



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**

**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ**

---

**КАЛИНА ПЕТЕВА БЕЛЕМЕЗОВА**

**МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ И РОЛЯТА  
ИМ В ИМУНОРЕГУЛАЦИЯТА**

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

**за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”**

**Докторска програма „Имунология“**

**Научен ръководител:**

**проф. д-р Доброслав Станимиров Кюркчиев, дмн**

**София, 2022**

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

### На латиница:

AMP	аденозин монофосфат
ATP	аденозин трифосфат
CD	Cluster of Differentiation
CFU-F	фибробластна колония-формираща единица
COX	циклооксигеназа
CTL	цитотоксични Т лимфоцити
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte antigen
DC	дендритни клетки
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EGF	епидермален растежен фактор
ELISA	ензим-свързан имуносорбентен метод
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	фетален телешки серум
FGF	фибробластен растежен фактор
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Gal	галектин
GM-CSF	гранулоцит-макрофаг колонии-стимулиращ фактор
GVHD	graft-versus-host disease
HGF	Hepatocyte growth factor
HLA	човешки левкоцитен антиген
HO	heme oxygenase
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IDO	Indoleamine-2,3-dioxygenase

IFN $\gamma$ R	рецептор за интерферон $\gamma$
IFN $\gamma$	интерферон $\gamma$
Ig	имуноглобулин
IGF	Insulin-like growth factor
IL	интерлевкин
iNOS	индуцируема азотен оксид синтаза
ISCT	Международно дружество по клетъчна терапия
KIR	Killer-cell immunoglobulin-like receptor
LFA	Lymphocyte function-associated antigen
LPS	липополизахарид
MAPK	митоген-активирана протеин киназа
MHC	главен комплекс за тъканна съвместимост
MLR	mixed lymphocyte reaction
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells
NK	natural killer
PBMC	мононуклеарни клетки от периферна кръв
PBS	фосфат-буфериран разтвор
PD	Programmed Death
PDGF	тромбоцитен растежен фактор
PD-L	Programmed Death ligand
PDT	време за популационно удвояване
PE	Phycocerythrin
PGE2	Prostaglandin E2
PHA	Phytohaemagglutinin
PVC	Polyvinyl chloride
PVDF	Polyvinylidene difluoride

SCF	stem cell factor
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
T <sub>H</sub>	хелперни Т лимфоцити
TLR	Toll-like рецептор
TNF $\alpha$	тумор некротизиращ фактор $\alpha$
Treg	регулаторни Т-клетки
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
Wnt	Wingless Int genes
WJ	Wharton's jelly
WJ-MСК	мезенхимни стволови клетки от Wharton's jelly

На кирилица:

АПК	антиген-представящи клетки
АТ-МСК	адипозни мезенхимни стволови клетки
ЕК	клоногенната ефективност
ЕСК	ембрионални стволови клетки
КМ-МСК	костно-мозъчни мезенхимни стволови клетки
МСК	мезенхимни стволови клетки
МСК $\gamma$	мезенхимни стволови клетки третирани с IFN $\gamma$
мРНК	информационна РНК
ССК	соматични стволови клетки
ХСК	хемопоеични стволови клетки

# СЪДЪРЖАНИЕ

<b>ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>8</b>
<b>ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР</b> .....	<b>9</b>
1. ВИДОВЕ КЛАСИФИКАЦИИ НА СТВОЛОВИ КЛЕТКИ .....	9
2. ОТКРИВАНЕ И ПРОИЗХОД НА СОМАТИЧНИТЕ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ .....	12
3. МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ .....	14
3.1. <i>История на мезенхимните стволови клетки</i> .....	14
3.2. <i>Източници</i> .....	15
3.3. <i>Потенциал за диференциация</i> .....	16
3.4. <i>Мезенхимните стволови клетки като модулатори участват в тъканната хомеостаза и регенерация</i> .....	18
4. ИМУНОМОДУЛИРАЩИ ЕФЕКТИ НА МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ .....	20
4.1. <i>Имунни клетки, модулирани от МСК</i> .....	22
4.2. <i>Имунни модулатори, експресирани и секретирани от МСК</i> .....	42
4.3. <i>Възможности за клинично приложение</i> .....	55
5. IFN $\gamma$ - МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ И ФУНКЦИИ .....	57
5.1. <i>IFN<math>\gamma</math> и IFN<math>\gamma</math>-рецепторен комплекс</i> .....	57
5.2. <i>IFN<math>\gamma</math> сигнализация</i> .....	58
5.3. <i>Биологични функции на IFN<math>\gamma</math></i> .....	60
5.4. <i>IFN<math>\gamma</math>: приятел или враг на автоимунните заболявания</i> .....	62
5.5. <i>IFN<math>\gamma</math> и злокачествени заболявания</i> .....	63
<b>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> .....	<b>65</b>
<b>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b> .....	<b>66</b>
<b>МАТЕРИАЛИ</b> .....	<b>66</b>
1. ПРОБИ ОТ ЧОВЕШКА ПЪПНА ВРЪВ .....	66
2. ПРОБИ ПЕРИФЕРНА ВЕНОЗНА КРЪВ ОТ ЗДРАВИ ДОНОРИ .....	66
3. ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ И РЕАКТИВИ ЗА КЛЕТЪЧНО КУЛТИВИРАНЕ .....	67
<b>МЕТОДИ</b> .....	<b>68</b>
1. ИЗОЛИРАНЕ И КУЛТИВИРАНЕ НА ЧОВЕШКИ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ПЪПНА ВРЪВ .....	68
1.1. <i>Клетъчно култивиране</i> .....	69
1.2. <i>Имунофлуоресценция на МСК от пълна връв за Vimentin</i> .....	72
2. ТРЕТИРАНЕ НА МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ С РАЗЛИЧНИ КОНЦЕНТРАЦИИ НА IFN $\gamma$ .....	73
3. ФЛОУЦИТОМЕТРИЧЕН АНАЛИЗ НА МСК $\gamma$ И КОНТРОЛНАТА ГРУПА НЕТРЕТИРАНИ МСК ПО ОТНОШЕНИЕ НА ЕКСПРЕСИРАНИТЕ ПОВЪРХНОСТНИ МАРКЕРНИ БЕЛГЪЦИ .....	73
4. ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА КЛОНОГЕНЕН КЛЕТЪЧЕН РАСТЕЖ НА ПЪРВИЧНИ КУЛТУРИ ОТ МСК, ТРЕТИРАНИ С IFN $\gamma$ И КОНТРОЛНАТА ГРУПА НЕТРЕТИРАНИ МСК .....	74
4.1. <i>Оцветяване на колонии</i> .....	75
5. ПРОЛИФЕРАТИВЕН ТЕСТ НА ПЪРВИЧНИ КУЛТУРИ ОТ МСК, ТРЕТИРАНИ С IFN $\gamma$ И КОНТРОЛНАТА ГРУПА НЕТРЕТИРАНИ МСК .....	75
6. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПРОЦЕНТ АПОПТИЧНИ КЛЕТКИ В КУЛТУРИ ОТ МСК, ТРЕТИРАНИ С IFN $\gamma$ И КОНТРОЛНАТА ГРУПА НЕТРЕТИРАНИ МСК .....	76

