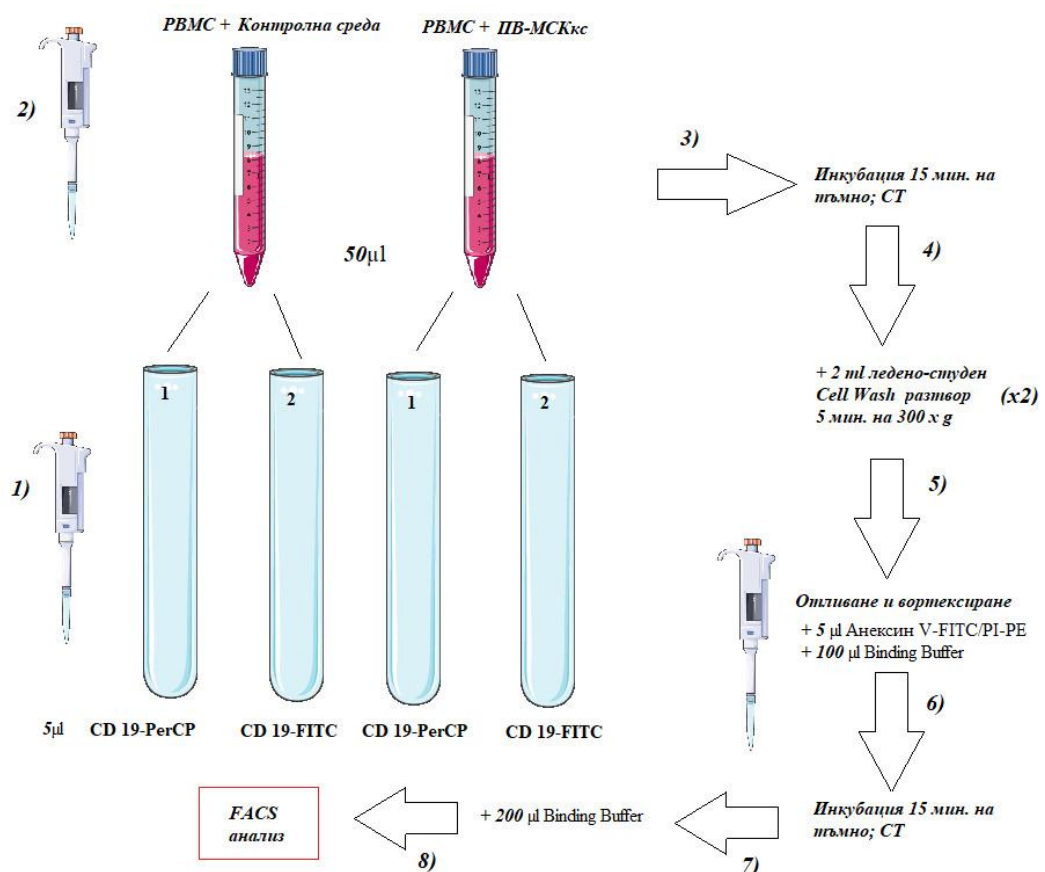
Детектирането на апоптотични и некротични В лимфоцити се осъществи посредством използването на търговски кит *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD, USA) Cat. № 556547*, като последователно се следваха инструкциите на производителя. Останалите реактиви и техните производители вече бяха посочени в раздел флуоцитометрия.

- *Работен протокол:*

Използваният материал за изследване бяха изолираните *PBMC* от включените в изследването здрави доброволци и пациенти. Необходими бяха общо четири флуоцитометрични епруветки: две за *PBMC*, култивирани в стандартна среда за клетъчно култивиране (*PBMC + Контролна среда*) и две за *PBMC*, култивирани в кондиционирана среда от *МСК (PBMC + ПВ-МСКкс)*, означени по следния начин, представен на *фиг. 10*.

- 1) Най-напред клетъчните култури бяха промити с *2 ml Cell Wash* разтвор.
- 2) В епруветките бяха пипетирани по *5 µl* от *CD19* антителата (*CD19-FITC* и *CD19-Per-CP*) и по *50 µl* от клетъчните суспензии.
- 3) Клетките бяха вортексирани и инкубирани на тъмно за *15 мин.* на стайна температура.

- 4) След инкубационния период бяха добавени по 2 ml ледено-студен *Cell wash* разтвор (4-8° C) и последва двукратно центрофугиране 300 x g за 5 мин., с последващо отливане на супернатантата.
- 5) Приготвен беше *Binding Buffer* (10x). За общо 4 епруветки: 120 µl *Binding Buffer* беше добавен към 1080 µl dH2O.
- 6) Към епруветките бяха последващо пипетирани по 5 µl *Анексин V (FITC)* и 5 µl *PI (PE)* и по 100 µl от *Binding Buffer*.
- 7) Клетките бяха вортексирани и инкубирани на тъмно за 15 мин., на стайна температура.
- 8) Добавени бяха по 200 µl *Binding Buffer* във всички епруветки.
- 9) Отчитането се извърши в рамките на 1ч. след като пробите бяха готови. Аквизирането и анализът беше осъществен на флуоцитометър *FACSCalibur*, като се използваше *BD CellQuest Pro* софтуер.

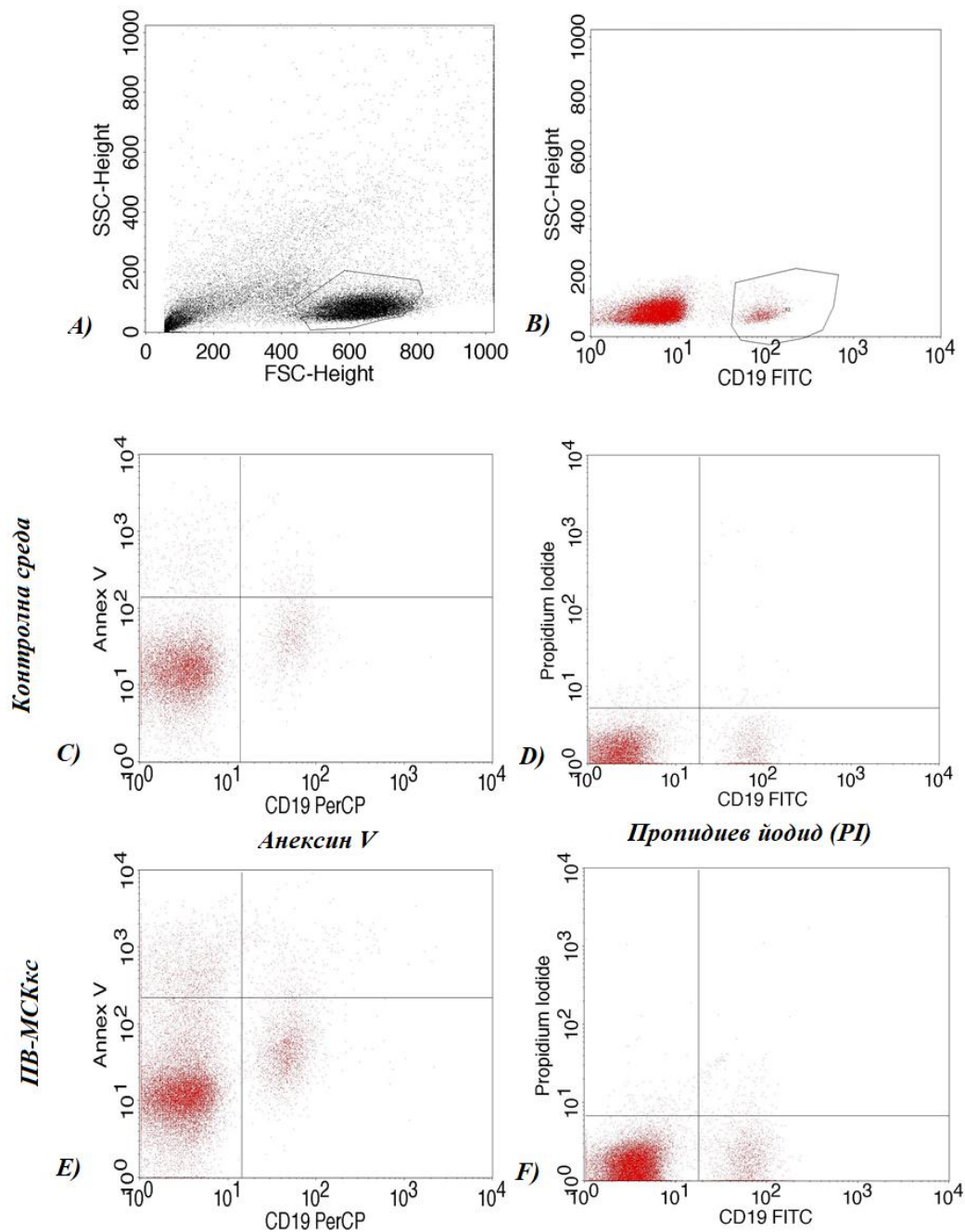


Фигура 10: Експериментална постановка на флуоцитометрично определяне на процент апоптотични и некротични В клетки от двете експериментални групи (PBMC + ПВ-МСКкс и PBMC + Контролна среда).

Използвани означения и съкращения: *PBMC* – периферни кръвни мононуклеарни клетки; *ПВ-МСКкс* – кондиционирана среда от МСК от пълна връв; *Cell Wash* – миещ разтвор;

Фигурата е създадена с помощта на *Servier Medical Art* – лицензиран, съгласно *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License* (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

На *фиг. 11* е представено фенотипното определяне на процент В лимфоцити в ранна и късна апоптоза.



Фигура 11: Фенотипно определяне на процент В лимфоцити в ранна и късна апоптоза. Първоначално беше гейтирано върху лимфоцитния облак (A) въз основа на физичните характеристики на клетките. Вторият гейт (B) беше поставен върху CD19⁺ В клетките (червените клетки, оградени в кръг). След което беше определен процентът на Анексин V-FITC и PI-PE положителни В лимфоцити. Клетките в етап на ранна апоптоза бяха положителни за оцветяване с Анексин V-FITC ((C)-контрола и (E)-кондиционирана среда на ПВ-МСК), а тези положителни за PI-PE ((D)-контрола и (F)-кондиционирана среда на ПВ-МСК) в късна апоптоза. Показаният флуцитометричен подход беше използван при определянето на процент CD19⁺ В лимфоцити в ранна и късна апоптоза за всички опитни постановки.

2.3 Имуноензимни методи:

Посредством имуноензимни методи бяха изследвани съхранените на -80°C кондиционирани среди след култивирането на *PBMC* от двете експериментални групи (*PB-MCKкс* и *Контролна среда*), както и кондиционирани среди на *PB-MCK* за секрецията на *BAFF/BLYS*, *IDO*, *PGE2*.

2.3.1 Изследване на кондиционирани среди от *PBMC* за наличието на специфичния за *B*-клетките лиганд *BAFF/Blys*

В основата на метода за *in vitro* количествено определяне на *BAFF* лиганда в кондиционирани среди е твърдофазова „сандвич“ *ELISA* (*ензимно-свързан имуносорбентен тест*). Гнездата на съответната микротитърна плака са натоварени с високоспецифични антитела „*anti-tag antibodies*“, към които се свързват комплекси от захващащото антигена антитяло („*Capture antibody*“), търсения лиганд/протеин (*BAFF*) и детекторното антитяло („*Detection antibody*“), конюгирано с *horse-radish peroxidase (HRP)*. За да се извърши анализът, пробите и стандартите бяха добавени към ямките, последвано от сместта от антитела („*antibody mix*“). След инкубационния период ямките на плаката бяха промити за отстраняване на несвързания материал. Добавеният субстрат се катализира от *HRP*, като по време на инкубацията протича ензимна реакция с образуване на цветен продукт със син цвят. Ензимната реакция се стопира със стопиращ разтвор H_2SO_4 , което води до промяна в цвета на реакцията от син в жълт. Следва спектрофотометрично отчитане на получените резултати. Интензитетът на цветния продукт зависи от количеството на търсения антиген (*BAFF*) в биологичната проба. Построена беше крива според калибраторите на кита и по нея се определи количеството на търсения протеин в тестваните проби. Материалът, който беше използван за изследване са среди, получени след клетъчно култивиране на *PBMC* от здрави донори и пациенти със *СЛЕ/АС*, в стандартна среда за клетъчно култивиране и в *PB-MCKкс*.

○ Използвани реактиви и консумативи

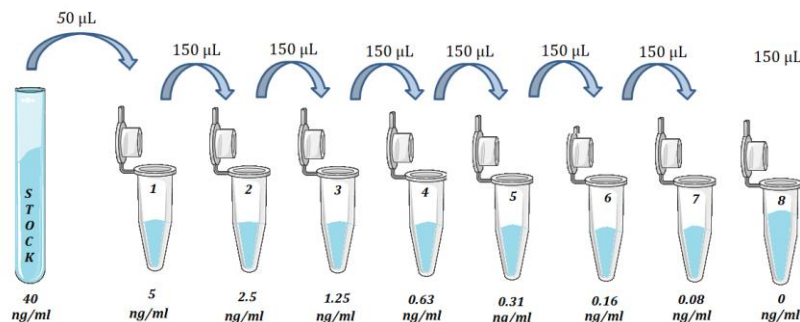
За определяне на концентрацията на секретирания *BAFF* протеин в културалните среди на *PBMC* беше използван *ELISA* тест. Наличието на *BAFF* в събраната културална среда на *PBMC*, която беше съхранена при -80°C , е количествено определено с помощта на търговски *ELISA* кит *Human BAFF ELISA Kit Cat. №188391 (Abcam)*, като бяха следвани стриктно инструкциите на производителя.

○ *Работен протокол*

Преди започване на работата по протокола, предварително бяха приготвени 1x *Wash Buffer* (за 50ml: 5ml *Wash Buffer 10x* и 45ml дестилирана вода - dH_2O) и т.нар. “антитялов коктейл” или микс (“*Antibody Cocktail*”), съдържащ захващащото антитяло и антитялото, необходимо за детекция на таргетния антиген. Антитяловият коктейл беше приготвен чрез разреждане на захващащото и детекторното антитяло в *Antibody Diluent 4BI* (за 3 ml “антитялов коктейл”: 300 μ l 10x *Detector antibody* и 10x *Capture antibody* с 2.4 ml *Antibody Diluent 4BI*).

1) Преди началото на експеримента всички материали и реагенти бяха темперирани на стайна температура.

2) Подготвяне на стандартите: Към шишенцето, съдържащо стандартния протеин бяха добавени 500 μ l dH_2O за получаване на изходния стандартен разтвор (“*stock solution*”) с концентрация 40 ng/mL. За подготвяне на стандартите бяха необходими осем епендорфни епруветки. Към епруветка 1 бяха добавени 350 μ l *Sample Diluent 25BS*, а в останалите епруветки (2-8) по 150 μ l *Sample Diluent 25BS*. Като се използва изходния стандартен разтвор, бяха приготвени падащи разреждания по начин, представен на *фиг. 12*. Единствено в епруветка 8 не беше добавен изходен (“*stock*”) разтвор и тази епруветка изпълняваше ролята на контрола.



Фигура 12: Схема, представяща подготвянето на стандарти с концентрация от 0 ng/ml до 5 ng/ml. Фигурата е създадена с помощта на *Servier Medical Art*, лицензиран съгласно *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License* (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

3) Накапани бяха по 50 μ l от пробите (кондиционираните среди) и стандартите в ямките на 96 ямковата плака.

4) Добавени бяха по 50 μ l от коктейла на антителата към всяка ямка.

5) Плаката беше покрита и инкубирана за 1 час на стайна температура и на шейкър, настроен на 400 rpm/мин.

6) Последва промиване на всяка ямка с 3 x 350 μ l 1x *Wash Buffer*.

- 7) Добавени бяха по $100 \mu\text{l}$ от субстрата (*TMB Development Solution*) към всяка ямка и отново последва инкубация за 10 мин. на тъмно, на шейкър – 400 rpm/мин .
- 8) Добавени бяха по $100 \mu\text{l}$ стоп разтвор към всяка ямка. Плаката беше оставена отново на шейкър за 1 мин., за да се гарантира хубавото смесване на реагентите.
- 9) Оптичната плътност (*OD*) беше отчетена при дължина на вълната 450 nm с помощта на *ELISA* четец (*Microplate Photometer MPP-96; Biosan, USA*).

- *Анализ на получените резултати:*

Осреднени бяха резултатите от повторенията за всеки стандарт и проба, след което получената средна стойност беше извадена от стойността на *BLANK* (получена с точка 0 pg/ml). Генерирана беше стандартна крива, като представена беше средната абсорбция, получена за концентрацията на всеки стандарт по хоризонталната (*X*) ос спрямо съответната концентрация на изследвания *BAFF* (ng/ml) по вертикалната ос. Изчисляването на концентрацията на *BAFF* в пробите се осъществи чрез интерполация на формулата на регресионната крива под формата на квадратно уравнение. Минималният детектируем праг на *ELISA* теста е 0.08 ng/ml , а максималният е 5 ng/ml .

2.3.2 Изследване на кондиционирани среди от ПВМС и ПВ-МСК за наличието на имunosупресивния ензим IDO

В основата на метода за *in vitro* количествено определяне на човешки *IDO* в супернатанти на клетъчни култури от *ПВМС* и *ПВ-МСК* е „сандвич“ *ELISA*.

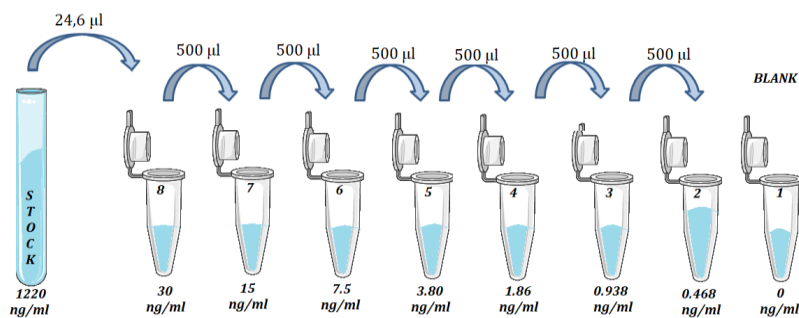
- *Използвани реактиви и консумативи*

Супернатантите от пробите на всички участници в проучването, както и кондиционираните среди на *ПВ-МСК*, бяха тествани за количествено определяне на *IDO* посредством търговски *ELISA* кит (*R&D System DuoSet Human Indoleamine 2,3-dioxygenase/IDO Catalog Number: DY6030-05 (5 plates) DuoSet® Ancillary Reagent Kit 2 (5 plates):DY 008*) при стриктно следване инструкциите на производителя.

- *Работен протокол*

Ден преди изпълнението на работния протокол, стартира подготовянето на плаката (стъпки от 1 до 4), целящо нейното натоваване с анти тяло, специфично за *IDO*.

- 1) Приготвяне на *Mouse Anti-human IDO Capture Antibody*: Виялката с лиофилизираното антитяло ($120\ \mu\text{g}$) беше разтворена с $0.5\ \text{ml}$ *PBS* (*Plate coating buffer*-готов за употреба). Това доведе до генерирането на разтвор на *Anti-human IDO Capture Antibody* с концентрация $240\ \mu\text{g/ml}$. Сток разтворът трябваше да бъде разреден до работна концентрация $2\ \mu\text{g/ml}$ (За $20\ \text{ml}$: $167\ \mu\text{L}$ разтвор на *Capture Antibody* + $19,833\ \text{ml}$ *PBS*). Останалата част от *Capture Antibody* беше съхранена на $2-8$ градуса за 8 седмици. Незабавно беше пипетирано по $100\ \mu\text{l/ямка}$ в 96 ямкова плака от разреденото *Capture Antibody*. Плаката беше запечатана и инкубирана за една нощ на стайна температура.
- 2) На следващия ден течността от всяка ямка беше премахната и плаката беше измита с предварително приготвен *Wash Buffer-3* пъти по $400\ \mu\text{l/ямка}$ (За приготвянето на $524\ \text{ml}$ *Wash Buffer 1x*: 1 виалка ($21\ \text{ml}$ $25x$) беше добавена към $504\ \text{ml}$ *dH2O*). Пълното отстраняване на течността на всяка стъпка е от съществено значение за доброто представяне. След последното измиване, остатъкът от *Wash Buffer* беше напълно премахнат чрез обръщане и потупване на плаката върху хартия.
- 3) Плаката беше блокирана посредством добавянето на $300\ \mu\text{l/ямка}$ предварително приготвен *Reagent Diluent 2* (*RD2*). За приготвянето на $120\ \text{ml}$: $12\ \text{ml}$ ($10x$ *RD2*), беше добавен към $108\ \text{ml}$ *dH2O*). Плаката беше инкубирана на стайна температура за 1 час.
- 4) Миене: както е описано в стъпка 2. Плаката беше готова за добавяне на пробите и стандартите.
- 5) Приготвяне на стандарти: *Recombinant Human IDO Standard* ($610\ \text{ng}$): Виялката беше разтворена с $0.5\ \text{ml}$ *RD2*. Това доведе до генерирането на стандарт с концентрация $1220\ \text{ng/ml}$. От разтворения стандарт бяха взети $24,6\ \mu\text{l}$ и бяха добавени към $975,4\ \mu\text{l}$ *RD2* до краен обем $1\ \text{ml}$. Това е стандарт 8 с концентрация $30\ \text{ng/ml}$. Останалите $475,4\ \mu\text{l}$ разтворен стандарт бяха разфасовани и съхранени на -70 за период не повече от 8 седмици. Приготвени бяха серийни-двойнопадащи разреждания, като за целта в епендорфки от 1 до 7 бяха предварително поставени по $500\ \mu\text{l}$ *RD2*. Взети бяха $500\ \mu\text{l}$ от стандарт 7 и поставени в епендорфка 6, след това от епендорфка 6 бяха взети $500\ \mu\text{l}$ и поставени в следващата и т.н. Епендорфка 1 е *BLANK*, в нея няма стандарт, а единствено $500\ \mu\text{l}$ *RD2* (фиг. 13).



Фигура 13: Схема, представяща приготвянето на стандарти с концентрация от 0 ng/ml до 30 ng/ml. Фигурата е създадена с помощта на Servier Medical Art, лицензиран съгласно Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

- 6) Пипетирани бяха по 100 µl/ямка от BLANK, стандартите и пробите. Плаката беше покрита и инкубирана за 2 часа на стайна температура.
- 7) Миене - 3 пъти с по 400 µl/ямка Wash Buffer.
- 8) Пипетирани бяха по 100 µl/ямка предварително приготвено Detection Antibody. Последва отново покриване на плаката и инкубиране за 2 часа на стайна температура. За приготвянето на Biotinylated Mouse Anti-Human IDO Detection Antibody виалката с лиофилизираното антитяло (3 µg) беше разтворена в 1 ml RD2. Това доведе до получаването на разтвор с концентрация 3 µg/ml. Антитялото трябваше да бъде разрежено до работна концентрация 50 ng/ml (за 20 ml: 333µL Detection antibody бяха добавени към 19.667ml RD2). Останалата част от разтвореното антитяло беше съхранена на 2-8 градуса за 8 седмици.
- 9) Миене - 3 пъти с по 400 µl/ямка Wash Buffer.
- 10) Добавени бяха по 100 µl/ямка от предварително приготвен Streptavidin-HRP (За 40 ml: 1 ml Streptavidin (40x) и 39 ml Reagent Diluent Buffer). Плаката беше покрита и инкубирана за 20 мин. на стайна температура и на тъмно.
- 11) Миене - 3 пъти с по 400 µl/ямка Wash Buffer.
- 12) Добавени бяха 100 µl/ямка от субстратния разтвор. Последва инкубиране за 20 мин. на стайна температура и на тъмно.
- 13) Цветната реакция беше стопирана чрез добавянето на 50 µl/ямка Stop разтвор. Внимателно разклащане на плаката беше необходимо за пълното смесване на реактивите.
- 14) Отчитането на получената цветна реакция беше направено спектрофотометрично на ELISA четец при дължина на вълната 450 nm.

- Анализ на получените резултати

За построяване на стандартна крива и за изчисляване на неизвестните концентрации на *IDO* беше използвана компютърна програма *QuantAssay v0.7.1.3*. Изчислени бяха средните стойности на абсорбция за всеки набор от повторения на стандарти, контроли и проби. Построена беше стандартна крива, използваща двукратните серийни разреждания. Количеството на *IDO* във всяка проба беше определено чрез интраполиране на стойностите на OD спрямо стандартните концентрации на *IDO*, като се използва построена стандартна крива. Минималният детектируем праг на теста е *0.47 ng/ml*, максималният детектируем праг е *30 ng/ml*.

2.3.3 Изследване на кондиционирани среди от РВМС и ПВ-МСК за наличие на Простагландин Е 2 (PGE2)

В основата на имуноензимната техника, използвана за количествено определяне нивата на *PGE2* в изследваните проби, е последователно конкурентно инхибиране и свързване. При наличие на *PGE2* в изследваната проба, той се конкурира с *PGE2*-белязан с *HRP*, за ограничения брой места за свързване към мише моноклонално антитяло, с което предварително е натоварена 96-ямковата плака. *PGE2*, наличен в изследваните проби, може да се свърже с антитялото още при първата инкубация. По време на втората инкубация, *HRP*-белязания *PGE2* се свързва с останалите свободни места на антитялото. Следва измиване за отстраняване на несвързаните молекули, а субстратен разтвор се добавя към ямките за определяне на активността на свързания ензим. Цветната реакция се стопира и абсорбцията се отчита при *450 nm*, като интензивността на цвета е обратно пропорционална на концентрацията на *PGE2* в пробата.

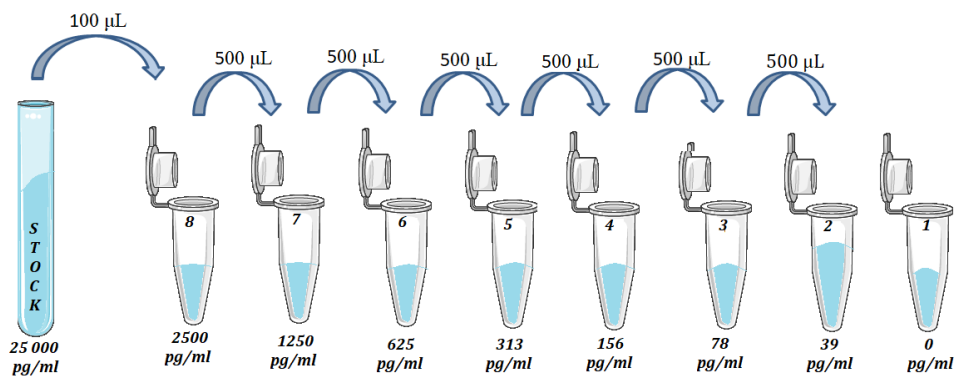
○ Използвани реактиви и консумативи

Супернатантите от пробите на всички участници в проучването, както и кондиционирани среди на *ПВ-МСК* бяха тествани за количественото определяне на *PGE2* посредством търговски *ELISA* кит (*R&D System, USA; Prostaglandin E2 Assay; Catalog Number: KGE004B*) при стриктно следване инструкциите на производителя.

○ Работен протокол

Всички реактиви бяха темперирани до стайна температура преди употреба. Преди започване на процедурата по анализ беше осъществена предварителна подготовка и приготвяне на необходимите реагенти.

- 1) Подготвяне на пробите: Всички проби изискват 3-кратно разреждане. Препоръчителното 3-кратно разреждане е $150\ \mu\text{l}$ проба + $300\ \mu\text{l}$ от Калибратор Разредител RD5-56.
- 2) Приготвяне на *Миещ буфер* (*Wash Buffer*): За приготвянето на $500\ \text{ml}$ *Wash Buffer*: $20\ \text{ml}$ *Wash Buffer* 25x концентрат бяха добавени към $480\ \text{ml}$ dH₂O.
- 3) Приготвяне на стандарти – Лиофилизираният PGE₂ стандарт ($25\ \text{ng}$) беше разтворен с $1\ \text{ml}$ dH₂O. Това разтваряне доведе до получаването на основен разтвор с концентрация $25\ 000\ \text{pg/mL}$. Полученият разтвор на стандарта беше оставен хубаво да се разтвори на стайна температура за минимум 15 мин. с леко разклащане, преди да бъдат направени последващите разреждания. Пипетирани бяха $900\ \mu\text{l}$ RD5-56 в епендорфка 8, а в останалите епендорфки (1-7) по $500\ \mu\text{l}$ RD5-56. Използван беше стандартният разтвор от $25\ 000\ \text{pg/mL}$, за да се създаде серия от разреждания (фиг. 14).



Фигура 14: Схема, представяща приготвянето на стандарти с концентрация от $0\ \text{pg/ml}$ до $2500\ \text{pg/ml}$. Фигурата е създадена с помощта на *Servier Medical Art*, лицензиран съгласно *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License* (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

- 4) Добавени бяха по $150\ \mu\text{l/ямка}$ стандарти и проби. Към ямките за неспецифично свързване (*NSB*) бяха добавени по $200\ \mu\text{l}$ RD5-56.
- 5) Добавени бяха по $50\ \mu\text{l/ямка}$ от *Primary Antibody Solution* (с изключение на *NSB* ямките). Всички ямки, с изключение на *NSB* ямките, бяха в син цвят.
- 6) Плаката беше покрита и инкубирана за 1 час на стайна температура на хоризонтален шейкър ($500 \pm 50\ \text{rpm}$).
- 7) Добавени бяха по $50\ \mu\text{l/ямка}$ PGE₂ конюгат към всяка ямка. Всички ямки, с изключение на *NSB* ямките, бяха оцветени във виолетов цвят.
- 8) Плаката беше покрита и инкубирана за 2 часа при стайна температура на шейкър.

- 9) Течността от всяка ямка беше премахната и последва миене, 3 пъти с по 400 μl /ямка *Wash Buffer*. Пълното отстраняване на течността на всяка стъпка беше от съществено значение за добрата производителност.
 - 10) Добавени бяха по 200 μl /ямка субстратен разтвор и последва инкубиране за 30 мин. на стайна температура и на тъмно.
 - 11) Добавени бяха по 100 μl /ямка *stop разтвор* за стопиране на цветната реакция. Цветът в ямките беше променен от син към жълт.
 - 12) Оптичната плътност беше определена в рамките на 30 мин. посредством *ELISA* четец на 450 nm.
- *Анализ на получените резултати*

Осреднени бяха показанията за всеки стандарт и проба, след което беше извадена средната оптична плътност на *NSB*. Създадена беше стандартна крива с помощта на компютърен софтуер *QuantAssay v0.7.1.3*. Концентрацията на *PGE2*, беше изчислена, съответстваща на средната абсорбция от стандартната крива (с намаляване на оптичната плътност, концентрацията на *PGE2* се повишава). Изчислената концентрация на пробите от стандартната крива беше допълнително умножена по фактора на разреждане (x3). Минималният детектируем праг на теста е 39.0 pg/ml , максималният детектируем праг е 2 500 pg/ml .

2.4 Графично представяне и статистическа обработка на получените резултати

Графичният дизайн на създадените фигури и статистическият анализ на суровите данни бяха извършени с помощта на специализирана софтуерна програма *GraphPad Prism* версия 8.0 и статистическият пакет *SPSS* версия 27.0. Дескриптивна статистика беше приложена за описание на демографската и клинична характеристика, както и за представянето на данни, относно имунологичните показатели на изследваните пациенти и здрави доброволци, взели участие в научното проучване част от настоящия дисертационен труд. Резултатите са представяни като средна аритметична стойност \pm стандартно отклонение – *Mean \pm Standart Deviation (SD)*. За да се определи подходящият стистически тест за сравнение на извадки (параметричен или непараметричен) бяха проведени тестове (тест на *Shapiro-Wilk* и тест на *Kolmogorov-Smirnov*), целящи проверка на нормалността на разпределението на данните за всеки изследван параметър.

Поради относително малкия брой на включените участници в дисертационния труд, както и разпределение на данните, различно от нормалното, беше приложен непараметричният тест на *Wilcoxon* за свързани извадки и беше прието ниво на статистическа значимост при $p \leq 0.05$. За данните с неправилно разпределение за несвързани извадки беше приложен непараметричният тест на *Mann-Whitney U* (статистическа значимост беше приета при $p \leq 0.05$). Получените резултати между трите групи бяха сравнени посредством приложението на *Kruskal-Wallis* тест, който позволява да се сравняват средните аритметични стойности на един и същ наблюдаван признак при две и повече извадки (статистическа значимост беше приета при $p \leq 0.05$).

За изследване на зависимости беше проведен корелационен анализ на *Спиърмън* (*Spearman's correlation*) за величини с разпределение различно от нормалното, при което зависимостта се отразява посредством коефициент на корелация (*Spearman's correlation coefficient – r*), с положителен или отрицателен знак, отразяващ посоката на зависимостта. (“r” - коефициент на корелация: $r < 0.3$ -слаба корелация; $0.3-0.5$ -умерена корелация; $0.5-0.7$ -силна корелация; > 0.7 -много силна корелация).

V. РЕЗУЛТАТИ

1. Обобщение на демографските, клиничните и имунологични характеристики на изследваните пациенти и здрави доброволци

Пациентите, участващи в настоящия дисертационен труд, бяха обстойно оценени въз основа на техните демографски, клинични и имунологични характеристики. В изследванията участие взеха и здрави доброволци ($n=10$) с равномерно полово разпределение: пет (50%) жени и петима (50%) мъже на средна възраст 33.5 ± 9.10 години. При изследваните пациенти с поставена диагноза СЛЕ ($n=17$) преобладаваха представителите на женския пол ($n=15$ (88%)) спрямо тези на мъжкия ($n=2$ (12%)). Средната възраст на включените в дисертационния труд болни със СЛЕ беше 42.71 ± 8.28 години. При пациентите с АС ($n=17$) средната възраст беше 41.53 ± 10.57 години, а половото разпределение почти равномерно, в полза на мъжкия пол (осем жени (47%) спрямо девет мъже (53%) (табл.13)).

| Изследвани групи лица | Възраст (години)* | Пол | | Давност на заболяването (години)* |
|------------------------------|-------------------|------------|------------|-----------------------------------|
| | | Жени n (%) | Мъже n (%) | |
| Здрави доброволци ($n=10$) | 33.5 ± 9.10 | 5 (50%) | 5 (50%) | - |
| Пациенти със СЛЕ ($n=17$) | 42.71 ± 8.28 | 15 (88%) | 2 (12%) | 6.82 ± 7.92 |
| Пациенти с АС ($n=17$) | 41.53 ± 10.57 | 8 (47%) | 9 (53%) | 10.59 ± 6.86 |

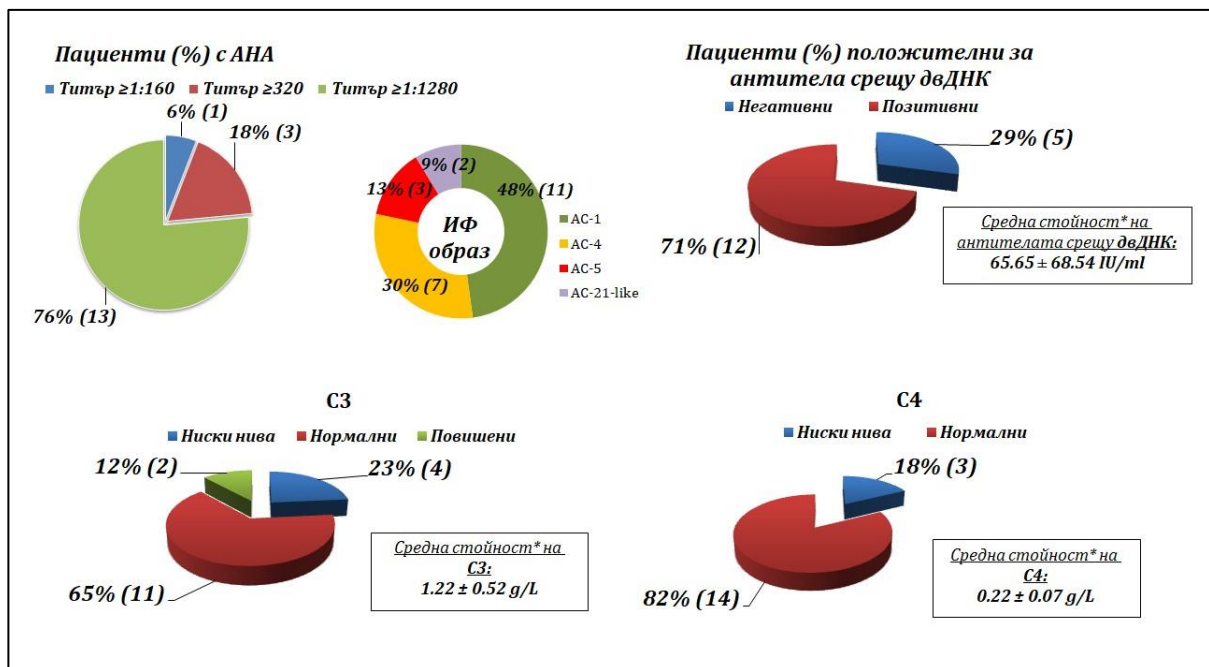
Таблица 13. Демографски и клинични характеристики на трите групи изследвани лица. *Данните са представени посредством $Mean \pm SD$.

Използвани съкращения: ЗД - здрави доброволци; СЛЕ – системен лупус еритематозус; АС – анкилозиращ спондилит;

Изследваните пациенти със СЛЕ бяха характеризирани и посредством имунологични параметри, включващи титър на АНА и имунофлуоресцентен образ, концентрация на антитела срещу *двДНК* и компонентите на комплемента С3 и С4. Преобладаваха пациентите със СЛЕ, които имаха титър на АНА $\geq 1:1280$ (13 (76%)), като трима от пациентите (18%) бяха с титър $\geq 1:320$ и един пациент с граничен титър $1:160$ (6%). По отношение на имунофлуоресцентния образ, единадесет (48%) пациента бяха с ядрен хомогенен образ (АС-1) и седем (30%) от пациентите бяха с дребнопетнисто ядрено светене (АС-4). Имаше и трима (15%) от пациентите, при които се съобщава за едро петнисто светене (АС-5) и двама (9%), при които в допълнение към ядрения образ, се наблюдава и цитоплазмено светене (АС-21-like). Част от пациентите (седем (41%)) бяха със смесен флуоресцентен образ. Преобладаваха пациентите с

позитивен резултат за *анти-двДНК* антитела (дванадесет (71%)) спрямо тези, които бяха с негативен резултат (петима (29%)).

Изчислената средна концентрация на *анти-двДНК* антитела при групата на болните със *СЛЕ* беше 65.65 ± 68.54 IU/ml. По отношение на концентрацията на *С3* компонента на комплемента, повечето пациенти бяха с нормални стойности (единадесет (65%)) спрямо референтните граници на теста. Едва четирима от пациентите със *СЛЕ* бяха с ниски нива на *С3* (23%) и двама бяха с повишени стойности (12%). Изследваните пациенти показаха подобна тенденция и по отношение на *С4* с преобладаване на болните с нормални стойности (четиринадесет (82%)) спрямо тези с понижени такива (трима (18%)), като липсват болни с повишени стойности на *С4*. Изчислените средни концентрации на *С3* и *С4* при болните със *СЛЕ* бяха съответно 1.22 ± 0.52 g/L и 0.22 ± 0.07 g/L (фиг. 15).



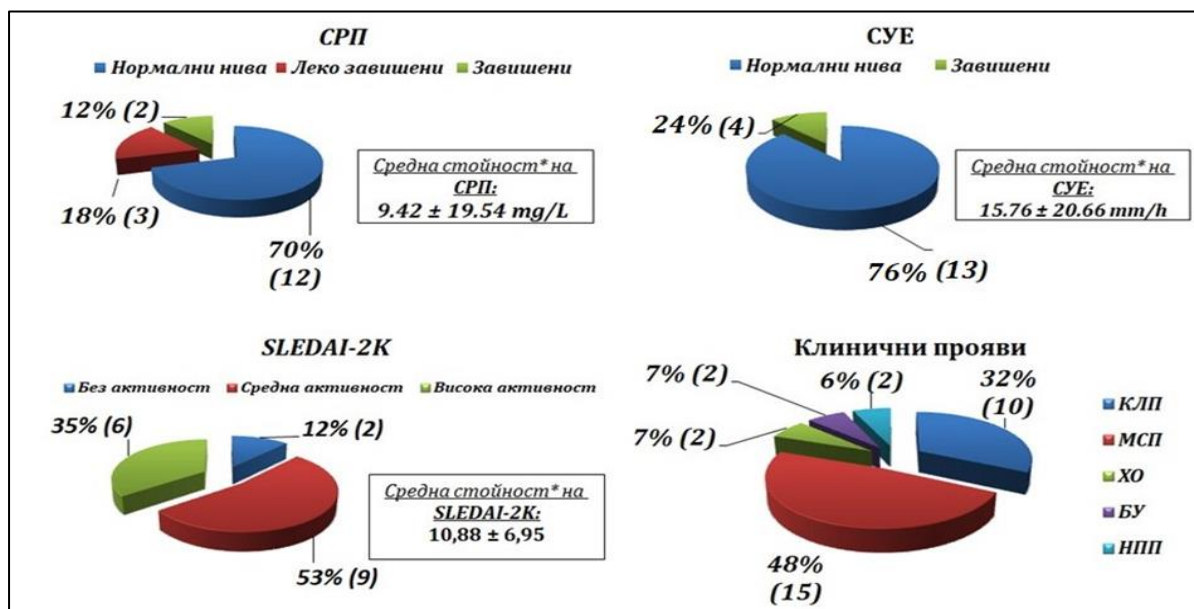
Фигура 15: Процентно разпределение на броя пациенти със системен лупус еритематозус (*СЛЕ*) по отношение на обобщени имунологични и лабораторни данни.

Използвани съкращения: *АНА* – анти-нуклеарни антитела; *двДНК* - двуверижна ДНК; *ИФ образ*-имунофлуоресцентен образ;

Данните бяха допълнени и посредством оценка на лабораторните биомаркери за възпаление *СРП* и *СУЕ*. Стойности на *СРП* под 6 mg/L бяха приети за отрицателни, от 6 до 20 mg/L бяха оценени като леко завишени и над 20 mg/L бяха оценени като завишени. Стойности на *СУЕ* под 18 mm/h бяха негативни, от 19 до 40 mm/h бяха определени като леко завишени и над 40 mm/h бяха възприети като силно повишени нива на възпалителния маркер. При групата болни с диагноза *СЛЕ* преобладаваха пациентите с нормални нива на *СРП* (дванадесет (70%)), следвани от тези с леко

завишени (трима (18%)) и двама пациенти показаха силно завишени нива на този острофазов белтък (12%). Средната стойност на *CRP* при пациентите със *СЛЕ* беше $9.42 \pm 19.54 \text{ mg/L}$. При същата група пациенти преобладаваха тези с нормални нива на *СУЕ* (тринадесет (76%)) и само четирима (24%) от пациентите бяха позитивни за *СУЕ*. Средната концентрация на *СУЕ* при групата на болните със *СЛЕ* беше изчислена на $15.76 \pm 20.66 \text{ mm/h}$ (фиг.16).

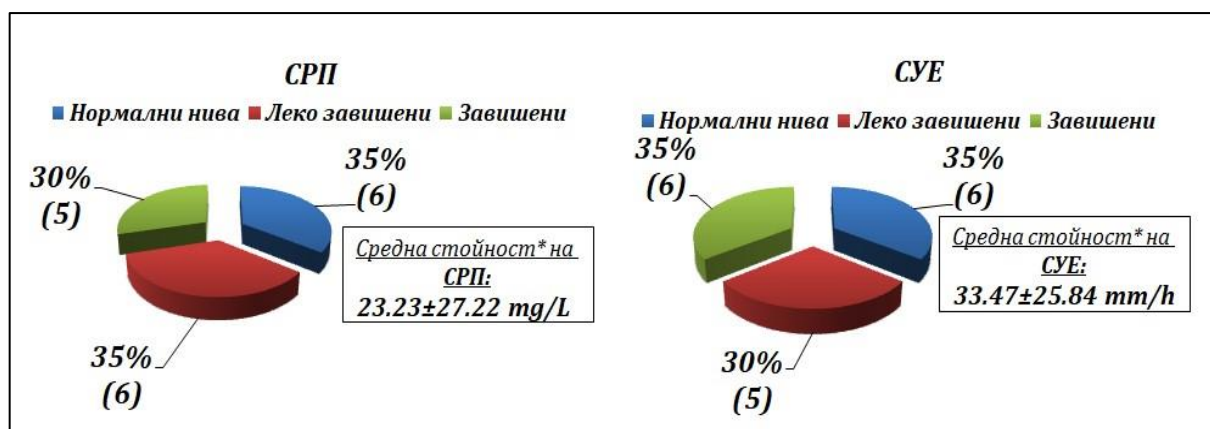
В допълнение, пациентите бяха категоризирани спрямо давността и нивото на активност на заболяването. Пациентите, диагностицирани със *СЛЕ* бяха със средна давност на заболяването 6.82 ± 7.92 (1-32 години). Активността на *СЛЕ* при пациентите беше оценена посредством *SLEDAI-2K* скората и обобщените данни показаха средна стойност 10.88 ± 6.95 , като преобладаваха болните със средно висока активност на заболяването (девет (53%)), следвани от тези с висока активност (шест (35%)) и двама от пациентите бяха с много лека активност на заболяването, определена по-скоро като липсваща активност (12%) към момента на включването им към експерименталната работа по дисертационния труд. По отношение на клиничните прояви на болестта при изследваните пациенти най-висок беше процентът на болните с *МСП* (петнадесет (48%)), следвани от тези с *КЛП* (десет (32%)), *ХО* (двама (7%)), *БУ* (двама (7%)) и *НПП* (двама (6%)) (фиг.16). Общо десет пациента със *СЛЕ* (59%) са на терапия с *НСО* и седем пациента (41%) са на лечение с *ИС*.



Фигура 16: Процентно разпределение на броя на пациентите със системен лупус еритематозус (*СЛЕ*) по отношение на обобщени лабораторни и клинични данни.

Използвани съкращения: *CRP* - С реактивен протеин; *СУЕ* – скорост на утаяване на еритроцитите; *КЛП* – кожно-лигавични прояви; *МСП* – мускулно – скелетни прояви; *ХО* – хематологични отклонения; *БУ* – бъбречно увреждане; *НПП* – невро-психиатрични прояви; *SLEDAI-2K* - Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index;

При групата на болните с *АС* почти равномерно бяха разпределени пациентите по отношение на тяхната концентрация на *СРП*. С нормални нива на *СРП* бяха шестима (35%) от пациентите, също толкова бяха и тези с леко завишени нива (шест (35%)) на възпалителния маркер *СРП*, като едва петима (30%) показаха завишени стойности на острофазния белтък спрямо референтните граници на теста. Средната концентрация на *СРП* при болните с *АС* беше оценена на 23.23 ± 27.22 mg/L. Обобщените данни при пациентите с *АС* показаха отново почти равномерно разпределение и по отношение на маркера за възпаление *СУЕ*. Еднакъв брой пациенти бяха със завишени (шестима (35%)) и с нормални стойности (шестима (35%)) на *СУЕ*, останалите петима пациенти показаха леко завишени стойности на възпалителния маркер (30%). Средната концентрация на *СУЕ* при пациентите с *АС* беше 33.47 ± 25.84 mm/h (фиг.17).

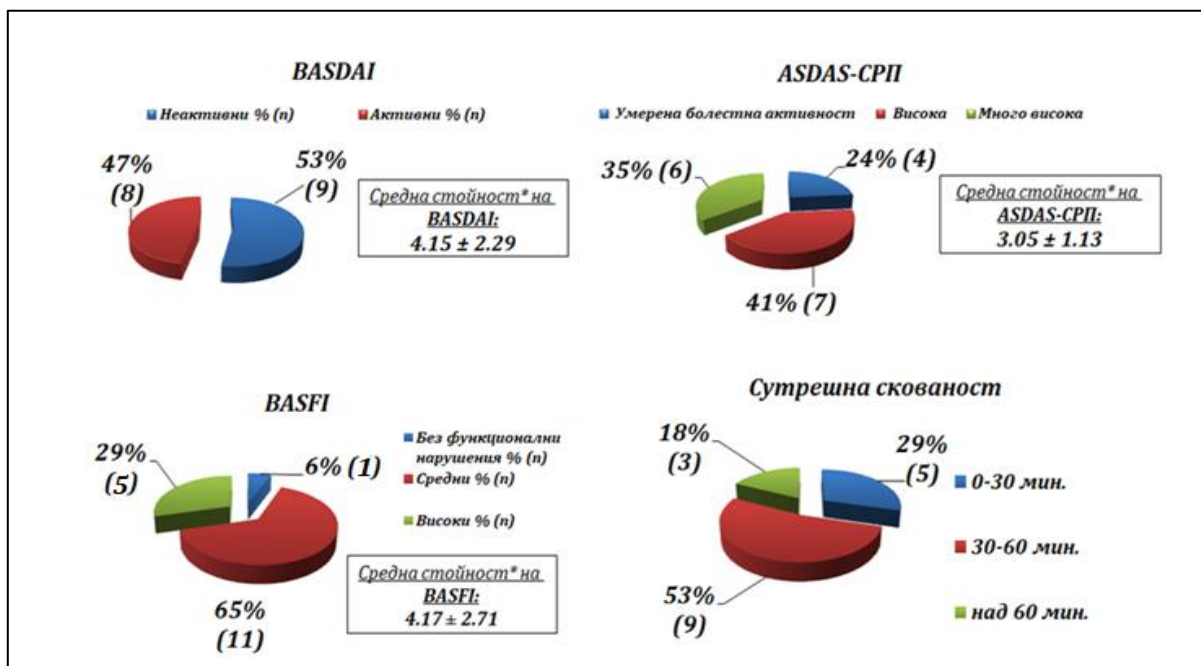


Фигура 17: Процентно разпределение на броя на пациентите с анкилозиращ спондилит (*АС*) по отношение на обобщени лабораторни данни.