7.	ЦИТОГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА КЛЕТКИ ТРЕТИРАНИ С IFN $\gamma$ И КОНТРОЛНАТА ГРУПА НЕТРЕТИРАНИ МСК ОТ ПЪПНА ВРЪВ.....	77
8.	ОСТЕГЕННА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ НА ТРЕТИРАНИ С IFN $\gamma$ МСК, ИНДУЦИРАНА ЧРЕЗ СПЕЦИФИЧНИ ХИМИЧНИ СРЕДСТВА И КОНТРОЛНАТА ГРУПА НЕТРЕТИРАНИ МСК .....	78
8.1.	<i>Доказване на алкално-фосфатазна активност.....</i>	79
8.2.	<i>Оцветяване по von Kossa.....</i>	79
8.3.	<i>Оцветяване с ализарин ред .....</i>	80
9.	АДИПОГЕННА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ НА ТРЕТИРАНИ С IFN $\gamma$ МСК, ИНДУЦИРАНА ЧРЕЗ СПЕЦИФИЧНИ ХИМИЧНИ СРЕДСТВА И КОНТРОЛНАТА ГРУПА НЕТРЕТИРАНИ МСК .....	80
9.1.	<i>Оцветяване с Oil Red O.....</i>	81
10.	ИЗОЛИРАНЕ НА ЧОВЕШКИ МОНОНУКЛЕАРНИ КЛЕТКИ ОТ ПЕРИФЕРНА КРЪВ .....	81
	<i>Фигура 6. Схематично представяне на метода за изолиране на човешки мононуклеарни клетки от периферна кръв.....</i>	82
11.	ФЛОУЦИТОМЕТРИЧЕН АНАЛИЗ НА РВМС КО-КУЛТИВИРАНИ С МСК В ПРИСЪСТВИЕ НА IFN $\gamma$ И КОНТРОЛНАТА ГРУПА НЕТРЕТИРАНИ МСК.....	82
12.	ПОЛУЧАВАНЕ НА КОНДИЦИОНИРАНА СРЕДА ОТ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ .....	84
13.	ИЗСЛЕДВАНЕ НА КОНДИЦИОНИРАНИ СРЕДИ ЗА НАЛИЧИЕТО НА IL-10, TGF $\beta$ И IDO. ....	85
13.1.	<i>Изследване на кондиционирани среди за наличието на IL-10.....</i>	85
13.2.	<i>Изследване на кондиционирани среди за наличието на TGF<math>\beta</math>1 .....</i>	88
13.3.	<i>Изследване на кондиционирани среди за наличието на IDO.....</i>	90
14.	СТАТИСТИЧЕСКА ОБРАБОТКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ.....	91
<b>РЕЗУЛТАТИ.....</b>		<b>93</b>
1.	ИЗОЛИРАНЕ И КУЛТИВИРАНЕ НА МСК ОТ ПЪПНА ВРЪВ .....	93
2.	ТРЕТИРАНЕ НА МСК С РАЗЛИЧНИ КОНЦЕНТРАЦИИ НА IFN $\gamma$ .....	95
3.	ФЕНОТИПИЗИРАНЕ НА МСК ОТ ПЪПНА ВРЪВ ТРЕТИРАНИ С IFN $\gamma$ .....	99
4.	МОРФОЛОГИЯ НА ТРЕТИРАНИТЕ С IFN $\gamma$ МСК ОТ ПЪПНА ВРЪВ .....	101
5.	КЛОНОГЕННА ЕФЕКТИВНОСТ НА МСК ОТ ПЪПНА ВРЪВ ТРЕТИРАНИ С IFN $\gamma$ .....	103
6.	РАСТЕЖНА КРИВА И ГЕНЕРАЦИОННО ВРЕМЕ НА КЛЕТЪЧНИТЕ КУЛТУРИ ТРЕТИРАНИ С IFN $\gamma$ .....	105
7.	ТЕСТ ЗА КЛЕТЪЧНА АПОПТОЗА .....	107
8.	ЦИТОГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА КЛЕТКИ ТРЕТИРАНИ С IFN $\gamma$ И КОНТРОЛНАТА ГРУПА НЕТРЕТИРАНИ МСК.....	109
9.	ОСТЕОГЕННА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ .....	110
10.	АДИПОГЕННА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ.....	113
11.	ИЗСЛЕДВАНЕ НА КОНДИЦИОНИРАНИТЕ СРЕДИ ОТ ЧОВЕШКИ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ТРЕТИРАНИ С IFN $\gamma$ И КОНТРОЛНАТА ГРУПА НЕТРЕТИРАНИ МСК ЗА НАЛИЧИЕТО НА IL-10, TGF $\beta$ 1 И IDO. ....	115
12.	ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МАРКЕРИ ВЪРХУ Т ЛИМФОЦИТИ ПОД ВЛИЯНИЕТО НА IFN $\gamma$ .....	117
13.	ИЗСЛЕДВАНЕ НА КОНДИЦИОНИРАНИ СРЕДИ ОТ ЧОВЕШКИ РВМС КО-КУЛТИВИРАНИ С МСК ТРЕТИРАНИ С IFN $\gamma$ ЗА НАЛИЧИЕТО НА IL-10, TGF $\beta$ 1 И IDO. ....	121
<b>ОБСЪЖДАНЕ.....</b>		<b>123</b>
1.	МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ПЪПНА ВРЪВ – ХЕТЕРОГЕННА ПОПУЛАЦИЯ КЛЕТКИ .....	124
2.	ВЛИЯНИЕ НА IFN $\gamma$ ВЪРХУ ПРИРОДАТА И СВОЙСТВАТА НА МСК.....	128
2.1.	<i>Ефект на IFN<math>\gamma</math> върху морфологията на МСК от пълна връв.....</i>	129
2.2.	<i>Ефект на IFN<math>\gamma</math> върху фенотипа на МСК от пълна връв .....</i>	129
2.3.	<i>Ефект на IFN<math>\gamma</math> върху генната експресия на МСК .....</i>	130

2.4.	<i>Ефект на IFN<math>\gamma</math> върху пролиферацията и клоногенността на МСК от пънна връв.....</i>	130
2.5.	<i>Ефект на IFN<math>\gamma</math> върху диференциацията на МСК от пънна връв.....</i>	131
2.6.	<i>Ефект на IFN<math>\gamma</math> върху степента на апоптоза на МСК от пънна връв.....</i>	133
2.7.	<i>Влияние на IFN<math>\gamma</math> върху хромозомната стабилност на МСК от пънна връв.....</i>	135
3.	<b>ЕФЕКТ НА IFN<math>\gamma</math> ВЪРХУ МСК И ТЕХНИТЕ ИМУНОМОДУЛИРАЩИ СВОЙСТВА .....</b>	<b>137</b>
3.1.	<i>Мезенхимни стволови клетки във възпалителната микросреда.....</i>	138
3.2.	<i>Ефект на IFN<math>\gamma</math> върху експресията на МНС клас I и клас II.....</i>	139
3.3.	<i>Ефект на IFN<math>\gamma</math> върху експресията на PD-L1 .....</i>	142
3.4.	<i>Ефект на IFN<math>\gamma</math> върху цитокиновата секреция на МСК.....</i>	144
3.5.	<i>Ефект на МСК<math>\gamma</math> върху Т лимфоцити .....</i>	146
3.6.	<i>МСК като „сензори и превключватели“ на възпалението.....</i>	151
4.	<b>ТЕРАПЕВТИЧНИ ПЕРСПЕКТИВИ И ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА НА МСК<math>\gamma</math>.....</b>	<b>152</b>
	<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>155</b>
	<b>БИБЛИОГРАФИЯ.....</b>	<b>157</b>
	<b>ИЗВОДИ .....</b>	<b>181</b>
	<b>ПРИНОСИ .....</b>	<b>182</b>
I.	ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР .....	182
II.	ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР .....	182
III.	ПРИНОСИ С ДИСКУТАБИЛЕН ХАРАКТЕР .....	182
	<b>ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ .....</b>	<b>183</b>
1.	ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....	183
2.	УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....	183
3.	УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....	184

## ВЪВЕДЕНИЕ

*Областта на изследване на стволовите клетки се разраства изключително бързо от началото на 21-ви век, с много нови и удивителни открития, представляващи най-възбуждащите аспекти на биологичните и биомедицинските изследвания. Забележително е, че областта на изследване на стволовите клетки нараства над два пъти по-бързо (7%) от отчетения среден световен ръст в научните изследвания, който е 2.9% за периода 2008 год. - 2012 год.*

*Мезенхимните стволови клетки (МСК) предизвикват голям интерес сред учените през последните години по няколко причини. Те имат потенциал за самообновяване и могат да бъдат получени от множество източници като костен мозък, мастна тъкан, тъкан от пъпна връв, кожа, мускули и зъбна пулпа. Те също така притежават *in vitro* капацитет за диференциация като могат и да се трансдиференцират в различни типове клетки, включително нервни клетки, инсулин-продуциращи  $\beta$  клетки и хепатоцити. Понастоящем няма етични казуси относно изолирането и използването на МСК, което допълнително насърчава учените да търсят подходящи начини за използване на тези клетки за лечение на различни заболявания.*

*Може би най-интригуващият аспект от природата на МСК, който все още не е напълно разбран, е свързан с техните имуномодулиращи функции. МСК модулират функциите на различни имунни клетки, включително Т и В клетки, макрофаги, дендритни клетки и NK клетки. Във възпалителна среда с високи нива на провъзпалителни цитокини, като  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  и  $IL-1\beta$ , МСК се активират и приемат имunosупресивен фенотип. Възпалението включва сложен набор от защитни механизми, действащи съвместно за възстановяване на хомеостатичния баланс в организмите след увреждане или инвазия на патоген. Няколко проучвания показват, че праймирането с възпалителни цитокини е от съществено значение за медираната от МСК имunosупресия. Именно поради това настоящият дисертационен труд имаше за цел да разбере и изследва дали и как човешки МСК изолирани от тъкан от пъпна връв се трансформират и реагират на процеса на възпаление, изучавайки техните основни характеристики и поведение, когато са третирани с ключовия провъзпалителен цитокин, интерферон- $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ).*

# ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

## 1. Видове класификации на стволови клетки

Стволовите клетки са клоногенни клетки, притежаващи две забележителни свойства, които им позволяват да поддържат тъканната хомеостаза: способност да се диференцират в различни клетъчни типове (потентност) (Odorico et al., 2001) и възможност да преминават през множество цикли на клетъчното делене като запазват недиференцираното си състояние (самообновяване) (Le Blanc & Ringdén, 2005). Дългосрочното самообновяване се определя като способността на клетката да се реплицира за продължителни периоди и през множество пасажи, като същевременно поддържа недиференцирано си състояние. Докато репликативният капацитет е от ключово значение за увеличаването на броя на стволовите клетки при подготовката за развитието на определена тъкан или орган с диференцирани клетъчни типове, той варира при всеки вид стволови клетки и дори в рамките на един и същ клетъчен тип в зависимост от средата, в която се намират клетките. Смята се, че раковите стволови клетки губят способността си да регулират митотичната си активност, което ги кара да се делят неконтролируемо.

Самообновяването на стволови клетки може да бъде симетрично (дъщерните клетки са идентични с майчината) и асиметрично (едната от дъщерните клетки е идентична с майчината, а другата се диференцира). Последното е известно още като задължителна асиметрична репликация и е изследвано задълбочено при нематода *Caenorhabditis elegans*. Функцията на асиметричното клетъчно делене е да допринесе както за разширяването на недиференцираната популация от стволови клетки, така и за населяване на развиващия се ембрион (или в някои случаи дори на зрели постнатални тъкани) с необходимите диференцирани клетъчни линии. Симетричното клетъчно делене — по-забележимо в хода на ембрионалното развитие, отколкото след раждането — води до увеличаване на популацията от недиференцирани стволови клетки за генериране на ембрионални тъкани и органи. При симетрично клетъчно делене всяка дъщерна клетка изглежда генетично и морфологично идентична една с друга и с майчината клетка. Това делене е по-характерно за плурипотентните ембрионални стволови клетки, отколкото за соматичните стволови клетки. Трябва да се отбележи, че симетричното и асиметричното делене на стволови клетки не се изключват взаимно.

Способността на стволовата клетка да се диференцира в различни линии е известна като потентност (Reubinoff et al., 2000). Тя може да придобие различни степени и определя може би най-важното свойство на стволовите клетки, което е способността им да осигуряват зрели, функционални типове клетки в тъканите и органите, необходими за оцеляването на организма. Според този потенциал стволовите клетки се делят на тотипотентни, плурипотентни, мултипотентни, олигопотентни и унипотентни:

а) *тотипотентни стволови клетки* - тотипотентността се определя като способността клетката да се диференцира както в ембрионални, така и в екстра-ембрионални тъкани. Тотипотентността понякога се нарича омнипотентност. Тотипотентните стволови клетки се получават веднага след сливането на яйцеклетката и сперматозоида и при бозайници се генерират в рамките на първите няколко клетъчни деления след оплождането. В контекста на развиващия се човешки ембрион, първата тотипотентна клетка е известна като зигота. Зиготата претърпява симетрично клетъчно делене, за да доведе до допълнителни тотипотентни клетки, всички от които имат способността да се диференцират в извънембрионални клетки и тъкани или в някой от трите първични зародишни слоя.

б) *плурипотентни стволови клетки* - клетките са плурипотентни, ако имат способността да се диференцират и в трите първични зародишни слоя (ендодерма, мезодерма, екзодерма), но не могат да допринесат за извънембрионални тъкани. Тези зародишни слоеве ще образуват специфични органи и тъкани при възрастния организъм. Плурипотентните стволови клетки са ембрионалните стволови клетки (ЕСК) и ембрионалните герминативни клетки (ЕГК), изолирани съответно от вътрешната клетъчна маса на бластоциста и от примордиалните герминативни клетки на ранен ембрион. Те произхождат от плурипотентна клетъчна популация, поддържат нормален кариотип, могат да се делят за неопределено време, като са способни спонтанно да се диференцират в соматични клетки, представителни за всичките три ембрионални зародишни слоя.

в) *мултипотентни стволови клетки* – мултипотентните стволови клетки могат да се диференцират в ограничен брой клетки, произхождащи от един зародишен слой. Тези клетки обикновено се намират в защитени тъканни пространства наречени ниши и са на етап G<sub>0</sub> от клетъчния цикъл (L. Li & Xie, 2005; Nauta & Fibbe, 2007). В някои случаи мултипотентните клетки имат ограничена способност за делене и стареят след определен брой клетъчни деления. Установено е, че мултипотентните стволови клетки се ангажират със специфични линии при излагане на подходящи условия на околната

среда, благоприятстващи развитието на линията. Мултипотентните клетки са преобладаващи в организма на възрастните, тъй като те често са необходими за попълване на различни видове диференцирани клетки, които намаляват с времето. Примерите за мултипотентни стволови клетки включват хематопоеични стволови клетки (ХСК) – които са в основата на различни типове зрели кръвни клетки – мезенхимни стволови клетки – които са източник на диференцирани хондроцити, остеоцити и адипоцити. Мезенхимните сърдечно-специфични стволови клетки се диференцират в кардиомиоцити, гладка мускулатура и ендотелни клетки.

з) *олигопотентни стволови клетки* – постембрионални тъканно-специфични стволови клетки, отличаващи се с ограничен потенциал за диференциация в няколко (обикновено две) органно-специфични клетъчни линии. Олигопотентните клетки често се срещат при възрастни организми. Съдовите стволови клетки, например, имат способността да се диференцират или в гладкомускулни, или в ендотелни клетки. Други примери за олигопотентни стволови клетки включват тези, които се намират в роговицата на бозайниците.

д) *прогениторни или прекурсорни клетки* (клетки предшественици, унипотентни стволови клетки) – имат способността да се диференцират само в един клетъчен тип. Тези клетки са склонни да бъдат диференцирани до степен, в която имат ограничена митотична активност. Унипотентните стволови клетки най-често присъстват в специфични тъканни компартменти на възрастния организъм, чиято цел е да осигури структурни или функционални компоненти на тази конкретна система. Един пример за унипотентни стволови клетки са клетките, присъстващи в най-външния слой на кожата при бозайниците. Унипотентната природа на стволовете клетки в епитела позволява да се използват за генериране на нова кожа *in vitro* за целите на трансплантацията. Друг пример за унипотентни стволови клетки са хепатоцитите. Хепатоцитите са уникални с това, че са диференцирани стволови клетки, които поддържат способността си да се делят и регенерират по-диференцирани клетки като могат да бъдат индуцирани да се разделят *in vitro* чрез добавяне на хепатоцитен растежен фактор (HGF).

Според стадия на развитие на организма, от който произлизат, стволовете клетки се подразделят на:

- *ембрионални стволови клетки (ЕСК)* - при бозайници ембрионалните стволови клетки могат да бъдат определени като плурипотентни клетки, присъстващи във или получени от вътрешната клетъчна маса (inner cell mass, ICM) на ембрионите в стадий бластоцист. Те се култивират *in vitro* в присъствие на специфични растежни фактори и

слой от подхранващи клетки (feeder cells). Както растежните фактори, така и подхранващите клетки (например миши фибробласти) са абсолютно необходими за осигуряване на размножаването на клетките и за тяхното поддържане в недиференцирано състояние.

- *ембрионални герминативни клетки* (ЕГК) - изолирани от примордиални клетки на ранен ембрион.

- *фетални стволови клетки* - могат да бъдат определени като примитивни клетки, присъстващи в органите и тъканите на развиващия се плод, които могат да доведат до диференцирани фенотипове. Изолирането на фетални стволови клетки и тяхното потенциално използване в терапевтични приложения е силно противоречиво, тъй като те обикновено се извличат от абортирана фетална тъкан.