Използвани съкращения: : *СРП* - *С* реактивен протеин; *СУЕ* – скорост на утаяване на еритроцитите;

Включените в проучването пациенти с *АС* бяха с умерено и висока активност на заболяването и средна продължителност 10.59 ± 6.86 години (1-22 години). При пациентите с *АС* бяха приложени три сора за оценка на болестната активност. От цялата кохорта болни с *АС* по отношение на *BASDAI* сора, осем пациента (47%) бяха с активност на заболяването, а девет (53%) бяха категоризирани като неактивни. Активността беше определена въз основа на индекса $BASDAI \geq 4$ и средната стойност на този показател при изследваните *АС* пациенти беше изчислена на 4.15 ± 2.29 . По отношение на функционалните нарушения на пациентите с *АС*, беше приложена оценка посредством *BASFI* сора, чиято средна стойност беше оценена на 4.17 ± 2.71 . Без функционални ограничения беше едва един от пациентите с *АС* (6%), като преобладаваха тези с високи (петима (29%)) и средни нарушения (единадесет (65%)) в своята функционална активност. Пациентите, които съобщават за продължителност на

сутрешна скованост между 30-60 мин. бяха девет (53%), петима (29%) бяха със сутрешна скованост до 30 мин. и трима (18%) с продължителност над 60 мин. В допълнение, използвахме и ASDAS скората, която оценихме по формула, включваща СРП. С висока активност ($ASDAS-CPI \geq 1.3$) бяха седем от пациентите (41%), шестима от пациентите бяха оценени с много висока активност (35%) и четирима с умерена болестна активност (24%) (фиг.18). Средната стойност на ASDAS-CPI беше оценена на 3.05 ± 1.13 (фиг.18). От изследваните пациенти с АС шестима (35%) са на лечение с НСПВС, един пациент (6%) е на терапия с ксБМАРЛ и десет (59%) са на терапия с БА.



Фигура 18: Процентно разпределение на броя пациенти с анкилозиращ спондилит (АС) по отношение на обобщени клинични данни.

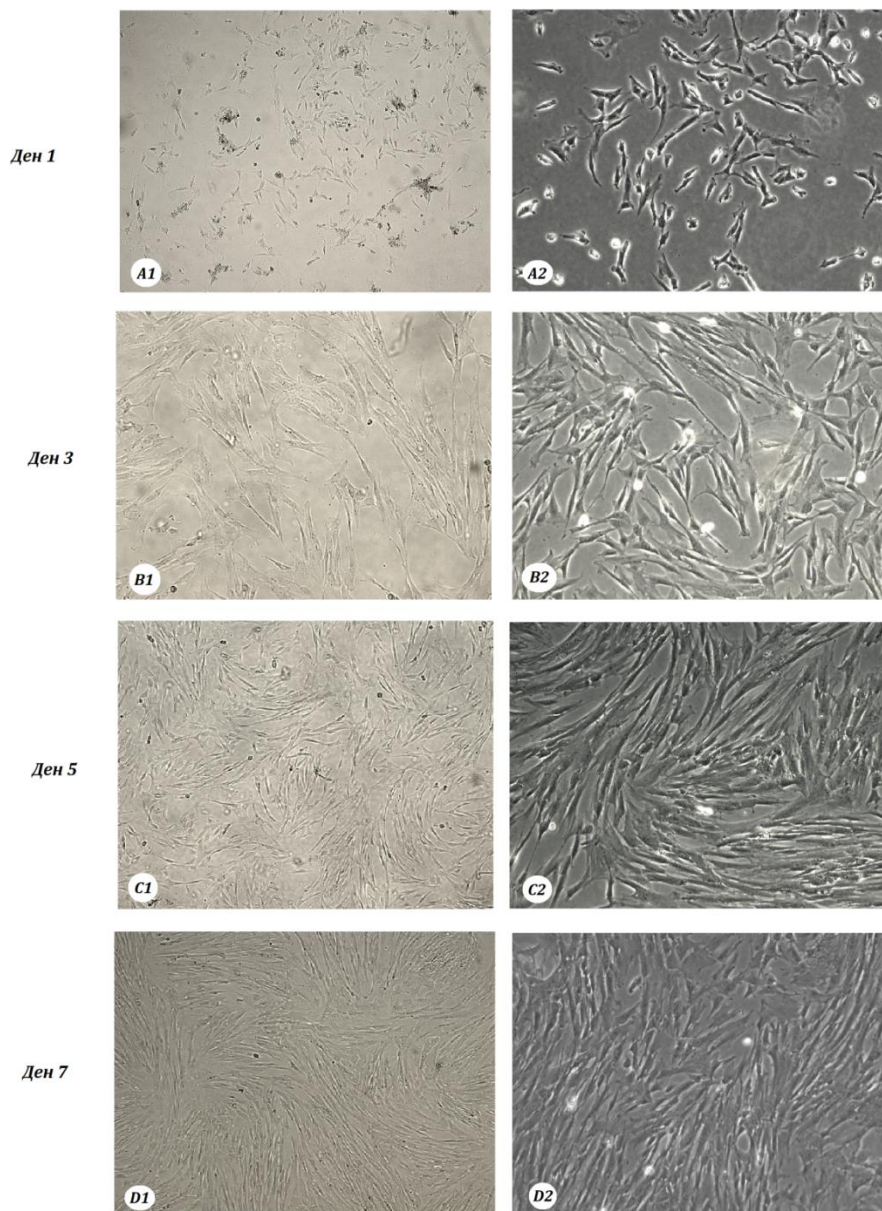
Използвани съкращения: BASDAI - Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI - Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; ASDAS-CPI - Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-C-реактивен протеин;

2. Изолиране, култивиране и получаване на кондиционирана среда от човешки ПВ-МСК

Човешки ПВ-МСК на здрави донори ($n=7$, възраст 25-38г.), взети доброволно след оперативно или нормално раждане, бяха успешно изолирани по начин описан подробно в раздел “Материали и Методи” на дисертационния труд. Клетките бяха доказани съгласно критериите на ISCT (Dominici et al., 2006).

Изолираните клетки от цяла пъпна връв представляват “смесена популация на МСК, която сме означили като ПВ-МСК. Средният клетъчен добив беше изчислен на $3-5 \times 10^6$ клетки/проба, а посредством използването на *Trypan blue* беше доказано, че $94.0 \pm 5.0\%$ от изолираните клетки от всички седем проби са жизнеспособни. Клетките

бяха посяти в концентрация 1×10^4 клетки/ cm^2 и оставени във влажен инкубатор ($37^\circ C$; $5\% CO_2$) за 24ч. Впоследствие, след замяна на старата среда с нова, потенциалът на клетките от всяка проба да адхерират към пластмасовата (поливинилхлоридна) повърхност на съдовете за клетъчно култивиране беше микроскопски визуализиран и документиран. Визуалната проверка посредством микроскоп показва хетерогенна популация от единични клетки на ПВ-МСК с различен размер, но с фибробластно-подобна морфология (фиг.19 А1 и А2). Клетките бяха култивирани по описания вече начин в продължение на 7-10 дни, като беше наблюдавана и документирана последователно тяхната пролиферация (фиг.19 В-Д). Получаването на кондиционирана среда от всяка една проба беше осъществено след достигане на 80-90% конfluентност (около 7^{ми} ден) (фиг.19 Д1 и Д2) на клетките във всеки един флак за клетъчно култивиране ($25cm^2$).



Фигура 19: *Репрезентативни светлинно-микроскопски снимки на изолирани човешки ПВ-МСК. Документирана е последователно пролиферацията и in vitro експанзия на първичната култура (пасаж 0) на ден 1 (А) след изолирането на МСК от пънна връв, ден 3 (В), ден 5 (С) и ден 7 (D) с видима фибробластно-подобна морфология. При достигане на 80-90% конфлуентност (D) беше успешно получена, необходимата кондиционирана среда за провеждането на изследванията част от дисертационния труд.*

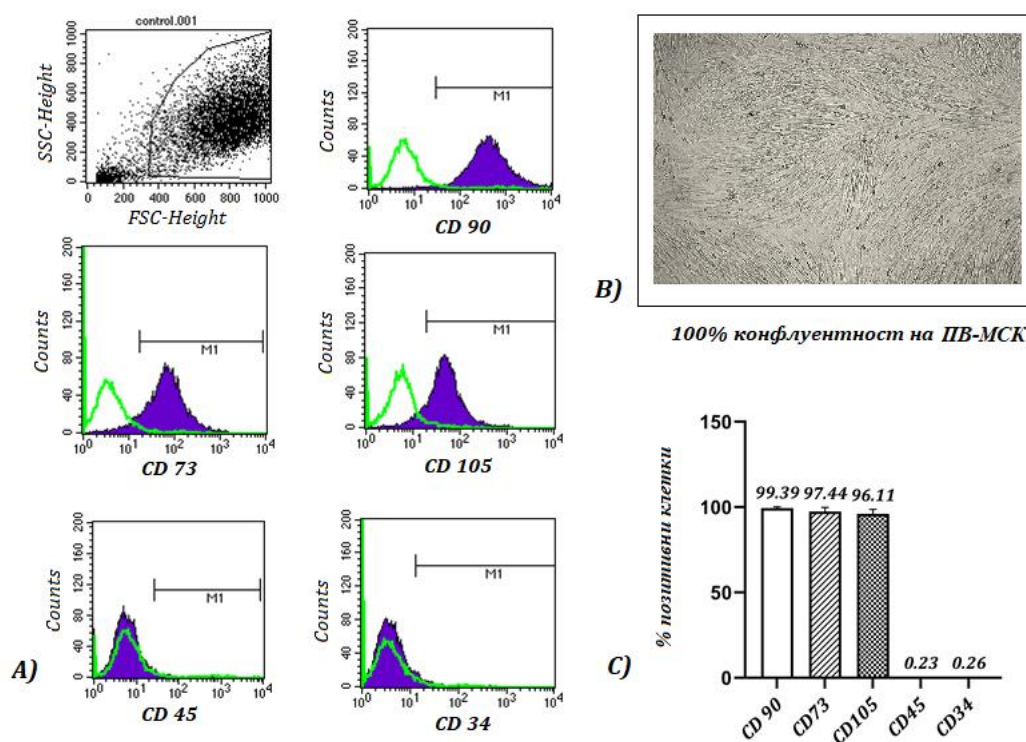
Забележка: *С 1 са представени светлинно-микроскопски снимки, а с 2 са представени фазово-контрастни микроскопски снимки (увеличение: $\times 100$ за всички изображения с изключение на А1, С1, D1: увеличение $\times 50$).*

3 Характеризиране на изолираните от пънна връв мезенхимни стволови клетки

3.1 Фенотипизиране на мезенхимни стволови клетки

Съгласно описаните минимални критериите на *ISCT* за окачествяване на клетките, успешно беше доказана експресията на маркери, характерни за *МСК*.

Имунофенотипният анализ на ПВ-МСК се извърши посредством поточна цитометрия (FACS анализ) за всяка проба ($n=7$) от пъпна връв. При достигане на пълна конфлуентност клетките бяха трипсинизирани, измити, преброени и анализирани според протокола, описан в раздел “Материали и Методи”. Анализираните проби показаха сходна фенотипна експресия на маркерите *CD90*, *CD73*, *CD105*, както и негативна експресия на маркери, характерни за хематопоеичната линия (*CD45/CD34*). Висока експресия ($\geq 95\%$) се наблюдаваше на *CD90* ($99.39 \pm 0.82\%$), *CD73* ($97.44 \pm 2.43\%$) и *CD105* ($96.11 \pm 2.55\%$), като експресията на *CD105* беше отчетена като най-ниска в сравнение с останалите положителни маркери. Минимално контаминиране от хематопоеични клетки ($CD45^+ - 0.23 \pm 0.22\%$ и $CD34^+ - 0.26 \pm 0.18\%$) беше наблюдавано при всички култури. На *fig. 20* са представени обобщените данни от проведеното фенотипизиране на клетките, изолирани от пробите пъпни върви, включени в дисертационния труд.



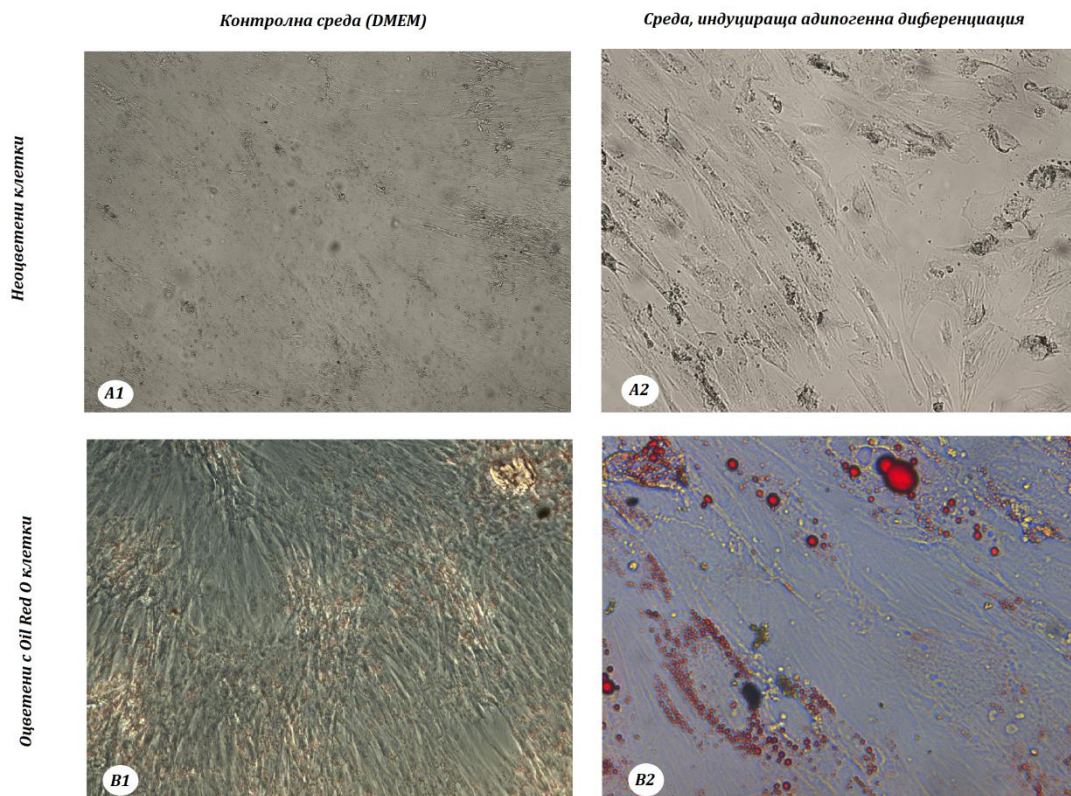
Фигура 20: Фенотипно характеризиране на МСК. Флуцитометрични хистограми, представящи експресията на маркерите *CD90*, *CD73*, *CD105*, както и отсъствието на маркери, характерни за хематопоеичната линия. На светлинно-микроскопската снимка е представена степента на конфлуентност (100%) на клетките, при която е осъществен анализа. На графиката са представени средните стойности на процентите (Mean \pm SD) за всеки изследван маркер (данните са средни от седем експеримента).

3.2 Изследване на диференциационния потенциал на изолираните мезенхимни стволови клетки

Капацитетът на *ПВ-МСК* да се диференцират в адипоцити и остеобласти също беше разгледан, тъй като е функционално изискване на *ISCT* за определяне и идентифициране на изолираните клетки като *МСК*. Клетъчната диференциация е сложен процес, характеризиращ се с фенотипна и метаболитна трансформация, придружен от последователна експресия на транскрипционни фактори и техните гени, чиито продукти изпълняват впоследствие тъканно специфични функции. За да се докаже, че изолираните от нашия екип клетки са популация на *МСК*, от която на следващ етап бяха добити необходимите кондиционирани среди, изискваше да се изследва тяхната способност за *in vitro* диференциация в мезенхимни линии. За целта, културална среда, обогатена с диференциращи фактори, беше добавяна към клетките за стимулиране на адипогенна/остеогенна диференциация в продължение на 21 дни. Потенциалът за диференциация на изолираните *МСК* от всички проби беше успешно доказан и визуализиран посредством положително тъканно-специфично оцветяване с *Oil Red O*, *Alizarin Red*, както и специфично оцветяване по *Von Kossa*.

3.2.1 Адипогенна диференциация

За *in vitro* изследване на диференциационния потенциал на *МСК* в адипогенна насока, клетките бяха култивирани в среда, обогатена с екзогенни диференциационни фактори, индуциращи адипогенеза. Оцветяването с *Oil Red O* подчертава мастните натрупвания в адипоцитите, оцветявайки ги в червено и осигурява чудесен визуален индикатор за наличието на формирани липидни вакуоли. Като доказателство на това резултатите показаха успешно диференциране на третираните *МСК* в адипогенна насока с ясно видими интрацитоплазмени липидни капчици, богати на триглицериди (*фиг. 21*), които бяха ярко оцветени в червено. Настъпилите промени са достоверен показател за успешното насочване на клетките от мултипотентно състояние към специфичен път на диференциация (в случая адипогенна), последвано от увеличаване на експресията на специфични за адипоцитите гени и придобиване на фенотип, характерен за зрелите мастни клетки. Относно нетретираните с индуцираща среда клетки (*контрола*), които бяха паралелно култивирани с *DMEM* (*контролна*) среда, не установихме подобен адипогенен фенотип с формиране на неутрални липидни вакуоли и следователно при тях липсваше характерното червено оцветяване.



Фигура 21: Репрезентативни светлинно-микроскопски снимки на адипогенно-диференцирани ПВ-МСК. Увеличение: (A1 и B1 x 50; A2 – x100; B2 x 400)

A-неоцветени клетки

B-оцветени с Oil Red O клетки (фазово-контрастни снимки)

1-клетки, култивирани в контролна среда (DMEM)

2-клетки, култивирани в среда, индуцираща адипогенна диференциация

Снимките са репрезентативни от 3 независими експеримента

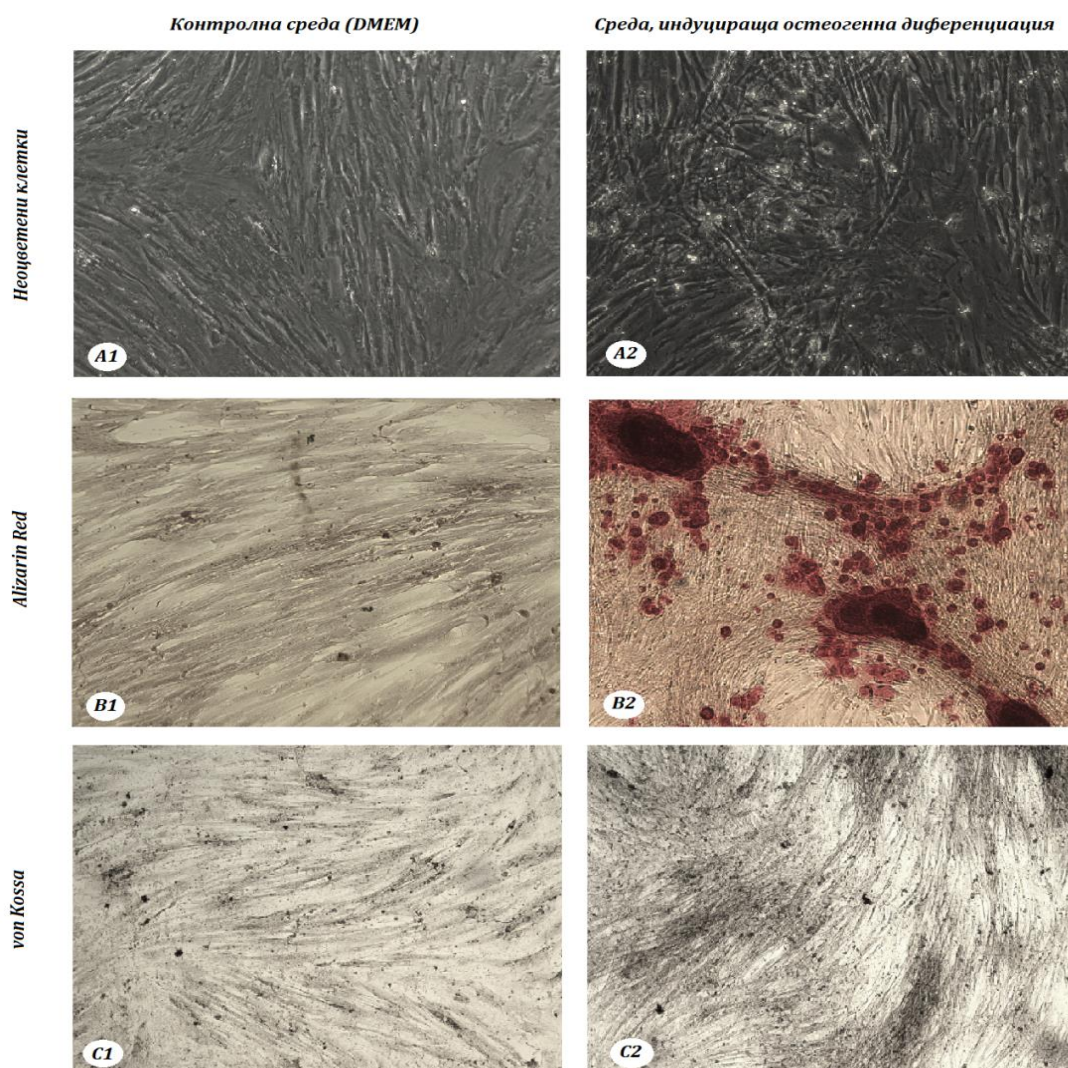
3.2.2 Остеогенна диференциация

За *in vitro* определяне на диференциационния потенциал на МСК в остеогенна насока, клетките бяха култивирани в среда, обогатена с екзогенни диференциационни фактори, химически индуциращи остеогенеза. Характеризирането на остеодиференциацията беше осъществено чрез оцветяване на Ca^{2+} отлагания (индикация на последната фаза от фенотипното развитие на остеобластите) с помощта на *Alizarin Red* и $AgNO_3$ (Оцветяване по Von Kossa).

Оцветяването с *Alizarin Red* успешно маркира в червено отлаганията на калциев фосфат (хидроксиапатит $Ca_5(PO_4)_3(OH)$), които се наблюдаваха единствено в третираните с остеогенна среда ПВ-МСК (фиг.22 B2), но не и в контролната група ПВ-МСК (фиг. 22 B1).

Другият използван метод на оцветяване се базира на основата на реакция на преципитация, при която сребърни йони реагират с фосфат, което води до образуването на черни преципитати. След инкубацията на клетките с $AgNO_3$, плътното черно

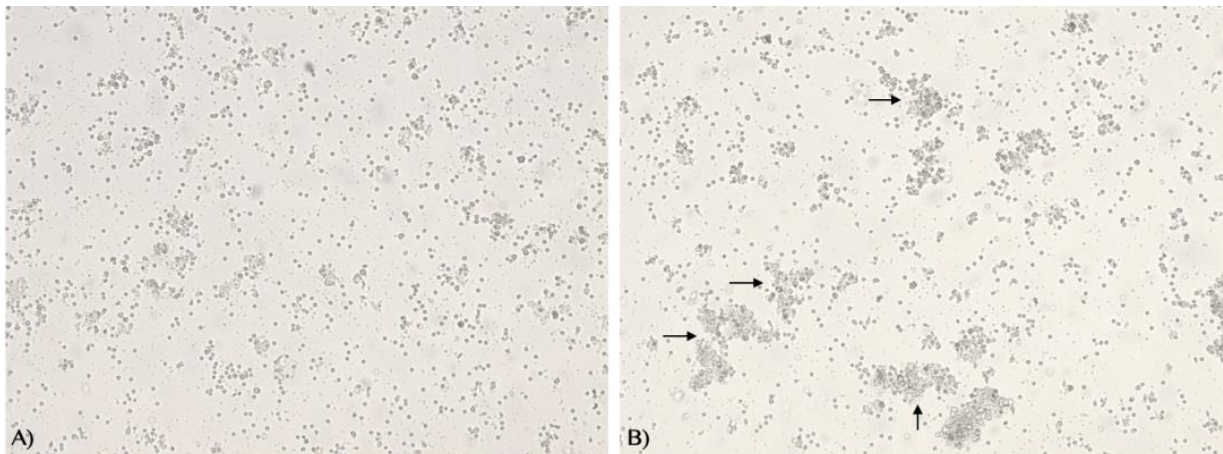
оцветяване (*Von Kossa*) на представените микроскопски снимки е сребърен фосфат, който замества калциевия фосфат, присъстващ в клетките и също е индикация за положително оцветяване след успешната диференциация на третираните *МСК* в остеоласти (*фиг.22*). За разлика от културите на *МСК*, култивирани в остеогенна среда, които са видимо положителни (*фиг. 22 С2*), култивираните *МСК* в контролна среда - *DMEM* (*фиг. 22 С1*), не показаха отлагания на сребърен фосфат, характерни за групата на диференцираните клетки.



Фигура 22: Репрезентативни светлинно-микроскопски снимки на остеогенно-диференцирани ПВ-МСК. Увеличение: (*A1;A2;B1;C1;C2 x 100; B2 – x50;*)
A-неоцветени клетки (фазово-контрастни снимки)
B-оцветени с *Alizarin Red* клетки
C-оцветени по *Von Kossa* (AgNO_3) клетки
1-клетки, култивирани в контролна среда (*DMEM*)
2-клетки, култивирани в среда, индуцираща остеогенна диференциация
 Снимките са репрезентативни от 3 независими експеримента

4 Изолиране и култивиране на РВМС от здрави доброволци, пациенти със СЛЕ и АС

За целите на настоящия дисертационен труд успешно бяха изолирани РВМС от венозна кръв на здрави донори ($n=10$), пациенти със СЛЕ ($n=17$) и пациенти с АС ($n=17$). Клетките бяха култивирани впоследствие в две среди: кондиционирана среда на МСК от пъпна връв (ПВ-МСКкк) и стандартна/контролна среда за клетъчно култивиране (Контролна среда - DMEM/F12 + 10% FBS + 1% смес от пеницилин/стрептомицин/амфотерицин В микс). Средната концентрация на изолираните РВМС от трите групи участници е: РВМС_{зд} ($1.42 \times 10^7 \pm 0.23$), РВМС_{СЛЕ} ($1.25 \times 10^7 \pm 0.67$), РВМС_{АС} ($1.67 \times 10^7 \pm 0.55$), а средната жизнеспособност на изолираните клетки беше оценена на $\geq 97\%$. Това, което нашият екип установи след 3-дневното клетъчно култивиране, бяха видими под светлинен микроскоп фенотипни промени в морфологията и поведението на РВМС при трите изследвани групи участници, когато клетките бяха под влияние на факторите в средата на МСК, но не и, когато бяха при нормални условия на култивиране в контролната среда. При РВМС култивирани в ПВ-МСКкк, след 72 часа на инкубация, се наблюдаваше образуването на големи клъстери от витални клетки, комуникиращи една с друга (фиг. 23). Успешно бяха събрани културалните среди на РВМС от всяка опитна постановка и съхранени за последващите имуноензимни методи (-80°C).



Фигура 23: Светлинно-микроскопски снимки (100x) на РВМС след 72 часа на култивиране. **А)** РВМС, култивирани в контролна среда (Контролна среда) и **В)** РВМС, култивирани в кондиционирана среда на МСК от пъпна връв (ПВ-МСКкк), със значително по-голяма степен на образувани клетъчни клъстери (черни стрелки). Снимките са на РВМС от здрав донор и са репрезентативни на всички проведени експерименти ($n=44$).

5 Флоуцитометрично определяне на промяната на повърхностната експресия на специфични В-клетъчни маркери, свързани с тяхната активация, антиген-представяща функция и преживяване, под влияние на секретом от МСК

След изтичане на 3-дневния период на култивиране на моноклеарните клетки в контролна/кондиционирана среда на *ПВ-МСК* и последващият флоуцитометричен анализ, представянето на получените резултати осъществихме посредством определяне на процент В клетки, които експресират дадена таргетна молекула при трите групи изследвани лица. Общият процент В клетки в отделните опитни постановки беше приблизително еднакъв: средният процент на В лимфоцитите при изследваните пациенти със *СЛЕ* беше 5.32%, при *АС* - 5.01% , а при здравите контроли - 4.59%. За пълнота и яснота на получените данни решихме да сравним не само какъв процент от В лимфоцитите експресират таргетния маркер, но какъв е и средният интензитет и нивото на мембранна експресия - *MFI (Mean Fluorescence Intensity)* на изследвания маркер под влияние на секретом от *МСК*. В следващите точки на тази част от раздел “*Резултати*” са представени последователно получените данни за всеки един от изследваните маркери.

5.1 Влияние на секретом от МСК върху В-клетъчната експресия на CD80

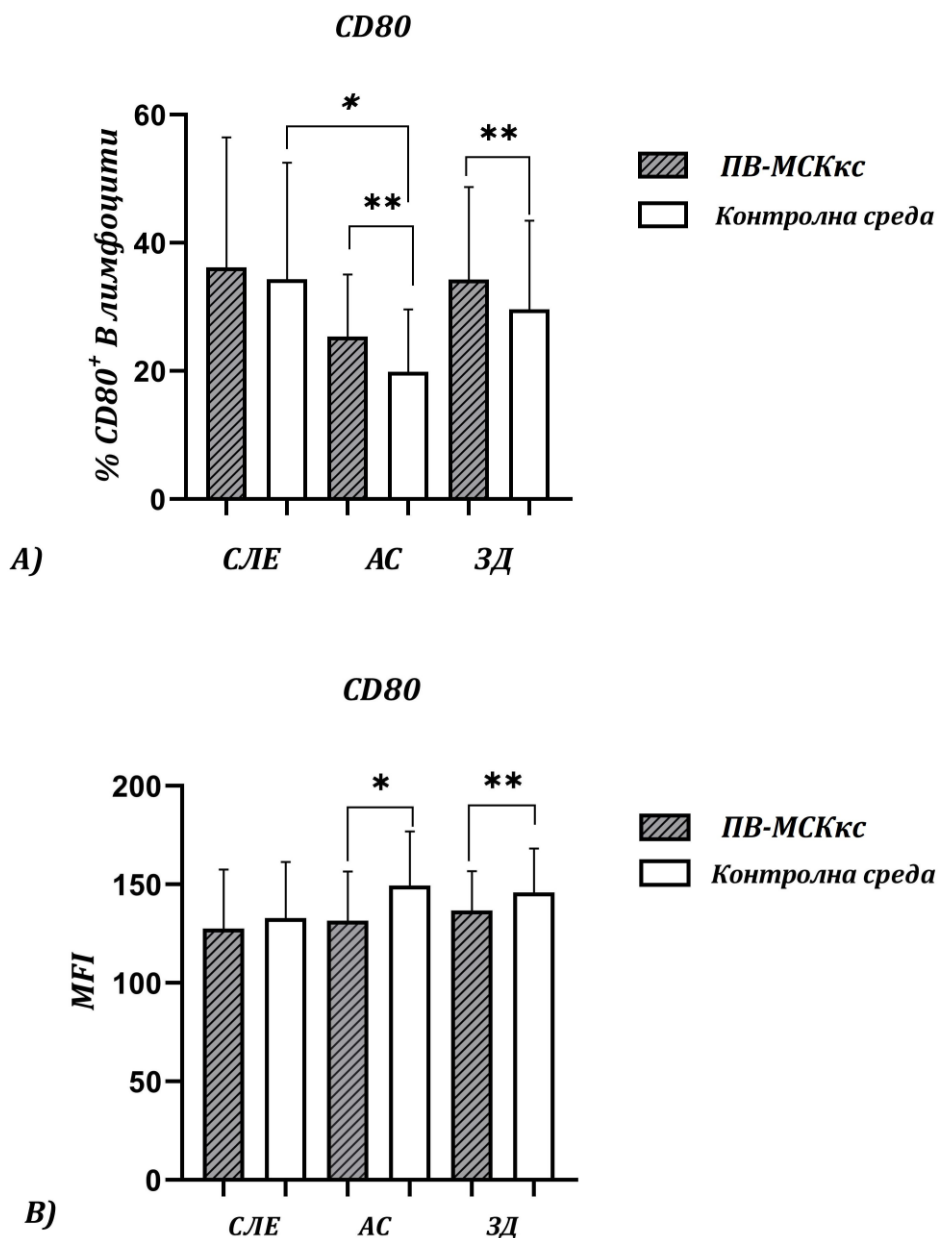
Като професионални *АПК* активираните В лимфоцити могат индиректно да допринесат за зараждането или разпространението на автоимунния процес. Ето защо, съществен фокус на настоящия дисертационен труд е проследяване на експресията на молекулите част от *B7* ко-стимулаторния комплекс поотделно. Това, което установихме е, че при култивирането на *PBMC* в кондиционирана среда на *МСК* от пъпна връв процентът на В лимфоцитите, позитивни за експресията на *CD80* молекулата, беше по-висок в сравнение с процента на В лимфоцити, експресиращи тази молекула в контролната група. Тази тенденция се наблюдаваше и при трите групи участници в научното проучване. Сигнификантно по-висок процент на В клетки, от *АС* болни и здрави индивиди, позитивни за *CD80* под влияние на секретом от *МСК* ($25.39 \pm 9.70\%$ и $34.26 \pm 14.48\%$) спрямо В лимфоцити от същите изследвани групи лица, култивирани в контролна среда ($19.86 \pm 9.76\%$; $p=0.0040$ и $29.64 \pm 13.85\%$; $p=0.0039$). При пациентите със *СЛЕ* не установихме сигнификантно значима разлика, но отново по-висок беше процентът на В лимфоцитите, експресиращи *CD80* под влияние на фактори, освободени от *МСК* ($36.17 \pm 20.33\%$ спрямо $34.30 \pm 18.22\%$; $p=0.1089$).

Относно интензитета на експресия на тази молекула (*CD80*) върху мембраната на В клетките, това което нашият екип установи беше статистически значимо по-ниско

ниво на експресия на *CD80* при В лимфоцити под действие на фактори, освободени от *МСК* при здрави доброволци (136.71 ± 20.07 спрямо 145.93 ± 22.26 $p=0.0020$) и пациенти с *АС* (134.40 ± 23.82 спрямо 149.39 ± 27.48 ; $p=0.0232$) (фиг. 24). При пациентите със *СЛЕ* също се наблюдаваше тенденция за понижен интензитет и ниво на експресия на молекулата *CD80* върху В-клетъчната мембрана след култивирането на клетките в кондиционирана среда на *МСК*, но без установена статистическа достоверност на получените резултати (127.66 ± 30.01 спрямо 132.92 ± 28.44 ; $p=0.0887$).

При сравняване на получените общи средни стойности на процент В лимфоцити, експресиращи *CD80* молекулата между трите групи изследвани участници, не установихме статистически значима разлика ($\chi^2=5.12$; $p=0.0775$). Единствено, след проведен *Man-Whitney U test* се наблюдаваше сигнификантно по-висок процент на *CD80*⁺ В лимфоцити на болни със *СЛЕ* ($34.30 \pm 18.22\%$), култивирани в контролна среда спрямо този на В лимфоцитите при същата опитна постановка на пациенти с *АС* ($19.86 \pm 9.76\%$; $p=0.0376$).

На фиг. 24 са представени графично обобщените получени резултати от всички експериментални постановки като средна стойност на (А) процент В клетки, позитивни за експресията на *CD80* маркера, както и (В) *MFI* на тази молекула при пациентите спрямо здравите контроли.



Фигура 24: Графично представяне на процент $CD19^+CD80^+$ В клетки **А)** и MFI на $CD80$ молекулата на В-лимфоцитната мембрана **В)**; Данните са представени като Mean \pm SD и са обобщаващи за всички експериментални постановки на СЛЕ (n=17), АС (n=17) и ЗД (n=10). Статистически значима разлика в данните е представена след проведени: тест на Wilcoxon и Mann-Whitney U тест (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$). **Използвани съкращения:** СЛЕ-Системен лупус еритематозус; АС- Анкилозиращ спондилит; ЗД-Здрави доброволци; MFI-Mean Fluorescence Intensity; ПВ-МСКкс – кондиционирана среда от мезенхимни стволови клетки от пълна връв

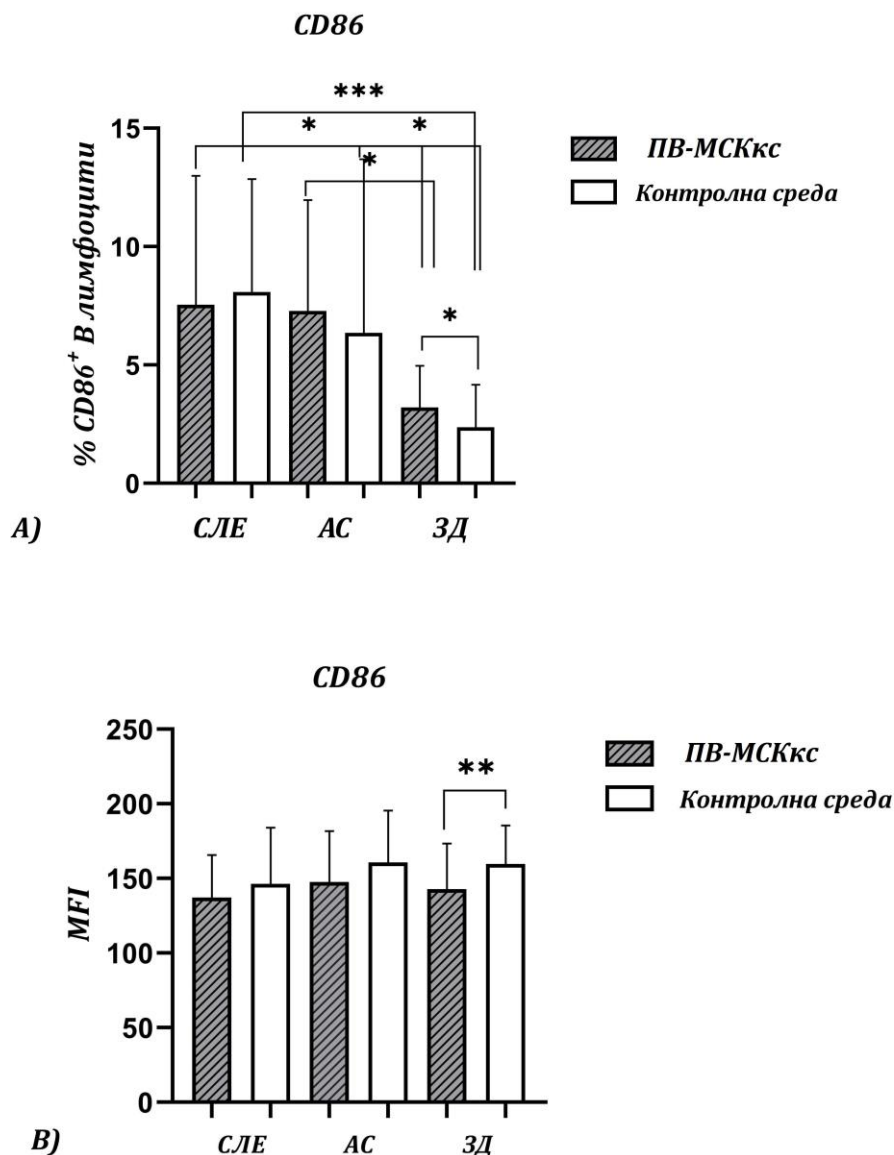
5.2 Влияние на секретом от МСК върху В-клетъчната експресия на $CD86$

Процентът на $CD19^+CD86^+$ В лимфоцити под влияние на секретом от МСК беше числено, но несигнификантно по-висок спрямо контролната група на РВМС при пациенти с поставена диагноза АС (7.28 ± 4.69 % спрямо $6.36 \pm 7.33\%$; $p=0.0638$), но без налична промяна на $CD86^+$ В лимфоцитите от двете опитни постановки при

болните със *СЛЕ* ($7.55 \pm 5.44\%$ спрямо $8.08 \pm 4.78\%$; $p=0.4038$) (фиг. 25 А). Единствено при здравите доброволци беше отчетена статистически значима разлика по отношение на процент В лимфоцити, експресиращи *CD86* от пула на *PBMC*, култивирани в кондиционирана среда на *МСК* спрямо тези, които са култивирани в контролна среда ($3.85 \pm 3.40\%$ спрямо $2.65 \pm 2.20\%$; $p=0.047$) (фиг 25 А).

Въпреки умерено повишеният процент на В лимфоцити, експресиращи *CD86* при пациенти с *АС* и здрави доброволци под действие на секретом от *МСК*, по отношение на средния интензитет на флуоресценция на тази молекула отчетен на мембраната на В клетките, той беше значително понижен и при трите групи участници. Статистическа достоверност на получените данни установихме единствено при здравите лица (145.40 ± 30.32 спрямо 163.00 ± 28.59 ; $p=0.0039$), но не и при болните със *СЛЕ* (137.08 ± 28.69 спрямо 146.32 ± 37.83 ; $p=0.0569$) и *АС* (147.50 ± 34.28 спрямо 160.71 ± 34.80 ; $p=0.1901$).

При сравняване на получените резултати между трите групи участници сигнификантна разлика беше установена между средните стойности на процент лимфоцити, позитивни за *CD86*, култивирани в контролна среда ($\chi^2=13.57$, $p= 0.0011$) и *CD86*⁺ В клетки, култивирани в кондиционирана среда на *МСК* ($\chi^2=7.29$, $p= 0.0261$). Култивирането на *PBMC* в контролна среда доведе до сигнификантно по-висок процент на *CD86*⁺ В клетки при пациенти със *СЛЕ* ($8.08 \pm 4.78\%$) спрямо процента на *CD19*⁺ *CD86*⁺ клетките на здравите лица ($2.65 \pm 2.20\%$; $p=0.0002$). Същата тенденция на сигнификантно по-висок процент на *CD86*⁺ В лимфоцити се наблюдаваше в контролната група при болните с *АС* ($6.36 \pm 7.33\%$) спрямо здравите доброволци ($2.65 \pm 2.20\%$; $p=0.0151$). По отношение на процент *CD86*⁺ В лимфоцити, култивирани в кондиционирана среда на *ПВ-МСК*, отново сигнификантно по-висок беше процентът на *CD86*⁺ В клетки на пациенти със *СЛЕ* ($7.55 \pm 5.44\%$; $p=0.0110$) и *АС* ($7.28 \pm 4.69\%$; $p=0.0203$) спрямо този, установен при здравите участници ($3.85 \pm 3.40\%$) (фиг 25).



Фигура 25: Графично представяне на процент $CD19^+CD86^+$ В клетки **A)** и MFI на $CD86$ молекулата на В-лимфоцитната мембрана **В)**; Данните са представени като Mean \pm SD и са обобщаващи за всички експериментални постановки на СЛЕ (n=17), АС (n=17) и ЗД (n=10). Статистически значима разлика в данните е представена след проведени тест на Wilcoxon и Mann-Whitney U тест (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

Използвани съкращения: СЛЕ-Системен лупус еритематозус; АС- Анкилозиращ спондилит; ЗД-Здрави доброволци; MFI-Mean Fluorescence Intensity; ПВ-МСКкс – кондиционирана среда от мезенхимни стволови клетки от пънна връв

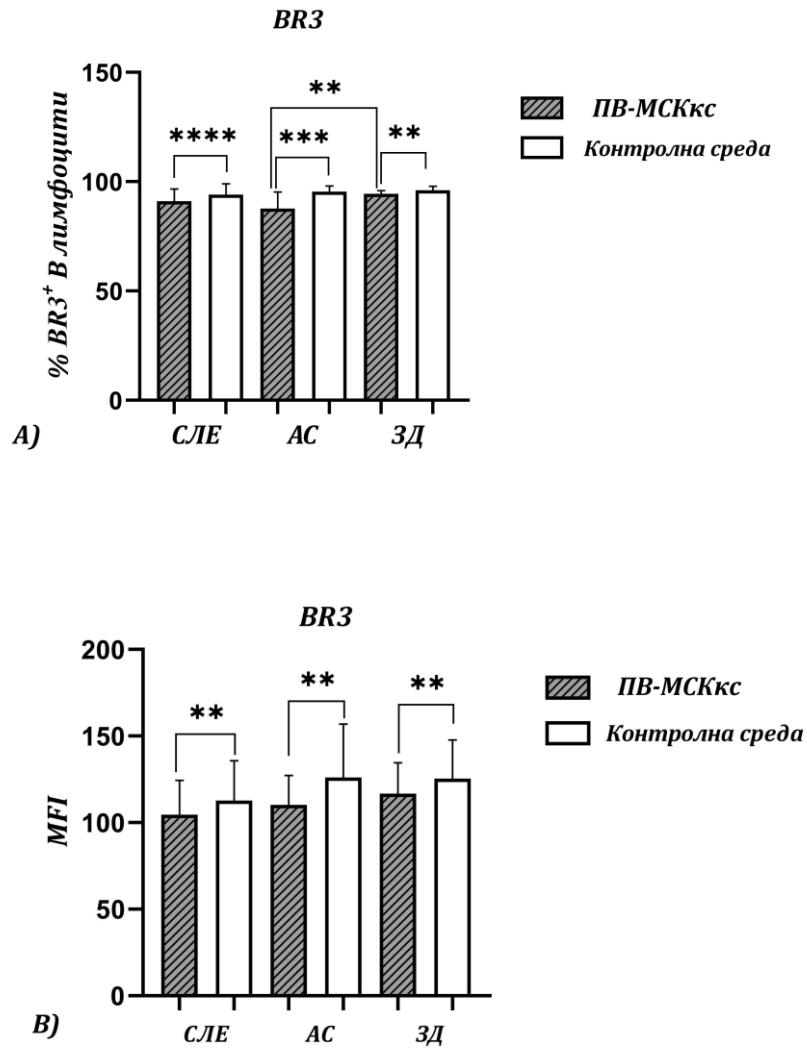
5.3 Влияние на секретом от МСК върху В-клетъчната експресия на BR3

Един от изследваните маркери, който в най-голяма степен представляваше интерес за научния ни екип, беше специфичният В-клетъчен рецептор за *BAFF* лиганда, а именно *BAFF-R* или по-често означаван като *BR-3*. Интересното беше, че установихме статистически сигнификантно по-нисък процент на $BR3^+$ В лимфоцити под действие на фактори, секретирани от МСК ($94.40 \pm 1.58\%$) спрямо контролната група В лимфоцити

($96.07 \pm 1.89\%$; $p=0.0020$) при здравите доброволци (фиг.26). Подобни сигнификантни резултати, както и същата тенденция за намаляване на процента В лимфоцити, експресиращи този рецептор под действие на МСК и техния секретом, се открояваха силно при болните индивиди със СЛЕ ($91.06 \pm 5.61\%$ спрямо $94.05 \pm 5.03\%$; $p<0.0001$) и АС ($87.68 \pm 7.61\%$ спрямо $95.42 \pm 2.59\%$; $p=0.001$).

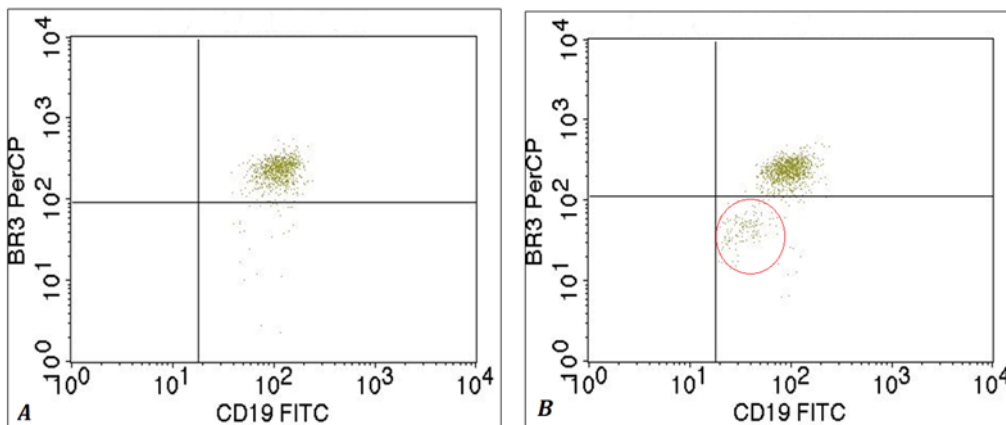
Паралелно с тези данни, нивото на експресия на рецептора за *BAFF* при здравите лица беше също значително понижено на В-клетъчната мембрана под влиянието на секретирания фактори от МСК (116.78 ± 17.76), като го сравним с това на В лимфоцитите, които са били инкубирани и отглеждани в контролна среда (125.43 ± 22.34 ; $p=0.0020$). Получените резултати и тенденцията за сигнификантно понижаване на плътността на експресия на *BAFF* рецептора на В-клетъчната мембрана се потвърдиха и при пациентите със СЛЕ (104.53 ± 19.90 спрямо 112.83 ± 22.86 ; $p=0.0032$) и АС (110.96 ± 16.92 спрямо 126.15 ± 30.76 ; $p=0.0017$).

Прави впечатление, че след изолирането и култивирането на В клетки от изследваните пациенти и здрави доброволци в кондиционирана среда на МСК се наблюдава формирането на една по-хомогенна популация от ниско-експресиращи *BR3* рецептора В лимфоцити, което може да се види и от представения репрезентативен за всички експериментални постановки флоуцитометричен *dot-plot* анализ на фиг. 27. При сравняване на получените резултати между трите групи участници установихме сигнификантна разлика между тях по отношение на процента *BR3*⁺ В лимфоцити от групата на *PBMC*, култивирани в среда на стволови клетки ($\chi^2=7.73$; $p=0.0210$). Сигнификантно по-нисък беше процентът на *BR3*⁺ В лимфоцити при болните с поставена диагноза АС ($87.68 \pm 7.61\%$) под влияние на секретом от МСК спрямо процента на В клетките, експресиращи тази молекула в групата на култивираните с кондиционирана среда при здравите контроли ($94.40 \pm 1.58\%$; $p=0.0039$).



Фигура 26: Графично представяне на процент $CD19^+BR3^+$ В клетки **А)** и MFI на **BR3** молекулата на В-лимфоцитната мембрана **Б)**; Данните, са представени като $Mean \pm SD$ и са обобщаващи за всички експериментални постановки на СЛЕ ($n=17$), АС ($n=17$) и ЗД ($n=10$). Статистически значима разлика в данните е представена след проведени тест на Wilcoxon и Mann-Whitney U тест (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$).