- *амниотични стволови клетки* - мезенхимни по произход, мултипотентни и извлечени от амниотична течност.

- *постембрионални стволови клетки* (соматични стволови клетки) – клетки, които имат в различна степен проявени свойства на стволови клетки и могат да бъдат изолирани от различни тъкани и органи на възрастния индивид. Подобни клетки са изолирани и характеризирани от костен мозък (Gneschi & Melo, 2009), кръв от пъпна връв, централна нервна система (Weiss et al., 1996), кожа (Toma et al., 2001), мускули (Fukada et al., 2013), плацентата (Fukuchi et al., 2004), космен фоликул (Morris et al., 2004) и др.

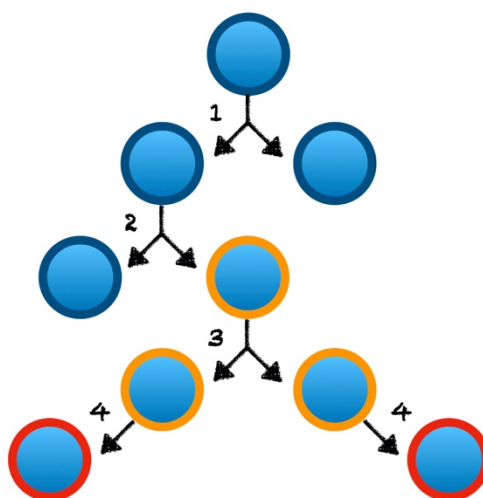
- *индуцирани плурипотентни стволови клетки* (induced pluripotent stem cells, iPSC) – най-често се използват кожни фибробласти, които са препрограмирани обратно в ембрионално плурипотентно състояние.

- *ракови стволови клетки* - дефинират се като стволови клетки, присъстващи в различни видове тумори, които са способни да се самообновяват и могат да доведат до клетъчен тип или типове клетки, присъстващи в конкретен тумор.

## **2. Откриване и произход на соматичните стволови клетки**

James и Ernest откриват съществуването на соматичните стволови клетки („сома“ е гръцка дума, означаваща „тяло“) в популация от клетки на миши костен мозък. Това откритие поставя основата за това, което скоро ще се превърне в революция в изследванията на стволови клетки и ще доведе до откриването на стволови клетки от различни други тъкани на възрастни организми. Тези клетки присъстват в цялото тяло в различни недиференцирани състояния в зависимост от произхода си. Соматичните

стволови клетки (ССК) имат по-ограничена способност да се диференцират в крайни, зрели линии в сравнение с ембрионални стволови клетки. Те често са мулти- или унипотентни по природа, като функционират като ресурс само за един или няколко диференцирани клетъчни типа. Подобно на изолираните от Till и McCulloch стволови клетки от костен мозък на мишки, много ССК също проявяват неограничен капацитет за делене, въпреки че някои клетъчни линии са склонни да стареят. ССК могат да встъпват, както в симетрично, така и в асиметрично клетъчно делене (Фигура 1). Съществуват много примери за ССК, които са получени от различни тъкани и органи (Meirelles et al., 2006).



*Фигура 1. Диаграмна илюстрация на деленето на соматични стволови клетки*

*(1) Симетрично клетъчно делене, в резултат на което се получават две идентични дъщерни стволови клетки. (2) Асиметрично клетъчно делене, което води до една идентична дъщерна клетка и една прогениторна клетка. (3) Симетрично клетъчно делене, което води до две идентични дъщерни прогениторни клетки. (4) Терминална диференциация на прогениторни клетки в зрели линии.*

Всеки от типовете клетки, изолиран от даден орган/тъкан, е уникален по произход и свойства. Това се дължи на една особеност, известна като ниша на стволите клетки, която се дефинира като микросреда, в която се намират стволите клетки. Тази ниша осигурява необходимите сигнални събития за растеж и диференциация, които са благоприятни както за клетъчно делене, така и за диференциация (L. Li & Xie, 2005).

### 3. Мезенхимни стволови клетки

Мезенхимът е вид тъкан, която се състои от клетки, вградени в извънклетъчен матрикс и мрежа от протеини. Свободната, течна природа на мезенхимната тъкан ѝ позволява да мигрира между зародишните слоеве по време на ембрионалното и феталното развитие. Мезенхимът дава началото на съединителна тъкан, кости, хрущял, лимфна и сърдечносъдова системи. Основната част от мезенхима е получена от мезодермата, докато малка част произлиза от ектодермата. Мезенхимните стволови клетки се дефинират като мултипотентни стромални клетки, произлизащи от мезенхима и могат да бъдат изолирани от различни източници. Те са малки, с голямо кръгло ядро, имат тънки израстъци и приличат на фибробласти. Ядрото често има голямо, видимо ядърце.

#### 3.1. История на мезенхимните стволови клетки

Историята на мезенхимните стволови клетки започва с работата на Friedenstein, който за първи път ги идентифицира в костен мозък от плъх и ги нарича „остеобласти“ (Friedenstein et al., 1968). По късно използвайки модел на морско свинче, същата група доказва, че трансплантирани клетки изолирани от костен мозък, водят до ектопично развитие на нехемопоеична мезенхимна тъкан в подкапсулното бъбречно пространство. Впоследствие били проведени редица проучвания, за да се потвърди образуването на колонии и способността за адхезия на тези клетки (Friedenstein et al., 1976; Friedenstein et al., 1970). Десет години по-късно подобни клетки били открити и в човешки костен мозък (Castro-Malaspina et al., 1980). Caplan нарича клетките със способност за самообновяване и *in vitro* потенциал за многолинейна диференциация „мезенхимни стволови клетки“ (Caplan, 1991). През следващото десетилетие серия от проучвания се фокусират върху изучаване на свойствата на МСК, но едва през 1997 г. е доказана *in vivo* способността на МСК от човешки костен мозък (КМ-МСК) да образуват кост (Kuznetsov et al., 1997).

Откакто е приета номенклатурната „MSC“ (МСК), коректността на наименованието предизвиква безпокойство сред учените. За да разреши този казус, Международното дружество за клетъчна терапия (International Society for Cellular Therapy, ISCT) дава нов термин „мезенхимни стромални клетки“, към които спадат всички мезенхимни клетки, които прилепват към пластмаса за клетъчно култивиране, без значение от произхода и тъканта, но само когато стволовият произход е демонстриран чрез ясно определени критерии, тези клетки могат вече да бъдат наречени

„мезенхимни стволови клетки“ (E. M. Horwitz et al., 2005). През следващата година ISCT публикува минимални критерии за дефиниране на човешки мезенхимни стволови клетки, които включват: прилепване към пластмаса, специфична експресия на повърхностни антигени и потенциал за мултипотентна диференциация (Dominici et al., 2006). Въпреки това, на този етап липсва категорично и единодушно приет набор от критерии определящи МСК, като най-използваните сред тях са:

- Прилепване към пластмаса при нормални условия за клетъчно култивиране;
- Фибробластоподобна морфология;
- Клоногенност;
- Способност да се диференцират остеогенно, адипогенно и хондрогенно;
- Експресират следните повърхностни маркери: CD73, CD90 и CD105;
- Не експресират: CD45, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD79a и HLA-DR;

Следва период, през който изследователите се интересуват главно от функцията на МСК и дали трансплантацията на МСК може да подобри ефекта при присаждане на хемопоеични стволови клетки (Chao et al., 2012; Le Blanc et al., 2007). Данните в научната литература убедително доказват, че поради своята мултипотентност, МСК могат да се използват за възстановяване на тъкани при различни увреждания (J. Nan et al., 2015; Martino et al., 2016). След като е открито и свойството на МСК да секретират цитокини, е проучена ролята им в имуномодулацията и поддържането на хомеостазата (Davies et al., 2017; K. Zhao et al., 2015). Важно е да се спомене, че през 2016 г. ISCT прави изявление, в което подчертава, че условията на култивиране могат да повлияят на функциите на МСК, така че клиничното им приложение трябва да бъде добре изследвано (Martin et al., 2016).

### **3.2.Източници**

Въпреки че първоначално МСК са били изолирани от костен мозък, множество фетални и възрастни тъкани съдържат МСК, включително кожа (Riekstina et al., 2008), зъбна пулпа (S. Shi & Gronthos, 2003), мускул (Jackson et al., 1999; Qu-Petersen et al., 2002), пъпна връв (Kestendjieva et al., 2008), ендометриум (Gargett & Masuda, 2010), децидуа (Dimitrov et al., 2010), амнион (Miki & Strom, 2006) и сърце (Messina et al., 2004). Важно е да се отбележи, че МСК, изолирани от различни източници, не са еднакви. Фактори като източника и методологията на изолиране могат да повлияят на морфологията и функциите на изолираните клетки.

### 3.3. Потенциал за диференциация

Както беше споменато по-горе, за да бъде класифицирана една клетка като МСК, тя трябва да може да се диференцира в мезодермални костни, хрущялни или мастни производни. МСК изолирани от различни органи и тъкани запазват способността си да се диференцират в различни мезодермални линии като адипоцити, остеоцити и хондроцити, но също така могат да се диференцират в немезодермални линии като неврони (процес известен като трансдиференциация).

Насочването на диференциацията на МСК *in vitro* се влияе до голяма степен от условията на култивиране, особено от растежните фактори. Растежните фактори, които имат регулаторен ефект върху МСК, включват членове на суперсемејството на TGF $\beta$ , инсулиноподобните растежни фактори (IGF) (Matsuda et al., 2005), фиброблатен растежен фактор (FGF) (Ito et al., 2008), епидермалния растежен фактор (EGF) (Kratchmarova et al., 2005), тромбоцитният растежен фактор (PDGF), съдовият ендотелен растежен фактор (VEGF) (J. W. Liu et al., 2007) и семейството на растежните фактори, известни като Wnt.

Ясно е, че са необходими различни индуциращи фактори и механизми за *in vivo* спрямо *in vitro* диференциацията на мезенхимни стволови клетки в костни или мастни линии. Това най-вероятно се дължи на разликите между естествената и изкуствената среда на двете системи. Йонните концентрации, рН и концентрацията на кислорода също играят роля в насочването на диференциацията на МСК. При хората, например, МСК се намират в хипоксична среда, която има тенденция да инхибира остеогенезата, докато хондрогенезата не е засегната.

#### 3.3.1. Остеогенеза

Като се имат предвид терапевтичните перспективи свързани с МСК, са проведени много изследвания върху остеогенния потенциал на МСК и са открити няколко важни индуциращи молекули, които ефективно стимулират ангажираността и съзряването на МСК в остеообласти. Те включват:

- 1,25-дихидроксивитамин D<sub>3</sub> + аскорбат-2-фосфат +  $\beta$ -глицерофосфат;
- $\beta$ -глицерофосфат + аскорбинова киселина + дексаметазон;
- Аскорбат-2-фосфат + дексаметазон +  $\beta$ -глицерофосфат;

Сигналната молекула Wnt10b и свързаният транскрипционен фактор Runx2 са идентифицирани като ключови регулатори при решаването към кой диференциран

клетъчен тип (адипоцит или остеобласт) да се премине. Runx2, известен също като CBF- $\alpha$ -1, е транскрипционен фактор, за който е доказано, че е от съществено значение както за диференциацията на клетките в остеобласти, така и за по-късния етап на скелетната морфогенеза. Индуцираната експресия на Runx2 от стероиди като дексаметазон едновременно инхибира адипогенезата и инициира ангажирането на МСК с пре-остеобластна съдба (Fang, 2012).

### 3.3.2. Адипогенеза

Проучвания *in vitro* открояват три основни индуктора на МСК-базирана адипогенеза, които са необходими: синтетичния глюкокортикоид дексаметазон, противовъзпалителното лекарство индометацин и инсулин. Докато дексаметазонът индуцира крайната диференциация на МСК в адипоцити на по-късен стадий, индометацинът задвижва активирането на рецептора PPAR $\gamma$ , който инициира обвързване на МСК с преадипоцити (Yuan et al., 2016). PPAR $\gamma$  е ядрен рецепторен транскрипционен фактор, който хетеродимеризира с ретиноидния X рецептор, за да регулира транскрипцията на гени, участващи в клетъчното развитие, диференциация, метаболизъм и дори развитие на тумор. Инсулинът активира адипогенезата чрез свързване с IGF-1, което води до фосфорилиране на cAMP-свързващия протеин (CREB) от PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase). CREB действа и за стимулиране на PPAR $\gamma$ . В допълнение, инсулинът индуцира фосфорилирането на анти-адипогенните транскрипционни фактори FOXO1 и FOXA2, което води до тяхната транслокация от ядрото и намалява ефекта на инхибиране на диференциацията на МСК в адипоцити.

Съществуват и други сигнали от околната среда, които са уникални и могат да доведат до активиране на адипогенезата на мезенхимните стволови клетки. Например, контактът клетка:клетка насърчава адипогенезата пред остеогенезата. В допълнение, триизмерната структура на извънклетъчния матрикс може да наклони към адипогенни срещу остеогенни събития. За разлика от остеогенезата, която се стимулира от твърди скелетни структурни, адипогенезата се насърчава от мека структурна геометрия.

### 3.3.3. Хондрогенеза

Аскорбатът, инсулинът, трансферинът, селеновата киселина и трансформиращият растежен фактор- $\beta$  (TGF $\beta$ ) са индуктори на хондрогенезата (Johnstone et al., 1998). По отношение на хондрогенезата, най-мощните индуктори са от семейството на TGF $\beta$ , включително TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3, както и костни

морфогенетични протеини (bone morphogenetic proteins, BMP). За човешките МСК, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3 са по-активни от TGF $\beta$ 1 за стимулиране на хондрогенезата, като значително повече протеогликани и колаген тип II могат да бъдат произведени след стимулиране с първите два цитокина (F. Barry et al., 2001). BMP (Bone morphogenetic proteins), известни с участието си в образуването на хрущял, могат да действат самостоятелно или съвместно с други растежни фактори, за да индуцират или подобрят хондрогенната диференциация на МСК. Например, BMP-2, BMP-4 или BMP-6, комбинирани с TGF $\beta$ 3, индуцират хондрогенен фенотип в култивирани КМ-МСК, като BMP-2 има най-изразен ефект (Sekiya et al., 2005). МСК, получени от мастна тъкан, не експресират TGF $\beta$  тип I рецептор и имат намалена експресия на BMP-2, BMP-4 и BMP-6 в сравнение с КМ-МСК. Следователно, добавянето на BMP-6 и TGF $\beta$  е необходимо за тяхната хондрогенна диференциация, като BMP-6 е по-силният стимулатор за хондрогенна диференциация (Hennig et al., 2007).

Регулаторните сигнали на растежните фактори се осъществяват чрез специфични пътища на сигнална трансдукция, които контролират транскрипционните фактори надолу по веригата. По отношение на индуцираната от растежни фактори хондрогенна диференциация, известно е, че различни вътреклетъчни сигнални пътища, като митоген-активирани протеин кинази (MAPK) и Smads, се активират, които индуцират няколко специфични транскрипционни фактора (Sox9, Sox5 и Sox6). Това от своя страна води до производството на протеини от извънклетъчния матрикс (ECM), включително колаген тип II, агрекан и олигомерен матричен протеин на хрущяла, които са необходими за образуването на хрущяла. Sox9 е една от най-важните молекули за експресията на хрущялния фенотип. Доказано е, че експресията на Sox9 в МСК, получени от костен мозък, води до повишено отлагане на протеогликан (Tsuchiya et al., 2003).

#### ***3.4. Мезенхимните стволови клетки като модулатори участват в тъканната хомеостаза и регенерация***

МСК са локализиращи в периваскуларните пространства, като тази локализация им дава възможност за достъп, до на практика всички тъкани и следователно възможност за комуникация с множество клетъчни типове и участие в процесите на регенерация на тъканите. Интензивните изследвания в областта на приложението на МСК очертават някои особено интересни клинични направления, част от резултатите, от които са:

- Мезенхимни стволови клетки при увреждане на миокарда

МСК култивирани в условия на хипоксия, са тествани върху сърце на маймуни с инфаркт. Деветдесет дни след първата инжекция размерът на инфаркта и функцията на лявата камера, както и пролиферацията на кардиомиоцитите, съдовата плътност и усвояването на глюкоза, били значително подобрени в сравнение с контролната група (Hu, Xu, et al., 2016). При миши модел на миокарден инфаркт, интравенозно инфузираните човешки МСК оказват ефект, отчасти защото МСК, уловени в белия дроб, се активират и секретират TSG6 и други протеини, които потискат възпалителните реакции (Ortiz et al., 2007).