Използвани съкращения: СЛЕ-Системен лупус еритематозус; АС- Анкилозиращ спондилит; ЗД-Здрави доброволци; MFI-Mean Fluorescence Intensity; ПВ-МСКкс – кондиционирана среда от МСК



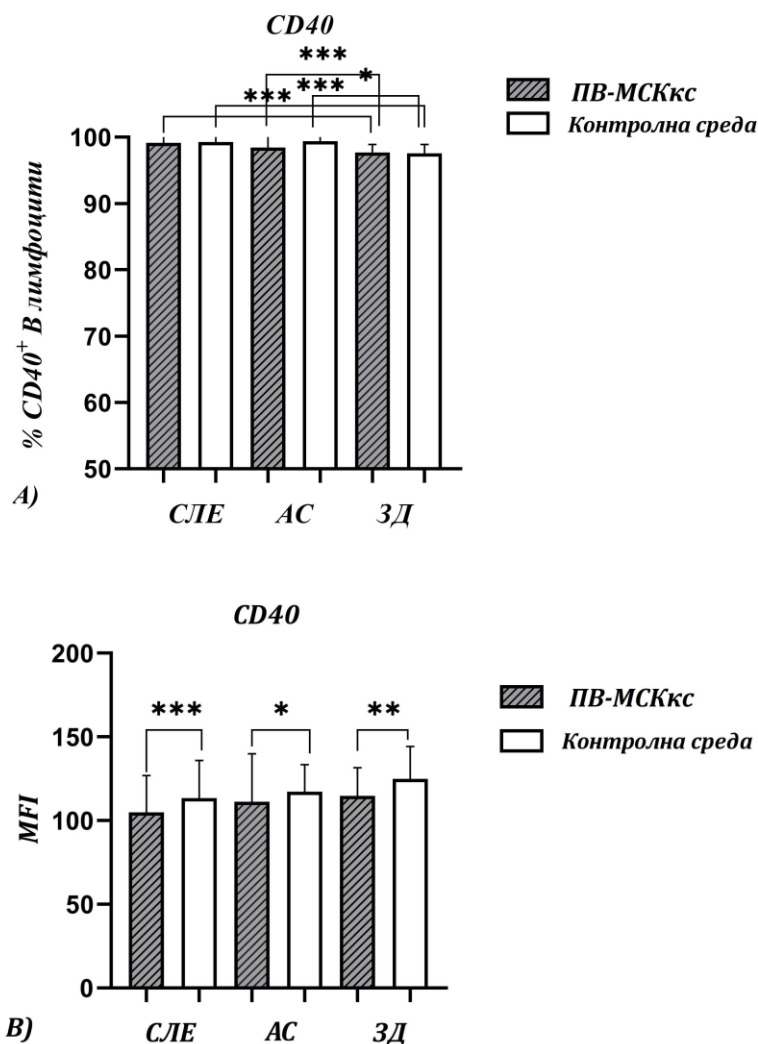
Фигура 27: Флоуцитометричен Dot-plot анализ на $CD19^+$ В лимфоцити, експресиращи BR3 рецептора на своята мембрана от пула на *PBMC* култивирани в **A**) контролна среда и **B**) в кондиционирана среда на мезенхимни стволови клетки от пънна връв. В червено е представено формирането на хомогенна популация от В лимфоцити с по-ниска експресия на BR3 рецептора под влияние на секретом от мезенхимни стволови клетки. На фигурата е представен репрезентативен пациент със системен лупус еритематозус.

5.4 Влияние на секретом от *MCK* върху В-клетъчната експресия на *CD40*

В контекста на междуклетъчната комуникация и ко-стимулаторното взаимодействие, необходимо за активацията и ефекторната функция на В-лимфоцитите, си поставихме за цел да изследваме експресията на ключовия протеин *CD40*. Получените от нашия екип данни за процента на $CD40^+$ В лимфоцити след култивирането на *PBMC* в кондиционирана среда на *MCK* беше с едва доловима промяна. Процентът на $CD40^+$ В лимфоцити при здрави доброволци ($97.55 \pm 1.33\%$ спрямо $97.69 \pm 1.21\%$) и пациенти със *SLE* ($99.27 \pm 1.08\%$ спрямо $99.15 \pm 1.14\%$) беше запазен сравнително числено висок. При пациентите с *AC* се наблюдаваше едно леко повишение на процента на $CD40^+$ В лимфоцити под действие на фактори, освободени от *MCK* ($99.37 \pm 0.72\%$ спрямо $98.46 \pm 1.97\%$), но тази установена промяна беше минимална и не успяхме да потвърдим с налична сигнификантна достоверност получените резултати (фиг.28 А).

Въпреки данните, относно процент В клетки, които експресират този маркер, окуражаващи са резултатите по отношение нивото на експресия на *CD40* на В-лимфоцитната мембрана. Сигнификантно понижен беше интензитетът на експресия на *CD40* върху В клетките под действие на кондиционирана среда на *MCK* (114.70 ± 16.91) в сравнение с контролната група В клетки (124.94 ± 19.23 ; $p=0.0020$) при здрави лица, както и при болните със *SLE* (104.89 ± 22.04 спрямо 113.45 ± 22.48 ; $p=0.0008$) и *AC* (111.20 ± 28.77 спрямо 117.32 ± 16.07 ; $p=0.0174$) (фиг. 28 В).

В допълнение установихме статистически значима разлика между трите групи участници в процента на $CD19^+CD40^+$ клетките от групите на *PBMC* култивирани в контролна ($\chi^2=10.71$; $p=0.0047$) и кондиционирана среда ($\chi^2=14.88$; $p=0.0006$). След култивиране на мононуклеарните клетки в контролна среда сигнификантно по-висок беше процентът на $CD19^+CD40^+$ клетките при пациенти със *СЛЕ* ($99.15 \pm 1.14\%$; $p=0.0010$) и *АС* ($98.46 \pm 1.97\%$; $p=0.0260$) спрямо този наблюдаван в групата на здравите участници ($97.69 \pm 1.21\%$). Подобни са и данните след култивирането на мононуклеарните клетки в кондиционирана среда на *МСК* със сигнификантно по-висок процент на $CD19^+CD40^+$ В клетки при болните лица със *СЛЕ* ($99.27 \pm 1.08\%$; $p=0.0007$) и *АС* ($99.37 \pm 0.72 \%$; $p<0.0001$) спрямо процентите на В клетките, които наблюдавахме относно експресията на тази молекула при здравите индивиди ($97.55 \pm 1.33\%$).



Фигура 28: Графично представяне на процент $CD19^+CD40^+$ В клетки А) и MFI на $CD40$ молекулата на В-лимфоцитната мембрана В); Данните са представени като $Mean \pm SD$ и са обобщаващи за всички експериментални постановки на СЛЕ ($n=17$), АС ($n=17$) и ЗД ($n=10$). Статистически значима разлика в данните е представена след проведени тест на Wilcoxon и Mann-Whitney U тест (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

Използвани съкращения: СЛЕ-Системен лупус еритематозус; АС- Анкилозиращ спондилит; ЗД-Здрави доброволци; MFI-Mean Fluorescence Intensity; ПВ-МСКкс – кондиционирана среда от мезенхимни стволови клетки от пълна връв

5.5 Влияние на секретом от МСК върху В-клетъчната експресия на HLA-DR

Съществен фокус от експерименталната част на настоящия научен труд представляваше изследването на промяната в експресията на молекулата *HLA-DR*, настъпваща в пула на В лимфоцитите под въздействие на секреторните фактори, съдържащи се в кондиционираните среди на ПВ-МСК. Нашите резултати от проведените анализи при здрави доброволци ясно показаха, че посредством своето паракринно действие МСК могат да доведат до понижаване ($15.93 \pm 6,91\%$) в процента на В лимфоцитите, експресиращи *HLA-DR* на своята мембрана, в сравнение с

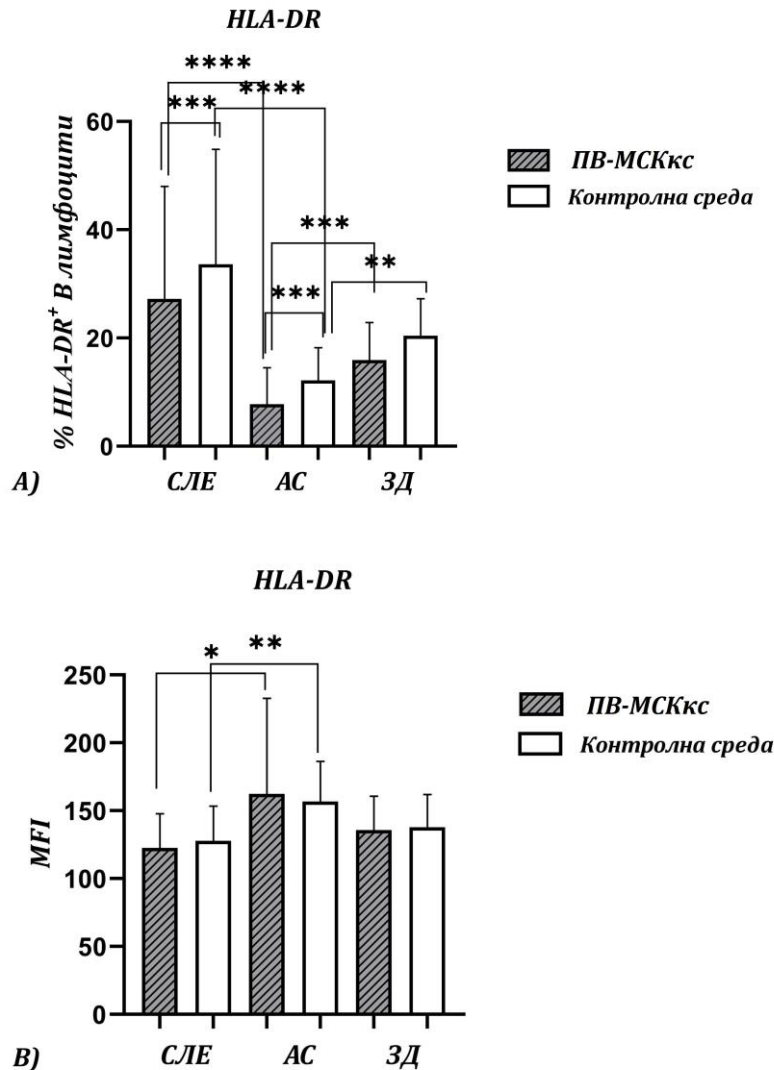
контролната група В клетки ($20.44 \pm 6,82\%$; $p=0.0527$), но разликата беше с гранична сигнификантност. При двете групи пациенти обаче получихме статистически значима разлика по отношение на процента $HLA-DR^+$ В лимфоцити след култивирането на *PBMC* в двете културални среди. Комбинацията от множеството разтворими фактори, продуцирани от *MCK*, заедно с тези продуцирани от *PBMC* по време на 3-дневното култивиране, доведе до установяването на сигнификантно понижен процент на В клетките, експресиращи *HLA-DR* при пациенти с *АС* ($7.78 \pm 6.72\%$ спрямо $12.16 \pm 6.07\%$; $p=0.0002$) и *СЛЕ* ($27.24 \pm 20.76\%$ спрямо $33.63 \pm 21.24\%$; $p=0.0005$).

Относно интензитета на експресия на този маркер върху В клетъчната мембрана, не установихме статистическа достоверност, но получените резултати показаха числено понижено ниво на експресия на *HLA-DR* молекулата на В-клетъчната мембрана под действие на секретом от *MCK* при здрави доброволци (135.79 ± 24.87 спрямо 137.83 ± 24.15 ; $p=0.3359$) и болни лица с поставена диагноза *СЛЕ* (122.57 ± 25.33 спрямо 127.72 ± 25.74 ; $p=0.1594$). Изненадващо, но при пациенти с *АС* интензитетът на експресия на *HLA-DR* молекулата на мембраната на В клетките, след култивирането на *PBMC* в кондиционирана среда на стволови клетки от пъпна връв, беше повишен (162.43 ± 70.43 спрямо 156.75 ± 29.56 ; $p=0.9357$), но получените данни нямаха статистическа значимост. Обобщените данни за процента от В лимфоцити, които експресират *HLA-DR*, както и нивото на мембранна експресия на маркера, са представени на *фиг. 29*.

В контекста на проведения междугрупов анализ, това което установихме беше доста впечатляваща статистически значима разлика между трите групи участници в процента на $CD19^+HLA-DR^+$ В клетките от групите на *PBMC* култивирани в контролна ($\chi^2=20.23$; $p<0.0001$) и кондиционирана среда ($\chi^2=19.86$; $p<0.0001$). След провеждането на непараметричен тест за несвързани извадки наблюдавахме по-висок процент на $CD19^+HLA-DR^+$ лимфоцити от опитните постановки със среда на *MCK* при пациенти със *СЛЕ* ($27.24 \pm 20.76\%$) спрямо пациентите с *АС* ($7.78 \pm 6.72\%$), като установените разлики бяха статистически значими ($p<0.0001$). В допълнение на това, също сигнификантно по-висок ($p<0.0001$) беше и процентът на $CD19^+HLA-DR^+$ лимфоцити от опитните постановки на *PBMC*, отглеждани в контролна среда, при пациенти със *СЛЕ* ($33.63 \pm 21.24\%$) спрямо болните с *АС* ($12.16 \pm 6.07\%$). Значително по-ниската експресия на *HLA-DR* на мембраната на В лимфоцитите при пациенти с *АС* ($7.78 \pm 6.72\%$ спрямо $12.16 \pm 6.07\%$) доведе и до сигнификантно по-ниските им стойности спрямо тези на здравите контроли ($15.93 \pm 6,91\%$ спрямо $20.44 \pm 6,82\%$) при

култивирането на *PBMC* в среда на стволови клетки ($p=0.004$) и контролна среда ($p=0.0026$).

По отношение на интензитета на експресия на тази молекула на В-клетъчната мембрана, след проведен *Kruskall-Wallis test*, установихме сигнификантна разлика между трите групи участници в интензитета на *HLA-DR* при В клетките от групата на култивираните в контролна среда ($\chi^2=8.25$; $p=0.0162$), докато в среда на МСК имаше по-скоро тенденция за подобна разлика ($\chi^2=5.62$; $p=0.0603$). Оказа се, че разликата в експресията на тази молекула на мембраната на В клетките от пациенти с АС (162.43 ± 70.43 спрямо 156.75 ± 29.56) и СЛЕ (122.57 ± 25.33 спрямо 127.72 ± 25.74) е статистически значима, не само когато клетките са култивирани в среда на МСК ($p=0.0232$), но и след период на отглеждането им в стандартна среда за клетъчно култивиране ($p=0.0043$).



Фигура 29: А) Графично представяне на процент $CD19^+$ В клетки, позитивни за експресията на **HLA-DR** и MFI на **HLA-DR** молекулата на В-лимфоцитната мембрана **В)**; Данните са представени като средна стойност \pm SD и са обобщаващи за всички експериментални постановки на СЛЕ (n=17), АС (n=17), ЗД (n=10). Статистически значима разлика в данните е представена посредством тест на Wilcoxon и Mann-Whitney U тест. (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$).

Използвани съкращения: СЛЕ-Системен лупус еритематозус; АС-Анкилозиращ спондилит; ЗД-Здрави доброволци; ПВ-МСКкс – кондиционирана среда от мезенхимни стволови клетки от пънна връв

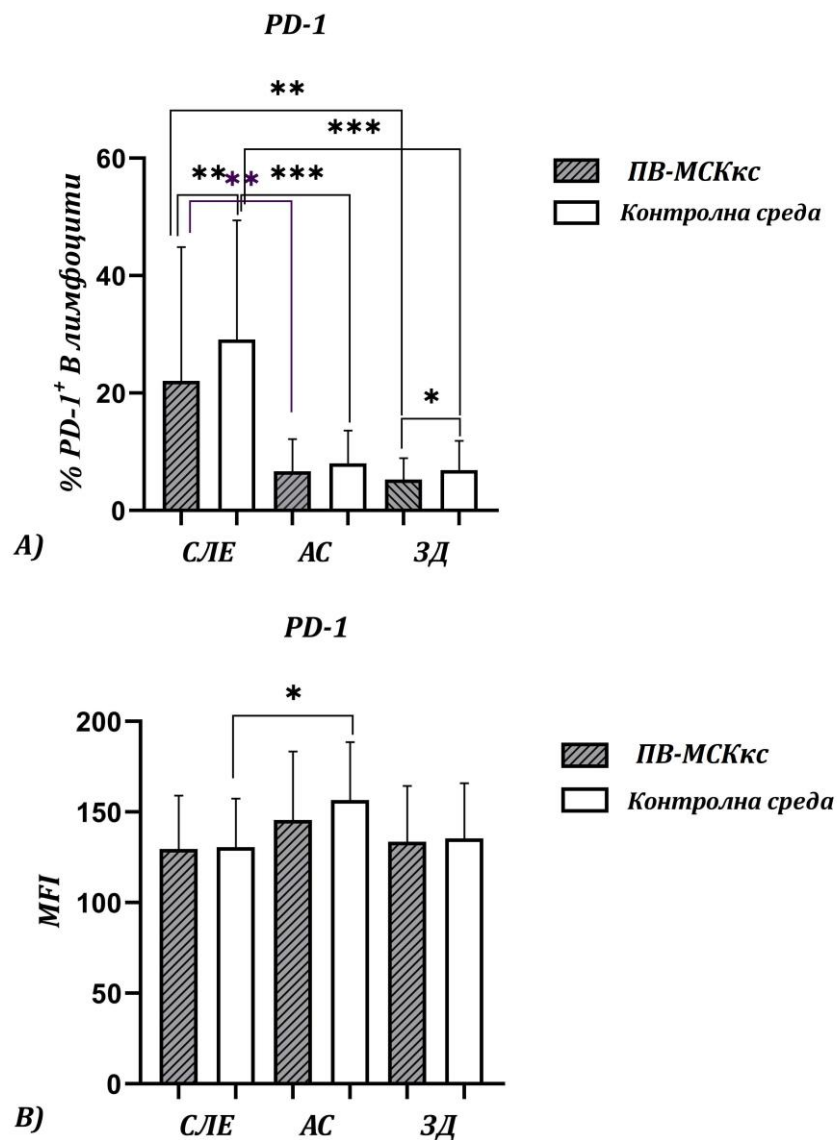
5.6 Влияние на секретом от МСК върху В-клетъчната експресия на PD-1

В условията на култивиране със среди на ПВ-МСК беше наблюдавана фина и в същото време доста интересна промяна в експресията на PD-1 повърхностния маркер. При здравите доброволци под действие на средите от ПВ-МСК, сигнификантно беше понижен процентът на $CD19^+$ клетките, експресиращи PD-1 маркера ($5.28 \pm 3.62\%$), спрямо обработените с контролни среди $CD19^+$ клетки ($6.87 \pm 5.01\%$; $p=0.0273$). Потвърдиха се данните и при пациентите със СЛЕ, като беше наблюдавано

сигнификантно понижение на процента В лимфоцити, позитивни за *PD-1* маркера при условия на култивиране в кондиционирана среда на *МСК* спрямо контролната група В клетки ($22.07 \pm 22.82\%$ спрямо $29.14 \pm 20.29\%$; $p=0.0011$). При пациентите с поставена диагноза *АС* не успяхме да установим статистически значима разлика, макар че резултатите са отново в насока понижен процент на В клетки, експресиращи *PD-1* под действие на секретом от *МСК* ($6.67 \pm 5.49\%$ спрямо $8.03 \pm 5.59\%$; $p=0.1901$) (фиг. 30 А).

Противоположно на нашите очаквания не установихме статистически значима разлика при здравите доброволци ($p=0.6406$) по отношение на понижената плътност на експресия на *PD-1* върху мембраната на $CD19^+$ В клетките, вследствие на култивирането на *PBMC* в кондиционирана среда на *МСК* (133.64 ± 30.74) спрямо контролната група (135.50 ± 30.05) (фиг. 30 В). Тенденцията за несигнификантно понижение на нивото на експресия на тази молекула на В-клетъчната мембрана след култивиране в среда, богата на разтворими фактори от *МСК*, се потвърди и при пациентите с *АС* (145.60 ± 37.75 спрямо 156.51 ± 32.05 ; $p=0.3467$) и при тези с поставена диагноза *СЛЕ* (129.65 ± 29.50 спрямо 130.54 ± 26.94 ; $p=0.6441$).

Имаше статистически значима разлика между процент $CD19^+PD-1^+$ В клетки от различните групи участници в двете експериментални постановки, когато *PBMC* са култивирани в среда на *МСК* ($\chi^2=10.71$; $p=0.0047$) и в контролна среда ($\chi^2=20.58$; $p<0.0001$). Част от тези резултати се дължат на сигнификантно по-високият процент на $CD19^+PD-1^+$ при пациенти със *СЛЕ* ($22.07 \pm 22.82\%$) спрямо здрави доброволци ($5.28 \pm 3.62\%$; $p=0.0058$) и пациенти с *АС* ($6.67 \pm 5.49\%$; $p=0.0048$), установени при опитните постановки със секретом от *МСК*. От друга страна, сигнификантно по-високият процент на $CD19^+PD-1^+$ при пациенти със *СЛЕ* ($29.14 \pm 20.29\%$) спрямо здрави доброволци ($6.87 \pm 5.01\%$; $p=0.0002$) и пациенти с *АС* ($8.03 \pm 5.59\%$; $p<0.0001$) беше потвърден и при опитните постановки с контролна среда. При анализа за наличието на разлики по отношение нивото на експресия на тази молекула на В-клетъчната мембрана между различните групи участници, установихме такава, единствено по отношение на В лимфоцитите от контролната група ($\chi^2=6.35$; $p=0.0419$). Тази разлика беше, поради сигнификантно по-високото ниво на мембранна експресия ($p=0.0157$) на *PD-1* при пациенти с *АС* (156.51 ± 32.05) спрямо пациенти със *СЛЕ* (130.54 ± 26.94) при контролната група В клетки.



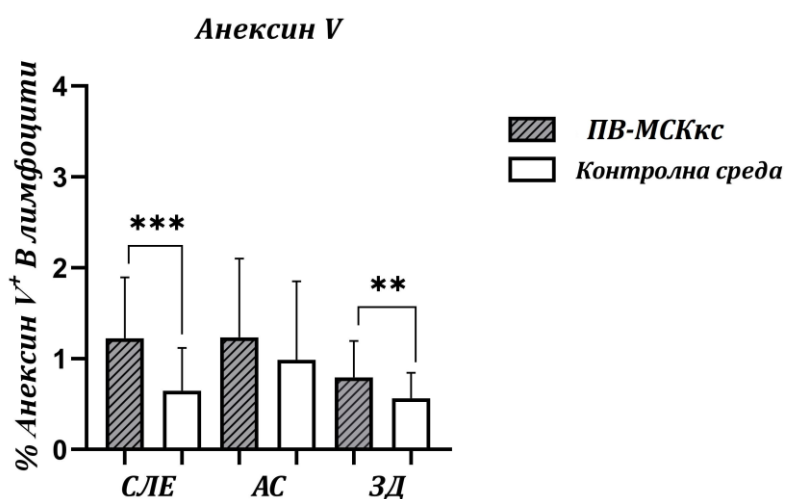
Фигура 30: А) Графично представяне на процента $CD19^+$ В клетки, позитивни за експресията на **PD-1** и **MFI** на **PD-1** молекулата на В-лимфоцитната мембрана **В)**; Данните са представени като средна стойност $\pm SD$ и са обобщаващи за всички експериментални постановки на **СЛЕ** ($n=17$), **АС** ($n=17$), **ЗД** ($n=10$). Статистически значима разлика в данните е представена посредством Wilcoxon rank test и Mann-Whitney U test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

Използвани съкращения: **СЛЕ**-Системен лупус еритематозус; **АС**- Анкилозиращ спондилит; **ЗД**-Здрави доброволци; **ПВ-МСКкс** – кондиционирана среда от мезенхимни стволови клетки от пънна връв

6 Флоуцитометрично детектиране на апоптотични и некротични $CD19^+$ В лимфоцити от периферни мононуклеарни клетки

В нашите изследвания оценихме влиянието на молекулите, освободени от **МСК**, върху способността им да повлияват програмираната клетъчна смърт на В клетките. Процентът апоптотични клетки беше определен посредством флоуцитометричен анализ на **РВМС** от здравите доброволци, пациентите със **СЛЕ** и **АС**. След отчитането на процента В клетки в ранна и късна апоптоза можем да обобщим накратко, че

секретомът на *МСК* оказва много слабо влияние върху смъртта на В лимфоцитите, което нагледно може да се види и от сформираните клъстери от видимо витални и жизнени клетки, комуникиращи помежду си (фиг.23). Наблюдавахме сигнификантно по-висок процент на *Анексин V*⁺ В клетки при здрави доброволци под влиянието на *МСК* фактори ($0.79 \pm 0.40\%$) спрямо контролната група В клетки ($0.56 \pm 0.28\%$; $p=0.0059$) (фиг. 31). При пациентите с поставена диагноза *СЛЕ* установихме също сигнификантно по-висок процент на *Анексин V*⁺ В клетки под влиянието на *МСК* фактори ($1.23 \pm 0.67\%$) спрямо контролната група В клетки ($0.65 \pm 0.47\%$; $p=0.0007$), докато при пациентите с *АС* се наблюдаваше същата тенденция, но без статистическа значимост на получените данни ($1.24 \pm 0.87\%$ спрямо $0.98 \pm 0.86\%$; $p=0.0775$). Също така, важно е да споменем, че тестът на *Kruskal-Wallis* разкри, че няма значителна разлика между категориите *СЛЕ*, *АС* и здрави доброволци по отношение на процента *Анексин V*⁺ В клетки.

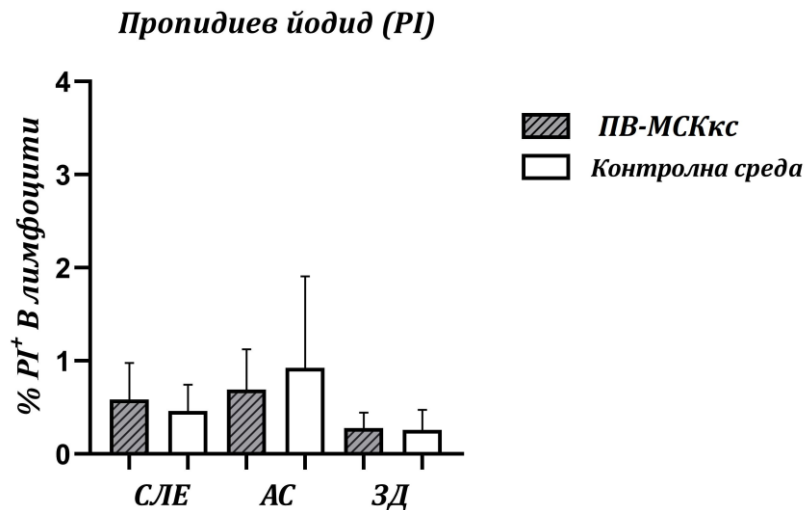


Фигура 31: Графично представяне на процент *CD19*⁺ В клетки, позитивни за *Анексин V* (ранна апоптоза). Данните са представени като средна стойност \pm SD и са обобщаващи за всички експериментални постановки на *СЛЕ* ($n=17$), *АС* ($n=17$), *ЗД* ($n=10$). Статистически значима разлика в данните е представена посредством *Wilcoxon rank test* (** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

Използвани съкращения: *СЛЕ*-Системен лупус еритематозус; *АС*- Анкилозиращ спондилит; *ЗД*-Здрави доброволци; *ПВ-МСКкс* – кондиционирана среда от мезенхимни стволови клетки от пънна връв.

Нашите резултати, обаче, показаха липса на сигнификантна разлика ($p=0.5586$) в процента В клетки, намиращи се в състояние на късна апоптоза в клетъчни култури на *РВМС*, култивирани със среди от *ПВ-МСК* ($0.28 \pm 0.16\%$) и с контролни среди ($0.26 \pm 0.22\%$) при здрави доброволци. Подобна тенденция се наблюдаваше и при пациентите със *СЛЕ* ($0.59 \pm 0.39\%$ спрямо $0.46 \pm 0.28\%$; $p=0.1324$). Очудващи бяха данните, които получихме относно влиянието на секретом от *МСК* върху късната апоптоза на В

клетките при пациенти с АС. Установихме, макар и несигнификантно, понижен процент на В лимфоцити в състояние на късна апоптоза след култивирането на РВМС в среда на МСК ($0.69 \pm 0.43\%$ спрямо $0.92 \pm 0.98\%$; $p=0.5871$) (фиг.32).



Фигура 32 Графично представяне на процент $CD19^+$ В клетки, позитивни за PI (късна апоптоза). Данните са представени като средна стойност \pm SD и са обобщаващи за всички експериментални постановки на СЛЕ ($n=17$), АС ($n=17$), ЗД ($n=10$).

Използвани съкращения: СЛЕ-Системен лупус еритематозус; АС- Анкилозиращ спондилит; ЗД-Здрави доброволци; ПВ-МСКкс – кондиционирана среда от мезенхимни стволови клетки от пълна връв.

7 Влияние на секретом от мезенхимни стволови клетки върху цитокиновата секреция от периферни мононуклеарни клетки

Предишният раздел концентрира значително вниманието върху влиянието на секретом от МСК върху В-клетъчната експресия на специфични молекули, които са свързани с активацията, антиген-представящата функция и преживяването на $CD19^+$ лимфоцитите от периферна венозна кръв. Приложенията от нашия екип имуноензимни експерименти бяха продиктувани от желанието ни да обогатим допълнително получените резултати, като изследваме влиянието на секретом от МСК върху секрецията на разтворими фактори и молекули с важно имунологично значение за В лимфоцитите от изолираните и култивирани мононуклеарни клетки на всички участници в научното проучване. Резултатите, представени в този раздел на дисертационния труд, акцентират върху изследването на получените кондиционирани среди след култивирането на РВМС на здрави доброволци и пациенти със СЛЕ и АС, за наличието и промяната в секреторните нива на цитокини с важна роля за преживяването, пролиферацията и цялостната функционална активност на В клетките, а именно *BAFF*, *IDO*, *PGE2*.

7.1 Влияние на секретом от мезенхимни стволови клетки върху секрецията на специфичния за В клетките лиганд BAFF/BLys от периферни мононуклеарни клетки

В контекста на изследването на секрецията на В-клетъчния активационен фактор от периферни мононуклеарни клетки и при трите подгрупи участници детектирахме нива под минималния детектируем праг на търговския *ELISA* кит, след проведения имуноензимен тест. Спрямо детекционния праг (80-5000 pg/ml) на използвания *ELISA* кит, секретиремите нива на BAFF в културите на *PBMC* при всички пациенти със *СЛЕ* и *АС*, бяха съответно 74 pg/ml, независимо дали клетките са били култивирани в контролна или кондиционирана среда. При здравите доброволци секретиремите нива на този цитокин в културите на *PBMC*, култивирани в кондиционирана среда бяха средно 54.30 ± 31.72 pg/ml, а в контролна среда средно 50.60 ± 31.69 pg/ml, като отново обръщаме внимание, че установените нива бяха под детекционния праг на използвания *ELISA* търговски кит. В кондиционираните среди от *МСК* стойностите на BAFF бяха също под минималния детектируем праг на *ELISA* метода (74 pg/ml).

7.2 Влияние на секретом от мезенхимни стволови клетки върху секрецията на IDO от периферни мононуклеарни клетки

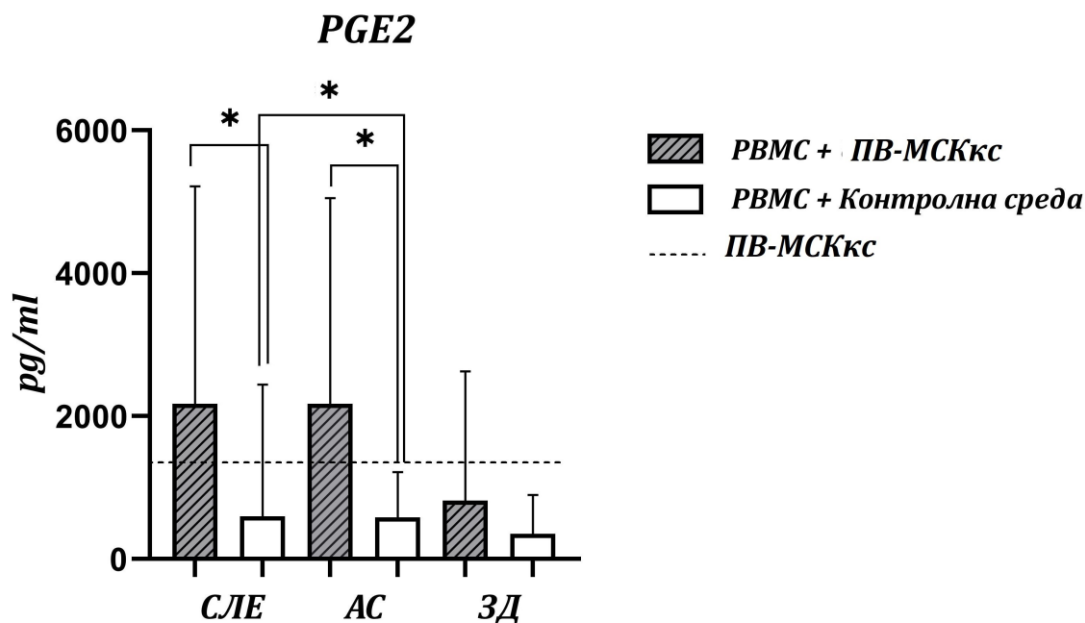
След проведения имуноензимен тест за детектиране на *IDO* в културални среди на *PBMC*, измерените от нашия екип нива на този ензим от всички опитни постановки на пациенти и здрави доброволци, бяха под минималния детектируем праг (0.356 ng/ml) на използвания търговски кит (0.469-30 ng/ml). В културалните среди на *ПВ-МСК* също детектирахме концентрация на *IDO* (0.356 ng/ml) под минималния детектируем праг на *ELISA* кита.

7.3 Влияние на секретом от мезенхимни стволови клетки върху секрецията на PGE2 от периферни мононуклеарни клетки

Анализирането на промените в концентрацията на *PGE2* в кондиционираните среди на *PBMC* под паракринното влияние на *ПВ-МСК*, показаха значително повишение в нивата на този ейкозаноид и при трите групи изследвани лица. Концентрацията на *простагландин Е2* в кондиционираните среди на *PBMC* от пациенти със *СЛЕ*, култивирани в кондиционирана среда на *ПВ-МСК* и контролна среда, бяха съответно 2173.04 ± 3043.09 pg/ml и 597.89 ± 1846.31 pg/ml, като получената разлика беше статистически достоверна ($p = 0.0342$). При пациентите с *АС* тази тенденция за висока концентрация на *PGE2* при култури на *PBMC*, култивирани в кондиционирана среда на *ПВ-МСК* беше статистически потвърдена (2172.93 ± 2880.34 pg/ml спрямо

580.70 ± 637.31 pg/ml; $p=0.0443$). При здравите лица не успяхме да установим сигнификантна разлика ($p=0.2730$), макар че отново под влияние на секретом от МСК се наблюдаваха по-високи нива (815.44 ± 1812.92 pg/ml) на секреция на PGE2 спрямо контролната група (351.87 ± 547.03 pg/ml). Детектирахме наличието на този паракринен хормон и в средите на стволовите клетки, като концентрацията, която установихме беше съответно 1302.13 ± 2073.00 pg/ml.

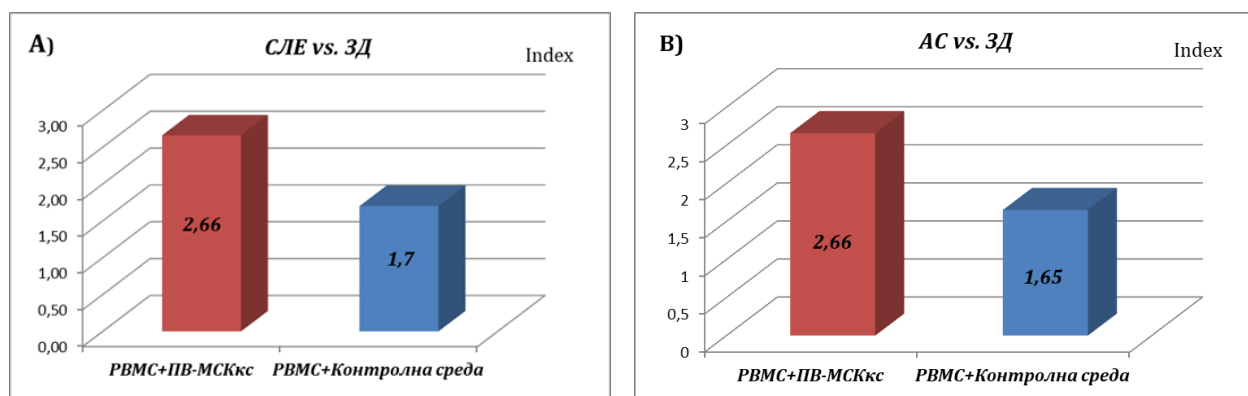
При сравняване на данните относно секрецията на PGE2 в културалните среди на PBMC, култивирани в стандартна хранителна среда от трите групи участници, установихме тенденция за налична разлика в стойностите на изследвания простагландин ($\chi^2=5.49$; $p=0.066$). След провеждането на *Mann-Whitney U test* за несвързани извадки получените резултати показаха сигнификантно по-високи нива на PGE2 в средите на PBMC, култивирани в контролна среда от пациенти със СЛЕ спрямо концентрацията на PGE2 от контролната експериментална постановка на пациенти с АС ($p=0.0462$). Обобщените данни от получените резултати, относно наличието на PGE2 в културите на PBMC и неговата концентрация, са представени на *фиг. 33*.



Фигура 33: Разлика в секрецията на PGE2 в култури на РВМС от пациенти със СЛЕ (n=17), АС (n=17) и ЗД (n=10), култивирани със среди на ПВ-МСК (РВМС + ПВ-МСКкс) и контролни среди за клетъчно култивиране (РВМС + Контролна среда). Данните са обобщаващи за всички експериментални постановки от всяка една група изследвани лица. С прекъснатата линия е представена средната стойност на концентрацията на PGE2, установена в кондиционираните среди на ПВ-МСК (ПВ-МСКкс). Статистически значима разлика в данните е представена посредством Mann-Whitney U тест и Wilcoxon sign rank тест (*p≤0.05).

Използвани съкращения: СЛЕ- Системен лупус еритематозус; АС- Анкилозиращ спондилит; ЗД-Здрави доброволци; ПВ-МСКкс – кондиционирана среда от мезенхимни стволови клетки от пълна връв.

За по-добро разбиране, съотношението на средните концентрации на PGE2 при болните със СЛЕ и АС спрямо здравите индивиди, е представено като индекс/числено съотношение на фиг 34.



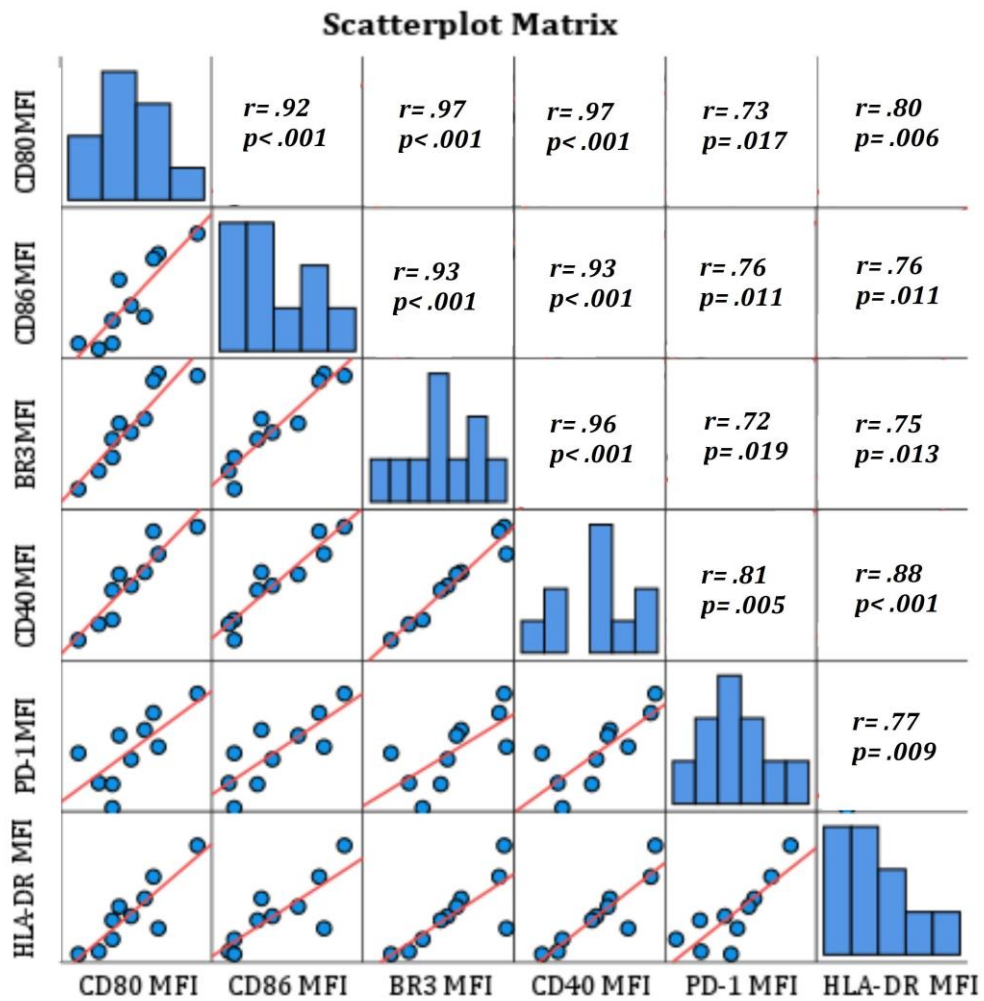
Фигура 34: Числено съотношение на средните концентрации на PGE2 при болните със СЛЕ (А) и АС (В) спрямо здравите индивиди.

8 Корелационен анализ на получените резултати

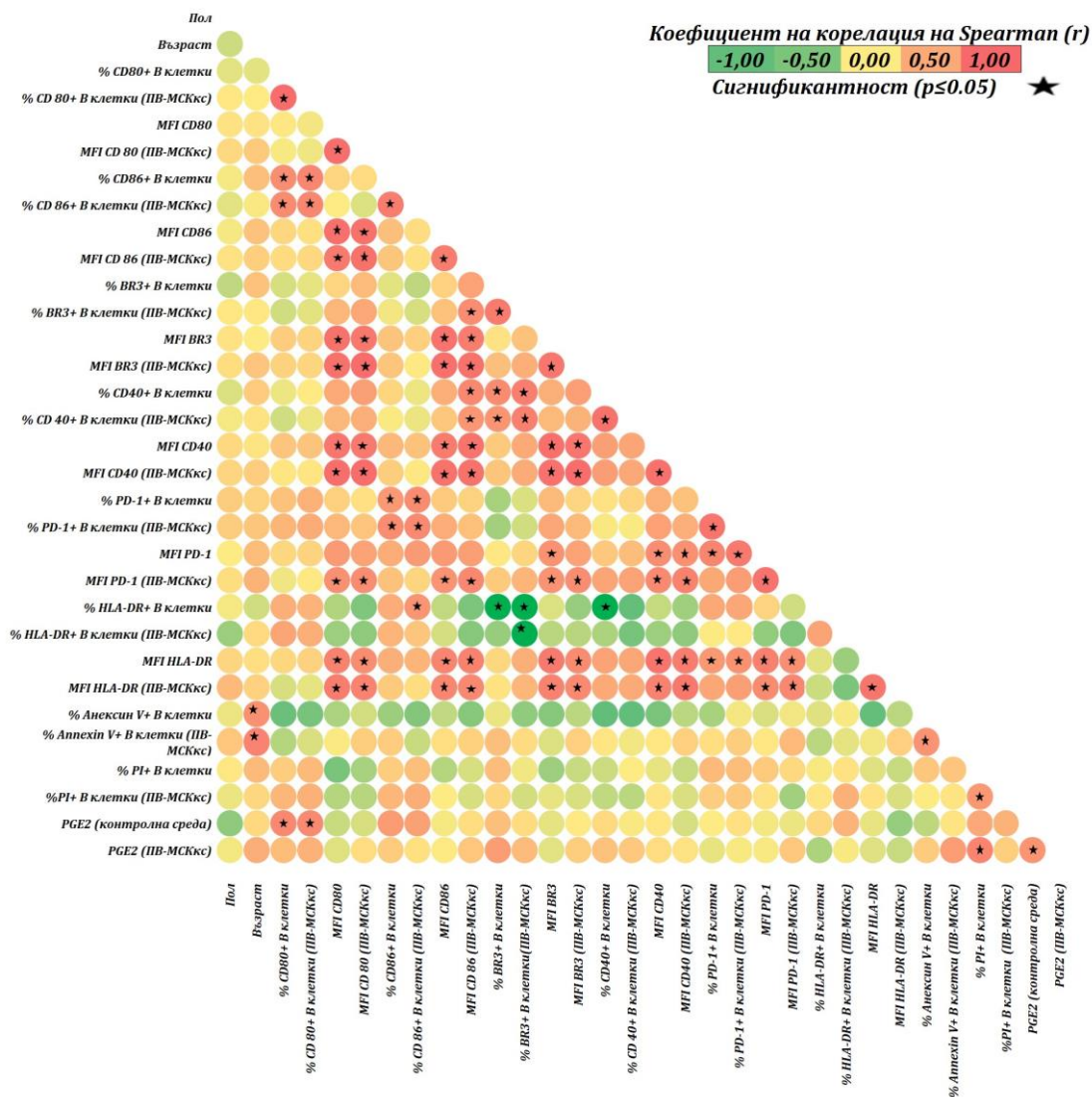
За проследяване на връзката между установените нива на експресия на В-клетъчните маркери, изследваните цитокини и демографските и клинични характеристики на изследваните групи лица, осъществихме посредством провеждането на корелационен анализ. В контекста на поставените цели на дисертационния труд, относно секретом на *МСК* и неговото влияние върху В лимфоцитите, както и връзката му с клиничните и демографски характеристики на изследваните лица, са коментирани най-значимите корелационни връзки, които бяха намерени след направения обстоен анализ. Корелационният коефициент на *Spearman* беше изчислен поотделно при всяка една група изследвани лица, за да се оцени линейната връзка между клиничните данни (при пациентите), експресията на изследваните маркери и резултатите от проведените имуноензимни тестове.

В групата на здравите доброволци под влияние на секретом от *МСК* бяха установени следните силни положителни корелации: Процент на $CD86^+$ В клетки и процент $CD80^+$ В клетки ($r=.77$, $p=.009$); процент $CD86^+$ В клетки и процент $PD-1^+$ В клетки ($r=.75$; $p=.013$); процент $CD40^+$ В клетки и процент $BR3^+$ В клетки ($r=.83$; $p=.003$); както и по отношение на процент на В клетки, експресиращи *BR3* рецептора и понижената мембранна (*MFI*) експресия на $CD86$ ($r=.73$, $p=.017$).

Силно корелираха помежду си и стойностите на *MFI* на изследваните маркери в групата на В лимфоцитите, култивирани в среда на *МСК* (фиг. 35). Единствената негативна корелационна зависимост беше установена между стойностите на процент $CD19^+HLA-DR^+$ В клетки и процент $CD19^+BR3^+$ В лимфоцити ($r= -.65$, $p=.043$). Не установихме обаче никакви сигнификантни зависимости между изследваните маркери и нивата на *PGE2* при здравите лица. В контекста на слабото влияние на секретирания фактори от *МСК* върху В клетъчната апоптоза трябва да отбележим и значимата положителна асоциация, която намерихме между възрастта на здравите участници и процентът на В клетките, позитивни за *Анексин V* след култивирането им в среда на *МСК* ($r= .70$; $p= .002$). За по-голяма онагледеност и значимост за настоящата научна разработка бяха коментирани данните на изследваните маркери под влияние на секретом от *МСК*, а обобщените корелационните зависимости между изследваните В-клетъчни маркери и нивата на детектираните цитокини в групата на здравите доброволци, могат да бъдат проследени на фиг. 36, където са графично представени посредством корелационна матрица.