- Мезенхимни стволови клетки при остеоартрит и възстановяване на хрущяла

Терапията със стволови клетки, базирана на хондрогенни прогениторни клетки, е проучена за регенерация на хрущяла при остеоартрит (ОА) (Koelling et al., 2009). Рекombинантният Atstrin (антагонист на TNF-TNFR сигнализацията), експресиран от МСК, е нов TNF $\alpha$  блокер и има хондропротективна роля, което води до подобряване на хода на развитие на ОА (Xia et al., 2015). Човешки МСК, инжектирани вътреставно, се активират и водят до подобряване на регенерацията на менискуса на плъх (Horie et al., 2012). Забавеното зарастване на фрактури може да бъде предотвратено чрез МСК, смесени с богата на тромбоцити плазма (Liebergall et al., 2013). Orozco et al. проследяват 12 пациенти след интраартикуларно инжектиране на МСК. Приложението на МСК се приема за безопасно и резултатът показва, че 65%-78% от пациентите показват бързо и прогресивно подобрене и повечето от тях имат подобрене в качеството на хрущяла (Orozco et al., 2013). Резултатите от двугодишното проследяване на пациентите показват, че качеството на хрущяла се е подобрило допълнително (Orozco et al., 2014).

- Мезенхимни стволови клетки при чернодробно заболяване

Трансплантацията на МСК може да се използва като потенциално лечение за чернодробно увреждане. Проучване (фаза II) оценяващо ефектите на КМ-МСК, трансплантирани при пациенти с цироза, показва, че три и шест месеца след операцията пациентите имат частично подобрене на чернодробната функция (El-Ansary et al., 2012). При друго проучване тридесет до петдесет милиона МСК са инжектирани на осем пациенти в краен стадий на чернодробно заболяване. Според резултатите, серумният албумин, билирубинът и оценката на чернодробната функция са подобрени (Kharaziha et al., 2009). При 54,5% от пациентите с алкохолна цироза се наблюдават хистологични

подобрения след инжектиране на КМ-МСК и нивата на TGF $\beta$ , колаген тип I и актина на гладката мускулатура намаляват (Y. O. Jang et al., 2014).

- Мезенхимни стволови клетки при стомашно-чревни заболявания

Един пример за приложението на МСК при стомашно-чревни заболявания е при пациенти, страдащи от аутоимунното заболяване болест на Crohn. Включените в проучването пациенти получили интравенозни инфузии с алогенни МСК седмично в продължение на 4 седмици. Четиридесет и два дни след първото приложение на МСК, 8 (от общо 15) са имали клинична ремисия, а останалите 7 са имали ендоскопско подобрене (Forbes et al., 2014).

МСК обикновено се прилагат за лечение на заболявания чрез системна инфузия. Въпреки че този метод води до увеличаване на ефективността на лечението, има малко преки доказателства, че МСК се диференцират в увредени тъканни клетки. Horwitz и Dominici обобщават ролята на секрецията на цитокини от МСК в регенерацията на тъканите (E. Horwitz & Dominici, 2008) и оттогава все повече и повече проучвания се фокусират върху секретото на МСК.

КМ-МСК са първият описан вид МСК, които могат да регулират тъканите, главно с участието си в поддържането на микросредата на ХСК. Доказано е, че човешките МСК възстановяват функционалната човешка хематопоеична микросреда в NOD-SCID мишки (Muguruma et al., 2006). Смята се, че CD146<sup>+</sup> МСК са специфичната популация, която допринася за поддържането на хематопоеичната микросреда, тъй като те имат способността да образуват хематопоеична ниша в хетеротопни места след трансплантация и силно експресират ангиопоетин-1, който е основна молекула на нишата на ХСК (Sacchetti et al., 2007).

#### **4. Имуномодулиращи ефекти на мезенхимни стволови клетки**

Тъй като МСК могат да секретират различни хемотактични фактори и да експресират ниски нива на молекулите от главния комплекс за тъканна съвместимост тип II, имуномодулаторната им способност привлича много внимание. Множество публикации показват, че МСК участват както във вродения, така и в адаптивния имунен отговор, чрез взаимодействието си с моноцити, поляризация на макрофаги и стимулиране на образуването на регулаторни Т клетки. Те не само водят до потискане на имунния отговор, но могат и да проявяват провъзпалителни ефекти в зависимост от специфичната възпалителна среда, в която се намират.

Компонентите на имунната система, като имунни молекули и имунни клетки, защитават организма от нахлуване на екзогенни патогени и клетъчно малигнизирание. Недостатъчно стимулираната имунна система не може да защити гостоприемника. Въпреки това, свръхстимулацията би довела до атака насочена към здравите клетки и структури на организма, което води до увреждане на тъкани и органи. Следователно имунният отговор трябва да бъде строго регулиран чрез различни пътища. Разкриването на подробните механизми на тази регулаторна мрежа е от решаващо значение за разбирането на патогенезата на заболяванията, свързани с имунна дисфункция и разработването на нови терапевтични стратегии. Доказано е, че няколко клетъчни популации предотвратяват свръхстимулацията на имунната система, сред които са CD4<sup>+</sup> Treg (T регулаторни клетки) (Miyara et al., 2014), CD8<sup>+</sup> Treg (S. Li et al., 2014), Breg (B регулаторни клетки) (Mauri & Bosma, 2012), M2 макрофаги (Vieira-Potter, 2014) и толерогенни дендритни клетки (García-González et al., 2016). Тези клетки модулират имунната реакция чрез секреция на имunosупресивни цитокини, като IL-10, TGFβ, IL-35, инхибиторни лиганди и рецептори (като PD-1 и PD-L1, CTLA-4 и CD28) и чрез директно регулиране на диференциацията, съзряването и оцеляването на имунните клетки.

Доказано е, че МСК също представляват един тип клетки за възпрепятстване на свръхстимулация на имунната система. Имunosупресивната активност на МСК се отключва предимно от провъзпалителни фактори, като IFNγ, TNFα и IL-1β (Bernardo & Fibbe, 2013). Сред тези фактори, IFNγ е особено важен за имunosупресивната функция на МСК (Krampera, 2011). IFNγ стимулира МСК да експресират имунните инхибитори PD-L1 и PD-L2 (Programmed death ligand 1 и 2) и понижава експресията на ILTRs (immunoglobulin-like transcript receptors).

Мезенхимните стволови клетки имат намалена или липсваща експресия на антиген-представящи молекули (МНС-I, МНС-II), костимулатори (CD80, CD86, CD40, CD40L) и FasL (Ren et al., 2008). Те експресират много хемокини и адхезионни протеини за привличане на клетки на имунната система, като CXCR3 лиганди, CCR5 лиганди, ICAM-1 и VCAM-1 (Ren et al., 2008). МСК биха могли да потиснат възпалителния процес, отчасти чрез понижаване на провъзпалителните фактори и повишаване на противовъзпалителните фактори. Освен това тези клетки могат да потискат имунните реакции и чрез директен клетъчен контакт.

Интензивните изследвания в областта показват, че микросредата може да превключва МСК между провъзпалителен и противовъзпалителен фенотип. МСК

изпълняват провъзпалителни функции в ранния стадий на възпалението чрез набиране на неутрофили (Kolaczowska & Kubes, 2013). Провъзпалителните МСК активират Т-клетките чрез секретирание на MIP-1 (макрофагов възпалителен протеин-1), CCL5, CXCL9 и CXCL10 и привличане на повече лимфоцити (Y. Wang et al., 2014). На този етап има ниски нива на сигналите за възпаление, като TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ . Това се потвърждава от данните, че МСК, получени от костен мозък и пъпна връв, стимулират имунния отговор, когато се третират с ниски нива на IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  и не могат да произведат достатъчно iNOS или IDO (индолеамин 2,3-диоксигеназа) за потискане на лимфоцитите (W. Li et al., 2012). Въпреки това, когато IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  достигнат високи нива, те стимулират МСК да секретират iNOS (при мишки) или IDO (при хора), което води до инхибиране на Т-клетъчната пролиферация и индукция на Tregs. Следователно концентрацията на IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  може да служи като отправна точка за изследване на про- и противовъзпалителните ефекти на МСК.