Фигура 35: Scatterplot матрица, отразяваща установените зависимости между средните стойности – по MFI на изследваните маркери при В лимфоцити от здрави доброволци, под влияние на секретом от ПВ-МСК



Фигура 36: Корелационна матрица, представяща връзката между изследваните показатели в групата на здравите индивиди посредством коефициент на Spearman. Сигнификантност е приета при $p < 0.05$ (two-tailed) и е означена със ★

Използвани съкращения: ПВ-МСККс – кондиционирана среда от мезенхимни стволови клетки от пълна връв; MFI – среден интензитет и ниво на мембранна експресия; BR3 – рецептор за В-клетъчен активационен фактор; PD-1 – program death 1 рецептор; PI – пропидиев йодид; PGE2 – простагландин E2;

При пациентите със *СЛЕ*, по отношение на клиничните прояви на заболяването, получихме интересни резултати. Отрицателна сигнификантна корелация, макар и незначително силна, беше намерена между възрастта на включените в проучването пациенти със *СЛЕ* и кожно-лигавичните клинични прояви, както и между пациентите с бъбречно увреждане и давността на заболяването; Отрицателна асоциация установихме и между стойностите на *анти-двДНК* антитела и кожно-лигавичните прояви, както и между хематологичните отклонения и стойностите на *С3*. По отношение на изследваните от нашия екип маркери и тяхната връзка с клиничните прояви на

включените болни със *СЛЕ* в дисертационния труд, открихме положителни зависимости между: мускулно-скелетните прояви и процентът на В клетките, позитивни за *CD80* маркера в групата на култивираните със среда на *МСК*; както и между бъбречното увреждане и нивата на *PGE2* в средата на *РВМС*, под влияние на фактори, освободени от стволите клетки. Останалите зависимости между клиничните прояви на пациентите с поставена диагноза *СЛЕ* и други клинични характеристики са представени на *табл. 14*.

| | Кожно-лигавични | Мускулно-скелетни | Хематологични отклонения | Бъбречно увреждане | Невро-психиатрични |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| Възраст | $r = -.53^p; p = .027$ | ns. | ns. | ns. | ns. |
| Давност на заболяването | ns. | ns. | ns. | $r = -.49^n; p = .046$ | ns. |
| SLEDAI | ns. | ns. | $r = .53^p; p = .027$ | ns. | ns. |
| СУЕ | ns. | ns. | $r = .49^p; p = .048$ | ns. | ns. |
| СРП | ns. | ns. | ns. | ns. | $r = -.52^n; p = .032$ |
| анти-двДНК | $r = -.58^n; p = .018$ | ns. | ns. | ns. | ns. |
| СЗ | ns. | ns. | $r = -.50^n; p = .039$ | ns. | ns. |
| % CD80+ В клетки (ПВ-МСКкс) | ns. | $r = .51^p; p = .037$ | ns. | ns. | ns. |
| PGE2 (ПВ-МСКкс) | ns. | ns. | ns. | $r = .52^p; p = .031$ | ns. |

Таблица 14. Корелационни зависимости между клиничните прояви на пациентите с поставена диагноза *СЛЕ* и част от изследваните маркери, както и други клинични характеристики

p - two-tailed *p* value (Spearman's test)

r - коефициент на корелация

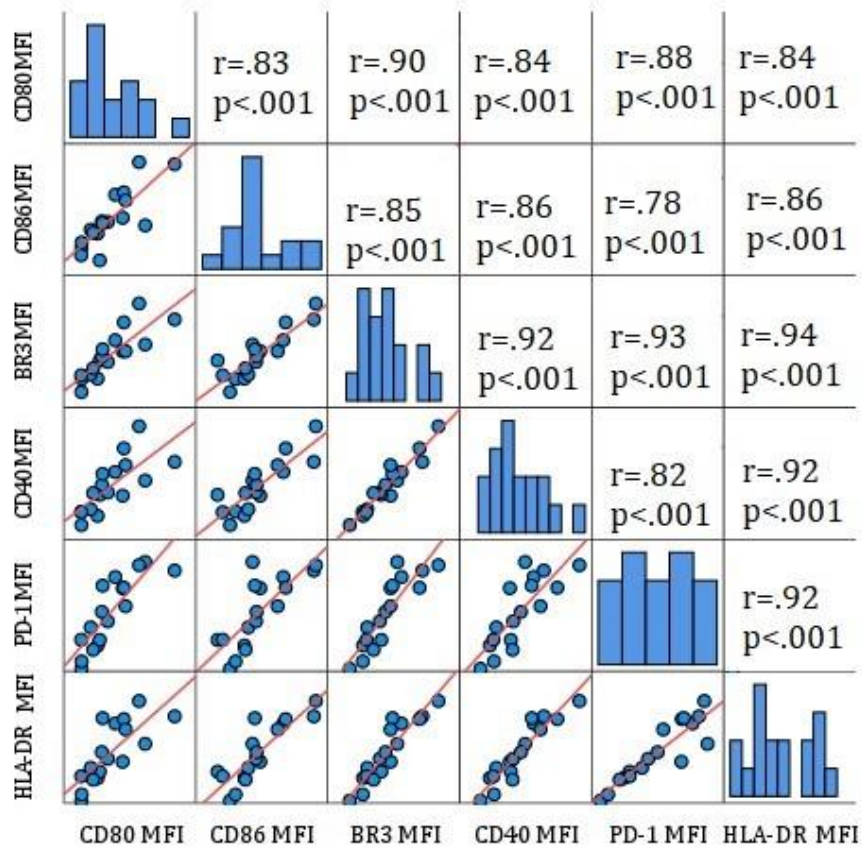
^p положителна сигнификантна връзка

ⁿ отрицателна сигнификантна връзка

ns. – несигнификантна разлика

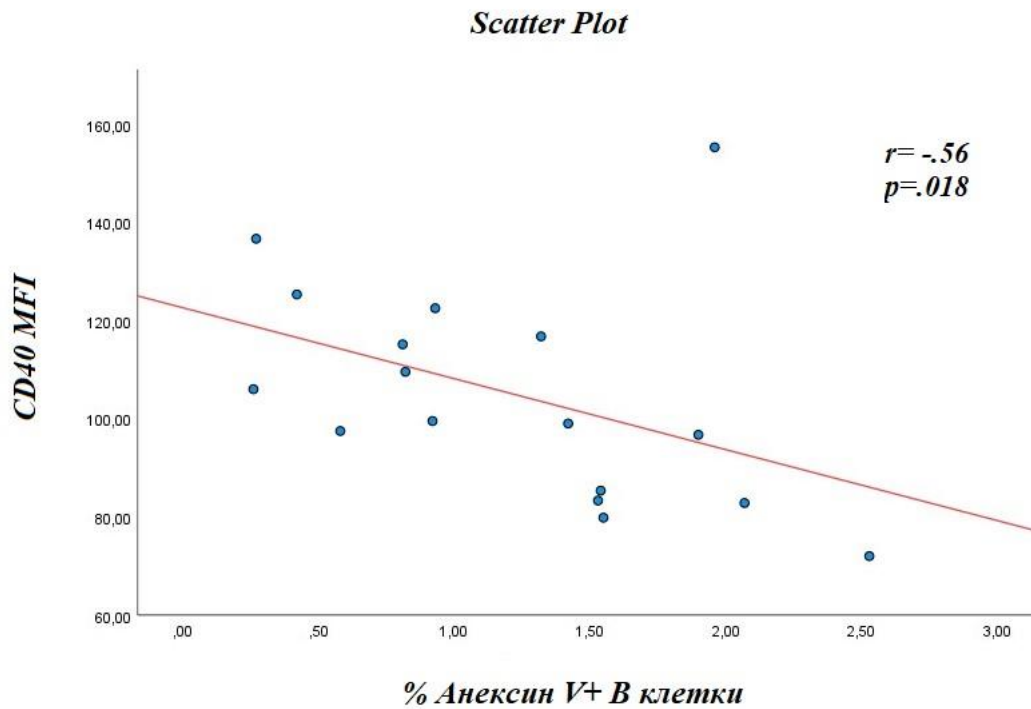
Във връзка с изследването на секретом от *МСК* и неговото влияние върху маркери, експресирани на мембраната на В лимфоцити и молекули, секретирани в културалната среда на *РВМС* при пациентите с поставена диагноза *СЛЕ*, установихме много силни положителни корелации по отношение нивото на мембранна експресия на изследваните маркери. Както при здравите лица и при болните със *СЛЕ* се наблюдаваше същата тенденция на силна сигнификантна зависимост между В-клетъчните маркери (*фиг. 37*).

Scatterplot Matrix



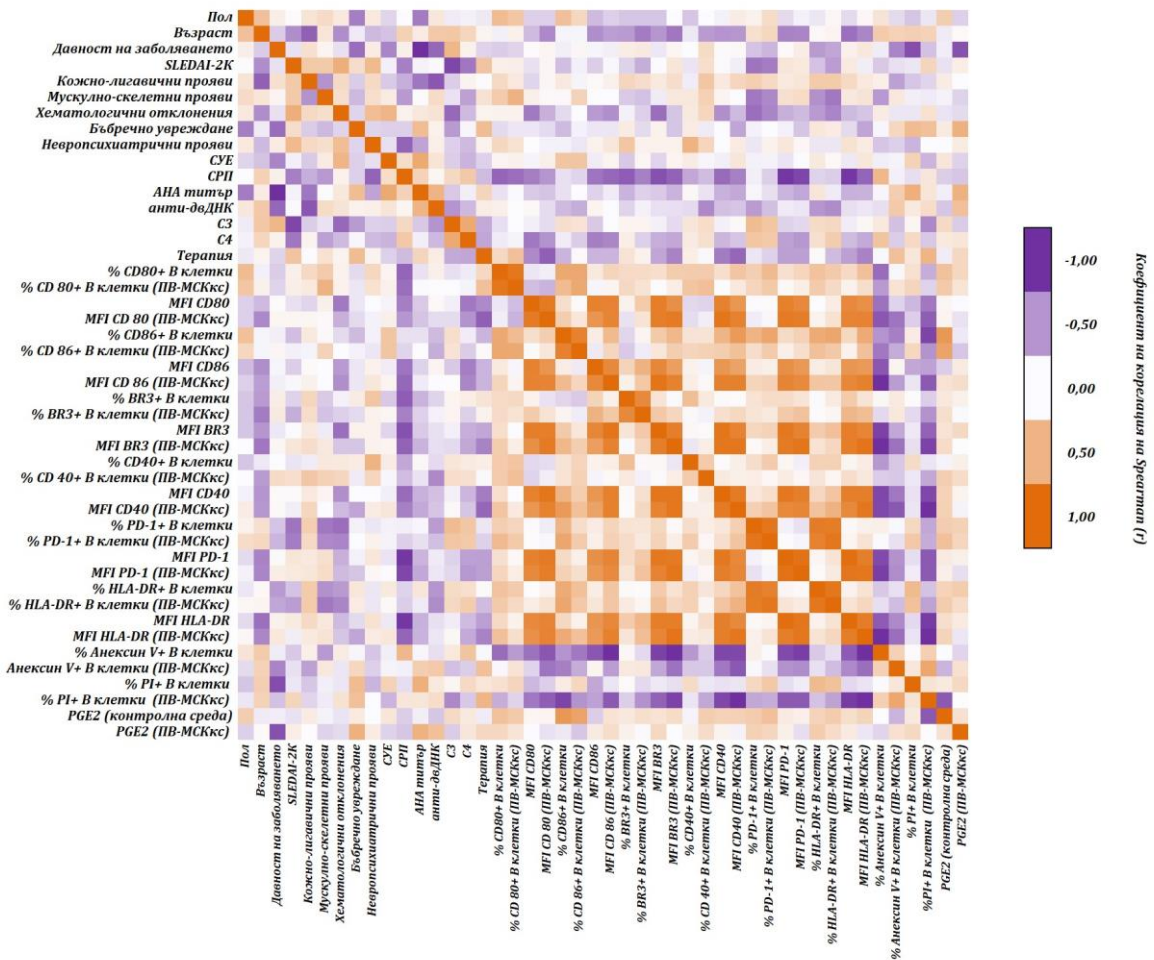
Фигура 37: Scatterplot матрица, отразяваща установените корелации по отношение на MFI между изследваните маркери при пациенти със СЛЕ

Значима отрицателна зависимост при болните със СЛЕ наблюдавахме между процента на В клетките в ранна апоптоза и нивото на експресия на маркера *CD40*, отново в групата на *PBMC*, култивирани в кондиционирана среда на *MCK* (фиг. 38).



Фигура 38: Scatterplot диаграма, отразяваща зависимостта между процента на B лимфоцитите в ранна апоптоза (Анексин V⁺) и MFI CD40 под влияние на секретом от МСК при пациенти със СЛЕ

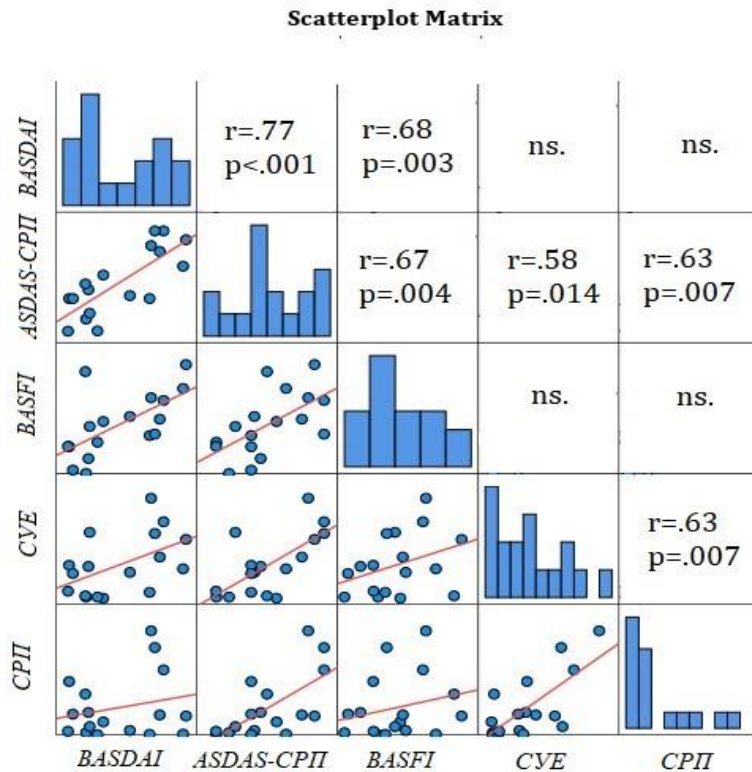
Останалите зависимости, установени между изследваните маркери при пациентите със СЛЕ, са обобщени и представени под формата на корелационна матрица на *фиг. 39*.



Фигура 39 Корелационна матрица, представяща връзката между изследваните показатели в групата на болните със СЛЕ посредством коефициент на Spearman.

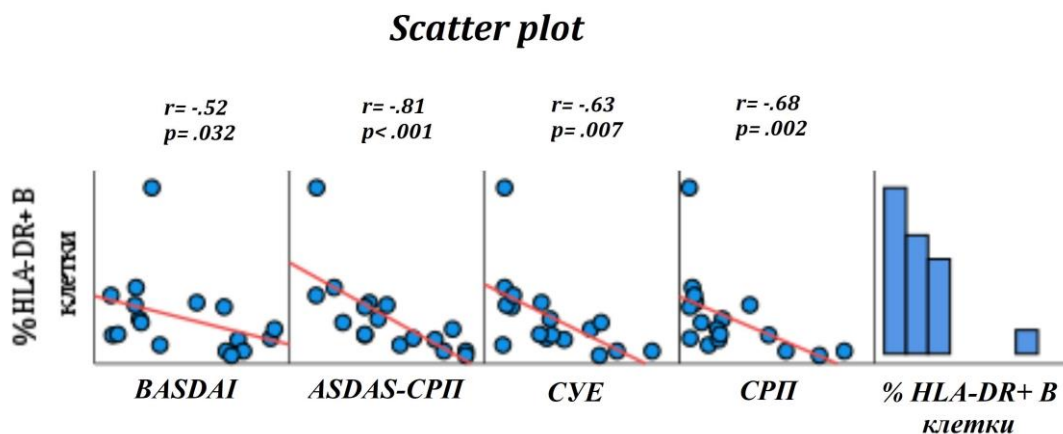
Използвани съкращения: АНА-анти-нуклеарни антитела; *двДНК*-двуверижна ДНК; *СПП*-С реактивен протеин; *СУЕ* – скорост на утаяване на еритроцитите; *ПВ-МСКкс* – кондиционирана среда от мезенхимни стволови клетки от пънна връв (*umbilical cord mesenchymal stem cells conditioned medium*); *SLEDAI* - *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*; *MFI* – средният интензитет и нивото на мембранна експресия (*mean fluorescence intensity*); *BR3* – рецептор на В-клетъчен активационен фактор; *PD-1* – *program death 1*; *PI* – *пропидиев йодид*; *PGE2* – *простагландин E2*;

При болните с *АС*, очаквано положително корелираха стойностите на *BASDAI*, *ASDAS-СПП* и *BASFI*, като за *ASDAS-СПП* анализът показва положителна връзка и със стойностите на пациентите по отношение на възпалителните маркери *СУЕ* и *СПП* (фиг.40). Поради липсата на сигнификантна зависимост между демографските характеристики на болните с *АС* и изследваните маркери, данните не са графично изобразени.



Фигура 40: Scatterplot матрица, отразяваща установените корелации по отношение на скоровете за активност на заболяването при пациентите с АС и изследваните възпалителни маркери CVE и CPII.

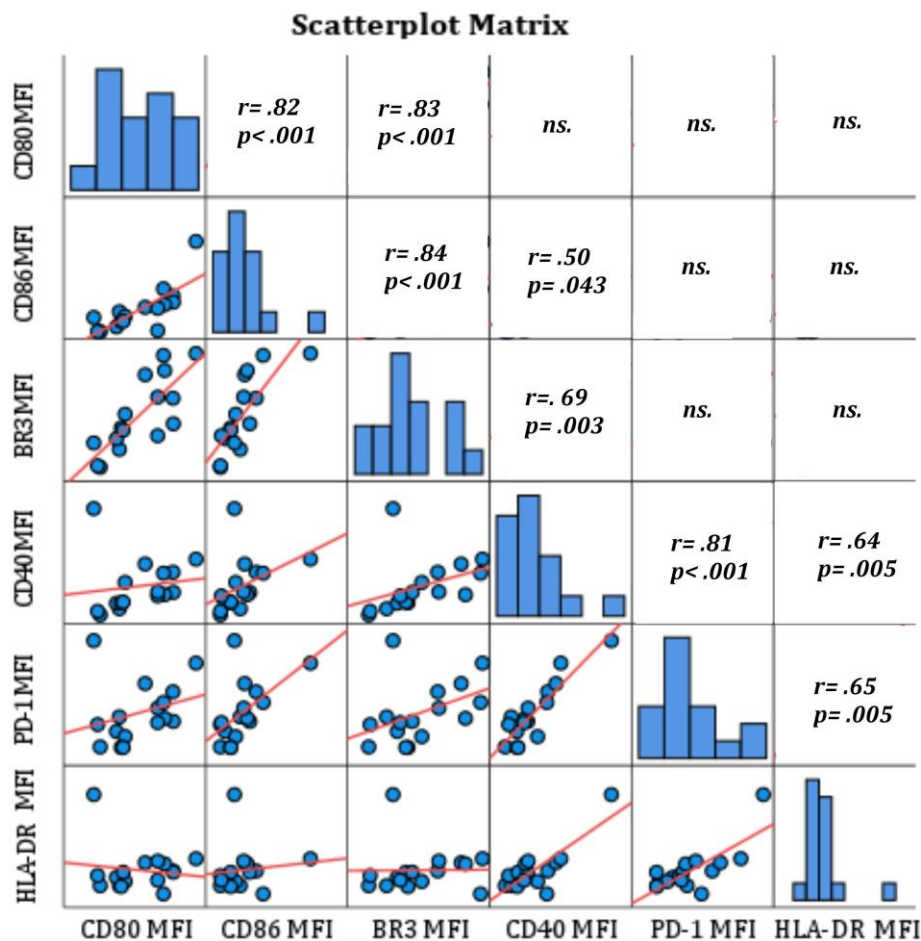
По отношение активността на заболяването и изследваните В-клетъчни маркери, силна отрицателна асоциация, установихме между процент $HLA-DR^+$ В клетки и стойностите на ASDAS-CPII, както и тези на BASDAI, CVE и CPII (фиг.41).



Фигура 41: Scatterplot матрица, отразяваща зависимостта между скоровете за активност на АС, възпалителните показатели (CVE и CPII) и получените резултати, по отношение на процент В клетки, експресиращи HLA-DR маркера под влияние на секретом от ПВ-МСК.

За разлика от получените резултати при пациентите със СЛЕ и здравите лица, при болните с АС установихме леки разминавания по отношение на връзката между

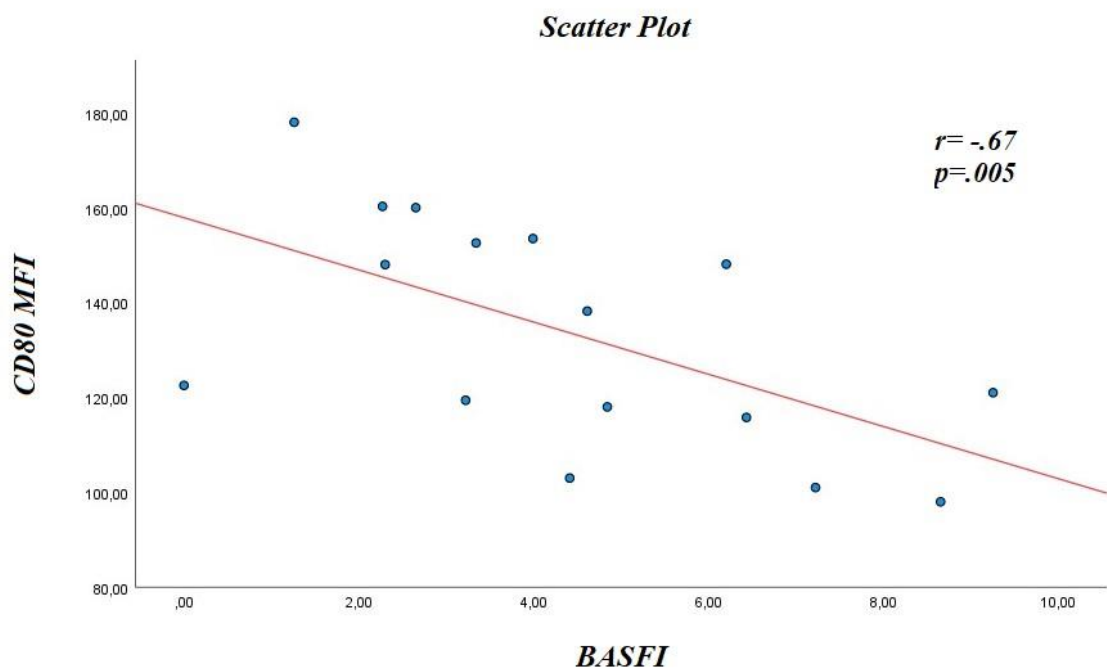
ниво на мембранна експресия на В-клетъчните молекули, таргет на настоящия дисертационен труд. Силно положително корелираха стойностите на *CD80* (MFI) и *CD86* (MFI) както помежду им, така и с тези на *BR3* рецептора (MFI). Също значителна зависимост имаше между *CD40* (MFI) и стойностите на *BR3* (MFI) и *PD-1* (MFI). Относно *HLA-DR* мембраната експресия (MFI), зависимост намерихме между нея и експресията на *CD40* (MFI) и *PD-1* (MFI). Данните са представени графично на *фиг. 42*



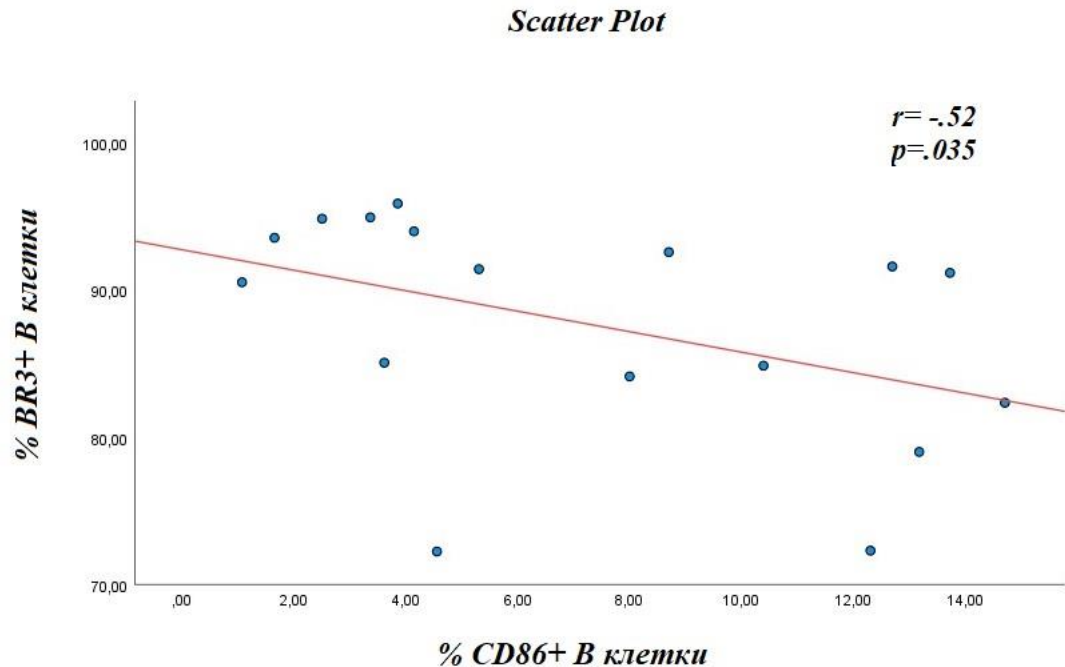
Фигура 42: Scatterplot матрица, отразяваща установените корелации по отношение на MFI между изследваните маркери при пациенти с АС, под влияние на секретом от МСК.

В хода на проведения корелационен анализ на резултатите при пациентите с поставена диагноза АС, впечатление направиха две корелационни зависимости, една от които касае активността на заболяването и възможността за връзката и с някои от изследваните маркери. Отрицателна беше зависимостта между интензитетът на експресия на *CD80* маркера под влияние на секретом от МСК и стойностите на функционалния индекс за активност на заболяването (*BASFI*) (*фиг. 43*). От друга страна, също силно впечатление прави отново обратната зависимост между процента на

$BR3^+$ и $CD86^+$ В клетките, когато са култивирани в среда на стволови клетки при изследваните болни с аксиален спондилоартрит (фиг. 44).

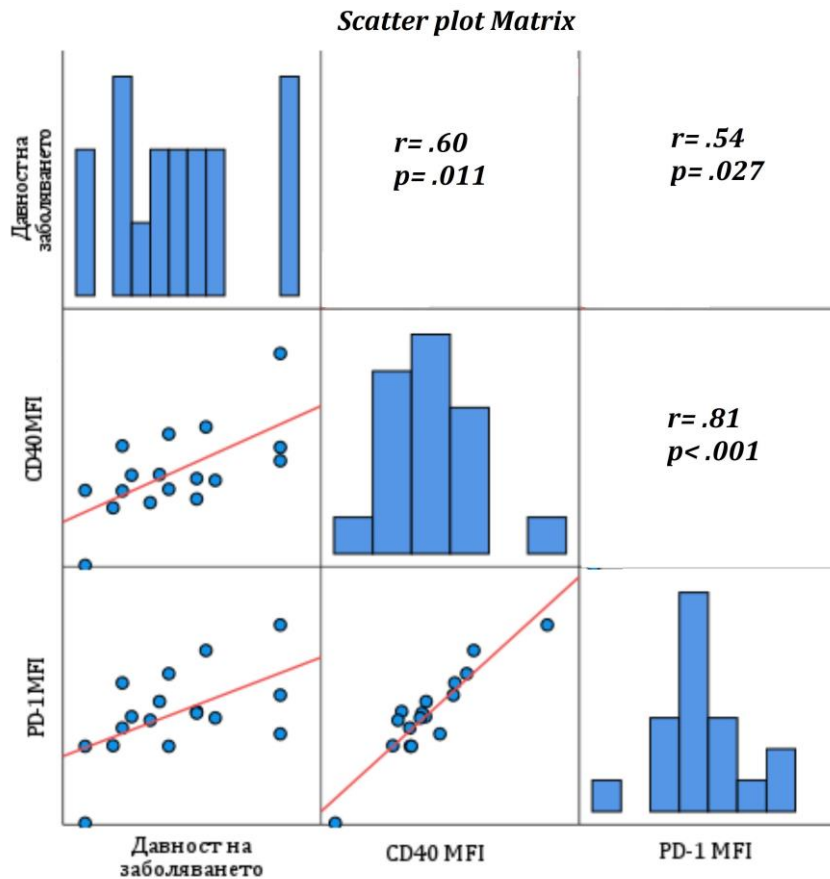


Фигура 43: Scatter plot диаграма, представяща отрицателна корелационна връзка между MFI CD80 маркера и стойностите на BASFI при пациенти с АС, под влияние на секретом от ПВ-МСК.



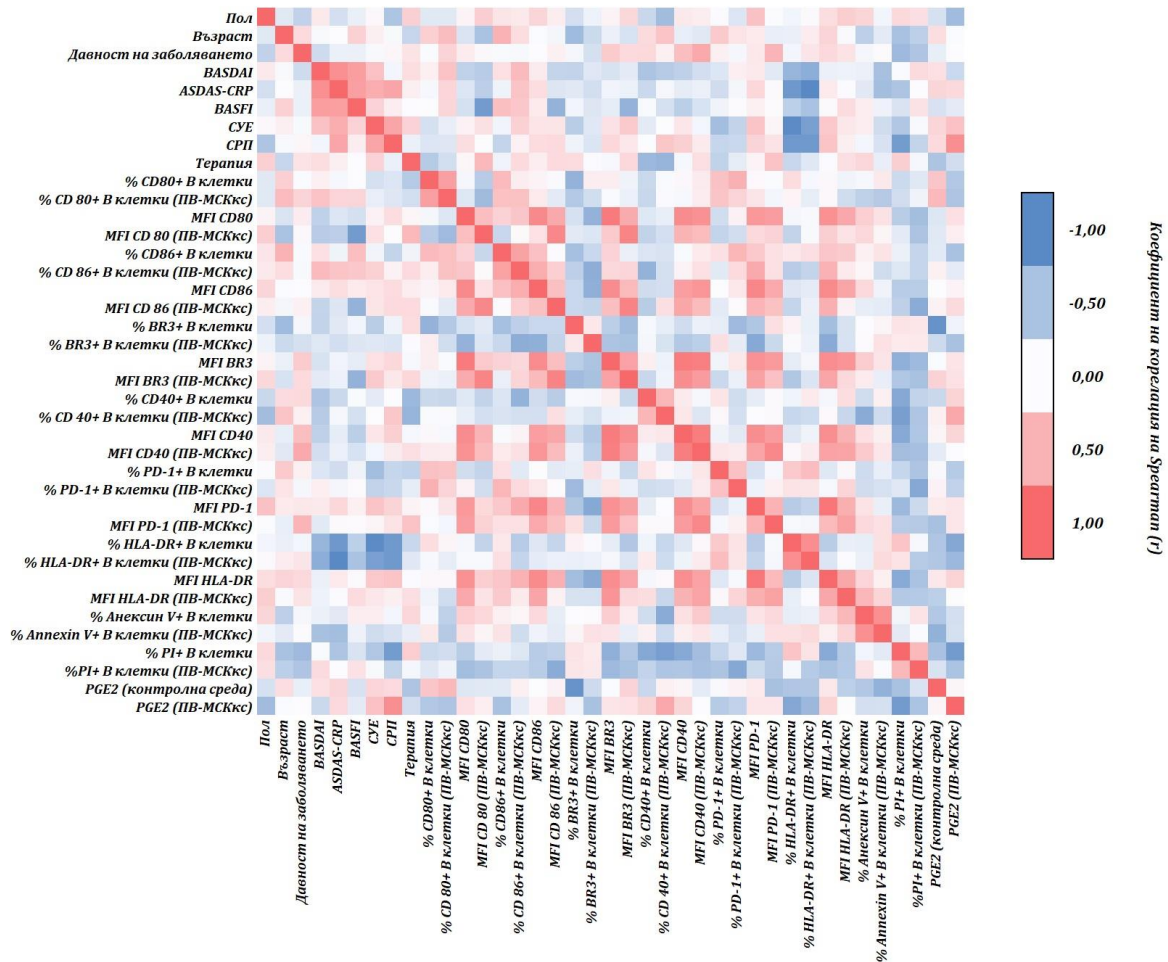
Фигура 44: Scatter plot диаграма, представяща отрицателна корелационна зависимост между процента на В клетките, позитивни за експресията на BR3 рецептора и CD86 молекулата, под влияние на секретом от ПВ-МСК при пациенти с поставена диагноза АС.

Последна значима зависимост, която открихме при болните с АС, е тази между давността на заболяването и два от изследваните маркери, а именно *CD40 (MFI)* и *PD-1 (MFI)*. Установената зависимост беше положителна, като доста по-висока беше асоциацията между давността на заболяването и интензитета на мембранна експресия на *CD40* молекулата (фиг. 45).



Фигура 45: Scatter plot матрица, отразяваща зависимостта между давността на заболяването и изследвани маркери при пациенти с АС

Останалите зависимости, установени между изследваните маркери при пациентите с АС, са представени под формата на корелационна матрица на *фиг. 46*



Фигура 46: Корелационна матрица, представяща връзката между изследваните показатели в групата на болните с АС посредством коефициент на Spearman.

Използвани съкращения: АНА- анти-нуклеарни антителиам; двДНК - двуверижна ДНК; СРП-С реактивен протеин; SYE – скорост на утаяване на еритроцитите; ПВ-МСККс – кондиционирана среда от мезенхимни стволови клетки (umbilical cord mesenchymal stem cells conditioned medium); BASDAI - Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI - Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; ASDAS-CRP - Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score-C reactive protein; MFI – среден интензитет на флуоресценция (mean fluorescence intensity); BR3 –рецептор на BAFF; PD-1 – program death 1; PI – пропидиев йодид; PGE2 – простагландин E2;

Поради това че в хода на нашите изследвания и получените резултати не успяхме да установим детектируеми нива на BAFF и IDO в културалните среди на РВМС при изследваните участници, беше невъзможно да се анализира връзката им с клиничните и демографските характеристики, както и изследваните маркери, които са таргет на настоящия дисертационен труд.

VI. ОБСЪЖДАНЕ

Секретомът на *МСК* се характеризира с преобладаващи активизиращи имуномодулаторни свойства, които го правят обещаващ биологичен материал за последващи експериментални и клинични изследвания в областта на аутоимунитета (Munoz-Perez et al. 2021). Плейотропните ефекти на секретомата от *МСК* са в основата на неговия имуномодулаторен потенциал, но нееднозначния поток на информация в насока влиянието му върху В клетките е една от пречките пред разработването на иновативни терапии. От друга страна, В лимфоцитите представляват интерес, поради техните общопризнати качества и значение за имунопатогенезата на аутоимунните заболявания.

В представения дисертационен труд си поставихме за цел да изследваме способността на секретом от човешки *МСК* от пъпна връв да повлиява повърхностната експресия на молекули, свързани с преживяването, активацията и антиген-представящата функция на В клетките. Така поставената цел беше преследвана посредством методи на клетъчно култивиране и задълбочен флуоцитометричен анализ, а получените резултати бяха допълнени с изследване на цитокиновата секреция на култивираните *РВМС* под влияние на секретом от *МСК*. Вниманието ни беше фокусирано върху успешно и поэтапно следване на поставените за изпълнение експериментални задачи. Водещата ни цел беше допълване на знанието за мястото на стволовите клетки с мезодермален произход, относно тяхната имуномодулация спрямо В клетки на болни и здрави индивиди от българската популация.

1. Характеристика на изследваните пациенти и здрави доброволци

В дисертационния труд бяха включени общо 44 индивида: 10 здрави контроли и 34 пациента, разделени в две групи - 17 пациента с поставена диагноза системен лупус еритематозус и 17 пациента с анкилозиращ спондилит. Подборът на подходящите пациенти, както и здрави доброволци, беше осъществен чрез предварително зададени включващи и изключващи критерии.

За оценка на болестната активност на пациентите бяха приложени индексите *SLEDAI-2K* за пациентите със *СЛЕ* и *BASDAI*, *ASDAS*, калкулиран с лабораторния биомаркер *СРП*, и *BASFI* за определяне на нарушения във функционалната активност на пациентите с *АС*. Преобладаването на пациентите със средна активност на *СЛЕ* (10.88 ± 6.95) отговаряше на изискванията ни за оценка на ефективността на секретомата

за повлияване на В лимфоцити и експресираниите от тях маркери. Причината, поради която при пациентите с *АС* бяха използвани три индекса за болестна активност се корени в по-добрата разграничаваща способност на *ASDAS* по отношение определянето на ниска и висока болестна активност, особено в ранните фази на *CnA* (Fernández-Espartero et al. 2014). Пациентите с *АС* бяха с налична болестна активност, предвид средните стойности на двата скората *BASDAI* (4.15 ± 2.29) и *ASDAS-CPPI* (3.05 ± 1.13). *ASDAS-CPPI* беше приложен вместо *ASDAS-CVE*, поради това че С-реактивният протеин е по-добър индикатор за възпаление от скоростта на утаяване на еритроцитите и в същото време е по-чувствителен маркер, реагиращ по-бързо на промени в клиничните показатели (Harrison 2015).

Най-честият симптом на болестта анкилозиращ спондилит е сутрешната скованост. По-голямата част от пациенти с *АС* в настоящото проучване съобщават за сутрешна скованост, която продължава 30-60 мин., едва трима от пациентите я определят като доста продължителна (над 60 мин.). Обикновено, за облекчаването на този толкова характерен за заболяването симптом, значение има както приложената терапия, така и изпълнението на специфични упражнения от болния (Calin et al. 1977; Gorman et al. 2002). В унисон с тези данни е и средната стойност на валидирания специфичен индекс *BASFI* за оценка на общото ниво на функция на пациентите, който е леко повишен (4.17 ± 2.71), предвид отговорите на въпросите на пациентите и това, че продължителността на сутрешната скованост е един от тези въпроси.

Не установихме никаква сигнификантна асоциация между скората за активност на *СЛЕ* и клиничните или имунологични характеристики, както и с експресията на изследваните мембранни маркери или секретираниите разтворими цитокини. Това, което нашият екип установи обаче при пациентите с *АС* беше силна положителна корелация между трите използвани скората за активност на заболяването. В същото време, силна положителна корелация се наблюдаваше между *ASDAS-CPPI* и нивата на острофазните белтъци *CVE* и *CPPI*, предвид това, че тези възпалителните маркери са част от двете версии на *ASDAS*, калкулиран със *CPPI* или със *CVE* (Van Der Heijde et al. 2009).

Aydemir и сътр. установяват, че повишените нива на *CVE* и *CPPI* при пациенти с *АС* не са често срещани и не корелират с клиничната активност на заболяването (Aydemir et al. 2022). Смята се, че повишените нива на острофазните белтъци се наблюдават при тези пациенти с *АС*, които съобщават за периферно ставно засягане или налично допълнително възпалително чревно заболяване (Zochling and Braun 2005). При нашите пациенти имаше и такива с нормални серумни нива на *CVE* и *CPPI*, което

донякъде се обяснява с кохортата ни от пациенти, чиято средна давност на заболяването беше определена като 10.59 ± 6.86 години и разбира се, донякъде с терапевтичното им повлияване. Например, приложението на *HCSPBC* понижава нивата на *CRP* след 12 месеца на терапия, без това да води до подобряване на цялостната симптоматика и активност на заболяването (*ASDAS*) (Иванова 2012). При изследваните болни със *СЛЕ* също преобладаваха тези с нормални нива на възпалителните маркери *СУЕ* и *СРП*, макар че средната стойност на *СРП* беше отчетена като повишена (9.42 ± 19.54). *СРП* е един от маркерите, който се използва за разграничаване на налична инфекция от релапс на заболяването, което за пациенти на имunosупресивна терапия е от значение (Ospina et al. 2017).

Интересни негативни корелации установихме между възрастта и кожно-лигавичните прояви, както и давността на *СЛЕ* и бъбречното увреждане. Нашите данни донякъде са в унисон с тези съобщени в научната литература, тъй като пеперудообразният обрив е по-често срещан при пациенти на възраст под 50г., обикновено в комбинация с повишена температура (Cildag et al. 2019). В тази насока са и данните от едно мултицентрово проучване, което сравнява клиничните прояви, съпътстващи заболяването сред 797 китайски пациенти с ювенилно начало, начало по време на средна възраст и късно начало на *СЛЕ*. При пациенти с ювенилен лупус (под 18г.) се наблюдава не само по-висока болестна активност, но и по-голяма честота на кожно-лигавичните прояви, заедно с по-висока степен на протеинурия (Wen et al. 2022). А по отношение на отрицателната корелация между давността на заболяването и бъбречното ангажиране, действително, бъбречно засягане може да бъде установено при повече от половината пациенти през първата година от диагностицирането им със *СЛЕ* (Fulgeri et al. 2018).

Отново, подчертаваме, че изследваните пациенти от двете групи заболявания бяха на медикаментозна терапия с различни фармакологични средства. Изключително важен изключващ критерии за участието на пациентите със *СЛЕ* беше терапията с моноклоналното антитяло, насочено срещу *BAFF* (*Benlysta*), тъй като това би попречило на целите ни, свързани с изследването на В клетките и В-клетъчния лимфоцитен стимулатор. По отношение на другите приложени медикаменти, според данни от предклинични и клинични проучвания, трансплантацията на *МСК* в повечето случаи е съпътствана от приложението на имunosупресивна терапия. Това е с цел потискане развитието на *GVHD* или като част от стандартния терапевтичен план на пациентите с автоимунни заболявания, като в повечето случаи стволовите клетки дори

имат способността да намалят отрицателните ефекти на приложените имуносупресивни лекарства върху имунната система (Наjkova et al. 2017). В тази връзка, са докладвани променена функционална активност на стволовите клетки, но не и на имуносупресивния им потенциал, вследствие на действието на глюкокортикоиди, инхибитори на калциневрин, *mTOR* и *инозин 5'-монофосфат дехидрогеназата (IMPDH)* (Javorkova et al. 2018).

В настоящия дисертационен труд са използвани кондиционирана среда от *МСК* от здрави донори и *РВМС* от пациенти със *СЛЕ* и *АС*, което все пак повдига въпроса за действието на терапевтичните средства цялостно върху изследваните болни и получените от нас резултати. От друга страна, набирането на новодиагностицирани пациенти със *СЛЕ* и *АС*, без терапия, значително би забавило хода на изследванията, особено в период на пандемия, когато комуникацията между лекар и пациент представляваше сериозно предизвикателство. Важно е да се спомене, че включените пациенти не са били на високи дози имуносупресивни лекарства, а при пациентите на биологична терапия, изолирането на *РВМС* беше осъществено седмица – две след последната инжекция от съответния медикамент. Също така, по отношение на *В* лимфоцитите в литературата основно се съобщава за повлияване на пролиферативния потенциал и имуноглобулиновата им секреция, вследствие на приложени медикаменти с потискащо имунната система действие (Heidt et al. 2008). Например, *НСПВС* основно потискат антияловата продукция посредством инхибиране на *СОХ2*, което впоследствие повлиява транскрипционни фактори, свързани с диференциацията на *В* клетките в плазматични (Bancos et al. 2009; Bernard and Phipps 2010). Тези констатации могат да бъдат подкрепени и от факта, че в нашата експериментална постановка преобладават пациентите с имунологична активност на заболяването, въпреки провежданата медикаментозна терапия.

Като част от предварителния подбор, пациентите бяха добре охарактеризирани имунологично. Преобладаваха пациентите със *СЛЕ*, които имат висок титър на *АНА* и висока концентрация на специфичните за *СЛЕ* *анти-двДНК* антитела. Абнормално високата концентрация на *анти-двДНК* антитела, заедно с висок *АНА* титър са многократно споменавани в научната литература при пациенти с това заболяване (Wichainun 2013). Средно около 97.1 % от пациентите със *СЛЕ* са позитивни за *АНА* (Aringer et al. 2022), а при изследваните от нас пациенти със *СЛЕ* този процент беше определен като 94%. Установената отрицателна корелация по отношение на *анти-двДНК* антитела и кожно-лигавичните прояви при този тип пациенти, не беше описана

до този момент в международната литература. Този вид антитела по-скоро са свързани с бъбречни прояви, измерени като повишена протеинурия и антителата могат да бъдат открити преди окончателната увреда на органа (Asif et al. 2022).

От имунофлуоресцентните образи преобладаващи бяха *АС-1* (хомогенно ядрено светене) и *АС-4* (фино петнисто светене), наблюдаваха се и други образи самостоятелно или в комбинация (“смесен образ”), като имаше и данни за пациенти, които показват *АС-5* (едро петнисто светене) и *АС-21*-подобен образ (анти-митохондриално подобно светене). Анализ при деца с лупусен нефрит показва, че действително най-честото *АНА* светене при *СЛЕ* е хомогенно ядрено светене, следвано от петнисто и нуклеоларно светене (Novianti et al. 2020). Според *ICAP*, *АС-1* се асоциира с антитела срещу *двДНК*, *хистони* и *нуклеозоми*; *АС-4* отговаря често на антитела срещу *SS-A/Ro*, *SS-B/La*, *Mi-2*, *TIF1 γ* , *TIF1 β* , *Ku*, докато *АС-5* се свързва с *hnRNP*, *UIRNP*, *Sm*, *RNA polymerase III*. *АС-21* образът се означава като митохондриално-подобно светене и в повечето случаи е свързан с *АМА-M2*, срещани се при първичен билиарен холангит. Нито един от изброените образи не е характерен само и единствено за системния лупус еритематозус (Andrade et al. 2022). По отношение на описаните по-горе антигени, детектирането на антитела, специфично насочени срещу тях, не беше таргет на настоящия дисертационен труд.

Понижението на нивата на компонентите от системата на комплемента е характерно за системния лупус, поради отлагането им в различни тъкани. Повечето от изследваните пациенти в нашето проучване бяха с нормални серумни нива на *С3* и *С4*. Едно от възможните обяснения разбира се е приложената стандартна терапия за лечение на болните. Данни показват, че терапията с *НСQ* е ефективна поддържаща терапия на пациенти със *СЛЕ* и обичайната доза *НСQ* може да има известно предимство за подобряване на ниските нива на комплемента (Wakiya et al. 2020). От друга страна, неутропенията при *СЛЕ* е значително свързана с тромбоцитопения, лимфопения и ниски нива на *С3*, а от проведения анализ установихме отрицателна корелация между *С3* и пациентите с хематологични отклонения (Meyer et al. 2020). Връзката между *SLEDAI-2K* индекса, *СVE* и хематологичните отклонения, установена от нашия екип, е често съобщавана корелационна зависимост при пациенти със *СЛЕ* (Soliman et al. 2020; Suszek et al. 2020; Santacruz et al. 2022).

При здравата група индивиди и пациентите с *АС*, където има пълно равенство или почти равен брой на представители от двата пола, не установихме сигнификатно значими асоциации по отношение на пола, което е причина и те да не бъдат описани.

Неравномерното полово разпределение, предвид патогенезата на СЛЕ, беше пречка, която не позволи да бъде направено подобно сравнение.

2. Характеристика на МСК и получаване на кондиционирана среда

През 2006г. *Arnold Caplan* и *James Dennis* определят МСК като “трофични медиатори” - функция на МСК, която е коренно различна от техния потенциал за диференциация в различни клетъчни типове. Ефектите на секретирани от МСК биоактивни молекули могат да бъдат директни, индиректни или комбинация от двете. Директните ефекти се проявяват чрез предизвикване на вътреклетъчно сигнализиране под действие на освободени медиатори, докато индиректните са свързани със стимулирането на друга клетка в близост за отделяне на функционално активен агент. Авторите определят тази индиректна дейност като “трофична” с потенциал за изумителна клинична употреба, особено за повлияване на състояния като инфаркт, инсулт или регенерация на минискус (*Caplan and Dennis 2006*).

В контекста на тези констатации, първата цел, която нашият екип си постави беше да се сдобием с кондиционирана среда от стволови клетки, за да могат да бъдат проведени експерименталните задачи, доближаващи ни до отговорите на поставените от нас въпроси, относно тези трофични и имуномодулаторни фактори, част от секретото на МСК и тяхното директно или индиректно влияние върху В лимфоцити. За тази цел първо беше осъществено изолиране, култивиране и характеризиране на мезенхимни стволови клетки от пъпна връв, от които на следващ етап успешно да бъде отделена, богата на биоактивни молекули, културална среда, която да се съхрани за последващите етапи на експерименталното проучване.

Изборът на тъкан, от която да бъдат изолирани мезенхимни стволови клетки, беше продиктуван от няколко биологични характеристики на пъпната връв. Пъпната връв представлява вид биологичен отпадък, който се смята за ненужен по отношение развитието на новороденото и следователно липсват етични съображения, свързани с употребата на тъканта за изследователски цели. Лесното изолиране на ПВ-МСК в комбинация с тяхната недиференцираност, по-висока пролиферативна активност и пониска експресия на *HLA* клас I молекули, както и на *HLA-DR* спрямо тази на КМ-МСК, направиха пъпната връв предпочитан тъканен източник на стволови клетки за целите на настоящия дисертационен труд (*Shang et al. 2021*). В допълнение, обширен протеомен анализ, който сравнява секретото на МСК, изолирани от четири различни тъкани (мастна тъкан, костен мозък, плацента и пъпна връв), предопредели нашето

решение също в посока *ПВ-МСК*. Авторите заключават, че макар секретомът на *МСК* да е сходен като състав при тези тъкани, то средите, получени от фетални тъкани предлагат по-разнообразен състав от този на *МСК*, получени от мастна тъкан и костен мозък (Shin et al. 2021).

Въпреки че съхраняването на *ПВ-МСК* на новородено е една често срещана практика, предоставяна като медицинска услуга от множество тъканни банки по света, все още липсва единен стандартизиран протокол за изолиране на клетки от пъпна връв (Skiles et al. 2020). За нашия експериментален подход заложихме на метод, включващ ензимно разграждане на компонентите на екстрацелуларния матрикс посредством ензимна смес в комбинация с механично надробяване на тъканта. Поради факта, че *МСК* не са еднородна клетъчна популация, съществуват и други техники на изолирането им от пъпна връв, като например отделянето на парче пъпна връв, което се поставя в съд за клетъчно култивиране в културална среда, подход, при който се разчита на миграционния потенциал на стволовите клетки (т.нар “метод на експлантация”) (Abouelnaga et al. 2022). След обстоен преглед на наличната специализирана литературна информация се спряхме на ензимния подход, поради неговата бързина за получаване на клетки, както и липсата на обективни разлики между подходите на изолиране по отношение на жизнеспособността, морфологията, скоростта на пролиферация, повърхностната маркерна експресия, нивата на секретираните цитокини или способността за диференциация на изолираните стволови клетки (Skiles et al. 2020).

За характеризирането на изолираните клетки се придържахме към описаните вече критерии на *ISCT* (Dominici et al. 2006). Морфологията на стволовите клетки, която беше наблюдавана, отговаряше на тази характерна за фибробластите с микроскопски видимо голямо овално ядро и издължено вретеновидно или звездовидно клетъчно тяло (Ravikanth et al. 2011). Отличителна черта беше видимата морфологична хетерогенност на клетките. В контекста на това трябва да отбележим, че за наблюдаваната хетерогенност значение има и избраната тъкан за източник на *МСК*. Пъпната връв е комплексен орган, от който могат да бъдат изолирани *МСК* от различни негови анатомични региони или части, като например *Wharton's Jelly (WJ)*, периваскуларното пространство и умбиликалната мембрана на пъпната връв (Semenova et al. 2021). Наблюдаваната морфологична хетерогенност на изолираните клетки от нашия екип, отчасти се дължи на надробяването на цялостната тъкан на пъпната връв след премахването на кръвоносните съдове, което е причина за наличието на стволови

клетки от трите посочени региона на тъканта – т.нар. “смесена популация” от *МСК*. От друга страна, по литературни данни *МСК*, изолирани от *WJ*, представляват морфологично и функционално високо хомогенна популация (*WJ-МСК*) от клетки (Musiał-Wysocka et al. 2019). Изборът, да използваме цялата пъпна връв като източник на *МСК*, беше продиктуван и от нашата таргетна цел - да се сдобием с максимално обогатен секретом.

От друга страна, благодарение на бързото прилепване към дъното на съда за култивиране успяхме да изпълним първия критерии за принадлежност на изолираните клетки към *МСК*, а именно техните адхезивни свойства и принадлежността им към адхерентен клетъчен тип. Големият пролиферативен потенциал на клетките доведе бързо до формирането на клетъчен монослой с 80-90% конfluентност – това е етапът от клетъчното култивиране на *ПВ-МСК*, на който беше събрана и съхранена културалната среда.

Друг важен аспект, на който трябва да се обърне внимание, е пасажът на *МСК*. Кондиционираната среда беше събрана от клетки на нулев и първи пасаж за последващите цели, което означава, преди клетките да бъдат трипсинизирани или след първото им субкултивиране. Данни по отношение на влиянието на *trypsin-ЕДТА* сочат пълна липса на нарушение на рецепторния мембранен интегритет, както и ограничени ефекти на ензима по отношение на мултипотентността на *МСК* (Fong et al. 2017; Tsuji et al. 2017). *ПВ-МСК* на различни пасажии имат сходни морфология, експресия на маркери и секреция на цитокини, въпреки това с увеличаването на пасажа обикновено се наблюдават натрупването на хромозомни аберации, както и се повишава риска от инфектирането на клетъчната култура (Baranovskii et al. 2022; Tavasolian and Inman 2023). Натрупването на мутации е една от причините за възможната туморогенност на *МСК*, а в същото време, репарационната ДНК активност е по-висока в по-ранните пасажии на клетките (Wu et al. 2017). Също така, фенотипът, с който се характеризират стареещите клетки или т.нар. “*senescence-associated secretory phenotype*” (*сенилно-асоцииран секреторен фенотип*) предопределя секретом богат на възпалителни цитокини, имуномодулатори, растежни фактори и протеази (Corré et al. 2008), а подобен фенотипен секреторен профил беше далеч от целта на настоящия дисертационен труд.

Дълги години на кондиционираната среда също се е гледало като на един отпаден продукт на клетъчното култивиране, който обаче се оказва недооценен и крие уникални терапевтични свойства (Rosochowicz et al. 2023). Секреторният профил на

МСК от различни източници има различни биологични ефекти (Kestendjieva et al. 2010). Най-съвременни данни допълват вече направения и описан преди извод, че кондиционираната среда от *ПВ-МСК* в сравнение с тази от мастна тъкан, костен мозък, и плацента, показва максимално обогатен секретом, с най-високо съдържание на цитокини и растежни фактори. Въпреки преобладаването на провъзпалителни молекули, успешно е демонстриран потенциалът на секретото от *ПВ-МСК* да стимулира поляризацията на *МАФ* в *M2* насока (Peshkova et al. 2023). Допълващи предишни данни показват, че кондиционирана среда от *КМ-МСК* инхибира активацията на миши *МАФ in vitro* (Jin et al. 2022). Цялата тази налична информация повдига въпроса относно повлияването на функционалното състояние и на В лимфоцитите под действието на кондиционирана среда от *ПВ-МСК*, информация, която до този момент не е съобщена.

Съставът на кондиционираната среда се влияе основно от два фактора: продължителността/вида на култивиране на клетките и избора на среда, в която се отглеждат клетките. Разбира се, съставът на секретото от мезенхимните стволови клетки, както вече беше подчертано, се влияе и от тъканния източник, цялостното състояние и включително възрастта на донора. В нашата опитна постановка клетките (*МСК* и *РВМС-контрола*) бяха култивирани в *DMEM* среда, тъй като балансираният състав на тази хранителна среда е подходящ за поддържане развитието както на адхерентни, така и на суспензионни клетъчни култури. *DMEM/F12* не съдържа протеини, растежни фактори или липиди, поради тази причина за успешното култивиране на клетките от значение е добавянето на хранителни суплементи като *FBS* (Grossner et al. 2022). Обикновено, в клиничните проучвания не се препоръчва добавянето на животински продукти, за да се избегне високият риск от повлияване безопасността на финалния продукт (Rowland et al. 2021). Препоръчва се клетките да се култивират в безсерумна среда или с добавен човешки тромбоцитен лизат (Guiotto et al. 2020). Поради факта, че нашите изследвания са експериментални и стволовите клетки не са прекондиционирани химично/биологично, телешкият серум беше предпочитаният от нас суплемент, защото е най-често използваният и в същото време есенциален за клетъчното култивиране. Феталният телешки серум е богат на множество растежни фактори и хормони, а в същото време като ефективност не се различава от тази на човешкия тромбоцитен лизат (Guiotto et al. 2020). Освен това, няма забрана за използването на *FBS*, а по-скоро се препоръчва приложението на негови алтернативи (Bieback et al. 2009).

Времето за култивиране на стволовите клетки за получаване на кондиционирана среда варира сред научните проучвания, като обикновено е във времеви диапазон от 24-48ч. (L et al. 2019). В нашия експериментален дизайн стволовите клетки бяха култивирани за 48ч, поради съображения, свързани с възможността от задействане на механизмите на контактното инхибиране на клетките при достигане на пълна конfluентност, ако те продължат да бъдат култивирани след оказания часови диапазон и също така, за да не се изпусне пика с максимална продукция на разтворими фактори. Според някои автори този пик е около 36ч. от култивирането на стволовите клетки (Shang et al. 2023). От друга страна, при достигане на плътен монослой и задействане на механизмите на контактното инхибиране се наблюдават събития, свързани с потискане на пролиферацията на клетките, съпътствано от понижен белтъчен синтез и значително понижен метаболизъм на клетките (Leontieva et al. 2014). Поради риск от забавяне в пролиферацията и цялостния метаболизъм на клетките, секретомът на *ПВ-МСК* беше получен от субконfluентна популация.

Характеризирането на стволовите клетки беше допълнено и с успешен флоуцитометричен анализ на панел повърхностни *CD* протеини, които отличават *МСК* от други клетъчни типове. Изолираните от нашия екип стволови клетки от седем донора на пълни върви показаха експресия на класическите за *МСК* маркери над 95% (*CD73*, *CD90* и *CD105*). Успоредно на това, наблюдаваната негативна експресия (под 2%) на маркерите *CD34/CD45* отличават категорично изолираните клетки от хематопоеичната линия. Получените от нас резултати затвърждават, че изолираните клетки са *МСК* и в същото време техният фенотипен потенциал е запазен по време на *in vitro* култивиране без промяна в експресията на специфични за *МСК* антигени.

Тези наши резултати бяха подкрепени и с изследването на мултипотентността на изолираните стволови клетки. Проведеният диференциационен анализ демонстрира способността на култивираните клетки да се диференцират остеогенно и адипогенно след третирането им със съответните диференциращи среди, което успешно се доказва чрез визуализирането на характерните белези за двата вида диференциация - Ca_2^+ отлагания, признак на костна минерализация и наличие на ясно очертани липидни вакуоли при адипогенно диференцираните клетки.

3. Експериментален дизайн

Изборът на описаната опитна постановка за клетъчно култивиране на *РВМС* от всички 44 изследвани индивида беше свързана с изследване на промяната на В-

лимфоцитните маркери под действието на секретом от *МСК* при условия максимално близки до физиологичните такива, които се наблюдават *in vivo*. *PBMC* са лесно-достъпен източник на имунни клетки за изследване при лабораторни условия (Kleiveland 2015). Периферните мононуклеарни клетки са хетерогенна популация на кръвни клетки, която включва основно лимфоцити и моноцити, но съотношението на клетките варира. С най-висок процент са $CD3^+$ Т лимфоцитите (70-85%), следвани от моноцити (10-20%), NK клетки (5-20%), В клетки (5-10%), а дялът на DC (1-2 %) е най-малък (Kleiveland 2015). В настоящия дисертационен труд средният процент на В клетките беше определен, както следва: *СЛЕ* (5.32%), *АС* (5.01%) и здрави контроли (4.59%).

За да проследим паракринното действие на *МСК* върху В лимфоцити, избрахме да използваме кондиционирани среди, а не т.нар. *transwell* система, при която *PBMC* и *МСК* се култивират посредством наличието на преграда между тях, която позволява свободното преминаване на секреторни фактори, но ограничава директния междуклетъчен контакт. При използването на кондиционирана среда, тя се получава след култивирането на един клетъчен тип (в случая *PB-МСК*) и се изследва нейното влияние върху друг клетъчен тип (В лимфоцити). При този подход на култивиране обаче се проследява единствено еднопосочното влияние от фактори на *МСК* към В клетки, но не и в обратна посока (Carroll et al. 2014). *PBMC* бяха култивирани за период от 72ч. (3 дни) при напълно еднакви условия в контролна среда и кондиционирана среда на *МСК*. Времето за култивиране на *PBMC* беше съобразено с научни изследвания, относно влиянието на кондиционирана среда от *МСК* върху различни кръвни клетки в състава на *PBMC* (Chulpanova et al. 2018; Tokhanbigli et al. 2019).

В допълнение на гореизложеното използваната кондиционирана среда е предпочетеният от нас подход за изследване на влиянието на секретиремите фактори на стволовите клетки върху В клетките на първо място, поради това че изолираната и добре съхранена кондиционирана среда представлява цялостен секретом от *МСК*, богат на биологично активни молекули и секреторни везикули (Damayanti et al. 2021). Погледнато от друг ъгъл, изборът на опитна постановка беше продиктуван и от целта на настоящия дисертационен труд да се изследва паракринното действие на “нативни”, нестимулирани (химично/биологично) *МСК*, а при посочената *transwell* система е известно, че потока на секреторни молекули не е едностранен, а двустранен, и би повлиял поведението на *МСК* по време на клетъчно култивиране (Кюркчиев С и Кюркчиев Д 2019). Също така, сметнахме, че таргетната цел би могла да бъде

постигната именно като бъдат култивирани заедно всички *PBMC* в кондиционирана и контролна среда, което цели запазване на комуникацията между мононуклеарните клетки. Може би, като негативен аспект отчитаме индиректното влияние върху В лимфоцитите от други клетки в културалната среда, които клетки могат сами да бъдат обект на факторите на *MCK* и индиректно да променят поведението на В клетките. Но не бива да забравяме, че *in vivo* клетките не съществуват самостоятелно, изолирани една от друга. Това не би могло да бъде постигнато, ако В лимфоцитите бяха изолирани и култивирани, в описаните културални среди, като отделна клетъчна популация. Ето защо, използваният в настоящия дисертационен труд експериментален дизайн е най-удачната, за поставената цел, тестова система за проследяване влиянието на секретиремите фактори от *MCK* в насока влияние върху В клетки (Kleiveland 2015).

Нещо необичайно, на което бяхме свидетели и успяхме да документираме по време на култивирането на *PBMC* в среда на стволови клетки беше значително по-високата степен на кълстериране на клетките. По емпиричен път установихме, различни по размер, но видимо оформени кълстери, сформирани ден след като клетките на изследваните болни/зdravi индивиди бяха култивирани със секретом от *MCK*. Единствените подобни наблюдения за *PBMC*, които са съобщени в научната литература, са тези от *Rubin и сътр.*, които съобщават, че в отговор на *анти-CD3/IL-2* самостоятелно или в комбинация с *мебендазол* (антихелминтен медикамент), клетките сформират подобни клетъчни агрегати в сравнение с контролната група *PBMC* (Rubin et al. 2018). Авторите допълват, че *мебендазол* няма никакъв ефект или ефектът е много слаб върху кълстерирането и освобождаването на провъзпалителни цитокини от *PBMC*, ако те не са предварително активирани.

Разбирането на глобалната комуникация и взаимоотношения между клетките включва голям арсенал от научни данни за разтворими или мембранни молекули, рецептори и техните лиганди. Всеки от тези типове кръвни клетки е отговорен за изпълнението на специфична функция. В същото време, комуникацията на *PBMC*, както помежду им, така и с други кръвни клетки, е от значение за взимането на различни клетъчни решения, включително решения за активиране на клетките, задвижване на механизмите на клетъчния цикъл, програмираната клетъчна смърт, клетъчната диференциация или дори миграцията на клетките към различни тъкани и области в организма, където да осъществяват специфични клетъчни функции (Scheiermann et al. 2015). От наличните микроскопски снимки направени от нашия екип може да се види, че този вид взаимоотношения между клетките се запазва дори и при *in*

in vitro условия, за което свидетелстват сформиранията скупчванията от не-адхерентни клетки. Интересно е, че при нашата експериментална постановка под влияние на факторите на *МСК*, *РВМС* формираха в много по-голяма степен агрегати от витални клетки, което може да се дължи на факта, че клетките се намират в една по-различна “нова” среда, чието съдържание ги кара да комуникират по интензивно едни с други, да променя техни важни физични параметри или секреторните им свойства. Дали, тези взаимоотношения са в насока “активация” или “супресия” отчасти се обясняват с получените от нас резултати по задачите, заложили в настоящия научен труд. На този етап, обаче, бихме могли само да спекулираме, тъй като до този момент, няма съобщени данни за подобен вид поведение на *РВМС*, след тяхното отглеждане в среда на *ПВ-МСК*.

4. Влияние на секретом от *МСК* върху специфични *В*-клетъчни маркери, свързани с тяхната активация, антиген-представяща функция и преживяване

След като успешно успяхме да потвърдим че култивирането на периферни мононуклеарни клетки запазва комуникацията и взаимодействията между субпопулациите на различните имунокомпетентни клетки, последва определяне процента на *В* клетки, експресиращи *CD80/CD86*, *BR3* рецептора, *HLA-DR*, *PD-1* и *CD40*, при трите изследвани групи участници. Бяхме мотивирани от това, че активацията, антиген-представящата функция и преживяването на *В* лимфоцитите са сложни процеси, които изискват строга регулация и участието на множество, донякъде ненапълно известни, молекули и механизми. Предвид хетерогенността на *В* клетките и за по-голямо разбиране, данните в раздел резултати, бяха представени не само като процент *В* лимфоцити, позитивни за конкретния мембранен маркер, но и чрез *MFI*, отразяващо нивото на мембранна експресия на всяка от изследваните молекули. По същия начин резултатите ще бъдат коментирани и в този раздел на дисертационния труд.

В контекста на нашето изследване върху профила на експресия на маркерите *CD80/CD86 (B7.1/B7.2)* на *В*-клетъчната повърхност, зложихме на тяхната важна роля в имунния отговор чрез медирането на активационни и ко-стимулаторни сигнали. Комплексът *B7* се експресира от *АПК*, като *В* лимфоцити, *МАФ* и *ДС*, и доставя ко-стимулаторните сигнали, необходими за активирането и оцеляването на *Т* клетките чрез свързване към техния партньор на *Т*-клетъчната мембрана, а именно *CD28* (Brzostek et al. 2016). От друга страна, протеинът *cytotoxic T lymphocyte associated*

protein 4 (*CTLA-4* или *CD152*), е отрицателен регулатор на активирането на Т клетките (Walunas et al. 1994), допринася за поддържането на толерантността на В клетките (Yang et al. 2021b) и е друг също толкова важен лиганд за *B7* комплекса. В резултат на това, *CD80/CD86* могат да изпращат както активиращи, така и инхибиторни сигнали, което ще бъде разгледано в настоящия раздел.

Нивата на експресия на *B7.1/B7.2* силно варират и зависят от клетъчния тип, активационното състояние и обкръжаващата ги цитокинова среда (Kennedy et al. 2022). Експресията на *CD86* може да бъде стимулирана след задействане на *BCR* или под действието на цитокини като *IL-2* и *IL-21*. От друга страна, експресията на *CD80* се повишава под действието на различни стимули като *LPS*, *CD40L* или анти-*CD40*, както и голямо разнообразие от цитокини, като например *IL-4*. Оказва се, че често индукцията на *CD80* е вследствие на стимулационни сигнали, доставени от *CD86* (Takatsu 1997; Sahoo et al. 2002). Това, че експресията на *CD86* задвижва тази на *CD80* би могло да обясни и наличната положителна корелация, която наблюдавахме между процент В клетки, експресиращи двете молекули при здрави лица след култивирането им в среда на *МСК*. Подобни наблюдения за силна положителна корелация по отношение на интензитета на експресия на двете молекули под действие на секретом от *МСК* установихме при трите изследвани групи участници.

Въпреки това, има и данни за различия в експресията и функционалната активност на *CD80* и *CD86*. Двете молекули са част от единния *B7* комплекс, но всяка една молекула се кодира от различен ген и според данните публикувани от *Suvas и сътр.* *CD80* осигурява отрицателен сигнал за пролиферацията и секрецията на *IgG* от нормални В клетки и В клетъчни лимфоми. Обратно, *CD86* насърчава активното състояние на този вид лимфоцити (Suvas et al. 2002). При друго изследване, където се проследява ефекта на топлинно шоките белтъци *GroEL* и *GroES* върху ко-стимулаторни молекули на В клетките, стресовите протеини стимулират експресията на *CD86*, но не и на *CD80* молекулата (Galdiero et al. 2005). Тези данни действително доказват, че експресията на двете молекули се влияе от различни стимули и фактори. Докладвано е също така, че експресията на *CD86* на мембраната на В клетките на пациенти с активен и неактивен лупус и здрави контроли се различава, като най-висока е при пациентите с активно заболяване (12.5%), следвана от тези с неактивно (6.9%) и здрави индивиди (2.9%). В допълнение, повишените нива на *CD86*, корелират със *SLEDAI-2K* индекса и нивата на *анти-двДНК* антитела (Vijl et al. 2001).

При нашите експериментални изследвания също се наблюдава най-висока експресия цялостно на *CD86* при пациентите със *СЛЕ* ($8.08 \pm 4.78\%$), следвани от тези с *АС* ($6.36 \pm 7.33\%$) и здравите контроли ($2.65 \pm 2.20\%$). Но не установяваме корелационни връзки между експресията на тази молекула и активността на *СЛЕ* при нашите пациенти. Въпреки това, установихме отрицателна връзка между *CD80 MFI* под действие на секретом от *МСК* и скората за оценка на функционалните нарушения (*BASFI*) на пациентите с *АС*. В контекста на нашите резултати едно проучване от 2018г. проведено в Китай с *АС* пациенти показва, че тези болни имат като цяло по-висока експресия на молекулите част от *B7* комплекса спрямо експресията на тези маркери, установена при *PBMC* на здрави индивиди посредством флуоресцентно-количествен *PCR*. Също така, изследователите докладват за отрицателна корелация между *CD80* молекулата и серумните нива на *СVE*, както и средната стойност на *BASFI* индекса (Du et al. 2018), което по отношение активността на заболяването е в унисон с нашите данни и потвърждава отчасти твърдението на *Suvas et al.* за провеждане на отрицателен сигнал за *B* клетъчна пролиферация през *CD80*.

След проведения междугрупов анализ установената сигнификантно по-висока експресия на *CD80* при пациентите със *СЛЕ* спрямо пациентите с *АС*, донякъде беше очаквана от нашия екип, поради абнормалния активационен статус на основните патогномонични клетки при пациентите с лупус и предполагаемата по-минорна роля на *B* клетките в патогенезата на *АС*. Предишни проучвания не съобщават за корелация между процента на *B* клетките, позитивни за *CD80* и пациентите с мускулно-скелетни прояви, а ние установихме сигнификантна връзка в групата на *B* клетки от *СЛЕ* болни, култивирани в среда на *МСК*. Тази асоциация между повишения процент *CD19⁺ CD80⁺* и мускулно-скелетните прояви, можем да си я обясним единствено с ко-стимулаторния сигнал предаван от *B* клетките към *T* лимфоцитите, едни от ключовите участници във възпалителните процеси, съпътстващи артрита, остеопорозата, остеонекрозата или миалгиите при тези пациенти. От друга страна, по отношение на *CD86*, анализът ни ясно показва сигнификантно повишени нива при болните от двете групи заболявания спрямо здравите контроли. Този резултат кореспондира с наличната информация в литературата, свързана с *B* клетки с увеличена експресия на този маркер при онкологични заболявания, алергични състояния и автоимунни болести, включително *СЛЕ* и *АС*, което говори за активното участие на *B* клетките в редица хронични възпалителни състояния (Folzenlogen et al. 1997; Niu et al. 2013; Wennhold et al. 2021).

Един различен поглед върху функцията на *CD86* или *CD80* е описана в проучвания, свързани с участието на *B7* комплекса върху имunosупресивния ефект на В клетките (Mann et al. 2007; Blair et al. 2010). Понастоящем, повечето данни са в насока, че *МСК* не оказват влияние върху експресията на *CD86* или *CD80* при В лимфоцитите (Corcione et al. 2006) и противоположно на това твърдение, ние установихме промени в експресията на тези молекули при В клетките в пула от *PBMC*, култивирани в кондиционирана среда от *МСК* при болните със *СЛЕ*, *АС* и здравите контроли. Получените резултати за трите изследвани групи участници бяха в една посока с наблюдавана тенденция за повишаване на процента В клетки, позитивни за *CD86* маркера, с понижен интензитет на мембранна експресия. Единствено при здравите контроли получените от нас резултати бяха сигнификантно достоверни. По отношение на *CD80* маркера наблюдаваната тенденция за повишен процент на В клетки и понижена мембранна експресия под действие на фактори, освободени от *МСК*, беше запазена. Като най-висок процент В клетки експресиращи *CD80* беше наблюдаван при пациентите със *СЛЕ* ($34.30 \pm 18.22\%$) спрямо този отчетен при здравите контроли ($29.64 \pm 13.85\%$) и болните с *АС* ($19.86 \pm 9.76 \%$). Под влияние на разтворимите фактори в културалните среди на *МСК* сигнификантно по-висока беше експресията на *CD80* при пациентите с *АС* и здравите контроли, последвано от сигнификантно понижена мембранната експресия на *CD80*, отново при тези две групи изследвани лица.

Едно скорошно проучване обръща внимание и на източника на *МСК*, като авторите съобщават, че *МСК* от плацента имат способността да понижават процента на *CD86*⁺ активирани периферни *B220*⁺ В клетки *in vivo*, докато *МСК* от костен мозък не успяват да постигнат този ефект (Lee et al. 2021). Данните от това изследване са допълнение на тези, според които *МСК* от фетални тъкани показват по-голям имunosупресивен потенциал спрямо стволовите клетки, изолирани от тъкани на възрастен организъм. Интересното е, че в същото време от нашите резултати установихме, че нивото на мембранна експресия на тези молекули *CD80/CD86* върху В-клетъчната мембрана под действие на секретом от *МСК* е значително по-ниска от тази на контролната група В клетки.

Като коментар на представените от нас данни по горе, *CD86* е молекула с много важна функция за *АПК* и се експресираща в по-ниски нива от В клетките в покой (Kin and Sanders 2007). Стимулирането чрез *CD86* на В клетките влияе върху тяхната пролиферация, секреция на имуноглобулини и производството на молекули, които повлияват тяхната програмирана клетъчна смърт (Manzoor A. Mir and Javed N. Agrewala

2007). От друга страна, *Tregs*, които конститутивно експресират *CTLA-4* и имат способността да упражняват имunosупресивна активност, са селективно зависими от *CD86* за тяхната цялостна хомеостаза, оцеляване, пролиферация и активиране (Halliday et al. 2020). Имайки това предвид, трябва да споделим някои доста впечатляващи данни за ролята на *CTLA-4* в потискането на *Tregs*. *CTLA-4*, експесиран върху *Tregs*, насърчава свързването на *Tregs* към *АПК*, което води до *CTLA-4*-зависима "трогоцитоза" на *CD80/CD86* и последващ трансфер на мембранни фрагменти от *АПК* към повърхността на *Treg* клетките (Tekguc et al. 2021). Някои автори предполагат, че това е причината част от $CD4^+$ Т клетките да имат ко-стимулиращи молекули като *CD80/CD86*, установени на тяхната мембрана (Reed et al. 2021). Тъй като нивото на експресия на *CD80* и *CD86* е намалено при проведените от нас експерименти, бихме могли да спекулираме на този етап, че може да бъде вследствие на индуциран от *Tregs* регулаторен механизъм "трогоцитоза", който води до прекъсване на *CD28* ко-стимулацията. Наред с това, косвено доказателство за наличната комуникация между *РВМС* е тяхното значително групиране или формирането на клъстери под въздействието на фактори, секретирани от *МСК* в нашите експерименти.

От друга страна, една от най-важните имуномодулиращи функции на *МСК* е способността да преобразуват конвенционалните Т клетки в *Tregs* (Ivanova-Todorova et al. 2012; Azevedo et al. 2020). За способността на *МСК* да повлияват диференциацията на В клетки, към такива с имунорегулаторен фенотип, също има съобщени данни (Liu et al. 2020b). Друга гледна точка, разбира се е, че факторите, освободени в средата на *МСК*, могат директно да индуцират това намаляване на експресията на посочените молекули върху В-клетъчната повърхност. Поради факта, че имаме повишен процент, но понижена мембранна експресия на *B7* комплекса при В лимфоцити на изследваните от нас участници можем да заключим, че секретомът на *МСК* води до имунна дисфункция на комплекса, вследствие на нарушен синхрон на експресия на *B7.1* и *B7.2*, последвано от нарушена ефективност на взаимодействие с лигандите на мембраната на Т клетките. Феномен, наблюдаван от нас както при В клетки на болни, така и на здрави индивиди.

Като продължение на написаното до тук, друга ко-стимулаторна молекула, която е свързана с активацията на В клетките и беше обект на нашите изследвания е *CD40*. Вниманието ни беше насочено към този мембранен рецептор, поради това че участва в едно от най-важните взаимодействия *CD40-CD40L* между В и Т клетките. Ко-стимулаторният рецептор *CD40* е трансмембранен протеин тип I, който първоначално е

характеризиран при В клетки, а впоследствие е докладван при DC, МАФ, моноцити, тромбоцити, както и при нехематопоеични клетки, като фибробластни, епителни и ендотелни клетки (Elgueta et al. 2009). Лигандът на CD40 - CD40L (CD154) е молекула, която се експресира от активирани Т и В клетки, DC, МАФ и тромбоцити. В клетките конститутивно експресират CD40 рецептора на своята мембрана и обикновено при здрави индивиди процентът на CD19⁺CD40⁺ е доста висок, вариращ между 87% и 96% (Soliman et al. 2009; Bolduc et al. 2010; Pereira et al. 2018). Високият процент на CD19⁺CD40⁺ В клетки беше потвърден и от нашите експерименти.

Ролята на взаимодействието CD40-CD40L е свързана с ключови процеси като: В-клетъчна активация и пролиферация, антитялова секреция, превключване на имуноглобулиновия клас. Също така, предпазва В клетките от задействието на механизмите на апоптоза на различен етап от тяхното развитие, стимулира развитието на герминативните центрове и преживяването на В клетките на паметта (Wykes 2003). В подкрепа на посочената информация е едно проучване от 2019г. при мишки, което показва важността на ко-стимулаторната молекула CD40 за развитието на В клетките на паметта (Koike et al. 2019). При мишки съществуват 2 субпопулации мемори В клетки: с висока експресия на CD80 (CD80^{hi} B_{mem}), които обикновено се диференцират до плазматични клетки и с ниска експресия на CD80 (CD80^{lo} B_{mem}), които диференцират до В клетки на герминативния център. Авторите съобщават, че сигнализацията със CD40 е важна за съдбата на В клетките, особено за развитието на CD80^{hi} B_{mem} клетки по време на първичен имунен отговор (Koike et al. 2019).

Според предишни доклади, сигнализацията със CD40 активира В клетките до фенотип, който е на границата между наивността и предстоящата диференциация или трансформация в антитяло-продуциращи клетки (Uradhyau et al. 2014). Следователно, понижението в експресията на този маркер може да е свързано с преобладаването на В клетки с наивен или по-скоро анергичен фенотип, характеризиращ се с липса на имунен отговор било то към патогенен или собствен антиген. Загубата на анергията е важна за възникването на автоимунни отговори и възможността за нейното възстановяване при автореактивните клетки, под действие на секретото на МСК, е обнадеждаващ факт.

Друго предположение е превръщането на В клетките в независими от Т-клетъчна помощ за активация, вследствие на нарушение във взаимодействието между имунните клетки, демонстрирано с промяна в експресията не само на CD40, но и на B7 комплекса след тридневното култивиране на В клетките част от PBMC в среда на МСК.

По отношение на съобщената връзката между *CD40* и инхибирането на процеса апоптоза, нашите резултати показаха понижена мембранна експресия на *CD40* и висок процент на В клетки в ранна апоптоза при пациенти със СЛЕ и здрави доброволци. Действително значението на *CD40* за процеса апоптоза е коментирано при пациенти с *PA*, където високите нива на *tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 (TRAF1)* в синовиума, потискат апоптозата на фибробласт-подобни синовиоцити посредством активирането на *JNK/NF-kB* сигнални пътища в резултат на ангажирането на *CD40* молекулата (Cheng et al. 2022). Други данни, както вече беше споменато, обръщат внимание на това, че стимулирането на *CD40* предава активационни и преживяващи сигнали за В клетките (Andjelic et al. 2000), което е от значение за намирането на начини за предотвратяване на експресията на тази молекула при определени заболявания, където е необходимо нейното инхибиране.

Хетерогенността в отговора на различните В-клетъчни субпопулации към сигналите, получени от взаимодействието *CD40-CD40L*, обясняват донякъде тези разнопосочни данни, свързани с преживяването на В клетките, както и дуалистичната природа на *CD40* рецептора. Блокирането на този аксис е съпроводено и с получаването на *IL-10*-продуциращи прекурсори на *Bregs* в маргиналната зона на слезката, важни при трансплантации за преживяването на графта (Lal et al. 2015).

Ето защо, смятаме, че понижената мембранна експресия на *CD40* под влияние на секретом от *MCK* също би могла да доведе до нарушен *CD40-CD40L* ко-стимулаторен сигнален аксис, важен не само за функционалното състояние на В лимфоцитите, но и на Т клетките. Секретомът на *MCK*, според нашите резултати, успешно успя да повлияе единствено нивото на мембранна експресия на *CD40* при В клетки от всички изследвани групи участници. Не установихме сигнификантна разлика между процента на В клетките, експресиращи *CD40* маркера, култивирани в контролна среда и среда на стволови клетки при болните със *СЛЕ*, *АС* и здравите контроли. По-високият обаче процент на В клетки, позитивни за *CD40* при болните със *СЛЕ* и *АС* спрямо здравите контроли, беше статистически достоверен според нашите резултати. В противоречие на нашите данни, група учени, които изследват пациенти с неактивен и активен лупус, както и здрави контроли, не установяват разлика в *CD19⁺CD40⁺* клетките при изследваните болни и здравите индивиди (Bijl et al. 2001). Наскоро, друго изследване потвърждава концепцията за висока експресия на *CD40*, *HLA-DR* и *IL-21* рецептора при активирани наивни В клетки на пациенти със *СЛЕ* (Wangriatisak et al. 2022), чиято кооперация със *CD4⁺* Т клетки допринася за патогенезата на заболяването. Донякъде си

обясняваме тези разнопосочни данни с популациите, при които са правени проучванията. Например, афро-американски пациенти с лупус действително показват, характерния за заболяването активиран В-клетъчен фенотип с по-висока експресия на *CD80*, *CD86*, *PD-1* и *CD40L*, но експресията на *CD40* е по-ниска спрямо тази, установена при пациенти със *SLE* от Европейски произход (Menard et al. 2016).

За съжаление, не успяхме да намерим информация относно влиянието на секретом от *MCK* върху тази молекула при В клетки, освен описаните вече данни от Corcione et al., 2006. Не липсват данни в тази насока обаче при други имунни клетки. Например, във връзка с везикуларните компоненти на секретом на *MCK*, група от изследователи демонстрират, че *EB* от индуцирани плурипотентни *MCK* (*iPSC-MCK*) успяват да потиснат експресията на *CD40*, *CD80*, *CD86* и *HLA-DR* и по този начин да инхибират диференциацията на моноцити в незрели *DC*, но при вече зрели *DC*, не се наблюдават резултати с подобен успех (Peng et al. 2022). Понижената мембранна експресия на *CD40*, заедно с тази на *B7* комплекса са показателни за нарушение в активацията на В лимфоцитите и последващата ко-стимулация на Т клетките. От друга страна, предвид връзката между свръхекспресията на *CD40* с освобождаването на възпалителни цитокини и повишената експресия на адхезионни молекули (Ferrer et al. 2014), понижението в нивото на експресия на *CD40* би могло да е част от антивъзпалителния ефект на секретом от *MCK* спрямо В клетките.

Следващата молекула, която беше обект на нашето внимание е част от главния комплекс за тъканна съвместимост. *HLA-DR* молекулата има значение за способността на В клетките да представят пептиди и да служат като *АПК*, но също така тя е асоциирана и с повишената продукция на *IgM* антитела от плазматичните клетки (Tabata et al. 2000). Като молекула с важно значение за активацията и представянето на екзогенни антигени, експресията на *HLA-DR*, заедно с тази на *HLA-DM*, започва рано в В-клетъчното развитие в костния мозък на стадий про-В клетка (Chen et al. 2002). При здрави индивиди процентът В клетки, носещи *HLA-DR* на своята мембрана, варира около 20% (Lu et al. 2016), което беше потвърдено и от нашите резултати.

Нашите данни показаха, понижен процент на В лимфоцити, които експресират *HLA-DR* при двете групи болни, когато *PBMC* са култивирани с кондиционирана среда на стволови клетки. По отношение на *MFI* на *HLA-DR* данните ни нямаха статистическа значимост при нито една от изследваните групи, а при пациентите с *AC*, дори наблюдавахме по-високи нива на експресия на маркера под действие на секретом от *MCK*. По принцип, подобни резултати бяха очаквани, поради предишни докладвани

данни на нашия колектив по отношение на понижен процент *HLA-DR*⁺, заедно с *CD80/CD86* молекулите при *DC* под действието на кондиционирана среда на *MCK* от мастна тъкан, макар да е установено несигнификантно повишение в плътността на експресия на *HLA* молекулата (Ivanova-Todorova et al. 2009). Друг екип успява да представи подобни наблюдения за *B* клетките, където изследване на *CD5*⁺ *B* клетки при пациенти със *CnA* показва също повишен *HLA-DR MFI*, но понижени *CD80* и *CD86* молекули при тези лимфоидни клетки (Cantaert et al. 2012). Интересна констатация, която можем да изведем от получените резултати е, че цялостно пациентите с *АС* показаха най-нисък процент *CD19*⁺*HLA-DR*⁺ клетки спрямо останалите две групи участници, макар че средният мембранен интензитет беше несигнификантно, но най-висок. Установената от нашия екип отрицателна зависимост между процент *HLA-DR*⁺ *B* клетки под влияние на секретом от *MCK* и скоростите за активност на заболяването (*ASDAS-CP* и *BASFI*), заедно със стойностите на възпалителните маркери повдига въпроси, свързани с участието на тази молекула в патогенезата на *АС*. По принцип, *HLA-DR* гените могат да имат слаб ефект върху предразположеността на пациентите към *АС*, но те не влияят върху тежестта на заболяването или различни клинични прояви (Brown et al. 1998). Едно от възможните обяснения за наблюдавания от нас резултат е свързано с нарушение в антиген-представящата функция на този вид лимфоцити, което би могло да бъде свързано с повишената активност на заболяването.

Не бива да забравяме, че имунологичният акцент на изследванията при болни с аксиален спондилоартрит е насочен към едни от ключовите клетки за имунопатогенезата на заболяването - *МАФ*, които поддържат възпалителна среда посредством секрецията на *TNF α* , *IL1 β* и *IL23*. Тези клетки показват свръхактивен статус посредством по-силни ко-стимулационни сигнали, като тези от *CD80*, *CD86* и *HLA-DR* (Weng et al. 2023). Може би, не толкова централната роля на *B* клетките в имунопатогенезата на заболяването или наличието на недоказани механизми, свързани с дефект или понижаване на молекули, асоциирани с антиген-представящата функция на тези клетки са възможна причина за нашите данни. Също така, *HLA-DR* молекулата е представител на главния комплекс за тъканна съвместимост и освен силна зависимост на *HLA-B* алелите със *CnA*, *HLA-DR* не зависимо от *HLA-B27*, също показва асоциация с тези заболявания (Vargas-Alarcón et al. 2002). Единствено, по-ниска изходна експресия на клас *II MHC* молекули (*HLA-DR*) се наблюдава при *monocyte-derived DCs (MDDCs)*, от *PBMC* на пациенти с *АС*, в сравнение със здрави индивиди (Slobodin et al. 2012). За съжаление, не попаднахме на публикувани резултати в тази насока, свързани с *B*

клетките. Дали, при В лимфоцитите се наблюдава подобен “почиващ” фенотип с ниска експресия на *HLA-DR* под влияние на *MCK* секретом, не бихме могли да коментираме на този етап предвид и получените от нас резултати, по отношение на другите изследвани В-клетъчни маркери.

Можем също да спекулираме от получените от нас резултати, че капацитетът за представяне на антигени от циркулиращите В клетки, последващата активация на Т клетките и вероятно секрецията на антитела от крайно диференцираните В клетки, вследствие на понижената експресия на *HLA-DR* при пациентите със *СЛЕ* и *АС*, се променят след култивирането им в среда на *MCK*. Това може да е част от механизмите за индуциране на толерантност от секретиранияте фактори на *MCK*. Съществува налична информация според, която антиген-специфичното производство и секреция на *IgM* и *IgG1* антитела се потиска от фактори на *MCK*, произведени в културална среда при мишки, имунизирани с Т-клетъчно-зависими и Т-клетъчно-независими антигени (Asari et al. 2009), както и директна роля на *MCK* за потискане на имуноглобулиновата секреция на В клетките (Bochev et al. 2008). Относно влиянието на *MCK* върху експресията на тази молекула на В-клетъчната мембрана данните в световната литература са оскъдни, но *AT-MCK* имат способността да потискат експресията на *HLA-DR* молекулата при активирани $CD4^+$ и $CD8^+$ Т лимфоцити (Kusa-Warnawin et al. 2020). Още повече получените от нас резултати по отношение на пониженият процент $CD19^+HLA-DR^+$ В клетки е в унисон с понижената мембранна експресия на *CD40* молекулата, която е свързана със стимулиране на изявата на молекули, участващи в антигенното представяне (van Kooten and Banchereau 2000). Предвид наблюдаваните умерени и силни корелации между пониженият процент В клетки, позитивни за *HLA-DR*, в комбинация с понижената мембранна експресия на *HLA-DR* и понижената мембранна експресия на *CD40* под влияние на секретом от *MCK* при пациентите със *СЛЕ*, *АС* и здравите контроли, смятаме че потвърждаваме тясната връзка и кооперация между двата маркера на мембраната на В лимфоцитите.

Озадачаваща беше умерено слабата корелация, която установихме между процент на В клетки, позитивни за *HLA-DR* и процент В клетки, експресиращи, рецептора за *BAFF* след култивиране на *PBMC* от нашите здрави контроли в среда на стволови клетки. Донякъде обясняваме наличната връзка с ролята на двете молекули за активацията на лимфоцитите, от друга страна *BR3* рецептора предоставя сигнали, свързани с оцеляване, докато *HLA-DR* молекулата може да индуцира протеин-киназа $C\beta$ (*PKC\beta*) - зависима В-клетъчна смърт (Guo et al. 2003).

Молекулата *PD-1* (*CD279*) е инхибиторна ко-стимулаторна молекула и т.нар. *check-point* рецептор, който има способността да се свързва към своите специфични лиганди (*PD-L1* и *PD-L2*). Взаимодействието води до предаване на инхибиторни сигнали към вътрешността на клетката, носеща *PD-1* (Boussiotis 2016). Лигандите за *PD-1* могат да са разположени мембранно, а също и да са в разтворима форма. Доказано е, че *MCK* могат също да са източник на *PD-L1* (Kyurkchiev et al. 2014). Отделно, вече има данни за разтворима форма на *PD-1*, получена след хидролизиране на мембранната форма на рецептора, установена както при новодиагностицирани, така и при пациенти с продължителна давност на *РА*, като експресията на разтворимата форма корелира с активността на заболяването (Greisen et al. 2022). При здрави индивиди процентът на В клетките, експресиращи инхибиторния рецептор е 6 % (Brusa et al. 2013), което кореспондира с получените от нас резултати.

В интерес на истината, повечето знание за ефектите на този рецептор идват от изследвания върху Т лимфоцити, особено в контекста на туморните заболявания, където вниманието е насочено към инхибиране на аксиса *PD-1-PD-L1* (Т клетка - туморна клетка). *PD-1* има отношение и при В клетките, *МАФ* и *DC*, само че при тях този рецептор има по-скоро плейотропни ефекти, които на този етап от развитието на науката са слабо проучени (Canavan et al. 2021).

От друга страна, взаимодействието между *PD-1* на мембраната на В клетките и *PD-L1* на мембраната на *MCK* е в основата на потискането на пролиферацията, диференциацията на В клетките в плазматични клетки и последващата секреция на имуноглобулини (Wang et al. 2014). В същото време *PD-1* се експресира в базални или ниски нива на почиващи В клетки и в много висока степен от активирани ефекторни В, Т клетки и моноцити (Agata et al. 1996), вероятно, защото взаимодействието *PD-1-PD-L1* служи като стоп сигнал за предотвратяване на тяхната активация и последваща атака. При пациенти с автоимунни заболявания би трябвало тази молекула и нейните лиганди да бъдат стимулирани посредством различни терапевтични подходи, за да се спре излишната атака на автореактивни клетки към собствени структури на организма.

Ето защо, *PD-1* се определя като един от новите регулатори на активацията на В лимфоцитите, тъй като стимулирането на *TLR9* е свързано с блокиране на *PD-1-PD-L1* пътя и с повишена В-клетъчна активация, пролиферация и секреция на провъзпалителни молекули (Thibult et al. 2013). Често, *PD-1* експресията се повишава след ангажирането на Т-клетъчния мембранен рецептор (*TCR*) или *BCR* на наивни лимфоцити и експресията му се поддържа висока под действието на цитокини,

разтворими фактори и при персистираща антигенна стимулация (Riella et al. 2012; Qin et al. 2019). Може би повишаването в експресията на *PD-1* се дължи на факта, че активацията на клетките се контролира от *PD-1*, който по механизма на обратната връзка след стимулиране на неговата експресия от *BCR*, има способността да инхибира сигнализацията на *BCR*. Част от този механизъм включва привличането на *src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 (SHP-2)* фосфатазата към фосфорилиран тирозинов остатък в цитоплазмения участък на *PD-1* и последващо дефосфорилиране на ключови сигнални преобразуватели, участващи в сигнализацията на *BCR* (Okazaki et al. 2001).

Резултатите обаче при този тип пациенти са малко объркващи, тъй като *PD-1*⁺ клетки инфилтрират тъканите и тази инфилтрация води до прогресия на автоимунната патогенеза (Zhao et al. 2019), което както споменахме преди, може да е част от плейотропните ефекти на тази молекула. Взети заедно тези данни показват, че понижаването на *PD-1*⁺ клетките в контекста на автоимунните заболявания може да бъде ефективен метод за тяхното облекчаване и цялостно подобрене на пациентите.

След култивирането на моноклеарните клетки в среда на *ПВ-МСК* докладваните от нас данни по отношение на *PD-1* много наподобяват тези, които сме получили при анализа на *HLA-DR*, с малки изключения. Например, при пациентите с *АС* не установихме сигнификантна разлика, но отново много нисък процент на *CD19*⁺ *PD-1*⁺ клетки, доближаващ се до този на здравите контроли, и висока мембранна експресия на същата молекула. Този резултат може да се обясни донякъде с генетичната асоциация на установените полиморфизми в гена, кодиращ *PD-1 (PDCD1)* и податливостта към развитие на *АС* (Lee et al. 2006). За съжаление, публикуваните в литературата данни са противоречиви и показват, че *PD-1* експресията при *CD8*⁺ Т клетки е по-ниска при пациенти с *АС*, докато други показват, че няма разлика в експресията на инхибиторния рецептор при *PBMC* на болни спрямо здрави (Schütz and Baraliakos 2023). По отношение на мембранната експресия на *PD-1* при В клетки от болни с *АС*, данните са оскъдни, тъй като проучванията са фокусирани основно върху Т клетките (Schütz and Baraliakos 2023). Все още не се знае до каква степен тази молекула е важна за патогенезата на *АС* и дали ниските нива на експресия след култивиране на *PBMC* в среда на стволови клетки не са свързани с по-ниско активационно състояние на В клетките или понижена възможност за супресия на тези клетки под влияние на освободените фактори в кондиционираната среда на *МСК*.

При пациентите със *СЛЕ* и здравите контроли установихме сигнификантно по-нисък процент на В клетки позитивни за *PD-1* рецептора под действието на секретирани от *МСК* фактори. При здравите контроли тази тенденция беше последвана и от несигнификантно понижен среден интензитет и ниво на мембранна експресия на изследвания маркер, но при пациентите със *СЛЕ* почти нямаше разлика в експресията му върху В клетките след култивирането на *PBMC* в двете културални среди. Силната положителна връзка между процента на В клетките, позитивни за *PD-1* и *CD86*, от групата на *PBMC*, култивирани в среда на *МСК*, отново обръща внимание на кооперативното взаимодействие между двата маркера и участието им в активацията на В лимфоцитите.

Резултатите ни дават основание да коментираме ролята на *PD-1* маркера в патогенезата на *СЛЕ*. При *СЛЕ* експресията на *PD-1* в мембранна и разтворима форма е асоциирана с патогенезата и двете форми могат да служат като маркери на прогресията на заболяването (Wang et al. 2023). Това е така, понеже всички популации на В лимфоцити от пациенти със *СЛЕ* показват свръхекспресия на *PD-1* (Lu et al. 2020). Високите нива на експресия на този инхибиторен рецептор, които ние наблюдаваме при *СЛЕ*, се обясняват с наличната информация не само за свръхекспресия на *PD-1*, но и на *PD-L1* и *PD-L2* върху различни имунни клетки. Установено е, че *PD-1* рецепторите и техните лиганди участват в патогенезата и развитието на *СЛЕ*, както вече споменахме, като два ключови пътя са отговорни за стимулиране на тяхната изява: *TLR*-подобен път и път на интерферони тип I, включващи активиране на *NF-κB* и/или *STAT1* (Chen et al. 2023). Макар да има скорошни данни за по-висока експресия на молекулите част от сигналния път *PD-1-PD-L1* при *СЛЕ* болни, трябва да отбележим, че част от изследователите съобщават за повишена експресия на ниво транскрипти, но не и на ниво белтък (Schütz and Baraliakos 2023). Още повече, при новодиагностицирани пациенти със *СЛЕ* се установяват и *анти-PD-1* антитела, за които се смята, че неутрализират рецептора и не позволяват на лигандите да се свържат с него (Shi et al. 2017). Ето защо, тези антитела водят до невъзможност за провеждане на инхибиторния сигнал от *PD-1* и дори серумните им нива корелират с активността на заболяването (Shi et al. 2017). Предвид противоречията в научната литература, нашите очаквания бяха за повишаване експресията на *PD-1* под действие на секретом от *МСК*, поради преобладаващите убеждения за имуносупресивния потенциал на тези стволови клетки, но тези очаквания не бяха потвърдени.

От изложените от нас резултати може би едни от най-значимите бяха тези свързани с експресията на В-клетъчния рецептор за *BAFF* и формирането на хомогенни популации от ниско и високо експресиращи *BR3*⁺ В лимфоцити под влияние на кондиционираната среда на стволовите клетки. Това е резултат, който не е докладван до този момент в научната литература. Както беше акцентирано, В-клетъчният активационен фактор като цитокин или лиганд част от голямото *TNF* семейство протеини, насърчава, съзряването, диференциацията и оцеляването на В клетките. Експресията на *BAFF-R* започва, когато незрелите В клетки се превръщат в преходни В клетки, които след това получават *BAFF-R*-зависими сигнали за оцеляване, за да се спасят от преждевременна клетъчна смърт. По този повод, *BR3* се експресира в по-високи нива на не-автореактивни незрели В клетки и тази експресия корелира с нивата на повърхностния *IgM* и тоничните *BCR* сигнали, които клетките получават (Rowland et al. 2010). На ниво протеин, *BR3* се открива на повърхността на всички човешки периферни В-клетъчни субпопулации, с изключение на плазматичните клетки и центробластите, разположени в тъмната зона на зародишните центрове (Smulski and Eibel 2018). За разлика от наивните В клетки и плазматичните клетки, В клетките на паметта могат да преживеят и без сигнализацията медирана от *BAFF* (Benson et al. 2008).

Далеч от нормалните ефекти на *BAFF*, свръхекспресията и секрецията му е придружена от поликлоналното активиране на В клетките, последвано от хипергаммаглобулинемия и развитието на автоимунитет (Melchers 2003). Експресията на *BAFF-R* на мембраната на *CD19*⁺ В клетки е сравнително висока (над 90% от В лимфоцитите експресират рецептора) (Sarantopoulos et al. 2007). Нашите данни потвърждават тези налични до този момент в научната литература, тъй като нашата група здрави контроли показва сравнително висока експресия на *BR3* (над 90%) при В клетките в състава на *PBMC*. В научната литература съществуват доклади като този на Gowhari Shabgah и сътр. в подкрепа на това, че 12 месеца след трансплантация на *MCK* при пациенти с РА, се наблюдава понижаване на процента *CD19*⁺ В клетки, които експресират не само *BR3* рецептора, но и *BCMA* рецептора за *BAFF* (Gowhari Shabgah et al. 2020). Това е доста показателно за възможността приложението на този вид стволови клетки да повлиява В-клетъчния имуен отговор при пациенти с автоимунни нарушения, в каквата насока са и получените от нас резултати, относно експресията на *BR3* рецептора върху В-лимфоцитната мембрана.