В заключение, мезенхимните стволови клетки могат да насърчат възпалението, когато имунната система е недостатъчно активирана или да ограничат възпалението, докато имунната система е свръхактивирана. Тази активност е известна още като функция на „сензор и превключвател на имунната система“ (“sensor and switcher of the immune system”) (Aggarwal & Pittenger, 2005). Терминирането на възпалението включва множество механизми, сред които най-широко изследваните включват действието на Т регулаторни клетки (Tregs), миелоидни регулаторни клетки, толерогенните дендритни клетки и алтернативно активирани макрофаги с регулаторни и репаративни свойства, които ще бъдат описани по-подробно в следващите страници.

#### ***4.1. Имуни клетки, модулирани от МСК***

МСК са в състояние да взаимодействат с широк спектър от клетки на имунната система. Потискането на възпалението от МСК може да се постигне чрез инхибиране както на вродения, така и на адаптивния имуноен отговор. МСК регулират много видове имуни клетки чрез имунните модулатори, експресирани от тях, включително дендритни клетки (DC), моноцити/макрофаги, В клетки, Breg (регулаторни В клетки), Т клетки, Treg (регулаторни Т клетки), Th1, Th2, Th17, NK, NKT, ILC (innate lymphoid cells, вродени лимфоидни клетки), MDSC (myeloid derived suppressor cells, миелоидни супресорни клетки), неутрофили и мастоцити (Najar et al., 2016) (Фигура 2).

Имуномодулиращите свойства на МСК ги отличават от други видове стволови клетки, включително хемопоеични клетки, ембрионални клетки и индуцирани

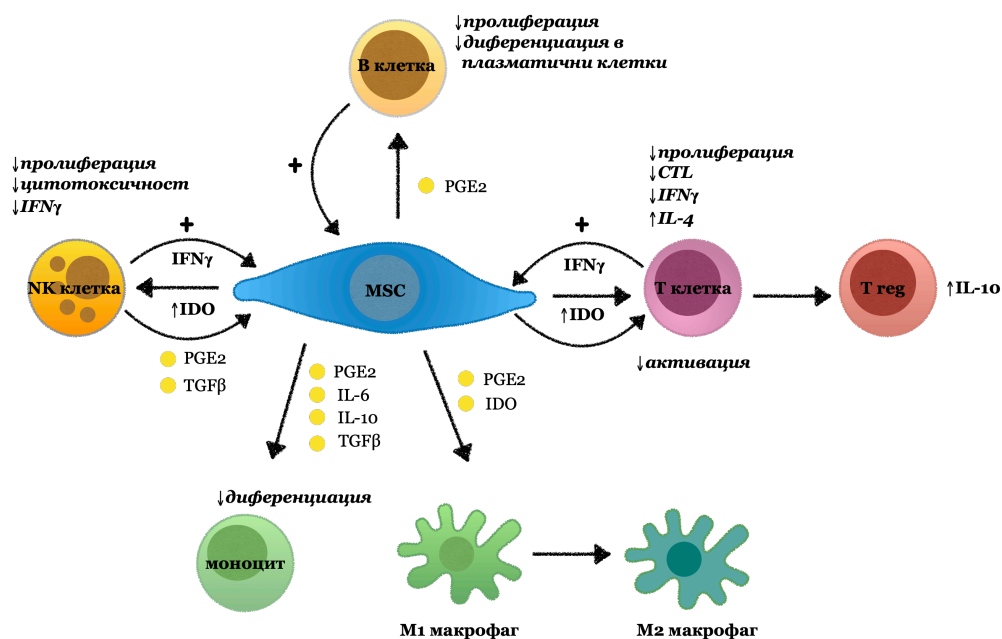
плюрипотентни стволови клетки. Освен това, много предклинични проучвания показват, че използването на МСК е ефективен начин за лечение на възпалителни заболявания, graft-versus-host disease (GVHD) и автоимунни заболявания (Kabat et al., 2020; Trounson & McDonald, 2015). Понастоящем подробният механизъм на имunosупресивните свойства на МСК все още е неясен. Все повече доказателства сочат, че МСК могат да развият имunosупресивни свойства чрез регулиране на фенотипите и функциите на вродените и адаптивните имунни клетки. В микросредата, регулирана от МСК, Т клетките се трансформират в Treg фенотип; макрофагите в имунорегулаторен M2-фенотип; NK клетките се потискат и МСК могат да потиснат формирането на имуноглобулини и да увеличат производството на регулаторни В клетки (Bregs) (Abdelrazik et al., 2012; H. Li et al., 2015; Y. Li, Kong, et al., 2019; O. Liu et al., 2013).

Най-общо МСК влияят върху регулацията на имунния отговор чрез фактори действащи чрез пряк междуклетъчен контакт между МСК и клетките мишени, и секреторни фактори. Известно е, че двата вида фактори действат съвместно, като влиянието на секреторните фактори е по-широко изследвано от това на прекия контакт, заради по-достъпните и информативни лабораторни методи.

Смята се, че основният начин за постигане на имуномодулаторните ефекти на МСК се крие в секрецията на имуномодулиращи молекули като индолеамин 2,3-диоксигеназа (IDO), простагландин E2 (PGE2), цитокини (TGF $\beta$ , IL-10) или други разтворими фактори (TSG6, IL-1Ra, sTNFR1). Повечето от проучванията съобщават, че разтворимите фактори са в състояние да инхибират клетките на имунната система при *in vitro* условия. Изследванията проведени чрез transwell система (клетките нямат пряк контакт помежду си, но секреторните фактори преминават свободно) доказват, че междуклетъчният контакт не е от първостепенно значение за имunosупресивната функция на МСК, за разлика от секреторните фактори. Това се потвърждава при част от проведените *in vivo* проучвания, в които се описва, че системно инфузираните МСК обикновено са локализирани в капилярната система на белите дробове, като рядко се задържат в увредените тъкани, докато секреторните им ефекти обикновено се запазват за значителен период от време.

Важно е да се отбележи, че контактът между МСК и имунните клетки е двупосочен, като са описани различни молекули, които участват в тези взаимодействия, като ICAM-1, PD-1 и PD-1L, както и CTLA-4 и CD28. Подробно описание на клетките,

които са обект на действието на МСК, както и мембранните и секреторните фактори участващи в процесите на имуномодулация, е направено в следващите страници.



Фигура 2. МСК и основните имунни клетки, обект на тяхното контактено и секреторно действие.

#### 4.1.1. Влияние на МСК върху моноцитите и макрофаги

Моноцитите произлизат от миелоидни прекурсорни клетки и представляват между 2 и 10% от циркулиращите левкоцити при хората. Това е популация от клетки предшественици на макрофагите и DC. Моноцитите и макрофагите са ключови имунни клетки, които регулират възпалението и регенерацията на тъканите. Непосредствено след нараняване голям брой от тези клетки се струпват в увредената тъкан и претърпяват бързи фенотипни и функционални промени. Кръстосаните разговори между МСК и моноцитите/макрофаги са от решаващо значение за регулирането на възпалението и възстановяване на хомеостазата в увредените тъкани.

Взаимодействията между МСК и моноцитите по време на вродения имунен отговор не са напълно разбрани. Въпреки това, има данни, че МСК оказват имunosупресивен ефект върху моноцитите. Така например, човешки моноцити, култивирани при условия, поддържащи тяхното съзряване (културална среда, обогатена с TNFα, GM-CSF и IL-4) заедно с МСК, имат намалена експресия на МНС клас II и костимулаторни молекули, намалена ендоцитоза и секреция на IL-12 (R. Jiang et al., 2011; Nauta et al., 2006; Y.-P. Li et al., 2008a; Saeidi et al., 2013; English et al., 2009).

Способността да стимулират алогенни Т клетки в MLR (mixed lymphocyte reaction) и Т-клетъчната антиген-зависима пролиферация също са намалени. В допълнение, мезенхимните стволови клетки инхибират моноцитната диференциация от CD34<sup>+</sup> ХСК (Spaggiari et al., 2009).

Така, както МСК въздействат на клетките на имунната система, така се наблюдава и обратното взаимодействие. Така например, има данни, че изчерпването на моноцитите прекратява имуносупресивните ефекти на МСК (Cutler et al., 2010; François et al., 2012) – резултати, които подкрепят хипотезата, че имуносупресивните ефекти на МСК се индуцират главно чрез модулация на моноцити/макрофаги от МСК и вследствие влияние на моноцити/макрофаги върху МСК.