Докладваните от нашия колектив резултати са доста категорични и показват не само сигнификантно понижение на процента В клетки експресиращи рецептора за *BAFF*, но и статистически значимо понижаване на мембранната му експресия при двете групи болни с *АС* и *СЛЕ*, включително при здравите индивиди. Въпреки това, средният интензитет и ниво на експресия на този рецептор е по-висок при здрави контроли, отколкото при В лимфоцити на клинично активни и не активни пациенти със *СЛЕ* (Duan et al. 2016), което може би при здравите индивиди се дължи на преобладаването на незрели наивни В лимфоцити. Нашите резултати показват най-висок процент *CD19⁺BR3⁺* В клетки при здравите индивиди ($96.07 \pm 1.89\%$), следвани от пациентите с *АС* ($95.42 \pm 2.59\%$) и *СЛЕ* ($94.05 \pm 5.03\%$), като нивото на мембранна експресия на рецептора при здравите индивиди и пациентите с *АС* е също по-високо от това, установено при пациентите със *СЛЕ*. Други автори наблюдават същата тенденция за по-висок процент от В клетки, които експресират *BR3* при здрави (96.91%) и по-ниски при пациенти с неактивен (91.25%) и активен лупус (23.97%), което те обясняват с високите плазмени нива на *BAFF* и свързването му към рецептора, което води до интернализация на *BAFF-BR3* комплекса и невъзможност за детектирането на рецептора на мембраната на лимфоцитите (Zhao et al. 2010). Изследването на серумните/плазмени нива на *BAFF* не беше цел на настоящия дисертационен труд и няма как да се позовем на тези данни. Поради това, че не установихме секретирем *BAFF* в културалните среди на *PBMC*, по-скоро в нашата експериментална постановка понижението на *BR3* рецептора е вследствие на формирането на тези две популации от В клетки с различна експресия на рецептора за *BAFF* и, вероятно е свързано с влиянието на секретом от *МСК*. Още повече, противоположно на предишните проучвания, Peng и сътр. провеждат клинично проучване с 38 пациенти с хроничен *GVHD*, третирани с *МСК* и представят данни в насока увеличаване броя на *CD27⁺* В клетките на паметта, понижението на плазмения В-клетъчен активационен фактор, съпътствано с повишена експресия на *BAFF-R* в периферните В клетки (Peng et al. 2014).

Някои данни сочат, че трите рецептора за *BAFF* имат и разтворима форма. Серумните нива на *BCMA* и *TACI* рецепторите, но не и на *BAFF-R*, са сигнификантно по-високи при *СЛЕ* пациенти спрямо тези, установени при здравите контроли (Vincent et al. 2019). Това е една друга възможна хипотеза за стимулиране освобождаването на секретиремата форма на *BAFF-R*, вследствие на освободените от *МСК* биологично активни молекули. Други изследвания обаче директно отричат тази възможност, тъй

като за протеолитичното откъсване на екстрацелуларния домен на *BAFF-R* от металопротеазата *ADAM10* (*a disintegrin and metalloprotease 10*) се изисква предварително свързване на лиганда *BAFF* към рецептора (Smulski and Eibel 2018), който ние не установихме като наличен в културалните среди на *PBMC*. Остава, следователно, възможността секретирания фактори, налични в средата на *MCK*, да са свързани с директното понижаване в експресията на този рецептор при В клетките в нашите експериментални постановки.

5. Влияние на секретом от *MCK* върху апоптозата на В лимфоцити

Елиминирането на свръхактивирани В лимфоцити е част от механизмите на периферния толеранс. Голяма част от терапиите при автоимунни пациенти целят именно да модулират живота или смъртта на патологични автореактивни В клетки. Апоптозата като процес е нормално явление или хомеостатичен механизъм по време на развитието и стареенето, необходим за поддържането на клетъчните популации в тъканите, но също така може да бъде и защитен механизъм, например при имунни реакции или когато клетките са увредени от наличието на патологично състояние или вреден агент. Има голямо разнообразие от стимули и състояния както физиологични, така и патологични, които могат да предизвикат апоптоза, но не е задължително всички клетки да умрат в отговор на един и същ стимул (Elmore 2007). Нещо, което установихме беше, че с увеличаването на възрастта на здравите контроли секретиремите фактори водят до повишени нива на В клетки в ранна апоптоза. Установената положителна корелация между възрастта на здравите контроли и повишеният процент на *Анексин V⁺* В клетки под влияние на секретом от *MCK* повдига въпроса за способността на секретиремите *MCK* фактори да допринасят за т.нар. *age-related apoptosis* или апоптоза, асоциирана с възрастта, като част от поддържането на клетъчната хомеостаза, включително на имунната система (Muradian and Schachtschabel 2001). Предвид и сравнително незначителната апоптоза на В клетките, която наблюдавахме при здравите лица, по-скоро се дължи на този хомеостатичен механизъм, за който споменахме преди. Всеизвестно е, че едни от молекулярните стимули за индукцията на процеса апоптоза са увреждане на ДНК или понижаване на молекулите, асоциирани с преживяването на клетките (Kapetanaki et al. 2013), което донякъде съвпада с понижението в експресията на *BR3* рецептора при В клетките в нашата експериментална постановка.

Вече беше акцентирано, че противоречивите данни, които се наблюдават съобщени в научната среда, се дължат на това, че *МСК* имат както про-, така и антиапоптотични свойства. От получените от нашия колектив резултати можем да заключим, че приложението на кондиционирани среди от *МСК* оказва много слабо действие върху програмираната клетъчна смърт на В клетки, както върху нейната ранна фаза, така и върху късната фаза на този процес, когато вече е налице и некроза. Единствено при болните със *СЛЕ* и здравите контроли леко по-високият процент на В лимфоцити в ранна апоптоза под влияние на секретом от *МСК* беше доказан посредством статистически методи. По отношение на стимулирането на В клетките да претърпят некроза/късна апоптоза от секретиремите молекули на *МСК*, получените резултати бяха несигнификантни и сравнително ниски, поради което няма да подлежат на коментар.

Въпреки това слабо влияние върху ранните процеси в основата на програмираната клетъчна смърт смятаме, че този резултат все пак е обнадеждаващ, като се има предвид противоречивите данни относно влиянието на *МСК* върху преживяването като цяло на В лимфоцитите. Например, *Franquesa и сътр.*, съобщават че *МСК* от мастна тъкан насърчават оцеляването на В клетките, като възпрепятстват апоптотичната клетъчна смърт (Franquesa et al. 2015b). Други данни от проучване, свързано с остра лимфобластна левкемия показват, че секретиремия лиганд *TRAIL*, освободен от генно модифицирани *ПВ-МСК*, е свързан с инхибиране на пролиферацията и води до повишена апоптоза на *B-ALL* клетки (*B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia*) *in vitro* и *in vivo* (Chen et al. 2022).

Комбинацията от разтворими фактори и мембранни молекули на В клетките най-вероятно е в основата на повлияването на този процес под действие на паракринните фактори, освободени от *МСК*. Блокирането на *BR3* посредством *анти-BR3* антитяло насърчава апоптозата на епителни клетки *in vitro* (Lahiri et al. 2014), а при нашите експериментални постановки установихме понижена изява на *BAFF-R*. Тук се включва ролята на *BAFF* за инхибирането на В-клетъчната апоптоза, процес, медиран от *CD20* или *BCR*. И това не е всичко, понеже *BAFF* е асоцииран със стимулирането на експресията на гена за *CD40*, един от гените, който има директна връзка с преживяването на В клетките (Saito et al. 2008). Възможно е повишената апоптоза да се дължи и на понижената мембранна експресия на *CD40* ко-стимулаторния рецептор, който както вече подчертахме се смята за положителен регулатор на преживяването на нормални В лимфоцити, макар че при малигнени клетки се съобщава за про- и анти-

апоптотични свойства на *CD40* молекулата (Dallman et al. 2003). Активирането на тази молекула е асоциирано с повишено преживяване на В клетките посредством *CD40*-индуцирани фосфатидилинозитол 3-кинази (Andjelic et al. 2000). Съществуват обаче и противоречиви данни, които показват, че стимулацията на *BCR* насърчава процеса автофагия и предизвиква апоптоза, докато съпътстващата стимулация чрез ко-рецептора *CD40* индуцира по-скромно повишаване на нивата на автофагия, ограничавайки клетъчната смърт (Raza and Clarke 2021). Нашите данни са в унисон с тези, представени преди особено установената отрицателна корелационна зависимост между *CD40 MFI* и процента на В клетките в ранна апоптоза при пациенти със *СЛЕ* под действие на секретом от *МСК*. Като допълнение установихме и силна положителна корелация между процента на В клетките, позитивни за *CD40* и *BR3* под действие на секретом от *МСК* при здрави контроли, предвид ролята на двете молекули за преживяването на лимфоцитите.

До 2022г. няма експериментално проучване, което да изследва имуномодулаторните ефекти на *EB* върху Т и В лимфоцити на пациенти със *СЛЕ* или *АС*. Поради тази причина екип от учени насочват своето внимание именно в тази насока и показват, че *EB* от човешки *ПВ-МСК* регулират специфичните имунни отговори *in vitro* на *MRL/lpr* миши модел на лупус. Това, което установяват е, че при култивирането на стволовите клетки с активирани мононуклеарни клетки успешно се потискат, както *CD4⁺* Т клетките, така и *CD19⁺* В лимфоцити, но резултатите са сигнификантни единствено за Т клетките, въпреки че *EB* показват инхибиторен потенциал и спрямо В клетките. Авторите обясняват отчасти получените резултати за В клетките с ниската концентрация на приложените *EB* и малкия размер на извадката (Xie et al. 2022). Предишни проучвания в тази насока обратно показват, че трансплантацията на *МСК* облекчава *СЛЕ*-подобно заболяване при мишки чрез намаляване броя на *CD4⁺* Т клетки и наивни зрели В клетки (Gu et al. 2012). Всички тези проучвания подчертават дуалистичната природа на тези мултифункционални клетки по отношение на стимулирането или инхибирането на програмираната клетъчна смърт на различни клетъчни типове. Нашите резултати се причисляват към тези, които показват слабо влияние върху апоптозата на В клетките под влияние на секретом от *МСК* с тенденция за нейното повишаване, като част от хомеостатичните механизми или с цел понижаване броя на патологични В клетъчни популации.

6. Секретия на разтворими фактори от PBMC под влияние на секретом от MCK

Не всички фактори, които се освобождават от *MCK* оказват влияние върху В лимфоцитите. С най-голям ефект върху тези лимфоцити са биологичните молекули *IDO*, *PGE2*, *IL-1RA*, *CCL2*, *CCL5*, *CCL7*, *IL-10*, *TGF- β* , *B7-H1*, *Gal-9* и др. (Kyurkchiev et al. 2014; Fan et al. 2016). Във връзка със значението на *BAFF* и възможността продукцията му да бъде стимулирана от *PBMC* този лиганд беше също таргет на нашето изследване, още повече предвид противоречивите данни, свързани с продукцията му от *MCK*. Спряхме се и на възможността да проследим концентрацията на още два цитокина, *IDO* и *PGE2*, поради влиянието им върху таргетните клетки за изследване - В клетките, и поради известната им индуцирана или конститутивна продукция от *MCK*.

IDO е катаболизиращ ензим с изключително важна роля по отношение установяване на контрол върху пролиферацията на автореактивни В клетки (Barbado et al. 2018). Продукцията и секретията на *IDO* от *MCK* се стимулира от *IFN- γ* (Polchert et al. 2008), т.е. наличието на една потенциално възпалителна среда би могла да бъде пусков механизъм за индуциране секретията на този ензим от стволовите клетки. Ензимът катализира първата и скоростоопределяща стъпка в катаболизма на есенциалната аминокиселина триптофан и по този начин допринася за регулиране на възпалителната среда чрез инхибиране на В и Т клетъчното зреене. Дори, съществуват данни, които показват, че метаболити на триптофановия катаболизъм индуцират не само *Tregs*, но и *Bregs* посредством активиране на *април хидрокарбонатов рецептор (AhR)* (Piper et al. 2019).

IDO съществува под формата на *IDO1* и *IDO2*, кодирани от свързани гени, демонстрирано със сравнителна белтъчна хомология в структурно отношение. Въпреки способността на *IDO1* и *IDO2* да стимулират диференциацията на *Tregs* и *Bregs in vitro* и наличната информация по отношение на инхибиторния потенциал на ензимите, съобщени са противоположни данни от *in vivo* предклинични модели на автоимунен артрит, които показват, че *IDO2* допринася за възпалителната среда, като медира автоимунни В-клетъчни отговори (Merlo et al. 2020). Тези данни показват различните роли на *IDO1* и *IDO2* за Т и В клетъчните имунни отговори по време на възпаление. В допълнение на тази информация *Darlan и сътр.*, 2022г. ко-култивират *ПВ-МСК* с *PBMC* (1:1; 1:25; 1:50) от пациенти със *СЛЕ* и показват, че *MCK* сигнификантно потискат *CD19⁺* лимфоцитите при болните индивиди чрез понижаване нивата на *IDO*.

Авторите установяват корелация между нивата на *IDO* и инхибирането на В клетките, като ефектите са дозо-зависими и при съотношение 1:1 *МСК:PBMC*, концентрацията на ензима е най-ниска, а супресията на В клетките от стволовите клетки - най-висока (Masyithah Darlan et al. 2022).

Към тези данни могат донякъде да се приобщят и получените от нас резултати по отношение на ензима *IDO*. Нашият екип не успя да установи наличие на ензима в културалните среди от *PBMC* и в кондиционираните среди на *МСК*. Донякъде си обясняваме липсата на установена секреция на *IDO* от *МСК* с липсата на възпалителна среда и потенциален стимул за стволовите клетки да продуцират този ензим. От друга страна, липсата на *IDO* в културалните среди на мононуклеарните клетки не бихме могли да свържем с леко повишената апоптоза на В клетките под действие на секретомата от *МСК*, поради това, че не установихме *IDO* и в контролните *PBMC* среди, където апоптозата беше по-ниска. Макар че съществуват данни, които показват, че инхибирането на *IDO* потиска експресията на *BCL2A1* гена, повишава не само експресията, но и транслокацията на *цитохром ц* и по този начин активира програмираната клетъчна смърт (Zheng et al. 2021). Може би комбинацията на липсващата секреция на *IDO*, понижената експресия на *CD40*, заедно с тази на рецептора, необходим за преживяването на В клетките (*BR3*), са причина за сравнително малкото, но все пак повече В клетки в ранна апоптоза под влияние на секретомата от *МСК*.

Подобни на данните за *IDO* бяха и нашите резултати по отношение на *BAFF*. Не успяхме да детектираме лиганда нито в кондиционираните среди на стволовите клетки, нито в културалните среди след тридневното култивиране на *PBMC*. По отношение на *МСК* резултатите, които получихме не бяха изненадващи за нас, тъй като няма данни, които да показват, че *PB-МСК* при нормални условия са източник на този лиганд. Патологични *МСК* от други тъканни източници обаче изглежда биха могли да бъдат източник на *BAFF*, което беше причина да насочи вниманието ни и да проверим тези констатации при нативни стволови клетки от здрави донори. В контекста на това, данни от проведено изследване с *МСК* от пациенти с остеоартрит и ревматоиден артрит установяват както детектиране на *mRNA* на *BAFF*, така и на самия протеин (Dallos et al. 2009). Други автори отбелязват, че не откриват никакви значителни нива на *APRIL* или *BAFF*, секретиранни от *KM-МСК* при здрави индивиди или болни донори с остра лимфобластна левкемия (Lasaviciute et al. 2021).

Действително, основната клетъчна популация в състава на *PBMC*, която продуцира *BAFF* са моноцитите и едни от основните цитокини, отговорни за стимулиране секрецията на този лиганд са *IFN- α* и *IFN- γ* . До голяма степен повишените нива на *BAFF* при пациентите със *СЛЕ* в плазма или серум се дължат на продукцията му не само от миелоидни клетки, но и от други имунни и неимунни клетки, като неутрофилите, например – клетки, които не са част от нашата експериментална постановка (Wang et al. 2022). Донякъде получените от нас данни са логични, защото *PB-MCK* не са източник на *BAFF* при нормални обстоятелства, в същото време предполагаемата концентрация на миелоидни клетки е сравнително ниска в нашата експериментална постановка и още повече нямаме външна цитокинова стимулация, която би могла да индуцира секреция на *BAFF* от малкото миелоидни клетки част от *PBMC*. В същото време, смятаме, че предвид доказаната роля на този лиганд за патогенезата на аутоимунните заболявания, това че секретиремите фактори от *MCK* не стимулират продукцията и секрецията му от *PBMC* е добър знак за бъдещо терапевтично повлияване на пациенти от този спектър на заболявания. Според Suzuki et al. 2008, *IL-2* силно и зависимо от дозата стимулира синтеза на *BAFF* в *PBMC* основно от активирани Т и НК клетки. Това показва, че *IL-2* е един от регулаторните цитокини, имащи положителен ефект върху синтеза на *BAFF* в човешките периферни Т и НК клетки и свръхпроизводство на *IL-2*, каквото има при лупус, може да доведе до повишена регулация на синтезата на *BAFF* в *PBMC* при подобни патологични състояния (Suzuki et al. 2008). Липсата или потиснатата секреция на описания цитокин може също да е причина за получените от нас резултати.

Друга насока на мисли е свързана с конформацията на молекулата и нейната експресия. *BAFF* има способността да съществува под различни форми както секретирема, така и в мембранна форма, гликозилиран или негликозилиран, мономер или тример, което може да е причина за невъзможността за детектиране на *BAFF* от един единствен *ELISA* кит (Duan et al. 2016).

При мишки е доказана способността на *BAFF* да стимулира експресията на ко-стимулаторните молекули *B7/28* и *CD40/CD154* и по този начин да повлиява взаимодействията между В и Т клетките *in vitro* посредством участието на *BAFF-R* (Zhang et al. 2016). Липсата на *BAFF* в културалните среди на *PBMC*, обяснява и липсата на втория активационен сигнал за В клетките, което допълва хипотезата за тяхното превръщане в анергични клетки с леко намалена продължителност на живота (Yarkoni et al. 2010). При нашите изследвания установихме силни положителни

корелации между средния интензитет и ниво на експресия на *CD80* и *CD86*, както помежду им, така и с тази на *BR3* рецептора при пациентите със *СЛЕ*, *АС* и здравите контроли. Но това, което наблюдавахме при пациентите с *АС* беше отрицателната корелация между процента *CD19⁺BR3⁺* и процента *CD19⁺CD86⁺*, резултати, които показват донякъде взаимносвързаните процеси медиирани от двете молекули и важноста им при това автовъзпалително заболяване. Още повече се допълват нашите данни от силната положителна корелация установена между процента В клетки, позитивни за *BR3* рецептора и средния интензитет и ниво на експресия на *CD86*, отново при тези пациенти, което е доказателство за ролята на *BAFF* и *BAFF-R* за експресията на тези молекули.

Един от цитокините, с чиято експресия и секреция са известни *МСК*, не зависимо от тъканния източник, е *PGE2*. Този простагландин е важен не само за имunosупресивните функции на стволовите клетки, но и за жизнено важни за тях процеси като пролиферация, диференциация, миграция и поддържане хомеостазата на *ХСК* (Kulesza et al. 2023). Сравнително наскоро беше докладвана и *МСК*-медирана фагоцитоза на апоптотични клетки, което допринася за имunosупресивното им действие, процес допълнен от повишената секрецията на *PGE2* (Zhang et al. 2019). Нашите резултати ясно потвърдиха, че *ПВ-МСК* са източник на *PGE2* като установихме повишени нива на този ейкозаноид в изследваните кондиционирани среди. Още впечатляващо беше откритието ни за сигнификантно повишена секреция на *PGE2* от *РВМС* след култивирането им в среда на *ПВ-МСК* при пациенти със *СЛЕ* и *АС*. При здравите контроли се наблюдаваше същата тенденция за повишаване на секрецията на *PGE2* от *РВМС* под влияние на секретом от *МСК*, но не успяхме да потвърдим посредством статистически методи, тези данни.

PGE2 е основният простагландин, който се получава от мембранни фосфолипиди, под действие на двете изоформи на ензима циклооксигеназа *COX1* (конститутивен) или *COX2* (индуцируем), след освобождаването на арахидонова киселина от фосфолипаза *A₂*. От това следва че, всяка една клетка в човешкото тяло би могла да бъде източник на *PGE2*. *МСК* конститутивно продуцират и секретират *PGE2*, но под действието на различни стимули секрецията му се повишава. Един от тези стимули е *IL-6*, който след като бъде продуциран от *МСК* може по автокринен път да повлияе синтезата и освобождаването на *PGE2* от стволовите клетки (Giacomini et al. 2023). Редица други стимули като лигирането на *TLR-4*, действието на хормони,

митогени, фактори, освободени от увредени клетки и други, също допринасят за повишеното освобождаване на този биоактивен липид (Kulesza et al. 2023).

Плейотропната природа на *PGE2* обуславя провеждането на инхибиторни сигнали спрямо редица имунни клетки, но и регулира и допълва вече налични възпалителни събития (Kalinski 2012). Причината за този парадокс *PGE2* да се определя като молекула с разностранни ефекти е, че се свързва към различни G-протеин свързващи рецептори (*GPCR*): *EP1-EP4*. Всеки един от тези рецептори има различна локализация в клетката и показва различен път на сигнална трансдукция, следователно различна крайна ефекторна функция - инхибиране или активация на клетките, експресиращи съответния рецептор (Markovič et al. 2017). Публикации в научната литература показват способността на *PGE2* да допринася за потискането на ко-стимулаторните молекули на зрели *DC* (Krause et al. 2009). Агонист на *EP3* рецептора за *PGE2*, води до инхибиране на *DC* чрез понижение в средния интензитет и ниво на експресия на молекулите *CD80*, *CD86*, *CD54 in vitro* (Shiraishi et al. 2013). Действително, най-разпространените рецептори за *PGE2* са *EP3* и *EP4*, които са установени дори на ядрената мембрана на клетките (Markovič et al. 2017). Отвъд способността на *PGE2* да инхибира пролиферацията на В лимфоцитите, *Ptger4* генът, представлява отрицателен регулатор на *BCR*-медираната активация на В клетките. Този ген кодира *EP4* рецептора – основната молекула, предаваща инхибиторния сигнал от *PGE2* към пролифериращите лимфоцити (Murn et al. 2008).

Сигнификантно повишената концентрация на *PGE2* под действие на освободените фактори на *МСК* след проведените от нас експерименти ни дават основание да заявим предполагаемото участие на този липиден медиатор в променената мембранна експресия на *CD80*, *CD86*, *CD40* молекулите, свързани с активацията на В клетките. Разбира се, едва ли това е единствената молекула отговорна за установената десинхронизирана експресия, но на базата на споделената до тук информация смятаме, че би могла да допринесе за наблюдавания от нас имуносупресивен ефект, предвид значението на *PGE2* за *МСК*-медираната супресия на В-клетъчната пролиферация. Освен това нашите наблюдения се подкрепят и от стари данни, според които *PGE2* потиска В-клетъчната активация, като води до инхибиране на мембранната експресия на *МНС II*, но изследователите забелязват, че не всички В лимфоцити отговарят на стимулите от липидния медиатор (Roper and Phipps 1992).

По отношение на ролята на простагландина за програмираната клетъчна смърт и понижената пролиферация на В лимфоцитите, други доклади, доказват, че *PGE2* индуцира апоптоза на незрели нормални и малигнени В клетки (Brown et al. 1992), тимоцити, незрели и зрели Т клетки (Pica et al. 1996). Друга важна функция на липидния медиатор е свързана с промотирането на *IgE* и *Th2* имунните отговори и индукцията на възпалителни спрямо алергични реакции (Fedyk et al. 1997). Високите нива на *PGE2* корелираха позитивно с *бъбречните прояви* при *СЛЕ* пациентите. Получените от нас резултати се обясняват с участието на *PGE2* в регулацията на гломерулната филтрация и често при лупусни пациенти нивата на този липиден медиатор са повишени в урината (Daza et al. 2005). Също интересен факт е, че органът с най-висока експресия на простагландини е бъбрекът, а *PGE2* е най-разпространеният метаболит на арахидоновата киселина в бъбреците. Установена е и връзка между лупусния нефрит и клас липидни медиатори, означени като оксипипини, които се получават от метаболизма на полиненаситени мастни киселини, включително от арахидоновата киселина (He et al. 2022). Тези данни, може би не са много обнадеждаващи за изследваните пациенти със *СЛЕ*, предвид значимото повишаване в нивата на *PGE2* след култивиране на *PBMC* в среда на стволови клетки.

Финалният поглед обобщаващ, получените от нас резултати и наличната информация в световната база данни ни предостави възможността да акцентираме своето внимание върху важността на взаимодействията на тези молекули помежду им и коментирахме установените корелационни връзки както между тях, така и с клиничните характеристики на включените болни лица и здрави доброволци. Общото между всички изследвани молекули, свързани с В клетките е, че взаимно участват в разнообразие от сложни и преплетени процеси, чиито механизми до голяма степен продължават да бъдат все още обект на задълбочени изследвания.

Силните положителни асоциации между изследваните маркери по отношение на средния интензитет и ниво на експресия при В лимфоцити на пациентите със *СЛЕ* и здравите лица са показателни за описаните по-горе взаимоотношения, тяхната взаимосвързаност и кооперативност. С обобщената дотук информация ясно се вижда, че всяка от молекулите на В-клетъчната мембрана, които бяха обект на нашите изследвания не съществува самостоятелно, а по-скоро има способността да повлиява експресията на други от молекулите, както и да се намесва в регулираните от тях сигнални пътища.

Друга връзка между изследваните маркери е техният молекулярно-биологичен произход. Например, *CD40* молекулата и *BAFF-R* са членове на суперфамилията на *TNF*, от друга страна *PD-1*, *CD80/CD86* молекулите и алфа веригата на *HLA-DR*, споделят едно семейство, заедно с имуноглобулините (Larhammar et al. 1982; Chen and Flies 2013). Различните патогенетични механизми и ролята на В лимфоцитите в тях при пациентите с *АС* вероятно беше причина да не установим наблюдаваните силни корелации между всички изследвани маркери, както при другите две групи лица (*СЛЕ* и здрави контроли).

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И БЪДЕЩИ НАСОКИ

Като обобщение от направения флуцитометричен анализ на експресията на ключови В-клетъчни молекули, може да заключим, че фенотипът и поведението на В-клетките се променя под действието на кондиционирани среди на *МСК*. Успяхме да подкрепим тезата, че голяма част от имуномодулаторното действие на *МСК* се осъществява без необходимостта от контакта клетка-клетка, а по-скоро чрез продукцията на разтворими фактори и молекули, чието действие върху В лимфоцитите беше изследвано в настоящата научна работа. До голяма степен остава въпросът, дали регулацията на В клетките от *МСК* е медирана чрез директни ефекти или факторите на *МСК* имат способността да повлияват други имунни клетки - междинни посредници, които впоследствие да регулират В клетките.

Разбира се, като лимитация на настоящия дисертационен труд бихме поставили на първо място ограниченото изследване на секретирани фактори в кондиционирани среди на *МСК* и изследваните *PBMC* в нашите експериментални постановки. Ето защо, една от бъдещите насоки на нашия колектив би била свързана с обогатяване на знанията за биологично активните молекули, които са отговорни за индукцията на тези промени в експресията на В-клетъчните маркери под влияние на кондиционирани *МСК* среди.

Използваният един единствен подход – кондиционирана среда за изследване влиянието на секретирани фактори от *МСК* по съображения, които вече бяхме споменали, също не смятаме, че е напълно достатъчен, за да бъдат направени категорични заключения. Трябва да бъдат допълнително проучени възможностите за повлияване на В-клетъчните маркери и след ко-култивиране на двата вида клетки с помощта на *transwell* система или да бъде изследвано влиянието на *EB* поотделно. В нашите експерименти, *МСК* са култивирани под формата на монослой (*2D-МСК*), а има данни, според които *МСК* под формата на сфероиди (*3D-МСК*) максимално се доближават до *in vivo* средата и в същото време тази моделна система, наподобява хипоксични условия, които могат да доведат до промяна в секретиремите молекули (Silva-Carvalho et al. 2022). Това е една друга идея за бъдещо изследване на секретом от сфероиди на *МСК* и неговото влияние върху В клетките.

Въпреки ограниченията на нашето изследване, можем категорично да заявим, че нативните *МСК* представляват „биологични машини“, които чрез състава на своя секретом могат да повлияват В-клетъчната активация и други техни ефекторни

функции, отколкото да доведат до тяхната директна смърт. Очакванията ни за еднопосочността на действие на *МСК* спрямо В лимфоцитите при нашата опитна постановка не се потвърдиха, по скоро потвърдихме противоречието по отношение на тяхното влияние върху този тип имунни клетки. Понижената експресия на част от маркерите, свързани с активацията и антиген-представящата функция не бяха в унисон с експресията на други маркери, които бяха детектирани при по-голям процент В клетки, но с нарушен среден интензитет и ниво на експресия. Може би изказаната от нас хипотеза за нарушен синхрон на експресия на изследваните молекули е по-скоро окончателният ефект от секретом на *МСК* върху В клетките.

Същите резултати получихме и по отношение на програмираната смърт на тези лимфоцити - много слаб ефект на секретом на *МСК*, но все пак в насока леко повишение, отчетено при пациентите със *СЛЕ*. Достоверно значима връзка установихме в комбинацията между понижената експресия на *BR3* рецептора и понижен инхибиторен маркер *PD-1*. Разбира се, част от наблюдаваните различия в експресията на изследваните маркери при пациентите от двете групи заболявания потвърди различната роля на В клетките в патогенезата на класическия системен лупус и автовъзпалителния анкилозиращ спондилит.

С нашите резултати екипът ни предоставя няколко от парчетата на пъзела, чието сглобяване, ще изясни цялостната картина, описваща влиянието на секретом от *МСК* върху биологията на В лимфоцитите. Не бихме казали, че сме успяли да отговорим на всички интересувачи ни въпроси, свързани с този тип стволови клетки и възможността техният секретом да промени в една или друга насока В клетките. Но все пак смятаме, че сме с една стъпка по напред в разбирането на сложното взаимодействие между описаните имунни клетки в основата на автоимунитета и стволовите клетки, на които дълги години се уповаваха надеждите на стотици лекари и изследователи, описващи ги като един от ценните биологични инструменти за справяне с автоимунните състояния. Предстои да бъде извървян още дълъг път, чийто край ще да бъде достигнат, там където надеждата и неуморният стремеж се обединят с натрупаните знания, придобития опит и най-вече търпението, че „облаците ще се разпръснат“ и всеки въпрос ще намери своя категоричен отговор.

VIII. ИЗВОДИ

I. Влияние на секретом от ПВ-МСК върху активацията и антиген-представящата функция на В лимфоцити

1. Под влияние на секретом от ПВ-МСК се наблюдава дисбаланс по отношение експресията на $CD80/CD86$ при В лимфоцити на пациенти с АС и здрави индивиди, изразяващ се в повишен процент на В лимфоцити, позитивни за изследвания маркер, допълнено с понижено ниво на мембранна експресия.

2. Секретомът от ПВ-МСК не води до промяна в процента на В клетките, позитивни за $CD40$, но е свързан с понижение в нивото на мембранна експресия на изследвания маркер при трите групи участници - пациенти със СЛЕ, АС и здрави индивиди.

3. Под влияние на секретом от ПВ-МСК се наблюдава сигнификантно понижен процент на $CD19^+HLA-DR^+$ В клетки при пациенти със СЛЕ и АС, и сигнификантно понижен процент на $CD19^+PD-1^+$ В клетки при пациенти със СЛЕ и здрави индивиди.

II. Влияние на секретом от ПВ-МСК върху оцеляването на В лимфоцити

1. Под влияние на секретом от ПВ-МСК се наблюдава понижен процент на $CD19^+BR3^+$ В клетки с понижен интензитет и ниво на експресия на изследвания рецептор за $BAFF$ при пациенти със СЛЕ, АС и здрави индивиди.

2. Секретомът от ПВ-МСК оказва слабо влияние върху програмираната клетъчна смърт на В клетките, с тенденция за повишаване на процент В лимфоцити в ранна апоптоза на пациенти със СЛЕ и здрави индивиди.

III. Други изводи, свързани с влиянието на секретом от ПВ-МСК върху В лимфоцити

1. Секретомът от ПВ-МСК стимулира освобождаването на $PGE2$ от $PBMC$ на пациенти със СЛЕ и АС.

2. Установени бяха силни положителни асоциации между стойностите на нивото и интензитета на мембранна експресия на всички изследвани маркери под влияние на секретом от ПВ-МСК при В клетки на пациенти със СЛЕ и здрави индивиди.

IX. ПРИНОСИ

- **Приноси с оригинален характер**

1. За първи път екипът ни съобщава за промени, свързани с повишено клъстериране на *PBMC* от болни и здрави индивиди, култивирани в кондиционирана среда на *PB-MCK*.
2. За първи път екипът ни съобщава за формирането на две популации от високо- и ниско-експресиращи *BR3* рецептора В лимфоцити под влияние на секретом от *PB-MCK*, изразяващо се в понижен процент на $CD19^+BR3^+$ В клетки с понижен интензитет и ниво на мембранна експресия на *BR3*.
3. За първи път екипът ни съобщава за понижен процент на $CD19^+HLA-DR^+$ В лимфоцити при пациентите с *АС* спрямо този, установен при здрави доброволци.

- **Приноси с потвърдителен характер**

1. Секретираните фактори от *PB-MCK* самостоятелно оказват влияние върху В лимфоцити
2. Нестимулирани *PB-MCK* от здрави донори не са източник на *BAFF* при стандартни условия на култивиране.
3. *PB-MCK* не експресират и секретират детектируеми нива на *IDO* при нормални условия (без наличие на възпалителни условия на средата).
4. *PB-MCK* конститутивно секретират *PGE2*.
5. Потвърдена беше положителната връзка между скорвете за активност при *АС* пациентите *BASDAI*, *ASDAS-CPII*, *BASFI* и *ASDAS-CPII*, *CVE* и *CPII*.

- **Приноси с дискутабилен характер**

1. Кондиционираната среда от *PB-MCK* оказва слабо влияние върху програмираната клетъчна смърт на В клетките в посока стимулиране на ранна апоптоза.
2. Установена беше отрицателна връзка между нивото на мембранна експресия на *CD40* и процента на В клетките в ранна апоптоза при пациенти със *СЛЕ*.
3. Установена беше положителна връзка между повишените нива на *PGE2* под влияние на секретом от *PB-MCK* и бъбречното увреждане при пациенти със *СЛЕ*.

Х. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ

- **Публикации във връзка с дисертационния труд**

1. **A. Yordanova**, D. Kyurkchiev. The underlying mechanisms of B-cell immunomodulation by mesenchymal stem cells. *Bulgarian Journal of Clinical Immunology* Vol.13 2020 №:1

2. **A. Yordanova**, D. Kyurkchiev, M. Ivanova, K. Tumangelova-Yuzeir, K. Belemezova, and E. Ivanova-Todorova, “Secreted Factors from Umbilical Cord-Mesenchymal Stem Cells Affect CD86 Expression on B Lymphocytes and Increase CCL5 Chemokine Secretion by Healthy Donors’ PBMC”, *C. R. Acad. Bulg. Sci.*, vol. 75, no. 11, pp. 1687–1695, Nov. 2022. (IF-0.300)

3. **A. Yordanova**, E. Ivanova-Todorova. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome in autoimmune patients. *Rheumatology (Bulgaria)*. 2023 May 25;31(1):37-53.

4. R. Komsa-Penkova, **A. Yordanova**, P. Tonchev, S. Kyurkchiev, S. Todinova, V. Strijkova, M. Iliev, B. Dimitrov, G. Altankov. Altered Mesenchymal Stem Cells Mechanotransduction from Oxidized Collagen: Morphological and Biophysical Observations. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 3635.

(IF-5.600)

- **Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд**

1. **Аделина Йорданова**. Влияние на фактори секретирани от мезенхимни стволови клетки върху В лимфоцити. Първа научна конференция “Хронични заболявания: патогенеза, диагностика, клиника и превенция” 27-30 май 2021, к.к Дюни (**устна презентация**).

2. **Аделина Йорданова**, Мариана Иванова, Александър Ангелов, Калина Тумангелова-Юзеир, Екатерина Куртева, Георги Василев, Доброслав Кюркчиев, Екатерина Иванова-Тодорова. Влияние на фактори, секретирани от мезенхимни стволови клетки, върху В-лимфоцити при анкилозираш спондилит. Национална конференция по ревматология 16-19 септември 2021, Свети Влас (**устна презентация**).

3. **Аделина Йорданова.** Влияние на фактори, секретирани от мезенхимни стволови клетки върху молекули на В лимфоцитите при пациенти със системен лупус еритематозус. Втора конференция на Българска ревматологична асоциация 17-19 март 2022г., конгресен център хотел Маринела, гр. София; Имунологична сесия (*устна презентация*).

4. **Аделина Йорданова.** Ролята на HLA-B27 в имунопатогенезата на анкилозираща спондилит. Втора научна конференция "Хронични заболявания: патогенеза, диагностика, клиника и превенция" 19 –22 май 2022 г., х-л Аква Парадайз Ризорт, гр. Несебър (*устна презентация*).

5. **Adelina Yordanova, Mariana Ivanova, Dobroslav Kyurkchiev, Alexander Angelov, Ekaterina Ivanova-Todorova.** Mesenchymal stem cell-secreted factors influence B lymphocytes of Systemic lupus erythematosus patient - A clinical case. 13th International Congress on Autoimmunity Athens, Greece 10 - 13 June 2022 (*paper poster presentation*).

6. **Аделина Даниелова Йорданова, Александър Красимиров Ангелов, Мариана Иванова Гойчева, Доброслав Станимиров Кюркчиев, Екатерина Иванова-Тодорова.** Влияние на секретом от мезенхимни стволови клетки върху В-лимфоцити на пациенти с анкилозиращ спондилит. Годишна научна конференция по имунология 16 декември 2022 г. Хотел Даунтаун гр. София (*устна презентация*).

• ***Участия в научни проекти по темата на дисертационния труд***

1. **Водещ изследовател** в Конкурс “Млад изследовател-2021” на МУ София, Проект с вх. №: 7804/17.11.2020г, Договор № Д-123/04.06.2021г. на тема: “*Изследване влиянието на разтворими фактори от кондиционирани среди на мезенхимни стволови клетки върху В-лимфоцити*”.

XI. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение №1

КЛАСИФИКАЦИОННИ КРИТЕРИИ ЗА СЛЕ НА SLICC, 2012

| <i>Клинични критерии</i> | <i>Имунологични критерии</i> |
|--|---|
| 1. Остър кожен лупус | 1. АНА – стойност над референтната граница на теста за съответната лаборатория |
| 2. Хроничен кожен лупус | 2. анти-двДНК антитела - стойност над референтната граница на теста за съответната лаборатория (при ELISA метод 2x над референтната граница на теста) |
| 3. Улцерации в носна/устна кухина | 3. анти-Sm антитела |
| 4. Алопеция | 4. Антифосфолипидни антитела Положителен резултат от тест за лупусен антикоагулант (LAC) |
| 5. Синовит в 2 или повече стави (оток/излив) или болка в 2 или повече стави, придружена със сутрешина скованост над 30 мин. | Фалиливо положителен резултат за бърз плазмен реакин (RPR) тест Среден или висок титър на анти-кардиолипинови антитела (IgG, IgM, IgA) Положителен резултат за анти-β2 гликопротеин I (IgG, IgM, IgA) |
| 6. Серозит | 5. Нисък комплемен Нисък C3 Нисък C4 Нисък CH50 |
| 7. Бъбречно ангажиране: протеинурия над 500 mg/24ч.; еритроцитни цилиндри | 6. Положителен директен тест на Coombs, без наличието на хемолитична анемия |
| 8. Неврологични прояви: гърчове, психози, множествен мононеврит, миелит, периферна или краниална невропатия, остър период на объркване | |
| 9. Хемолитична анемия | |
| 10. Левкопения (< 4000/мм ³ поне веднъж) или лимфопения (<1000/мм ³ поне веднъж) | |
| 11. Тромбоцитопения (<100 000/мм ³ поне веднъж) | |

Таблица 15. Клинични и имунологични критерии, използвани в класификационната система на SLICC
Забележка: Критериите са кумулативни и не е необходимо да присъстват едновременно. Необходими са най-малко 4 критерии, от които поне един клиничен и един имунологичен критерии.

Използвани съкращения: SLICC - Systemic Lupus International Collaborating Clinics; СЛЕ – системен лупус еритематозус; АНА- анти-нуклеарни антитела; анти-двДНК – анти-двуверижна ДНК; ELISA – ензимно-свързан имуносорбентен тест.

КЛАСИФИКАЦИОННИ КРИТЕРИИ НА ЕВРОПЕЙСКАТА ЛИГА ЗА РЕВМАТИЗЪМ И АМЕРИКАНСКИЯ КОЛЕЖ ПО РЕВМАТОЛОГИЯ - EULAR/ACR ЗА СЛЕ, 2019Г.

| Критерии | Дефиниция |
|--|---|
| <i>АНА – анти-нуклеарни антитела</i> | <i>АНА при титър $\geq 1:80$ върху HEp-2 клетки или еквивалентен положителен тест поне веднъж</i> |
| <i>Температура</i> | <i>$>38.3^{\circ}\text{C}$</i> |
| <i>Левкопения</i> | <i>Левкоцити $< 4000/\text{mm}^3$</i> |
| <i>Тромбоцитопения</i> | <i>Тромбоцити $< 100\ 000/\text{mm}^3$</i> |
| <i>Автоимунна хемолитиза</i> | <i>Доказателство за хемолитиза, като ретикулоцитоза, нисък хептоглобин, повишен индиректен билирубин, повишен LDH и положителен тест на Coombs (директен антиглобулинов тест)</i> |
| <i>Делириум</i> | <ul style="list-style-type: none"> • промяна в съзнанието или нивото на възбуда с намалена способност за фокус • развитие на симптомите в продължение на часове до < 2 дни, • колебания на симптомите през целия ден • остра/подостра промяна в познавателната способност или промяна в поведението, настроението или афекта (напр. безпокойство, обръщане на цикъла сън/събуждане) • заблуди и/или халюцинации без прозрение • липса на делириум |
| <i>Психоза</i> | <i>Първично генерализиран припадък или парциален/фокален припадък</i> |
| <i>Припадъци</i> | |
| <i>Алопеция</i> | <i>Алопеция без белези, наблюдавана от лекуващия лекар</i> |
| <i>Улцерации</i> | <i>Орални язви, наблюдавани от лекуващия лекар</i> |
| <i>Подостър кожен или дискоиден лупус</i> | <i>Наблюдавани от лекуващия лекар</i> |
| <i>Остър кожен лупус</i> | <i>Пеперудообразен обрив или генерализиран макулопапулозен обрив</i> |
| <i>Плеврален или перикарден излив</i> | <i>Образни доказателства (ултразвук, рентгенова снимка, компютърна томография, адрено-магнитен резонанс-ЯМР) на плевралния или перикардния излив, или и двете ≥ 2 от 1) перикардна гръдна болка (обикновено остра, влошаваща се при вдишване, подобряваща се при накланяне напред), 2) триене на перикарда, 3) ЕКГ с нова разпространена ST елевация или PR депресия, 4) нов или влошен перикарден излив при образна диагностика</i> |
| <i>Остър перикардит</i> | <i>синовит, включващ 2 или повече стави, характеризиращ се с подуване или излив, или чувствителност в 2 или повече стави; сутрешина скованост най-малко 30 минути</i> |
| <i>Ставно ангажиране</i> | |
| <i>Протеинурия</i> | <i>$>0.5\ \text{g}/24\text{ч.}$</i> |
| <i>Лупусен нефрит от клас II или V на бъбречна биопсия</i> | <i>по ISN/RPS класификация, 2003г</i> |
| <i>Лупусен нефрит от клас III или IV на бъбречна биопсия</i> | <i>по ISN/RPS класификация, 2003г</i> |
| <i>Положителни анти-фосфолипидни антитела</i> | <i>анти-кардиолипинови антитела, антитела срещу $\beta 2$ гликопротеин I или положителен лупусен антикоагулант</i> |
| <i>Нисък C3 или нисък C4</i> | <i>C3 или C4 под долната граница на нормата</i> |
| <i>Нисък C3 и C4</i> | <i>C3 и C4 са под долните граници на нормата</i> |
| <i>Анти-двДНК антитела или анти-Sm антитела</i> | <i>Показват над 90% специфичност за СЛЕ</i> |

Таблица 16. Дефиниции на критериите за класификация на СЛЕ

Използвани съкращения: СЛЕ – системен лупус еритематозус; LDH – лактат дехидрогеназа; ЕКГ – електрокардиография; ISN - International Society of Nephrology; RPS - Renal Pathology Society;

**МОДИФИЦИРАНИ НЮ ЙОРКСКИ КРИТЕРИИ ЗА АНКИЛОЗИРАЩ
СПОНДИЛИТ (1984)**

Клинични критерии

Болка ниско в гърба и скованост с продължителност над 3 месеца, които се подобряват с раздвижване и не се облекчават при покой

Ограничения в подвижността на поясния гръбнак в сагитална и фронтална равнини

Ограничения в разгръщането на гръдния кош (до 2.5cm или по-малко) спрямо нормалните стойности за възрастта и пола

Рентгенологичен критерий

Двустранен сакроилиит 2-4 степен или

Едностранен сакроилиит 3-4 степен

Таблица 17. Ню Йоркски критерии за АС от 1984г.

ОБНОВЕНИ КЛАСИФИКАЦИОННИ КРИТЕРИИ НА МЕЖДУНАРОДНОТО ДРУЖЕСТВО ЗА ОЦЕНКА НА СПОНДИЛОАРТРИТИТ (ASAS), 2010

| | |
|---|---|
| <i>При пациенти с хронична болка в гърба ≥ 3 месеца и възраст при началото < 45 години</i> | |
| <i>Сакроилиит от образно изследване плюс ≥ 1 признак на СпА</i> | <i>HLA-B27 плюс ≥ 2 признака на СпА</i> |
| <p><i>Признаци на СпА:</i> <i>Възпалителна болка в гърба</i> <i>Артрит</i> <i>Ентезит (нета)</i> <i>Увеит</i> <i>Дактилит</i> <i>Псориазис</i> <i>Болест на Крон/Улцерозен колит</i> <i>Добър ефект от НСПВС</i> <i>Фамилна история за СпА</i> <i>HLA-B27</i> <i>Повишен СРП (при изключване на други причини)</i></p> | |

Таблица 18. Класификационни критерии на ASAS за анкилозиращ спондилит (2010)

Използвани съкращения: ASAS – международно дружество за оценка на спондилоартрит; СпА – спондилоартрит; НСПВС – нестероидни противовоспалителни средства; СРП – С-реактивен протеин;

| <i>SLEDAI SCORE</i> | <i>Описание</i> | <i>Дефиниция</i> |
|---------------------|---------------------------------------|---|
| 8 | Гърчове | Нововъзникнали, да се изключат метаболитни, инфекциозни причини или лекарства. |
| 8 | Психоза | Променена способност за функциониране при нормални условия, дължаща се на тежко нарушение във възприятието за реалността. Включва халюцинации, инкохерентност, подчертана свободна асоциация, бедно мисловно съдържание, явно алогично мислене, странност, дезорганизираност, или кататонно поведение. Изключва уремия и медикаментозни причини. |
| 8 | Органичен мозъчен синдром | Променена ментална функция с нарушена ориентация, памет, или друга интелектуална функция, с внезапно начало и променливи клинични характеристики, неспособност за концентриране на вниманието към околната среда, плюс поне 2 от следните: смущение във възприятието, несвързана реч, безсъние или сънливост през деня, или повишена или намалена психомоторна активност. Да се изключат метаболитни, инфекциозни или медикаментозни причини. |
| 8 | Зрително нарушение | Ретинални промени от СЛЕ. Включват цитоидни телца, ретинални хеморагии, серозни ексудати или хеморагии в хориоидеята, или оптичен неврит. Да се изключат хипертония, инфекция, или медикаментозна причина. |
| 8 | Увреда на черепно-мозъчен нерв | Нововъзникнала сензорна или моторна невропатия, засягаща черепно-мозъчни нерви. |
| 8 | Лупусно главоболие | Тежко, персистиращо главоболие; може да е мигренозно, но трябва да е не-отговарящо на наркотична аналгезия. |
| 8 | Мозъчно-съдов инцидент | Нововъзникнал мозъчно-съдов инцидент(и). Да се изключи артериосклероза. |
| 8 | Васкулит | Улцерация, гангрена, болезнени възли по пръстите, периунгвален инфаркт, кървящи фисури или биопсично или ангиографски доказан васкулит. |
| 4 | Артрит | >= 2 стави с болка и белези на възпаление (т.е. чувствителност, оток или излив). |
| 4 | Миозит | Проксимална мускулна болка/слабост, асоциирана с повишена креатин киназа (КК)/алдолаза, или ЕМГ промени или биопсия, показваща миозит. |
| 4 | Цилиндри в урината | Гранулирани или еритроцитни цилиндри. |
| 4 | Хематурия | > 5 Ер. на зрително поле. Изключват се камъни, инфекция или друга причина. |
| 4 | Протеинурия | > 0.5 г/24 часа. |
| 4 | Пиурия | > 5 Левк. на зрително поле. Изключва се инфекция. |
| 2 | Обрив | Възпалителен тип обрив. |
| 2 | Алопеция | Абнормна огнищна или дифузна загуба на коса. |
| 2 | Лигавични улцерации | Орални или назални улцерации. |
| 2 | Плеврит | Плевритна гръдна болка или плеврално триене с излив, или задебеляване на плеврата (изисква обективни доказателства). |
| 2 | Перикардит | Класическа перикардна болка и/или триене, излив с ЕКГ или ехокардиографско потвърждение (изисква обективна компонента). |
| 2 | Нисък комплемент | Понижение на CH50, C3 или C4 под долна граница на нормата за лабораторното тестване. |
| 2 | Повишено ДНК свързване | Повишено ДНК свързване над нормалната граница за лабораторното тестване. |
| 1 | Фебрилитет | > 38°C. Изключва инфекциозна причина. |
| 1 | Тромбоцитопения | < 100 x 10 ⁹ тромбоцита/L, изключва медикаментозни причини. |
| 1 | Левкопения | < 3 x 10 ⁹ левкоцита/L, изключва медикаментозни причини. |

SLEDAI:.....

Адаптирано по **Bombardier et al. 1992** и **Gladman et al. 2002**

➤ **ИНДЕКС НА БОЛЕСТНАТА АКТИВНОСТ ПРИ АНКИЛОЗИРАЩ СПОНДИЛИТ (THE BATH ANKYLOSING SPONDYLITIS DISEASE ACTIVITY INDEX - BASDAI)**

BASDAI

Моля поставете знак на всяка линия по-долу, за да покажете вашия отговор на всеки въпрос, свързан с изминалата седмица.

(1) Как бихте описали общото ниво на умора/изтощение, което сте изпитвали?

Липсва | _____ | Много тежка

(2) Как бихте описали общото ниво на свързаната с анкилозиращия спондилит болка, която сте имали в шията, гърба или тазобедрената става?

Липсва | _____ | Много тежка

(3) Как бихте описали общото ниво на болка/оток на другите стави, изключвайки шията, гърба или тазобедрените стави, която сте имали?

Липсва | _____ | Много тежка

(4) Как бихте описали общото ниво на дискомфорт, който сте имали от всяко чувствително на допир или натиск място?

Липсва | _____ | Много тежка

(5) Как бихте описали общото ниво на сутрешна скованост, която сте имали от момента на събуждане?

Липсва | _____ | Много тежка

(6) Колко продължава вашата сутрешна скованост от момента на събуждането ви?

|_____|_____|_____|_____|_____|_____|_____|

0 часа ½ 1 1 ½ 2 или повече часа

BASDAI:.....

➤ **ФУНКЦИОНАЛЕН ИНДЕКС ПРИ АНКИЛОЗИРАЩ СПОНДИЛИТ (THE BATH ANKYLOSING SPONDYLITIS FUNCTIONAL INDEX - BASFI)**

BASFI

Моля поставете знак на всяка от линиите по-долу, за да покажете степента на справяне с всяка от следните дейности през изминалата седмица.

Помощното средство е част от екипировката, която ви помага да извършите дадено действие или движение.

Пример:

Лесно | _____ | Невъзможно

- 1) Да обуете чорапите или чорапогашите си без помощ или помощно средство (т. е. обувалка за чорапи)

Лесно | _____ | Невъзможно

- 2) Да се наведете от кръста напред, за да вземете от пода химикал без помощно средство

Лесно | _____ | Невъзможно

- 3) Да достигнете до висок рафт без помощ или помощно средство

Лесно | _____ | Невъзможно

- 4) Да станете от кухненски стол без странични облегалки, без да използвате ръцете си или друга помощ

Лесно | _____ | Невъзможно

- 5) Да станете от пода от легнало по гръб положение без помощ

Лесно | _____ | Невъзможно

- 6) Да стоите прав без подкрепа в продължение на 10 мин без да изпитате дискомфорт

Лесно | _____ | Невъзможно

- 7) Да изкачите 12-15 стъпала без да се подпирате на парапет или да използвате помощно средство при ходене. **С един крак на всяко стъпало**

Лесно | _____ | Невъзможно

- 8) Да погледнете през рамото си без да си обръщате тялото

Лесно | _____ | Невъзможно

- 9) Да извършвате дейности, изискващи физически усилия (т. е. лечебна физкултура, градинарство или спорт)

Лесно | _____ | Невъзможно

10) Да извършвате целодневна дейност където и да е, в дома или на работното място

Лесно | _____ | Невъзможно

BASFI:.....

Адаптирано по Calin et al. 1994 и Garrett et al. 1994

ХІІ. БЛАГОДАРНОСТИ

*Искрена признателност, уважение и благодарност изказвам към своя научен ръководител **доц. д-р Екатерина Иванова-Тодорова, дм** за високия професионализъм, търпение, безусловната морална и професионална подкрепа, ценните съвети, препоръки и свободата, от която имах нужда, по време на разработването и написването на дисертационния труд.*

*Дълбока благодарност отправям и към **проф. Доброслав Кюркчиев, дмн**, за това, че ми беше дадена възможността да разработя настоящия дисертационен труд в ЛКИ, за проявеното доверие към мен, за подкрепата, предадените знания и насоки през всичките години на докторантурата.*

*Благодаря и на всички останали **колеги от ЛКИ** за колегиалната подкрепа и оказаните съвети. Най-вече изказвам своята дълбока благодарност и уважение към **проф. Станимир Кюркчиев, дмн** и **Калина Белемезова, дм** от Тъканна банка “БулГен” за напътствията, предадения опит и знания в областта на клетъчното култивиране на мезенхимни стволови клетки.*

*Сърдечна благодарност изказвам на **проф. Мариана Иванова, дм** от Клиниката по ревматология към УМБАЛ “Св. Иван Рилски”- ЕАД за клиничния подбор на включените пациенти, помощта при статистическия анализ на получените данни и професионалната подкрепа.*

*Разработването на настоящия дисертационен труд не би било възможно без подкрепата на моето **семейство**, което ми оказва незаменима помощ, кураж, обич и непрестанна вяра в моите възможности и потенциал. Тяхната опора направи трудния и дълъг път на докторантурата изпълнен със смисъл и увенчан с успех.*

ХШ БИБЛИОГРАФИЯ

• *Използвани литературни източници на латиница:*

1. Abdelaziz MM, Gamal RM, Ismail NM, Lafy RA, Hetta HF. Diagnostic value of anti-CD74 antibodies in early and late axial spondyloarthritis and its relationship to disease activity. *Rheumatology (Oxford)*. 2021 Jan 5;60(1):263–8.
2. Abouelnaga H, El-Khateeb D, Moemen Y, El-Fert A, Elgazzar M, Khalil A. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Egyptian Liver Journal*. 2022 Jan 3;12(1):2.
3. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996 May;8(5):765–72.
4. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815–22.
5. Ahangar P, Mills SJ, Cowin AJ. Mesenchymal Stem Cell Secretome as an Emerging Cell-Free Alternative for Improving Wound Repair. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 24;21(19):E7038.
6. Ahn SS, Jung SM, Yoo J, Lee SW, Song JJ, Park YB. Anti-Smith antibody is associated with disease activity in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 2019 Nov;39(11):1937–44.
7. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *General Principles of Cell Communication*. *Molecular Biology of the Cell* 4th edition [Internet]. 2002 [cited 2022 Sep 13]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26813/>
8. Almalki SG, Agrawal DK. Key Transcription Factors in the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Differentiation*. 2016;92(1–2):41–51.
9. Alvites R, Branquinho M, Sousa AC, Lopes B, Sousa P, Maurício AC. Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Paracrine Activity-Immunomodulation Mechanisms and How to Influence the Therapeutic Potential. *Pharmaceutics*. 2022 Feb 9;14(2):381.
10. Aly RM. Current state of stem cell-based therapies: an overview. *Stem Cell Investig*. 2020 May 15;7:8.
11. Ameer MA, Chaudhry H, Mushtaq J, Khan OS, Babar M, Hashim T, et al. An Overview of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Pathogenesis, Classification, and Management. *Cureus [Internet]*. 2022 Oct 15 [cited 2023 Jul 6];14(10). Available from: <https://www.cureus.com/articles/114743-an-overview-of-systemic-lupus-erythematosus-sle-pathogenesis-classification-and-management>
12. Andersen T, Rasmussen TK, Hvid M, Holm CK, Madsen KJNB, Jurik AG, et al. Increased plasma levels of IL-21 and IL-23 in spondyloarthritis are not associated with clinical and MRI findings. *Rheumatol Int*. 2012 Feb;32(2):387–93.
13. Andjelic S, Hsia C, Suzuki H, Kadowaki T, Koyasu S, Liou HC. Phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappa B/Rel are at the divergence of CD40-mediated proliferation and survival pathways. *J Immunol*. 2000 Oct 1;165(7):3860–7.
14. Andrade LEC, Damoiseaux J, Vergani D, Fritzler MJ. Antinuclear antibodies (ANA) as a criterion for classification and diagnosis of systemic autoimmune diseases. *J Transl Autoimmun*. 2022 Jan 19;5:100145.
15. Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *STEM CELLS*. 2019;37(7):855–64.

16. Aringer M, Costenbader K, Johnson SR. Assessing the EULAR/ACR classification criteria for patients with systemic lupus erythematosus. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2022 Feb 1;18(2):135–44.
17. Aringer M, Costenbader KH, Daikh DI, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 EULAR/ACR Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol*. 2019 Sep;71(9):1400–12.
18. Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu CP, Kuroda Y, Kandeel F, et al. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Experimental Hematology*. 2009 May;37(5):604–15.
19. Asif S, Khan A, Zahoor S, Lashari N, Haroon M, Khanum A. Correlation Between Quantitative Anti-dsDNA Levels with Severity of Proteinuria in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Reumatol Clin (Engl Ed)*. 2022 Oct;18(8):464–8.
20. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. 2005 May;35(5):1482–90.
21. Aydemir FD, Can G, Uslu S, Kenar G, Birlik M, Önen F. Evaluation of Acute Phase Reactants in Patients with Ankylosing Spondylitis. *J Contemp Med*. 2022 Nov 30;12(6):846–50.
22. Ayed K, Gorgi Y, Ayed-Jendoubi S, Bardi R. The involvement of HLA - DRB1*, DQA1*, DQB1* and complement C4A Loci in diagnosing systemic lupus erythematosus among Tunisians. *Ann Saudi Med*. 2004;24(1):31–5.
23. Azevedo RI, Minskaia E, Fernandes-Platzgummer A, Vieira AIS, da Silva CL, Cabral JMS, et al. Mesenchymal stromal cells induce regulatory T cells via epigenetic conversion of human conventional CD4 T cells in vitro. *Stem Cells*. 2020 Aug;38(8):1007–19.
24. Bach JF. The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals. *Nat Rev Immunol*. 2018 Feb;18(2):105–20.
25. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 Mar 4;100(5):2610–5.
26. Baerlecken NT, Nothdorft S, Stummvoll GH, Sieper J, Rudwaleit M, Reuter S, et al. Autoantibodies against CD74 in spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014 Jun;73(6):1211–4.
27. Bancos S, Bernard MP, Topham DJ, Phipps RP. Ibuprofen and other widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit antibody production in human cells. *Cell Immunol*. 2009;258(1):18–28.
28. Baranovskii DS, Klabukov ID, Arguchinskaya NV, Yakimova AO, Kisel AA, Yatsenko EM, et al. Adverse events, side effects and complications in mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Investigation [Internet]*. 2022 Nov 8 [cited 2023 Aug 4];9(0). Available from: <https://sci.amegroups.org/article/view/104230>
29. Barbado J, Tabera S, Sánchez A, García-Sancho J. Therapeutic potential of allogeneic mesenchymal stromal cells transplantation for lupus nephritis. *Lupus*. 2018 Nov;27(13):2161–5.
30. Basta F, Fasola F, Triantafyllias K, Schwarting A. Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Therapy: The Old and the New. *Rheumatol Ther*. 2020 Jun 2;7(3):433–46.
31. Bazzoni R, Takam Kamga P, Tanasi I, Krampera M. Extracellular Vesicle-Dependent Communication Between Mesenchymal Stromal Cells and Immune Effector Cells. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Nov 6;8:596079.
32. Benson MJ, Dillon SR, Castigli E, Geha RS, Xu S, Lam KP, et al. Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J Immunol*. 2008 Mar 1;180(6):3655–9.

33. Berebichez-Fridman R, Montero-Olvera PR. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2018 Aug;18(3):e264–77.
34. Bernard MP, Phipps RP. Inhibition of cyclooxygenase-2 impairs the expression of essential plasma cell transcription factors and human B-lymphocyte differentiation. *Immunology*. 2010 Jan;129(1):87–96.
35. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell*. 2013 Oct 3;13(4):392–402.
36. Bernatsky S, Boivin JF, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladman DD, et al. Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006 Aug;54(8):2550–7.
37. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(174):249–82.
38. Bhattacharya M. Understanding B Lymphocyte Development: A Long Way to Go. In: *Lymphocytes* [Internet]. IntechOpen; 2018 [cited 2023 Jul 4]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/62616>
39. Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells*. 2009 Sep;27(9):2331–41.
40. Bijl M, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CG. Expression of costimulatory molecules on peripheral blood lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2001 May;60(5):523–6.
41. Bizzaro N, Villalta D. The predictive value of ANA and anti-dsDNA antibodies for flares in SLE. *Rheumatology (Oxford)*. 2001 Dec;40(12):1422–3.
42. Blair HA. Secukinumab: A Review in Ankylosing Spondylitis. *Drugs*. 2019 Mar 1;79(4):433–43.
43. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*. 2010 Jan 29;32(1):129–40.
44. Bocelli-Tyndall C, Bracci L, Spagnoli G, Braccini A, Bouchenaki M, Ceredig R, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and auto-immune disease patients reduce the proliferation of autologous- and allogeneic-stimulated lymphocytes in vitro. *Rheumatology (Oxford)*. 2007 Mar;46(3):403–8.
45. Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. *Cell Biol Int*. 2008 Apr;32(4):384–93.
46. Bolduc A, Long E, Stapler D, Cascalho M, Tsubata T, Koni PA, et al. Constitutive CD40L Expression on B Cells Prematurely Terminates Germinal Center Response and Leads to Augmented Plasma Cell Production in T Cell Areas. *The Journal of Immunology*. 2010 Jul 1;185(1):220–30.
47. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum*. 1992 Jun;35(6):630–40.
48. Boussiotis VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med*. 2016 Nov 3;375(18):1767–78.
49. Bowness P. Hla-B27. *Annual Review of Immunology*. 2015;33(1):29–48.
50. Bowness P, Ridley A, Shaw J, Chan AT, Wong-Baeza I, Fleming M, et al. Th17 cells expressing KIR3DL2+ and responsive to HLA-B27 homodimers are increased in ankylosing spondylitis. *J Immunol*. 2011 Feb 15;186(4):2672–80.

51. Braid LR, Wood CA, Wiese DM, Ford BN. Intramuscular administration potentiates extended dwell time of mesenchymal stromal cells compared to other routes. *Cytotherapy*. 2018 Feb;20(2):232–44.
52. Braun D, Caramalho I, Demengeot J. IFN- α /beta enhances BCR-dependent B cell responses. *Int Immunol*. 2002 Apr;14(4):411–9.
53. Braun J, van den Berg R, Baraliakos X, Boehm H, Burgos-Vargas R, Collantes-Estevez E, et al. 2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jun;70(6):896–904.
54. Braun J, Bollow M, Remlinger G, Eggens U, Rudwaleit M, Distler A, et al. Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum*. 1998 Jan;41(1):58–67.
55. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet*. 1973 Apr 28;1(7809):904–7.
56. Briolay A, Lencel P, Bessueille L, Caverzasio J, Buchet R, Magne D. Autocrine stimulation of osteoblast activity by Wnt5a in response to TNF- α in human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jan 18;430(3):1072–7.
57. Brown DM, Warner GL, Alés-Martínez JE, Scott DW, Phipps RP. Prostaglandin E2 induces apoptosis in immature normal and malignant B lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992 Jun;63(3):221–9.
58. Brown MA. Progress in the genetics of ankylosing spondylitis. *Briefings in Functional Genomics*. 2011 Sep 1;10(5):249–57.
59. Brown MA, Kennedy LG, Darke C, Gibson K, Pile KD, Shatford JL, et al. The effect of HLA-DR genes on susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 1998 Mar;41(3):460–5.
60. Brusa D, Serra S, Coscia M, Rossi D, D’Arena G, Laurenti L, et al. The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2013 Jun 1;98(6):953–63.
61. Brzostek J, Gascoigne NRJ, Rybakin V. Cell Type-Specific Regulation of Immunological Synapse Dynamics by B7 Ligand Recognition. *Front Immunol*. 2016;7:24.
62. Budoni M, Fierabracci A, Luciano R, Petrini S, Di Ciommo V, Muraca M. The immunosuppressive effect of mesenchymal stromal cells on B lymphocytes is mediated by membrane vesicles. *Cell Transplant*. 2013;22(2):369–79.
63. Bynoe MS, Grimaldi CM, Diamond B. Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naïve B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 14;97(6):2703–8.
64. Cainelli F, Vento S. Malaria and Systemic Lupus Erythematosus: Complex Interactions and Reciprocal Influences. In: *Infection and Autoimmunity* [Internet]. Elsevier; 2015 [cited 2023 Jul 6]. p. 657–68. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?scp=85072149042&partnerID=8YFLogxK>
65. Calin A, Garrett S, Whitelock H, Kennedy LG, O’Hea J, Mallorie P, et al. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *J Rheumatol*. 1994 Dec;21(12):2281–5.
66. Calin A, Porta J, Fries JF, Schurman DJ. Clinical History as a Screening Test for Ankylosing Spondylitis. *JAMA*. 1977 Jun 13;237(24):2613–4.
67. Canavan M, Floudas A, Veale DJ, Fearon U. The PD-1:PD-L1 axis in Inflammatory Arthritis. *BMC Rheumatology*. 2021 Jan 11;5(1):1.
68. Cantaert T, Doorenspleet ME, FrancoSalinas G, Paramarta JE, Klarenbeek PL, Tiersma Y, et al. Increased numbers of CD5+ B lymphocytes with a regulatory phenotype in spondylarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2012;64(6):1859–68.

69. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641–50.
70. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med*. 2017 Jun;6(6):1445–51.
71. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006 Aug 1;98(5):1076–84.
72. Carreras-Planella L, Monguió-Tortajada M, Borràs FE, Franquesa M. Immunomodulatory Effect of MSC on B Cells Is Independent of Secreted Extracellular Vesicles. *Front Immunol*. 2019;10:1288.
73. Carroll MJ, Stopfer LE, Kreeger PK. A simplified culture system to examine soluble factor interactions between mammalian cells. *Chem Commun (Camb)*. 2014 May 25;50(40):5279–81.
74. Caseiro AR, Pedrosa SS, Ivanova G, Branquinho MV, Almeida A, Faria F, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cells metabolomic and bioactive factors profiles: A comparative analysis on the umbilical cord and dental pulp derived Stem/Stromal Cells secretome. *PLOS ONE*. 2019 Nov 27;14(11):e0221378.
75. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007 Nov;25(11):2739–49.
76. Chan AT, Kollnberger SD, Wedderburn LR, Bowness P. Expansion and enhanced survival of natural killer cells expressing the killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in spondylarthritis. *Arthritis Rheum*. 2005 Nov;52(11):3586–95.
77. Chandrashekhara S. The treatment strategies of autoimmune disease may need a different approach from conventional protocol: A review. *Indian J Pharmacol*. 2012;44(6):665–71.
78. Chavele KM, Ehrenstein MR. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Letters*. 2011 Dec 1;585(23):3603–10.
79. Che N, Li X, Zhang L, Liu R, Chen H, Gao X, et al. Impaired B cell inhibition by lupus bone marrow mesenchymal stem cells is caused by reduced CCL2 expression. *J Immunol*. 2014 Nov 15;193(10):5306–14.
80. Che N, Li X, Zhou S, Liu R, Shi D, Lu L, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells suppress B-cell proliferation and differentiation. *Cell Immunol*. 2012;274(1–2):46–53.
81. Chen F, Zhong X, Dai Q, Li K, Zhang W, Wang J, et al. Human Umbilical Cord MSC Delivered-Soluble TRAIL Inhibits the Proliferation and Promotes Apoptosis of B-ALL Cell In Vitro and In Vivo. *Pharmaceuticals*. 2022 Nov;15(11):1391.
82. Chen J, Shi ZD, Ji X, Morales J, Zhang J, Kaur N, et al. Enhanced Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells by Periodic Heat Shock in Self-Assembling Peptide Hydrogel. *Tissue Eng Part A*. 2013 Mar;19(5–6):716–28.
83. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013 Apr;13(4):227–42.
84. Chen L, Xiang B, Wang X, Xiang C. Exosomes derived from human menstrual blood-derived stem cells alleviate fulminant hepatic failure. *Stem Cell Res Ther*. 2017a Jan 23;8(1):9.
85. Chen M, Zhang L, Ren Y, Zhang K, Yang Y, Fang Y, et al. Defective Function of CD24+CD38+ Regulatory B Cells in Ankylosing Spondylitis. *DNA and Cell Biology*. 2016 Feb;35(2):88–95.
86. Chen RY, Zhu Y, Shen YY, Xu QY, Tang HY, Cui NX, et al. The role of PD-1 signaling in health and immune-related diseases. *Frontiers in Immunology [Internet]*. 2023 [cited 2023 Aug 17];14. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1163633>

87. Chen SH, Lv QL, Hu L, Peng MJ, Wang GH, Sun B. DNA methylation alterations in the pathogenesis of lupus. *Clin Exp Immunol*. 2017b Feb;187(2):185–92.
88. Chen X, Cai C, Xu D, Liu Q, Zheng S, Liu L, et al. Human Mesenchymal Stem Cell-Treated Regulatory CD23+CD43+ B Cells Alleviate Intestinal Inflammation. *Theranostics*. 2019;9(16):4633–47.
89. Chen X, Laur O, Kambayashi T, Li S, Bray RA, Weber DA, et al. Regulated Expression of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-DO During Antigen-dependent and Antigen-independent Phases of B Cell Development. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002 Apr 15;195(8):1053–62.
90. Chen Z, Wang H, Xia Y, Yan F, Lu Y. Therapeutic Potential of Mesenchymal Cell-Derived miRNA-150-5p-Expressing Exosomes in Rheumatoid Arthritis Mediated by the Modulation of MMP14 and VEGF. *The Journal of Immunology*. 2018 Oct 15;201(8):2472–82.
91. Cheng Q, Khodadadi L, Taddeo A, Klotsche J, F Hoyer B, Radbruch A, et al. CXCR4-CXCL12 interaction is important for plasma cell homing and survival in NZB/W mice. *Eur J Immunol*. 2018 Jun;48(6):1020–9.
92. Cheng T, Wu J, Xu Y, Liu C, Zhang H, Wang M. CD40/TRAF1 decreases synovial cell apoptosis in patients with rheumatoid arthritis through JNK/NF- κ B pathway. *J Bone Miner Metab*. 2022 Sep 1;40(5):819–28.
93. Cho KA, Lee JK, Kim YH, Park M, Woo SY, Ryu KH. Mesenchymal stem cells ameliorate B-cell-mediated immune responses and increase IL-10-expressing regulatory B cells in an EB13-dependent manner. *Cell Mol Immunol*. 2017 Jan 2;14(11):895–908.
94. Choi EW, Shin IS, Park SY, Park JH, Kim JS, Yoon EJ, et al. Reversal of serologic, immunologic, and histologic dysfunction in mice with systemic lupus erythematosus by long-term serial adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation. *Arthritis Rheum*. 2012 Jan;64(1):243–53.
95. Chulpanova D, Soloveva V, Tazetdinova LG, Gomzikova MO, Khaiboullina S, Rizvanov A. Analysis of the Effect of Mesenchymal Stem Cells Culture with Interleukin 2 Overexpression on Human Mononuclear Cells Activation in Vitro. *Blood*. 2018 Nov 29;132:3712.
96. Cildag S, Kara Y, Cakir E, Cildag MB, Senturk T. Comparison of Clinical and Laboratory Findings in Patients with Systemic Lupus Erythematosus with Regard to Age at Onset. *Eurasian J Med*. 2019 Feb;51(1):17–21.
97. Cipriani P, Carubbi F, Liakouli V, Marrelli A, Perricone C, Perricone R, et al. Stem cells in autoimmune diseases: Implications for pathogenesis and future trends in therapy. *Autoimmunity Reviews*. 2013 May 1;12(7):709–16.
98. COJOCARU M, COJOCARU IM, SILOSI I, VRABIE CD. Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Maedica (Bucur)*. 2011 Oct;6(4):330–6.
99. Colbert RA, DeLay ML, Layh-Schmitt G, Sowders DP. HLA-B27 misfolding and spondyloarthropathies. *Prion*. 2009;3(1):15–26.
100. Comerford I, Kara EE, McKenzie DR, McColl SR. Advances in understanding the pathogenesis of autoimmune disorders: focus on chemokines and lymphocyte trafficking. *British Journal of Haematology*. 2014;164(3):329–41.
101. Conforti A, Scarsella M, Starc N, Giorda E, Biagini S, Proia A, et al. Microvesicles Derived from Mesenchymal Stromal Cells Are Not as Effective as Their Cellular Counterpart in the Ability to Modulate Immune Responses In Vitro. *Stem Cells Dev*. 2014 Nov 1;23(21):2591–9.
102. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol*. 2008 Dec;6(12):e301.

103. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):367–72.
104. Costa LA, Eiro N, Fraile M, Gonzalez LO, Saá J, Garcia-Portabella P, et al. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78(2):447–67.
105. Crompot E, Van Damme M, Pieters K, Vermeersch M, Perez-Morga D, Mineur P, et al. Extracellular vesicles of bone marrow stromal cells rescue chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis, enhance their migration and induce gene expression modifications. *Haematologica*. 2017 Sep;102(9):1594–604.
106. Curry R, Thoen J, Shelborne C, Gaudernack G, Messner R. Antibodies to and elevations of beta 2 microglobulin in the serum of ankylosing spondylitis patients. *Arthritis Rheum*. 1982 Apr;25(4):375–80.
107. Cyster JG, Allen CDC. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell*. 2019 Apr;177(3):524–40.
108. Dallman C, Johnson PWM, Packham G. Differential regulation of cell survival by CD40. *Apoptosis*. 2003 Jan 1;8(1):45–53.
109. Dallos T, Krivosíková M, Chorazy-Massalska M, Warnawin E, Zánová E, Rudnicka W, et al. BAFF from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells of rheumatoid arthritis patients improves their B-cell viability-supporting properties. *Folia Biol (Praha)*. 2009;55(5):166–76.
110. Damayanti RH, Rusdiana T, Wathoni N. Mesenchymal Stem Cell Secretome for Dermatology Application: A Review. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2021 Oct 5;14:1401–12.
111. Day RB, Bhattacharya D, Nagasawa T, Link DC. Granulocyte colony-stimulating factor reprograms bone marrow stromal cells to actively suppress B lymphopoiesis in mice. *Blood*. 2015 May 14;125(20):3114–7.
112. Daza L, Kornhauser C, Zamora L, Flores J. Captopril effect on prostaglandin E2, thromboxane B2 and proteinuria in lupus nephritis patients. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2005 Dec 1;78(1):194–201.
113. Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD, Macfarlane GJ. Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Apr;53(4):650–7.
114. Dema B, Pellefigues C, Hasni S, Gault N, Jiang C, Ricks TK, et al. Autoreactive IgE Is Prevalent in Systemic Lupus Erythematosus and Is Associated with Increased Disease Activity and Nephritis. *PLoS One*. 2014 Feb 28;9(2):e90424.
115. Desai MK, Brinton RD. Autoimmune Disease in Women: Endocrine Transition and Risk Across the Lifespan. *Frontiers in Endocrinology [Internet]*. 2019 [cited 2022 Sep 12];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00265>
116. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
117. Dorgham K, Amoura Z, Parizot C, Arnaud L, Frances C, Pionneau C, et al. Ultraviolet light converts propranolol, a nonselective β -blocker and potential lupus-inducing drug, into a proinflammatory AhR ligand. *Eur J Immunol*. 2015 Nov;45(11):3174–87.
118. Dorraji SE, Kanapathipillai P, Hovd AMK, Stenersrød MR, Horvei KD, Ursvik A, et al. Kidney Tertiary Lymphoid Structures in Lupus Nephritis Develop into Large Interconnected Networks and Resemble Lymph Nodes in Gene Signature. *Am J Pathol*. 2020 Nov;190(11):2203–25.
119. Du W, Pang L, Ba Y, Lv T, Zheng Z, Li X, et al. The expression and significance of CD28, Ctl4, CD80 and CD86 in ankylosing spondylitis were also stimulated. *Biomedical Research [Internet]*. 2018 [cited 2022 Nov 6];29(3). Available from: <https://www.alliedacademies.org/abstract/the-expression-and-significance-of-cd28-ctl4-cd80-and-cd86-in-ankylosing-spondylitis-were-also-stimulated-9645.html>

120. Duan JH, Jiang Y, Mu H, Tang ZQ. Expression of BAFF and BR3 in patients with systemic lupus erythematosus. *Braz J Med Biol Res.* 2016 Mar;49(3):e4853, S0100-879X2016000300706.
121. Ebrahimiadib N, Berijani S, Ghahari M, Pahlaviani FG. Ankylosing Spondylitis. *J Ophthalmic Vis Res.* 2021 Jul 29;16(3):462–9.
122. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev.* 2009 May;229(1):10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x.
123. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495–516.
124. El-Zayadi AA, Jones EA, Churchman SM, Baboolal TG, Cuthbert RJ, El-Jawhari JJ, et al. Interleukin-22 drives the proliferation, migration and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: a novel cytokine that could contribute to new bone formation in spondyloarthropathies. *Rheumatology.* 2017 Mar 1;56(3):488–93.
125. Fan L, Hu C, Chen J, Cen P, Wang J, Li L. Interaction between Mesenchymal Stem Cells and B-Cells. *Int J Mol Sci.* 2016 May 5;17(5):650.
126. Fedyk ER, Brown DM, Phipps RP. PGE2 Regulation of B Lymphocytes and T Helper 1 and T Helper 2 Cells: Induction of Inflammatory versus Allergic Responses. In: Honn KV, Marnett LJ, Nigam S, Jones RL, Wong PYK, editors. *Eicosanoids and other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Radiation Injury 3* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 1997 [cited 2023 Jan 17]. p. 237–42. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1813-0_35
127. Feng X, Che N, Liu Y, Chen H, Wang D, Li X, et al. Restored immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells on B cells after olfactory 1/early B cell factor-associated zinc-finger protein down-regulation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2014 Dec;66(12):3413–23.
128. Feng X, Xu X, Wang Y, Zheng Z, Lin G. Ectopic Germinal Centers and IgG4-Producing Plasmacytes Observed in Synovia of HLA-B27+ Ankylosing Spondylitis Patients with Advanced Hip Involvement. *Int J Rheumatol.* 2015;2015:316421.
129. Fernández-Espartero C, de Miguel E, Loza E, Tomero E, Gobbo M, Descalzo MA, et al. Validity of the ankylosing spondylitis disease activity score (ASDAS) in patients with early spondyloarthritis from the Esperanza programme. *Ann Rheum Dis.* 2014 Jul;73(7):1350–5.
130. Ferraro F, Celso CL, Scadden D. ADULT STEM CELLS AND THEIR NICHEs. *Adv Exp Med Biol.* 2010;695:155–68.
131. Ferrer G, Bosch R, Hodgson K, Tejero R, Roué G, Colomer D, et al. B cell activation through CD40 and IL4R ligation modulates the response of chronic lymphocytic leukaemia cells to BAFF and APRIL. *Br J Haematol.* 2014 Feb;164(4):570–8.
132. Fistonich C, Zehentmeier S, Bednarski JJ, Miao R, Schjerven H, Sleckman BP, et al. Cell circuits between B cell progenitors and IL-7+ mesenchymal progenitor cells control B cell development. *J Exp Med.* 2018 Oct 1;215(10):2586–99.
133. Folzenlogen D, Hofer MF, Leung DY, Freed JH, Newell MK. Analysis of CD80 and CD86 expression on peripheral blood B lymphocytes reveals increased expression of CD86 in lupus patients. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997 Jun;83(3):199–204.
134. Fong D, Duceppe N, Hoemann CD. Mesenchymal stem cell detachment with trace trypsin is superior to EDTA for in vitro chemotaxis and adhesion assays. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Mar 11;484(3):656–61.
135. Franquesa M, Hoogduijn M, Bestard O, Grinyó J. Immunomodulatory Effect of Mesenchymal Stem Cells on B Cells. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2012 [cited 2023 Jul 5];3. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00212>

136. Franquesa M, Mensah FK, Huizinga R, Strini T, Boon L, Lombardo E, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem Cells*. 2015a Mar;33(3):880–91.
137. Franquesa M, Mensah FK, Huizinga R, Strini T, Boon L, Lombardo E, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem Cells*. 2015b Mar;33(3):880–91.
138. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976 Sep;4(5):267–74.
139. Fujimoto S, Arinobu Y, Miyawaki K, Ayano M, Mitoma H, Kimoto Y, et al. Anti-dsDNA IgE induces IL-4 production from basophils, potentially involved in B-cell differentiation in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2023 Feb 22;kead082.
140. Fulgeri C, Carpio JD, Ardiles L. Kidney injury in systemic lupus erythematosus: Lack of correlation between clinical and histological data. *Nefrología (English Edition)*. 2018 Jul 1;38(4):380–7.
141. Galdiero M, Pisciotta MG, Gorga F, Petrillo G, Marinelli A, Galdiero E. Modulation of Costimulatory Molecules CD80/CD86 on B Cells and Macrophages by Stress Proteins GroEL, GroES and DnaK. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2005 Oct 1;18(4):637–44.
142. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol*. 1994 Dec;21(12):2286–91.
143. Gazdic M, Arsenijevic A, Markovic BS, Volarevic A, Dimova I, Djonov V, et al. Mesenchymal Stem Cell-Dependent Modulation of Liver Diseases. *Int J Biol Sci*. 2017 Sep 5;13(9):1109–17.
144. Gazdic M, Markovic BS, Arsenijevic A, Jovicic N, Acovic A, Harrell CR, et al. Crosstalk between mesenchymal stem cells and T regulatory cells is crucially important for the attenuation of acute liver injury. *Liver Transpl*. 2018a May;24(5):687–702.
145. Gazdic M, Simovic Markovic B, Vucicevic L, Nikolic T, Djonov V, Arsenijevic N, et al. Mesenchymal stem cells protect from acute liver injury by attenuating hepatotoxicity of liver natural killer T cells in an inducible nitric oxide synthase- and indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent manner. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018b Feb;12(2):e1173–85.
146. Ge Y, Huang M, Yao Y ming. Efferocytosis and Its Role in Inflammatory Disorders. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Feb 25;10:839248.
147. Geng L, Li X, Feng X, Zhang J, Wang D, Chen J, et al. Association of TNF- α with impaired migration capacity of mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Res*. 2014;2014:169082.
148. Giacomini C, Granéli C, Hicks R, Dazzi F. The critical role of apoptosis in mesenchymal stromal cell therapeutics and implications in homeostasis and normal tissue repair. *Cell Mol Immunol*. 2023 Jun;20(6):570–82.
149. Giles J, Shaw J, Piper C, Wong-Baeza I, McHugh K, Ridley A, et al. HLA-B27 homodimers and free H chains are stronger ligands for leukocyte Ig-like receptor B2 than classical HLA class I. *J Immunol*. 2012 Jun 15;188(12):6184–93.
150. Giordano D, Kuley R, Draves KE, Elkon KB, Giltiay NV, Clark EA. B cell-activating factor (BAFF) from dendritic cells, monocytes and neutrophils is required for B cell maturation and autoantibody production in SLE-like autoimmune disease. *Frontiers in Immunology [Internet]*. 2023 [cited 2023 Jul 11];14. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1050528>

151. Giovannone N, Liang J, Antonopoulos A, Geddes Sweeney J, King SL, Pochebit SM, et al. Galectin-9 suppresses B cell receptor signaling and is regulated by I-branching of N-glycans. *Nat Commun.* 2018 Aug 17;9(1):3287.
152. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol.* 2002 Feb;29(2):288–91.
153. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EWF, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* 2005 Apr 1;105(7):2821–7.
154. González LA, Toloza SMA, McGwin G, Alarcón GS. Ethnicity in systemic lupus erythematosus (SLE): its influence on susceptibility and outcomes. *Lupus.* 2013 Oct;22(12):1214–24.
155. González-González A, García-Sánchez D, Dotta M, Rodríguez-Rey JC, Pérez-Campo FM. Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World J Stem Cells.* 2020 Dec 26;12(12):1529–52.
156. Gorman JD, Sack KE, Davis JC. Treatment of Ankylosing Spondylitis by Inhibition of Tumor Necrosis Factor α . *New England Journal of Medicine.* 2002 May 2;346(18):1349–56.
157. Gowhari Shabgah A, Shariati-Sarabi Z, Tavakkol-Afshari J, Ghasemi A, Ghoryani M, Mohammadi M. A significant decrease of BAFF, APRIL, and BAFF receptors following mesenchymal stem cell transplantation in patients with refractory rheumatoid arthritis. *Gene.* 2020 Mar 30;732:144336.
158. Greisen SR, Kragstrup TW, Thomsen JS, Hørslev-Pedersen K, Hetland ML, Stengaard-Pedersen K, et al. The Programmed Death-1 Pathway Counter-Regulates Inflammation-Induced Osteoclast Activity in Clinical and Experimental Settings. *Front Immunol.* 2022;13:773946.
159. Grossner T, Haberkorn U, Hofmann J, Gotterbarm T. Effects of Different Basal Cell Culture Media upon the Osteogenic Response of hMSCs Evaluated by ^{99m}Tc -HDP Labeling. *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 3;23(11):6288.
160. Gu F, Molano I, Ruiz P, Sun L, Gilkeson GS. Differential effect of allogeneic versus syngeneic mesenchymal stem cell transplantation in MRL/lpr and (NZB/NZW)F1 mice. *Clin Immunol.* 2012 Nov;145(2):142–52.
161. Guiotto M, Raffoul W, Hart AM, Riehle MO, di Summa PG. Human platelet lysate to substitute fetal bovine serum in hMSC expansion for translational applications: a systematic review. *Journal of Translational Medicine.* 2020 Sep 15;18(1):351.
162. Guo W, Castaigne JG, Mooney N, Charron D, Al-Daccak R. Signaling through HLA-DR induces PKC β -dependent B cell death outside rafts. *European Journal of Immunology.* 2003;33(4):928–38.
163. Hahn BH, King JK. Chapter 80 - Treatment of Autoimmune Disease: Established Therapies. In: Rose NR, Mackay IR, editors. *The Autoimmune Diseases (Fifth Edition)* [Internet]. Boston: Academic Press; 2014 [cited 2022 Sep 12]. p. 1209–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849298000800>
164. Hai B, Shigemoto-Kuroda T, Zhao Q, Lee RH, Liu F. Inhibitory Effects of iPSC-MSCs and Their Extracellular Vesicles on the Onset of Sialadenitis in a Mouse Model of Sjögren's Syndrome. *Stem Cells Int.* 2018;2018:2092315.
165. Hajkova M, Hermankova B, Javorkova E, Bohacova P, Zajicova A, Holan V, et al. Mesenchymal Stem Cells Attenuate the Adverse Effects of Immunosuppressive Drugs on Distinct T Cell Subpopulations. *Stem Cell Rev Rep.* 2017 Feb;13(1):104–15.
166. Halliday N, Williams C, Kennedy A, Waters E, Pesenacker AM, Soskic B, et al. CD86 Is a Selective CD28 Ligand Supporting FoxP3+ Regulatory T Cell Homeostasis in the Presence of High Levels of CTLA-4. *Front Immunol.* 2020;11:600000.

167. Hanna H, Mir LM, Andre FM. In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018 Jul 27;9(1):203.
168. Hanron JB, Hemmingway B. The great imitator: understanding lupus erythematosus. *J Pract Nurs*. 1981 Jun;31(6):13–6, 28.
169. Harley JB, Kelly JA, Kaufman KM. Unraveling the genetics of systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immun*. 2006 Oct 4;28(2):119–30.
170. Harrell CR, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A New Remedy for the Treatment of Autoimmune and Inflammatory Diseases. In: Haider KH, editor. *Stem Cells: Latest Advances* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [cited 2022 Oct 5]. p. 59–69. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-77052-5_4
171. Harrison M. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein. *Aust Prescr*. 2015 Jun;38(3):93–4.
172. He J, Ma C, Tang D, Zhong S, Yuan X, Zheng F, et al. Absolute quantification and characterization of oxylipins in lupus nephritis and systemic lupus erythematosus. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2022 [cited 2023 Aug 16];13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.964901>
173. He Y, Sawalha AH. Drug-induced lupus erythematosus: an update on drugs and mechanisms. *Curr Opin Rheumatol*. 2018 Sep;30(5):490–7.
174. Healy ME, Bergin R, Mahon BP, English K. Mesenchymal stromal cells protect against caspase 3-mediated apoptosis of CD19(+) peripheral B cells through contact-dependent upregulation of VEGF. *Stem Cells Dev*. 2015 Oct 15;24(20):2391–402.
175. Heidt S, Roelen DL, Eijssink C, van Kooten C, Claas FJH, Mulder A. Effects of immunosuppressive drugs on purified human B cells: evidence supporting the use of MMF and rapamycin. *Transplantation*. 2008 Nov 15;86(9):1292–300.
176. Heirani-Tabasi A, Toosi S, Mirahmadi M, Mishan MA, Bidkhorri HR, Bahrami AR, et al. Chemokine Receptors Expression in MSCs: Comparative Analysis in Different Sources and Passages. *Tissue Eng Regen Med*. 2017 Sep 19;14(5):605–15.
177. Hermann E, Yu DT, Meyer zum Büschenfelde KH, Fleischer B. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet*. 1993 Sep 11;342(8872):646–50.
178. Hevia A, Milani C, López P, Cuervo A, Arboleya S, Duranti S, et al. Intestinal dysbiosis associated with systemic lupus erythematosus. *mBio*. 2014 Sep 30;5(5):e01548-01514.
179. Hocking AM. The Role of Chemokines in Mesenchymal Stem Cell Homing to Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015 Nov 1;4(11):623–30.
180. Hua Z, Hou B. TLR signaling in B-cell development and activation. *Cell Mol Immunol*. 2013 Mar;10(2):103–6.
181. International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS), Cortes A, Hadler J, Pointon JP, Robinson PC, Karaderi T, et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet*. 2013 Jul;45(7):730–8.
182. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Dimitrov R, Belemezova K, Mourdjeva M, Kyurkchiev S, et al. Conditioned medium from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induces CD4⁺FOXP3⁺ cells and increases IL-10 secretion. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:295167.
183. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*. 2009 Sep 22;126(1–2):37–42.

184. Javorkova E, Vackova J, Hajkova M, Hermankova B, Zajicova A, Holan V, et al. The effect of clinically relevant doses of immunosuppressive drugs on human mesenchymal stem cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018 Jan 1;97:402–11.
185. Jegu G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Plasma Cell Differentiation through Type I Interferon and Interleukin 6. *Immunity*. 2003 Aug 1;19(2):225–34.
186. Jenks SA, Palmer EM, Marin EY, Hartson L, Chida AS, Richardson C, et al. 9G4+ autoantibodies are an important source of apoptotic cell reactivity associated with high levels of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2013 Dec;65(12):3165–75.
187. Ji YR, Yang ZX, Han ZB, Meng L, Liang L, Feng XM, et al. Mesenchymal stem cells support proliferation and terminal differentiation of B cells. *Cell Physiol Biochem*. 2012;30(6):1526–37.
188. Jin QH, Kim HK, Na JY, Jin C, Seon JK. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cell-conditioned media inhibited macrophages activation in vitro. *Sci Rep*. 2022 Mar 19;12(1):4754.
189. Kalinski P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2. *J Immunol*. 2012 Jan 1;188(1):21–8.
190. Kapetanaki MG, Mora AL, Rojas M. Influence of age on wound healing and fibrosis. *The Journal of Pathology*. 2013;229(2):310–22.
191. Kawano M, Nagata S. Efferocytosis and autoimmune disease. *Int Immunol*. 2018 Aug 24;30(12):551–8.
192. van Kempen TS, Leijten EFA, Lindenbergh MFS, Nordkamp MO, Driessen C, Lebbink R, et al. Impaired proteolysis by SPPL2a causes CD74 fragment accumulation that can be recognized by anti-CD74 autoantibodies in human ankylosing spondylitis. *Eur J Immunol*. 2020 Aug;50(8):1209–19.
193. Kenna TJ, Robinson PC, Haroon N. Endoplasmic reticulum aminopeptidases in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Rheumatology*. 2015 Sep 1;54(9):1549–56.
194. Kennedy A, Waters E, Rowshanravan B, Hinze C, Williams C, Janman D, et al. Differences in CD80 and CD86 transendocytosis reveal CD86 as a key target for CTLA-4 immune regulation. *Nat Immunol*. 2022 Sep;23(9):1365–78.
195. Kestendjieva S, Popova Z, Cvetkova G, Bochev I, Kehayov I, Kyurkchiev S, et al. Different effects of conditioned medium samples from mesenchymal stem cells (CM-MSC) isolated from different sources. 2010 Jan 1;63:97–104.
196. Khan FA, editor. *Advances in Application of Stem Cells: From Bench to Clinics* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [cited 2023 Jul 2]. (Stem Cell Biology and Regenerative Medicine; vol. 69). Available from: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-78101-9>
197. Khan MA. Polymorphism of HLA-B27: 105 subtypes currently known. *Curr Rheumatol Rep*. 2013 Oct;15(10):362.
198. Khan MA, van der Linden S. Axial Spondyloarthritis: A Better Name for an Old Disease: A Step Toward Uniform Reporting. *ACR Open Rheumatol*. 2019 Jul 11;1(5):336–9.
199. Kim A, Chong BF. Photosensitivity in Cutaneous Lupus Erythematosus. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2013 Feb;29(1):4–11.
200. Kim JO, Lee JS, Choi JY, Lee KH, Kim YB, Yoo DH, et al. The relationship between peripheral arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine*. 2013 Jul;80(4):399–401.
201. Kin NW, Sanders VM. CD86 regulates IgG1 production via a CD19-dependent mechanism. *J Immunol*. 2007 Aug 1;179(3):1516–23.

202. Klein B, Kunz M. Current concepts of photosensitivity in cutaneous lupus erythematosus. *Frontiers in Medicine* [Internet]. 2022 [cited 2023 Jul 6];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.939594>
203. Kleiveland CR. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* [Internet]. Cham (CH): Springer; 2015 [cited 2023 Jul 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500157/>
204. Koike T, Harada K, Horiuchi S, Kitamura D. The quantity of CD40 signaling determines the differentiation of B cells into functionally distinct memory cell subsets. Batista FD, Taniguchi T, editors. *eLife*. 2019 Jun 21;8:e44245.
205. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells: Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy*. 2007 Feb 19;9(1):204.
206. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*. 2000 Jan;67(1):2–17.
207. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 14;96(19):10711–6.
208. Krause P, Bruckner M, Uermösi C, Singer E, Groettrup M, Legler DF. Prostaglandin E(2) enhances T-cell proliferation by inducing the costimulatory molecules OX40L, CD70, and 4-1BBL on dendritic cells. *Blood*. 2009 Mar 12;113(11):2451–60.
209. Krishnamurthy S, Mahadevan S. Systemic Lupus Erythematosus: Recent Concepts in Genomics, Pathogenetic Mechanisms, and Therapies. *ISRN Immunology*. 2011 Oct 24;2011:1–7.
210. Kuca-Warnawin E, Janicka I, Szczesny P, Olesińska M, Bonek K, Głuszko P, et al. Modulation of T-Cell Activation Markers Expression by the Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells of Patients with Rheumatic Diseases. *Cell Transplant*. 2020;29:963689720945682.
211. Kulesza A, Paczek L, Burdzinska A. The Role of COX-2 and PGE2 in the Regulation of Immunomodulation and Other Functions of Mesenchymal Stromal Cells. *Biomedicines*. 2023 Feb 3;11(2):445.
212. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belemezova K, et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*. 2014 Nov 26;6(5):552–70.
213. L PK, Kandoi S, Misra R, S V, K R, Verma RS. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019 Apr;46:1–9.
214. Lahiri A, Varin MM, Le Pottier L, Pochard P, Bendaoud B, Youinou P, et al. Specific forms of BAFF favor BAFF receptor-mediated epithelial cell survival. *J Autoimmun*. 2014 Jun;51:30–7.
215. Lal G, Nakayama Y, Sethi A, Singh AK, Burrell BE, Kulkarni N, et al. Interleukin-10 From Marginal Zone Precursor B-Cell Subset Is Required for Costimulatory Blockade-Induced Transplantation Tolerance. *Transplantation*. 2015 Sep;99(9):1817–28.
216. Larhammar D, Gustafsson K, Claesson L, Bill P, Wiman K, Schenning L, et al. Alpha chain of HLA-DR transplantation antigens is a member of the same protein superfamily as the immunoglobulins. *Cell*. 1982 Aug;30(1):153–61.
217. Lasaviciute G, Höbinger A, Ujvari D, Salamon D, Yusuf A, Sundin M, et al. Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell-Derived CXCL12, IL-6 and GDF-15 and Their Capacity to Support IgG-Secreting Cells in Culture Are Divergently Affected by Doxorubicin. *Hemato*. 2021 Mar;2(1):154–66.

218. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*. 1995 Oct;16(4):557–64.
219. Lee DS, Yi TG, Lee HJ, Kim SN, Park S, Jeon MS, et al. Mesenchymal stem cells infected with *Mycoplasma arginini* secrete complement C3 to regulate immunoglobulin production in B lymphocytes. *Cell Death Dis*. 2014 Apr;5(4):e1192.
220. Lee SH, Lee YA, Woo DH, Song R, Park EK, Ryu MH, et al. Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):R163.
221. Lee SH, Meng XW, Flatten KS, Loegering DA, Kaufmann SH. Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. *Cell Death Differ*. 2013 Jan;20(1):64–76.
222. Lee W, Wang LT, Yen ML, Hsu PJ, Lee YW, Liu KJ, et al. Resident vs nonresident multipotent mesenchymal stromal cell interactions with B lymphocytes result in disparate outcomes. *STEM CELLS Translational Medicine*. 2021;10(5):711–24.
223. Leontieva OV, Demidenko ZN, Blagosklonny MV. Contact inhibition and high cell density deactivate the mammalian target of rapamycin pathway, thus suppressing the senescence program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jun 17;111(24):8832–7.
224. Li C, Zhao H, Cheng L, Wang B. Allogeneic vs. autologous mesenchymal stem/stromal cells in their medication practice. *Cell & Bioscience*. 2021a Nov 2;11(1):187.
225. Li H, Zheng Y, Chen L, Lin S. High titers of antinuclear antibody and the presence of multiple autoantibodies are highly suggestive of systemic lupus erythematosus. *Sci Rep*. 2022a Feb 1;12(1):1687.
226. Li S, Li F, Mao N, Wang J, Xie X. Efficacy and safety of Janus kinase inhibitors in patients with ankylosing spondylitis: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Internal Medicine*. 2022b Aug 1;102:47–53.
227. Li W, Chen W, Sun L. An Update for Mesenchymal Stem Cell Therapy in Lupus Nephritis. *Kidney Dis (Basel)*. 2021b Mar;7(2):79–89.
228. Liao HT, Tsai CY, Lai CC, Hsieh SC, Sun YS, Li KJ, et al. The Potential Role of Genetics, Environmental Factors, and Gut Dysbiosis in the Aberrant Non-Coding RNA Expression to Mediate Inflammation and Osteoclastogenic/Osteogenic Differentiation in Ankylosing Spondylitis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [Internet]. 2022 [cited 2023 Jul 9];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.748063>
229. Lieberman LA, Tsokos GC. The IL-2 Defect in Systemic Lupus Erythematosus Disease Has an Expansive Effect on Host Immunity. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:740619.
230. Lim U, Song MA. Dietary and lifestyle factors of DNA methylation. *Methods Mol Biol*. 2012;863:359–76.
231. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum*. 1984 Apr;27(4):361–8.
232. Liu H, Liang Z, Wang F, Zhou C, Zheng X, Hu T, et al. Exosomes from mesenchymal stromal cells reduce murine colonic inflammation via a macrophage-dependent mechanism. *JCI Insight* [Internet]. 2020a May 13 [cited 2022 Oct 5];4(24). Available from: <https://insight.jci.org/articles/view/131273>
233. Liu J, Liu Q, Chen X. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells on Regulatory B Cells. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2020b [cited 2023 Aug 8];11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7456948/>

234. Liu Z, Zou Y, Davidson A. Plasma cells in systemic lupus erythematosus: The long and short of it all. *European Journal of Immunology*. 2011;41(3):588–91.
235. Lo B, Parham L. Ethical Issues in Stem Cell Research. *Endocr Rev*. 2009 May;30(3):204–13.
236. Locht H, Skogh T, Kihlström E. Anti-lactoferrin antibodies and other types of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol*. 1999 Sep;117(3):568–73.
237. Lodha M, Erhard F, Dölken L, Prusty BK. The Hidden Enemy Within: Non-canonical Peptides in Virus-Induced Autoimmunity. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2022 [cited 2022 Sep 12];13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.840911>
238. Long S, Ma L, Wang D, Shang X. High frequency of circulating follicular helper T cells is correlated with B cell subtypes in patients with ankylosing spondylitis. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018 May 1;15(5):4578–86.
239. Lu D, Ma T, Zhou X, Jiang Y, Han Y, Li H. B Lymphocytes Are the Target of Mesenchymal Stem Cells Immunoregulatory Effect in a Murine Graft-versus-Host Disease Model. *Cell Transplant*. 2019;28(9–10):1279–88.
240. Lu J, Ding Y, Yi X, Zheng J. CD19+ B cell subsets in the peripheral blood and skin lesions of psoriasis patients and their correlations with disease severity. *Braz J Med Biol Res*. 2016 Aug 15;49:e5374.
241. Lu Y, Zhu Q, Li Y, Wang Q, Jiang C, Li Z, et al. Aberrant expression of PD-1 on B cells and its association with the clinical parameters of systemic lupus erythematosus [Internet]. In Review; 2020 Feb. Available from: <https://www.researchsquare.com/article/rs-8571/v2>
242. Luk F, Carreras-Planella L, Korevaar SS, de Witte SFH, Borràs FE, Betjes MGH, et al. Inflammatory Conditions Dictate the Effect of Mesenchymal Stem or Stromal Cells on B Cell Function. *Front Immunol*. 2017;8:1042.
243. Lukas C, Landewé R, Sieper J, Dougados M, Davis J, Braun J, et al. Development of an ASAS-endorsed disease activity score (ASDAS) in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2009 Jan;68(1):18–24.
244. Luz-Crawford P, Djouad F, Toupet K, Bony C, Franquesa M, Hoogduijn MJ, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization and Inhibits B Cell Differentiation. *Stem Cells*. 2016 Feb;34(2):483–92.
245. Ma C, Xia Y, Yang Q, Zhao Y. The contribution of macrophages to systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology*. 2019 Oct 1;207:1–9.
246. Ma X, Che N, Gu Z, Huang J, Wang D, Liang J, et al. Allogenic mesenchymal stem cell transplantation ameliorates nephritis in lupus mice via inhibition of B-cell activation. *Cell Transplant*. 2013;22(12):2279–90.
247. Machado P, Landewé R, Lie E, Kvien TK, Braun J, Baker D, et al. Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS): defining cut-off values for disease activity states and improvement scores. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jan;70(1):47–53.
248. Mageed RA, Prud'homme GJ. Immunopathology and the gene therapy of lupus. *Gene Ther*. 2003 May 1;10(10):861–74.
249. Mallis P, Michalopoulos E, Chatzistamatiou T, Giokas CS. Interplay between mesenchymal stromal cells and immune system: clinical applications in immune-related diseases. *Explor Immunol*. 2021 Jun 30;1(2):112–39.
250. Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2007 Mar 15;178(6):3447–56.

251. Manzoor A, Mir, Javed N, Agrewala. Influence of CD80 and CD86 Co-Stimulation in the Modulation of the Activation of Antigen Presenting Cells. *CIR*. 2007 Aug 1;3(3):160–9.
252. Maosong Qi ELC. Effect on B Cell Function by Mesenchymal Stem Cells of Different Derivation. *J Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2015 [cited 2023 Jul 10];05(07). Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/effect-on-b-cell-function-by-mesenchymal-stem-cells-of-differentderivation-2157-7633-1000294.php?aid=57749>
253. Margo CE, Harman LE. Autoimmune disease: Conceptual history and contributions of ocular immunology. *Surv Ophthalmol*. 2016 Oct;61(5):680–8.
254. Marín-Rosales M, Cruz A, Salazar-Camarena DC, Santillán-López E, Espinoza-García N, Muñoz-Valle JF, et al. High BAFF expression associated with active disease in systemic lupus erythematosus and relationship with rs9514828C>T polymorphism in TNFSF13B gene. *Clin Exp Med*. 2019 May;19(2):183–90.
255. Markovič T, Jakopin Ž, Dolenc MS, Mlinarič-Raščan I. Structural features of subtype-selective EP receptor modulators. *Drug Discovery Today*. 2017 Jan 1;22(1):57–71.
256. Masyithah Darlan D, Munir D, Putra A, Alif I, Amalina ND, Jusuf NK, et al. Revealing the decrease of indoleamine 2,3-dioxygenase as a major constituent for B cells survival post-mesenchymal stem cells co-cultured with peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Med Glas (Zenica)*. 2022 Feb 1;19(1).
257. Maurer M, Altrichter S, Schmetzer O, Scheffel J, Church MK, Metz M. Immunoglobulin E-Mediated Autoimmunity. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2018 [cited 2023 Jul 6];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00689>
258. Mauro D, Thomas R, Guggino G, Lories R, Brown MA, Ciccia F. Ankylosing spondylitis: an autoimmune or autoinflammatory disease? *Nat Rev Rheumatol*. 2021 Jul;17(7):387–404.
259. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1246–53.
260. Mehra NK, Kanga U. Molecular diversity of the HLA-B27 gene and its association with disease. *Mod Rheumatol*. 2001 Dec;11(4):275–85.
261. Melchers F. Actions of BAFF in B cell maturation and its effects on the development of autoimmune disease. *Ann Rheum Dis*. 2003 Nov;62 Suppl 2(Suppl 2):ii25-27.
262. Menard LC, Habte S, Gonsiorek W, Lee D, Banas D, Holloway DA, et al. B cells from African American lupus patients exhibit an activated phenotype [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 2016 [cited 2023 Aug 26]. Available from: <https://insight.jci.org/articles/view/87310/pdf>
263. Merimi M, El-Majzoub R, Lagneaux L, Moussa Agha D, Bouhtit F, Meuleman N, et al. The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine: Current Knowledge and Future Understandings. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [Internet]. 2021 [cited 2022 Sep 12];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.661532>
264. Merlo LMF, DuHadaway JB, Montgomery JD, Peng WD, Murray PJ, Prendergast GC, et al. Differential Roles of IDO1 and IDO2 in T and B Cell Inflammatory Immune Responses. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2020 [cited 2023 Aug 10];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01861>
265. Meyer A, Guffroy A, Blaison G, Dieudonne Y, Amoura Z, Bonnotte B, et al. Systemic lupus erythematosus and neutropaenia: a hallmark of haematological manifestations. *Lupus Science & Medicine*. 2020 Jul 1;7(1):e000399.
266. Milosavljevic N, Gazdic M, Simovic Markovic B, Arsenijevic A, Nurkovic J, Dolicanin Z, et al. Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury by altering ratio between interleukin 17 producing and regulatory natural killer T cells. *Liver Transpl*. 2017 Aug;23(8):1040–50.

267. Mitsdoerffer M, Lee Y, Jäger A, Kim HJ, Korn T, Kolls JK, et al. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Aug 10;107(32):14292–7.
268. Moll G, Ankrum JA, Kamhieh-Milz J, Bieback K, Ringdén O, Volk HD, et al. Intravascular Mesenchymal Stromal/Stem Cell Therapy Product Diversification: Time for New Clinical Guidelines. *Trends Mol Med*. 2019 Feb;25(2):149–63.
269. Mondello C, Scovassi AI. Apoptosis: a way to maintain healthy individuals. *Subcell Biochem*. 2010;50:307–23.
270. Monzón Manzano E, Fernandez-Bello I, Justo Sanz R, Robles Marhuenda Á, Acuña P, Alvarez Román MT, et al. Thrombin Generation Related to Netosis in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Blood*. 2020 Nov 5;136(Supplement 1):10–1.
271. Moroni G, Calatroni M, Ponticelli C. Severe lupus nephritis in the present days. *Frontiers in Nephrology* [Internet]. 2022 [cited 2023 Jul 7];2. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneph.2022.984613>
272. Moulton VR, Suarez-Fueyo A, Meidan E, Li H, Mizui M, Tsokos GC. Pathogenesis of Human Systemic Lupus Erythematosus: A Cellular Perspective. *Trends Mol Med*. 2017 Jul;23(7):615–35.
273. Munoz-Perez E, Gonzalez-Pujana A, Igartua M, Santos-Vizcaino E, Hernandez RM. Mesenchymal Stromal Cell Secretome for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases: Latest Trends in Isolation, Content Optimization and Delivery Avenues. *Pharmaceutics*. 2021 Oct 27;13(11):1802.
274. Muradian K, Schachtschabel DO. The role of apoptosis in aging and age-related disease: update. *Z Gerontol Geriat*. 2001 Dec 1;34(6):441–6.
275. Murn J, Alibert O, Wu N, Tendil S, Gidrol X. Prostaglandin E2 regulates B cell proliferation through a candidate tumor suppressor, Ptger4. *J Exp Med*. 2008 Dec 22;205(13):3091–103.
276. Murphy PM. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*. 2002 Jun;54(2):227–9.
277. Musette P, Bouaziz JD. B Cell Modulation Strategies in Autoimmune Diseases: New Concepts. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2018 [cited 2023 Jul 5];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00622>
278. Musiał-Wysocka A, Kot M, Sułkowski M, Badyra B, Majka M. Molecular and Functional Verification of Wharton’s Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) Pluripotency. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 12;20(8):1807.
279. Muto A, Ochiai K, Kimura Y, Itoh-Nakadai A, Calame KL, Ikebe D, et al. Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch. *EMBO J*. 2010 Dec 1;29(23):4048–61.
280. Múzes G, Sipos F. Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Cells*. 2022 Jul 26;11(15):2300.
281. Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Sep 1;76(17):3323–48.
282. Nakano M, Nagaishi K, Konari N, Saito Y, Chikenji T, Mizue Y, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetes-induced cognitive impairment by exosome transfer into damaged neurons and astrocytes. *Sci Rep*. 2016 Apr 22;6(1):24805.
283. Narayanan K, Marwaha V, Shanmuganandan K, Shankar S. Correlation between Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, C3, C4 and Anti-dsDNA Antibodies. *Med J Armed Forces India*. 2010 Apr;66(2):102–7.

284. Nashi E, Wang Y, Diamond B. The Role Of B Cells in Lupus Pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Apr;42(4):543–50.
285. Nelson CM. Mechanical Control of Cell Differentiation: Insights from the Early Embryo. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2022;24(1):307–22.
286. Neunert C, Farah R, Yacobovich J, Neufeld E. Refractory autoimmune disease: an overview of when first-line therapy is not enough. *Semin Hematol*. 2016 Apr;53 Suppl 1:S35-38.
287. Niu XY, Zhang HY, Liu YJ, Zhao D, Shan YX, Jiang YF. Peripheral B-cell activation and exhaustion markers in patients with ankylosing spondylitis. *Life Sciences*. 2013 Nov 4;93(18):687–92.
288. Nojehdehi S, Soudi S, Hesampour A, Rasouli S, Soleimani M, Hashemi SM. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cell–derived exosomes on experimental type-1 autoimmune diabetes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018;119(11):9433–43.
289. Novianti F, Ghrahani R, Indraswari N. Pattern of Indirect Immunofluorescence Assay Antinuclear Antibody in Pediatric Lupus Nephritis. *International Journal of Integrated Health Sciences*. 2020 Apr 5;8(1):38–42.
290. Oh M, Nör JE. The Perivascular Niche and Self-Renewal of Stem Cells. *Front Physiol*. 2015 Dec 2;6:367.
291. Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001 Nov 20;98(24):13866–71.
292. Ospina FE, Betancur JF, Suso JP, Muñoz-Buitron E, Cañas CA, Tobón GJ. Role of the cytokine BAFF in autoimmune diseases: Physiopathology and therapeutic targets. *Rev Colomb Reumatol*. 2016 Jul 1;23(3):177–94.
293. Ospina FE, Echeverri A, Zambrano D, Suso JP, Martínez-Blanco J, Cañas CA, et al. Distinguishing infections vs flares in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2017 Apr 1;56(suppl_1):i46–54.
294. Ou-yang Y, Dai M miao. Screening for genes, miRNAs and transcription factors of adipogenic differentiation and dedifferentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2023 Jan 17;18(1):46.
295. Pan Q, Chen X, Liao S, Chen X, Zhao C, Xu Y zhi, et al. Updated advances of linking psychosocial factors and sex hormones with systemic lupus erythematosus susceptibility and development. *PeerJ*. 2019a Jun 25;7:e7179.
296. Pan Q, Liu Z, Liao S, Ye L, Lu X, Chen X, et al. Current mechanistic insights into the role of infection in systemic lupus erythematosus. *Biomed Pharmacother*. 2019b Sep;117:109122.
297. Parameswaran P, Lucke M. HLA-B27 Syndromes. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Jul 9]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551523/>
298. Pelanda R, Zikherman J. Many Achilles' heels of B and T cell tolerance. *Immunological Reviews*. 2022;307(1):5–11.
299. Peng J, Gong Y, Zhang Y, Wang D, Xiao Z. Immunohistological analysis of active sacroiliitis in patients with axial spondyloarthritis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Apr;96(16):e6605.
300. Peng Y, Chen X, Liu Q, Xu D, Zheng H, Liu L, et al. Alteration of naïve and memory B-cell subset in chronic graft-versus-host disease patients after treatment with mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Sep;3(9):1023–31.

301. Peng Y, Chen X, Liu Q, Zhang X, Huang K, Liu L, et al. Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5+ regulatory B cells producing interleukin 10. *Leukemia*. 2015 Mar;29(3):636–46.
302. Peng YQ, Wu ZC, Xu ZB, Fang SB, Chen DH, Zhang HY, et al. Mesenchymal stromal cells-derived small extracellular vesicles modulate DC function to suppress Th2 responses via IL-10 in patients with allergic rhinitis. *European Journal of Immunology*. 2022;52(7):1129–40.
303. Pereira CTM, Bichuetti-Silva DC, da Mota NVF, Salomão R, Brunialti MKC, Costa-Carvalho BT. B-cell subsets imbalance and reduced expression of CD40 in ataxia-telangiectasia patients. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2018 Sep 1;46(5):438–46.
304. Perez-Hernandez J, Forner MJ, Pinto C, Chaves FJ, Cortes R, Redon J. Increased Urinary Exosomal MicroRNAs in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *PLOS ONE*. 2015 Sep 21;10(9):e0138618.
305. Perez-Hernandez J, Martinez-Arroyo O, Ortega A, Galera M, Solis-Salguero MA, Chaves FJ, et al. Urinary exosomal miR-146a as a marker of albuminuria, activity changes and disease flares in lupus nephritis. *J Nephrol*. 2021 Aug 1;34(4):1157–67.
306. Peshkova M, Korneev A, Suleimanov S, Vlasova II, Svistunov A, Kosheleva N, et al. MSCs' conditioned media cytokine and growth factor profiles and their impact on macrophage polarization. *Stem Cell Research & Therapy*. 2023 May 25;14(1):142.
307. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and Validation of Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012 Aug;64(8):2677–86.
308. Phelps J, Sanati-Nezhad A, Ungrin M, Duncan NA, Sen A. Bioprocessing of Mesenchymal Stem Cells and Their Derivatives: Toward Cell-Free Therapeutics. *Stem Cells Int*. 2018;2018:9415367.
309. Pica F, Franzese O, D'Onofrio C, Bonmassar E, Favalli C, Garaci E. Prostaglandin E2 induces apoptosis in resting immature and mature human lymphocytes: a c-Myc-dependent and Bcl-2-independent associated pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996 Jun 1;277(3):1793–800.
310. Piper CJM, Rosser EC, Oleinika K, Nistala K, Krausgruber T, Rendeiro AF, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Contributes to the Transcriptional Program of IL-10-Producing Regulatory B Cells. *Cell Rep*. 2019 Nov 12;29(7):1878-1892.e7.
311. Planat-Benard V, Varin A, Casteilla L. MSCs and Inflammatory Cells Crosstalk in Regenerative Medicine: Concerted Actions for Optimized Resolution Driven by Energy Metabolism. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2021 [cited 2022 Sep 12];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.626755>
312. Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, et al. IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*. 2008 Jun;38(6):1745–55.
313. Poliwoda S, Noor N, Downs E, Schaaf A, Cantwell A, Ganti L, et al. Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice. *Orthopedic Reviews* [Internet]. 2022 Aug 25 [cited 2023 Jul 16];14(3). Available from: <https://orthopedicreviews.openmedicalpublishing.org/article/37498-stem-cells-a-comprehensive-review-of-origins-and-emerging-clinical-roles-in-medical-practice/stats/7/downloads>
314. Pollard KM. Silica, Silicosis, and Autoimmunity. *Front Immunol*. 2016;7:97.
315. Popis M, Konwerska A, Partyka M, Wieczorkiewicz M, Ciesiółka S, Stefańska K, et al. Mesenchymal stem cells and their secretome - candidates for safe and effective therapy for systemic lupus erythematosus. *Medical Journal of Cell Biology*. 2021 Sep 1;9(3):110–22.

316. Qi LL, Fan ZY, Mao HG, Wang JB. The Therapeutic Efficacy of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium on Experimental Colitis Was Improved by the Serum From Colitis Rats. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:694908.
317. Qin W, Hu L, Zhang X, Jiang S, Li J, Zhang Z, et al. The Diverse Function of PD-1/PD-L Pathway Beyond Cancer. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2019 [cited 2023 Aug 20];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02298>
318. Qin Y, Zhou Z, Zhang F, Wang Y, Shen B, Liu Y, et al. Induction of Regulatory B-Cells by Mesenchymal Stem Cells is Affected by SDF-1 α -CXCR7. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(1):117–30.
319. Rafei M, Hsieh J, Fortier S, Li M, Yuan S, Birman E, et al. Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood.* 2008 Dec 15;112(13):4991–8.
320. Rastogi I, Jeon D, Moseman JE, Muralidhar A, Potluri HK, McNeel DG. Role of B cells as antigen presenting cells. *Front Immunol.* 2022 Sep 8;13:954936.
321. Ravikanth M, Soujanya P, Manjunath K, Saraswathi T, Ramachandran C. Heterogeneity of fibroblasts. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2011;15(2):247–50.
322. Raza IGA, Clarke AJ. B Cell Metabolism and Autophagy in Autoimmunity. *Front Immunol.* 2021 Jun 7;12:681105.
323. Reed J, Reichelt M, Wetzel SA. Lymphocytes and Trophocytosis-Mediated Signaling. *Cells.* 2021 Jun 12;10(6):1478.
324. Rees F, Doherty M, Grainge MJ, Lanyon P, Zhang W. The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: a systematic review of epidemiological studies. *Rheumatology.* 2017 Nov 1;56(11):1945–61.
325. Rezaeiemanesh A, Abdolmaleki M, Abdolmohammadi K, Aghaei H, Pakdel FD, Fatahi Y, et al. Immune cells involved in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2018 Apr 1;100:198–204.
326. Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S, Velada I, Leite C, Andrade P, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Res Ther.* 2013 Oct 15;4(5):125.
327. Riella LV, Paterson AM, Sharpe AH, Chandraker A. Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response. *Am J Transplant.* 2012 Oct;12(10):2575–87.
328. Roper RL, Phipps RP. Prostaglandin E2 and cAMP inhibit B lymphocyte activation and simultaneously promote IgE and IgG1 synthesis. *J Immunol.* 1992 Nov 1;149(9):2984–91.
329. Rosado MM, Bernardo ME, Scarsella M, Conforti A, Giorda E, Biagini S, et al. Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T cells. *Stem Cells Dev.* 2015 Jan 1;24(1):93–103.
330. Rosenberg JN, Johnson GD, Holborow EJ. Antinuclear antibodies in ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, and psoriasis. *Ann Rheum Dis.* 1979 Dec;38(6):526–8.
331. Rosochowicz MA, Lach MS, Richter M, Suchorska WM, Trzeciak T. Conditioned Medium – Is it an Undervalued Lab Waste with the Potential for Osteoarthritis Management? *Stem Cell Rev and Rep* [Internet]. 2023 Feb 15 [cited 2023 Jul 18]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s12015-023-10517-1>
332. Rowland AL, Burns ME, Levine GJ, Watts AE. Preparation Technique Affects Recipient Immune Targeting of Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Front Vet Sci.* 2021 Sep 14;8:724041.

333. Rowland SL, Leahy KF, Halverson R, Torres RM, Pelanda R. BAFF-R signaling aids the differentiation of immature B cells into transitional B cells following tonic BCR signaling. *J Immunol.* 2010 Oct 15;185(8):4570–81.
334. Rubin J, Mansoori S, Blom K, Berglund M, Lenhammar L, Andersson C, et al. Mebendazole stimulates CD14+ myeloid cells to enhance T-cell activation and tumour cell killing. *Oncotarget.* 2018 Jul 20;9(56):30805–13.
335. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Akkoc N, Brandt J, Chou CT, et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis.* 2011 Jan;70(1):25–31.
336. Rui K, Hong Y, Zhu Q, Shi X, Xiao F, Fu H, et al. Olfactory ecto-mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate murine Sjögren's syndrome by modulating the function of myeloid-derived suppressor cells. *Cell Mol Immunol.* 2021 Feb;18(2):440–51.
337. Rustad KC, Gurtner GC. Mesenchymal Stem Cells Home to Sites of Injury and Inflammation. *Advances in Wound Care.* 2012 Aug;1(4):147–52.
338. Ryu KH, Cho KA, Park HS, Kim JY, Woo SY, Jo I, et al. Tonsil-derived mesenchymal stromal cells: evaluation of biologic, immunologic and genetic factors for successful banking. *Cytotherapy.* 2012 Nov;14(10):1193–202.
339. Sado T. Does XIST safeguard against sex-biased human diseases? *Molecular Cell.* 2021 Apr;81(8):1598–600.
340. Sahoo NC, Rao KVS, Natarajan K. CD80 Expression is Induced on Activated B Cells Following Stimulation by CD86. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2002;55(6):577–84.
341. Saito Y, Miyagawa Y, Onda K, Nakajima H, Sato B, Horiuchi Y, et al. B-cell-activating factor inhibits CD20-mediated and B-cell receptor-mediated apoptosis in human B cells. *Immunology.* 2008 Dec;125(4):570–90.
342. Santacruz JC, Mantilla MJ, Rueda I, Pulido S, Rodriguez-Salas G, Londono J. A Practical Perspective of the Hematologic Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Cureus.* 2022 Mar;14(3):e22938.
343. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Bhuiya NS, Cutler CS, Soiffer RJ, et al. High Levels of B-Cell Activating Factor in Patients with Active Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Clin Cancer Res.* 2007 Oct 15;13(20):6107–14.
344. Sawalha AH, Schmid WR, Binder SR, Bacino DK, Harley JB. Association between systemic lupus erythematosus and *Helicobacter pylori* seronegativity. *The Journal of Rheumatology.* 2004 Aug 1;31(8):1546–50.
345. Scheiermann C, Frenette PS, Hidalgo A. Regulation of leucocyte homeostasis in the circulation. *Cardiovasc Res.* 2015 Aug 1;107(3):340–51.
346. Schena F, Gambini C, Gregorio A, Mosconi M, Reverberi D, Gattorno M, et al. Interferon- γ -dependent inhibition of B cell activation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2010 Sep;62(9):2776–86.
347. Schlegel PM, Steiert I, Kötter I, Müller CA. B Cells Contribute to Heterogeneity of IL-17 Producing Cells in Rheumatoid Arthritis and Healthy Controls. *PLoS One.* 2013 Dec 5;8(12):e82580.
348. Schu S, Nosov M, O'Flynn L, Shaw G, Treacy O, Barry F, et al. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med.* 2012 Sep;16(9):2094–103.
349. Schuster JA, Stupnikov MR, Ma G, Liao W, Lai R, Ma Y, et al. Expansion of hematopoietic stem cells for transplantation: current perspectives. *Experimental Hematology & Oncology.* 2012 May 14;1(1):12.

350. Schütz C, Baraliakos X. What do we know about co-stimulatory and co-inhibitory immune checkpoint signals in ankylosing spondylitis? *Clinical and Experimental Immunology*. 2023 Mar 8;uxad032.
351. Schwimmbeck PL, Oldstone MB. Molecular mimicry between human leukocyte antigen B27 and *Klebsiella*. Consequences for spondyloarthropathies. *Am J Med*. 1988 Dec 23;85(6A):51–3.
352. Seetharaman R, Mahmood A, Kshatriya P, Patel D, Srivastava A. Mesenchymal Stem Cell Conditioned Media Ameliorate Psoriasis Vulgaris: A Case Study. *Case Rep Dermatol Med*. 2019;2019:8309103.
353. Semenova E, Grudniak MP, Machaj EK, Bocian K, Chroscinska-Krawczyk M, Trochonowicz M, et al. Mesenchymal Stromal Cells from Different Parts of Umbilical Cord: Approach to Comparison & Characteristics. *Stem Cell Rev and Rep*. 2021 Oct 1;17(5):1780–95.
354. Shahir M, Mahmoud Hashemi S, Asadirad A, Varahram M, Kazempour-Dizaji M, Folkerts G, et al. Effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes on the induction of mouse tolerogenic dendritic cells. *J Cell Physiol*. 2020 Oct;235(10):7043–55.
355. Shang J, Zha H, Sun Y. Phenotypes, Functions, and Clinical Relevance of Regulatory B Cells in Cancer. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2020 [cited 2023 Jul 5];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.582657>
356. Shang L, Zhang R, Yan J, Lu Y, Zhang S, Sun Y, et al. Sustainable Production and Activity Determination of Serum-Free Conditioned Medium from Menstrual Blood-Derived Endometrial Stem Cells. *Appl Biochem Biotechnol*. 2023 Feb 1;195(2):1109–21.
357. Shang Y, Guan H, Zhou F. Biological Characteristics of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Its Therapeutic Potential for Hematological Disorders. *Front Cell Dev Biol*. 2021 May 3;9:570179.
358. Sheehan NJ. HLA-B27: what's new? *Rheumatology*. 2010 Apr 1;49(4):621–31.
359. Shi H, Ye J, Teng J, Yin Y, Hu Q, Wu X, et al. Elevated serum autoantibodies against co-inhibitory PD-1 facilitate T cell proliferation and correlate with disease activity in new-onset systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Research & Therapy*. 2017 Mar 9;19(1):52.
360. Shigemoto-Kuroda T, Oh JY, Kim D ki, Jeong HJ, Park SY, Lee HJ, et al. MSC-derived Extracellular Vesicles Attenuate Immune Responses in Two Autoimmune Murine Models: Type 1 Diabetes and Uveoretinitis. *Stem Cell Reports*. 2017 May 9;8(5):1214–25.
361. Shin S, Lee J, Kwon Y, Park KS, Jeong JH, Choi SJ, et al. Comparative Proteomic Analysis of the Mesenchymal Stem Cells Secretome from Adipose, Bone Marrow, Placenta and Wharton's Jelly. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Jan;22(2):845.
362. Shiraishi N, Nomura T, Tanizaki H, Nakajima S, Narumiya S, Miyachi Y, et al. Prostaglandin E2-EP3 Axis in Fine-Tuning Excessive Skin Inflammation by Restricting Dendritic Cell Functions. *PLOS ONE*. 2013 Jul 29;8(7):e69599.
363. Shoham T, Parameswaran R, Shav-Tal Y, Barda-Saad M, Zipori D. The mesenchymal stroma negatively regulates B cell lymphopoiesis through the expression of activin A. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 May;996:245–60.
364. Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A. Ankylosing spondylitis: an overview. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2002 Nov 1;61(suppl 3):iii8–18.
365. Silva-Carvalho AÉ, da Silva IGM, Corrêa JR, Saldanha-Araujo F. Regulatory T-Cell Enhancement, Expression of Adhesion Molecules, and Production of Anti-Inflammatory Factors Are Differentially Modulated by Spheroid-Cultured Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2022 Nov 18;23(22):14349.
366. Silverstein A. Horror autotoxicus, Autoimmunity, and Immunoregulation: The Early History. *Transfusion Medicine and Hemotherapy - TRANSFUS MED HEMOTHER*. 2005 Nov 1;32:296–302.

367. Skiles ML, Marzan AJ, Brown KS, Shamonki JM. Comparison of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells isolated from cryopreserved material and extracted by explantation and digestion methods utilizing a split manufacturing model. *Cytotherapy*. 2020 Oct 1;22(10):581–91.
368. Slobodin G, Kessel A, Kofman N, Toubi E, Rosner I, Odeh M. Phenotype of Resting and Activated Monocyte-Derived Dendritic Cells Grown from Peripheral Blood of Patients with Ankylosing Spondylitis. *Inflammation*. 2012 Apr 1;35(2):772–5.
369. Smith CD, Cyr M. The history of lupus erythematosus. From Hippocrates to Osler. *Rheum Dis Clin North Am*. 1988 Apr;14(1):1–14.
370. Smith JA. The role of the unfolded protein response in axial spondyloarthritis. *Clin Rheumatol*. 2016 Jun;35(6):1425–31.
371. Smulski CR, Eibel H. BAFF and BAFF-Receptor in B Cell Selection and Survival. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2018 [cited 2023 Jul 6];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02285>
372. Soliman MA, Fathy AA, Alkilani A, Abd El-Bary N, El-Bassal F. Impact of CD40 expression by flowcytometry on outcome of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Egypt J Immunol*. 2009;16(1):61–70.
373. Soliman WM, Sherif NM, Ghanima IM, EL-Badawy MA. Neutrophil to lymphocyte and platelet to lymphocyte ratios in systemic lupus erythematosus: Relation with disease activity and lupus nephritis. *Reumatol Clin*. 2020 Jul 1;16(4):255–61.
374. Somoza RA, Welter JF, Correa D, Caplan AI. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Challenges and Unfulfilled Expectations. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014 Dec 1;20(6):596–608.
375. Song IH, Heldmann F, Rudwaleit M, Listing J, Appel H, Braun J, et al. Different response to rituximab in tumor necrosis factor blocker-naïve patients with active ankylosing spondylitis and in patients in whom tumor necrosis factor blockers have failed: A twenty-four-week clinical trial. *Arthritis & Rheumatism*. 2010;62(5):1290–7.
376. Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J*. 2004 Jun;18(9):980–2.
377. Speyer CB, Costenbader KH. Cigarette Smoking and the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol*. 2018 Jun;14(6):481–7.
378. Stefańska K, Bryl R, Moncrieff L, Pinto N, Shibli JA, Dyszkiewicz-Konwińska M. Mesenchymal stem cells – a historical overview. *Medical Journal of Cell Biology*. 2020 Jun 1;8(2):83–7.
379. Su W, Wan Q, Huang J, Han L, Chen X, Chen G, et al. Culture medium from TNF- α -stimulated mesenchymal stem cells attenuates allergic conjunctivitis through multiple antiallergic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Aug;136(2):423-432.e8.
380. Sun LY, Zhang HY, Feng XB, Hou YY, Lu LW, Fan LM. Abnormality of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2007;16(2):121–8.
381. Suszek D, Górak A, Majdan M. Differential approach to peripheral blood cell ratios in patients with systemic lupus erythematosus and various manifestations. *Rheumatol Int*. 2020 Oct 1;40(10):1625–9.
382. Suvas S, Singh V, Sahdev S, Vohra H, Agrewala JN. Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *J Biol Chem*. 2002 Mar 8;277(10):7766–75.
383. Suzuki K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Effect of interleukin-2 on synthesis of B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*. 2008 Oct 1;44(1):44–8.

384. Tabata H, Matsuoka T, Endo F, Nishimura Y, Matsushita S. Ligation of HLA-DR molecules on B cells induces enhanced expression of IgM heavy chain genes in association with Syk activation. *J Biol Chem*. 2000 Nov 10;275(45):34998–5005.
385. Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, López A, et al. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*. 2008 Sep;93(9):1301–9.
386. Takatsu K. Cytokines involved in B-cell differentiation and their sites of action. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997 Jun;215(2):121–33.
387. Tam LS, Gu J, Yu D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 Jul;6(7):399–405.
388. Taurog JD, Gensler LS, Haroon N. Spondyloarthritis. In: Loscalzo J, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson JL, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine* [Internet]. 21st ed. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2022 [cited 2023 Jul 9]. Available from: accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1198714334
389. Tavasolian F, Inman RD. Biology and therapeutic potential of mesenchymal stem cell extracellular vesicles in axial spondyloarthritis. *Commun Biol*. 2023 Apr 14;6(1):413.
390. Tekguc M, Wing JB, Osaki M, Long J, Sakaguchi S. Treg-expressed CTLA-4 depletes CD80/CD86 by trogocytosis, releasing free PD-L1 on antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jul 27;118(30):e2023739118.
391. Thibult ML, Mamessier E, Gertner-Dardenne J, Pastor S, Just-Landi S, Xerri L, et al. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol*. 2013 Feb;25(2):129–37.
392. Tokhanbigli S, Baghaei K, Asadirad A, Hashemi SM, Asadzadeh-Aghdai H, Zali MR. Immunoregulatory impact of human mesenchymal-conditioned media and mesenchymal derived exosomes on monocytes. *Mol Biol Res Commun*. 2019 Jun;8(2):79–89.
393. Toong C, Adelstein S, Phan TG. Clearing the complexity: immune complexes and their treatment in lupus nephritis. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2011 Jan 11;4:17–28.
394. Traggiai E, Volpi S, Schena F, Gattorno M, Ferlito F, Moretta L, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells*. 2008 Feb;26(2):562–9.
395. Treamtrakanpon W, Tantivitayakul P, Benjachat T, Somparn P, Kittikowit W, Eiam-ong S, et al. APRIL, a proliferation-inducing ligand, as a potential marker of lupus nephritis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(6):R252.
396. Truedsson L, Bengtsson AA, Sturfelt G. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2007 Dec;40(8):560–6.
397. Tsokos GC, Lo MS, Costa Reis P, Sullivan KE. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Nov 22;12(12):716–30.
398. Tsuji K, Ojima M, Otabe K, Horie M, Koga H, Sekiya I, et al. Effects of Different Cell-Detaching Methods on the Viability and Cell Surface Antigen Expression of Synovial Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant*. 2017 Jun;26(6):1089–102.
399. Uchanska-Ziegler B, Ziegler A. Ankylosing spondylitis: a beta2m-deposition disease? *Trends Immunol*. 2003 Feb;24(2):73–6.
400. Ullah M, Liu DD, Thakor AS. Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *iScience*. 2019 May 9;15:421–38.

401. Ulusoy H, Akgol G, Gulkesen A, Kaya A, Ayden Kal G, Kaman D, et al. Serum heat-shock protein-65 antibody levels are elevated but not associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Open Access Rheumatol*. 2018;10:55–60.
402. Ungerer C, Quade-Lyssy P, Radeke HH, Henschler R, Königs C, Köhl U, et al. Galectin-9 is a suppressor of T and B cells and predicts the immune modulatory potential of mesenchymal stromal cell preparations. *Stem Cells Dev*. 2014 Apr 1;23(7):755–66.
403. Upadhyay M, Priya GK, Ramesh P, Madhavi MB, Rath S, Bal V, et al. CD40 signaling drives B lymphocytes into an intermediate memory-like state, poised between naïve and plasma cells. *J Cell Physiol*. 2014 Oct;229(10):1387–96.
404. Van Der Heijde D, Lie E, Kvien TK, Sieper J, Van Den Bosch F, Listing J, et al. ASDAS, a highly discriminatory ASAS-endorsed disease activity score in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2009 Dec 1;68(12):1811–8.
405. Van Praet JT, Donovan E, Vanassche I, Drennan MB, Windels F, Dendooven A, et al. Commensal microbiota influence systemic autoimmune responses. *EMBO J*. 2015 Feb 12;34(4):466–74.
406. Vargas-Alarcón G, Londoño JD, Hernández-Pacheco G, Pacheco-Tena C, Castillo E, Cardiel MH, et al. Effect of HLA-B and HLA-DR genes on susceptibility to and severity of spondyloarthropathies in Mexican patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2002 Aug 1;61(8):714–7.
407. Vasconcelos C, Kallenberg C, Shoenfeld Y. Refractory disease in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2011 Sep;10(11):653–4.
408. Vasilev G, Ivanova M, Ivanova-Todorova E, Tumangelova-Yuzeir K, Krasimirova E, Stoilov R, et al. Secretory factors produced by adipose mesenchymal stem cells downregulate Th17 and increase Treg cells in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int*. 2019 May;39(5):819–26.
409. Vincent FB, Kandane-Rathnayake R, Koelmeyer R, Hoi AY, Harris J, Mackay F, et al. Analysis of serum B cell-activating factor from the tumor necrosis factor family (BAFF) and its soluble receptors in systemic lupus erythematosus. *Clin Transl Immunology*. 2019 Apr 21;8(4):e01047.
410. Vizoso FJ, Eiro N, Costa L, Esparza P, Landin M, Diaz-Rodriguez P, et al. Mesenchymal Stem Cells in Homeostasis and Systemic Diseases: Hypothesis, Evidences, and Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul 31;20(15):3738.
411. Volarevic V, Gazdic M, Simovic Markovic B, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N. Mesenchymal stem cell-derived factors: Immuno-modulatory effects and therapeutic potential. *Biofactors*. 2017 Sep 10;43(5):633–44.
412. Volkman HE, Stetson DB. The enemy within: endogenous retroelements and autoimmune disease. *Nat Immunol*. 2014 May;15(5):415–22.
413. Wakiya R, Kameda T, Nakashima S, Shimada H, Fahmy Mansour MM, Kato M, et al. Efficacy and Safety of Hydroxychloroquine Therapy for Systemic Lupus Erythematosus Patients Depend on Administration Dose. *Intern Med*. 2020 Sep 1;59(17):2105–12.
414. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1994 Aug;1(5):405–13.
415. Wang B, Chen C, Liu X, Zhou S, Xu T, Wu M. The effect of combining PD-1 agonist and low-dose Interleukin-2 on treating systemic lupus erythematosus. *Front Immunol*. 2023 Mar 8;14:1111005.
416. Wang D, Huang S, Yuan X, Liang J, Xu R, Yao G, et al. The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus. *Cell Mol Immunol*. 2017 May;14(5):423–31.

417. Wang G, Yuan J, Cai X, Xu Z, Wang J, Ocansey DKW, et al. HucMSC-exosomes carrying miR-326 inhibit neddylation to relieve inflammatory bowel disease in mice. *Clinical and Translational Medicine*. 2020a;10(2):e113.
418. Wang H, Chen T, Ding T, Zhu P, Xu X, Yu L, et al. Adipogenic differentiation alters the immunoregulatory property of mesenchymal stem cells through BAFF secretion. *Hematology*. 2011 Sep;16(5):313–23.
419. Wang H, Qi F, Dai X, Tian W, Liu T, Han H, et al. Requirement of B7-H1 in mesenchymal stem cells for immune tolerance to cardiac allografts in combination therapy with rapamycin. *Transpl Immunol*. 2014 Aug;31(2):65–74.
420. Wang J, Xia J, Huang R, Hu Y, Fan J, Shu Q, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles alter disease outcomes via endorsement of macrophage polarization. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020b Sep 29;11(1):424.
421. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of Internal Medicine*. 2015;278(4):369–95.
422. Wang T, Vasconcellos A, Marken J, Skopelja-Gardner S, Lood C, Giltaiy NV. Immune complex-driven neutrophil activation and BAFF release: a link to B cell responses in SLE. *Lupus Sci Med*. 2022 Jul 19;9(1):e000709.
423. Wangriatisak K, Kochayoo P, Thawornpan P, Leepiyasakulchai C, Suangtamai T, Ngamjanyaporn P, et al. CD4+ T-cell cooperation promoted pathogenic function of activated naïve B cells of patients with SLE. *Lupus Science & Medicine*. 2022 Sep 1;9(1):e000739.
424. Weckerle CE, Niewold TB. The Unexplained Female Predominance of Systemic Lupus Erythematosus: Clues from Genetic and Cytokine Studies. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011 Feb;40(1):42–9.
425. Wen L, Chen Z, Jin Z, Pan W, Liu L, Wu M, et al. Clinical and laboratorial outcome of different age-onset systemic lupus erythematosus patients in Jiangsu, China: a multicentre retrospective study. *Sci Rep*. 2022 Jun 23;12:10683.
426. Weng W, Gui L, Zhang Y, Chen J, Zhu W, Liang Z, et al. PKM2 Promotes Pro-Inflammatory Macrophage Activation in Ankylosing Spondylitis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2023 May 16;qiad054.
427. Wennhold K, Thelen M, Lehmann J, Schran S, Preugszat E, Garcia-Marquez M, et al. CD86+ Antigen-Presenting B Cells Are Increased in Cancer, Localize in Tertiary Lymphoid Structures, and Induce Specific T-cell Responses. *Cancer Immunology Research*. 2021 Sep 1;9(9):1098–108.
428. Wichainun R. Sensitivity and specificity of ANA and anti-dsDNA in the diagnosis of systemic lupus erythematosus: A comparison using control sera obtained from healthy individuals and patients with multiple medical problems. *Asian Pac J Allergy Immunol* [Internet]. 2013 Apr 29 [cited 2023 Aug 13];31(4). Available from: <http://apjai.digitaljournals.org/index.php/apjai/article/view/1305>
429. Wignall SM. Cell Division: Stem Cells Take the Stage. *Current Biology*. 2015 May 4;25(9):R376–8.
430. Wilbrink R, Spoorenberg A, Arends S, van der Geest KSM, Brouwer E, Bootsma H, et al. CD27-CD38lowCD21low B-Cells Are Increased in Axial Spondyloarthritis. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2021a [cited 2022 Nov 5];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.686273>
431. Wilbrink R, Spoorenberg A, Verstappen GMPJ, Kroese FGM. B Cell Involvement in the Pathogenesis of Ankylosing Spondylitis. *Int J Mol Sci*. 2021b Dec 11;22(24):13325.
432. Wu J, Lin S, Wan B, Velani B, Zhu Y. Pyroptosis in Liver Disease: New Insights into Disease Mechanisms. *Aging Dis*. 2019 Oct;10(5):1094–108.

433. Wu P, Wang J, Chen C, Chao K, Chang M, Chen W, et al. Early Passage Mesenchymal Stem Cells Display Decreased Radiosensitivity and Increased DNA Repair Activity. *Stem Cells Transl Med.* 2017 May 24;6(6):1504–14.
434. Wykes M. Why do B cells produce CD40 ligand? *Immunol Cell Biol.* 2003 Aug;81(4):328–31.
435. Xia Y, Ye H, Li K, Shi B, Sun X, Wu J. Efficacy of Mesenchymal Stem Cell Therapy on Lupus Nephritis and Renal Function in Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis. *Clin Invest Med.* 2023 Mar 26;46(1):E24-35.
436. Xiao F, Rui K, Shi X, Wu H, Cai X, Lui KO, et al. Epigenetic regulation of B cells and its role in autoimmune pathogenesis. *Cell Mol Immunol.* 2022 Nov;19(11):1215–34.
437. Xie M, Li C, She Z, Wu F, Mao J, Hun M, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles regulate acquired immune response of lupus mouse in vitro. *Sci Rep.* 2022 Jul 30;12(1):13101.
438. Xie Z, Wang P, Li Y, Deng W, Zhang X, Su H, et al. Imbalance Between Bone Morphogenetic Protein 2 and Noggin Induces Abnormal Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Feb;68(2):430–40.
439. Xu H, Chen W, Zheng F, Tang D, Liu D, Wang G, et al. Reconstruction and analysis of the aberrant lncRNA–miRNA–mRNA network in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2020 Apr 1;29(4):398–406.
440. Yagura K, Ohtaki H, Tsumuraya T, Sato A, Miyamoto K, Kawada N, et al. The enhancement of CCL2 and CCL5 by human bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells might contribute to inflammatory suppression and axonal extension after spinal cord injury. *PLOS ONE.* 2020 Mar 10;15(3):e0230080.
441. Yan H, Wu M, Yuan Y, Wang ZZ, Jiang H, Chen T. Priming of Toll-like receptor 4 pathway in mesenchymal stem cells increases expression of B cell activating factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 May 30;448(2):212–7.
442. Yang S, Liang X, Song J, Li C, Liu A, Luo Y, et al. A novel therapeutic approach for inflammatory bowel disease by exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells to repair intestinal barrier via TSG-6. *Stem Cell Research & Therapy.* 2021a May 29;12(1):315.
443. Yang Y, Li X, Ma Z, Wang C, Yang Q, Byrne-Steele M, et al. CTLA-4 expression by B-1a B cells is essential for immune tolerance. *Nat Commun.* 2021b Jan 22;12(1):525.
444. Yarkoni Y, Getahun A, Cambier JC. Molecular underpinning of B-cell anergy. *Immunol Rev.* 2010 Sep;237(1):249–63.
445. Yoshioka S, Miura Y, Yao H, Satake S, Hayashi Y, Tamura A, et al. CCAAT/enhancer-binding protein β expressed by bone marrow mesenchymal stromal cells regulates early B-cell lymphopoiesis. *Stem Cells.* 2014 Mar;32(3):730–40.
446. Youd M, Blickarz C, Woodworth L, Touzjian T, Edling A, Tedstone J, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells do not protect NZB \times NZW F1 mice from developing lupus disease. *Clin Exp Immunol.* 2010 Jul;161(1):176–86.
447. Zhang F, Song S shan, Shu J ling, Li Y, Wu Y jing, Wang Q tong, et al. BAFF upregulates CD28/B7 and CD40/CD154 expression and promotes mouse T and B cell interaction in vitro via BAFF receptor. *Acta Pharmacol Sin.* 2016 Aug;37(8):1101–9.
448. Zhang L, Qu YN, Zhang HY, Wu ZY, Li ZL, Guo WB, et al. SOCS1 Regulates the Immunomodulatory Roles of MSCs on B Cells. *Int J Stem Cells.* 2020a Apr 30;13(2):237–45.
449. Zhang Y, Li X, Gibson A, Edberg J, Kimberly RP, Absher DM. Skewed allelic expression on X chromosome associated with aberrant expression of XIST on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *Hum Mol Genet.* 2020b Aug 29;29(15):2523–34.

450. Zhang Z, Huang S, Wu S, Qi J, Li W, Liu S, et al. Clearance of apoptotic cells by mesenchymal stem cells contributes to immunosuppression via PGE2. *EBioMedicine*. 2019 Jul;45:341–50.
451. Zhang Z, Shi L, Song L, Ephrem E, Petri M, Sullivan KE. Interferon regulatory factor 1 marks activated genes and can induce target gene expression in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Mar;67(3):785–96.
452. Zhao LD, Li Y, Smith MF, Wang JS, Zhang W, Tang FL, et al. Expressions of BAFF/BAFF receptors and their correlation with disease activity in Chinese SLE patients. *Lupus*. 2010 Nov;19(13):1534–49.
453. Zhao P, Wang P, Dong S, Zhou Z, Cao Y, Yagita H, et al. Depletion of PD-1-positive cells ameliorates autoimmune disease. *Nat Biomed Eng*. 2019 Apr;3(4):292–305.
454. Zheng Q, Gan G, Gao X, Luo Q, Chen F. Targeting the IDO-BCL2A1-Cytochrome c Pathway Promotes Apoptosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2021 Mar 4;14:1673–87.
455. Zhou K, Zhang H, Jin O, Feng X, Yao G, Hou Y, et al. Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cell ameliorates the autoimmune pathogenesis in MRL/lpr mice. *Cell Mol Immunol*. 2008 Dec;5(6):417–24.
456. Zhou T, Liao C, Li HY, Lin W, Lin S, Zhong H. Efficacy of mesenchymal stem cells in animal models of lupus nephritis: a meta-analysis. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020 Feb 4;11(1):48.
457. Zhu W, He X, Cheng K, Zhang L, Chen D, Wang X, et al. Ankylosing spondylitis: etiology, pathogenesis, and treatments. *Bone Res*. 2019 Dec;7(1):22.
458. Zochling J, Braun J. Assessment of ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23(5 Suppl 39):S133-141.
459. Zucchi D, Elefante E, Schilirò D, Signorini V, Trentin F, Bortoluzzi A, et al. One year in review 2022: systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2022 Jan;40(1):4–14.

• ***Използвани литературни източници на кирилица:***

1. С. Кюркчиев, Д. Кюркчиев. Мезенхимни стволови клетки – имуномодулаторна активност и приложение. ЦМБ 2019- ISBN 978-619-7491-03-6, “Таурус Адвертайзинг” ЕООД; 5-210.
2. М. Иванова. Клинична оценка на физическата функция във връзка с болестната активност и рентгенографската структурна увреда при болни с анкилозиращ спондилит от българската популация. Дисертационен труд. МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ. КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ, 2012; стр. 139.