При нормални условия макрофагите (Мф) патрулират в тъканите и улавят и усвояват остатъци, мъртви или апоптотични клетки или патогени (Gordon & Plüddemann, 2017). При получаване на сигнали за „опасност“, част, от които често се явява и секрецията на възпалителни цитокини, те регулират представянето на антигена заедно с костимулиращи молекули (L. Zhang & Wang, 2014). Има няколко вида Мф, които се различават по своето тъканно разпределение, произход и свойства и се активират при различни условия в зависимост от сигналите на околната среда. (Murray et al., 2014). Възпалителните, М1 макрофаги възникват след среща с бактериални или вирусни продукти или възпалителни цитокини и са в състояние да секретират провъзпалителни цитокини, които също така благоприятстват имунния отговор на Th1 клетките секретирани IL-12, TNF $\alpha$ , IFN тип I, IL-6 и др. От друга страна, Мф, активирани в присъствието на IL-4/IL-13 и/или имунни комплекси се отбелязват като М2 макрофаги, и са способни да секретират Th2 цитокини (като IL-10), да обновяват извънклетъчния матрикс, да стимулират растежа на кръвоносни съдове и миграцията на стволови клетки на мястото на увреждане на тъканите, и да стимулират възстановяването на тъканите (Mantovani et al., 2013; Sica & Mantovani, 2012). М2 макрофагите могат допълнително да бъдат разделени на М2а-, М2b- и М2с-тип Мф. М1 макрофагите се появяват в ранните фази на процесите свързани със заздравяване на рани (1-3 дни) и по-късно се заменят с М2 Мф (4-7 дни). Въпреки че няма ясно разграничение на М2 типовете Мф, всеки от които експресира М2 маркерите CD206 и CD163, се очаква те да имат различни функции в процеса на възстановяване на тъканите чрез секретиране на различни противовъзпалителни цитокини и хемокини (Lucas et al., 2010; Mirza et al., 2009; Summan et al., 2006; van Amerongen et al., 2007). Трябва да се отбележи, че диференциацията към

всички тези фенотипове е обратима и може да се постигне чрез промени във външните условия.

Едно от първите проучвания, които идентифицират взаимодействието между МСК и макрофагите, е направено от Kim et al. 2009. Те показват, че Мф, изолирани и култивирани от човешка периферна кръв и ко-култивирани с МСК, получени от човешки костен мозък (J. Kim & Hematti, 2009), повишават експресията си на CD206 и имат висока фагоцитна активност. Те също се характеризират с намалена експресия на TNF $\alpha$ , но висока експресия на IL-10 и CCL18.

Множество данни сочат, че макрофагите взаимодействат с МСК и участват във възстановяването на тъканите, като МСК могат да привличат макрофаги към възпалените места и да подобрят регенерацията на тъканите и имунната регулация (Chaturvedi et al., 2014; W. Liu et al., 2015; M. Wang et al., 2015). В ранния стадий на инфекция, макрофагите реагират бързо и освобождават възпалителни фактори, за да убият патогените. На този етап нивата на възпалителните фактори в тъканта са относително ниски; МСК реагират на ниското ниво на възпаление и се поляризират в провъзпалителен тип МСК (МСК1), секретират възпалителни цитокини, като IL-6 и IL-8. Когато нивата на възпалителните цитокини са достатъчни, МСК преминават в противовъзпалителен тип (МСК2) и секретират TGF $\beta$ , IL-10 и IDO, които поляризират провъзпалителните макрофаги (M1) до противовъзпалителни макрофаги (M2), които експресират високи нива на имunosупресивни фактори (като IL-10) и ниски нива на имунни активатори (като IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-23, CD86 и MHC II) (D.-I. Cho et al., 2014; Cutler et al., 2010; J. Kim & Hematti, 2009; Selleri et al., 2016). Описано е, че МСК, получени от костен мозък и плацента, могат да индуцират толерогенни моноцити и M2 макрофаги чрез експресия на IL-10 и B7-H4 (Hof-Nahor et al., 2012). Сигналният път на TGF $\beta$ , медиран от МСК, също участва в процеса на поляризация на макрофагите към M2 (Song et al., 2015). МСК реагират на възпалителните фактори и превключват макрофагите от M1 (провъзпалителни) към M2 (противовъзпалителни) и чрез CCL18 (С-С мотив лиганд 18) и PGE2 (Melief et al., 2013). PGE2, секретирани от МСК, се свързва със своите рецептори EP2 и EP4 върху макрофагите и активира интрацелуларни сигнални пътища за поляризиране на макрофагите към M2 фенотип (Nauta et al., 2006). МСК също секретират IL-1Ra, който може да има участие в потискане на имунния отговор и индуциране на поляризация на M2 макрофагите (Y. Chen et al., 2015). В

допълнение, чрез извънклетъчен везикул-медиран механизъм, МСК също насочват макрофагите към противовъзпалителен фенотип (Morrison et al., 2017)

Ефектът на поляризация на М2 макрофагите от МСК се засилва допълнително при стимулирането им с провъзпалителни фактори (Luz-Crawford et al., 2016) като IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и LPS. Освен това, активираните МСК секретират имunosупресивния фактор TSG-6 и инхибират активирането на новодиференцирани макрофаги (Choi et al., 2011). Описаният път се свързва със способността на TSG-6 да взаимодейства с CD44, експресиран върху макрофагите и в следствие се стига до намалена ядрена транслокация на NF- $\kappa$ B (Y. Chen et al., 2015).

При директно ко-култивиране с КМ-МСК се повишава експресията на Arg-1, IL-10 и TGF $\beta$  - маркери за диференциация на макрофаги тип 2 (Zheng et al., 2018). Друго проучване демонстрира повишен процент на CD206<sup>+</sup> и Arg-1-експресиращи Мф по време на активиране в МСК-кондиционирана среда в сравнение с клетките, култивирани при стандартни условия (Wolfe et al., 2016). Ortiz et al. показват, че МСК-кондиционирана среда може да инхибира секрецията на TNF $\alpha$  от активирани RAW-264.7 клетки (линия миши макрофаги). IL-1Ra е един от потенциалните медиатори на този ефект (Ortiz et al., 2007; Gao et al., 2014). Németh et al. изследват ефекта на МСК, получени от миши костен мозък, в миши модел на септицемия и показват, че LPS-стимулирани макрофаги произвеждат повече IL-10, когато се култивират съвместно с КМ-МСК. Благоприятният ефект на МСК се елиминира при изчерпване на макрофагите или предварително третиране с антитела, специфични за IL-10 или IL-10-рецептор (Németh et al., 2009).

Важно е да се отбележи, че връзката между МСК и Мф е двупосочна. Според някои проучвания взаимодействието между МСК и макрофагите има много важна роля в имунорегулаторните свойства на МСК. Възпалителните цитокини, секретирани от Мф, стимулират МСК да отделят противовъзпалителни фактори като TSG6, PGE2 и азотен оксид (NO). Проучванията *in vitro* разкриват, че TNF $\alpha$ -активираните МСК могат да попречат на индуцираното от зимозан възпаление, предизвикано от макрофагите, и секретираният от МСК TSG6 има ключова роля за това (Choi et al., 2011).

Предполага се, че съвместните действия на МСК и макрофагите са необходими за регенерацията на тъканите и реваскуларизацията по време на процеса на заздравяване на раните. Цялостният ефект на МСК върху макрофагите разчита не само на намаляването на синтеза на възпалителни цитокини, но и на преминаването към противовъзпалителния, възстановяващ тъканта фенотип.

#### 4.1.2. МСК и DC

Дендритните клетки са най-мощните антиген-представящи клетки (АПК) и са хетерогенна група, която се различава по своя произход и функция. Някои от тях произхождат от лимфоидния ред (плазмацитоидни, pDC), а други от миелоидния (миелоидни DC). В зависимост от тяхната диференциация и степен на съзряване, DC са в състояние да осъществяват два противоположни ефекта – индукция на имуен отговор (имуногенни DC) и индукция на имуен толеранс (толерогенни DC). Толерогенните DC са незрели и се характеризират със силна фагоцитна активност и ниска експресия на ко-стимулаторни молекули.

Дендритните клетки, култивирани в присъствието на МСК или МСК-кондиционирана среда, имат намалена степен на съзряване. Подобни резултати са наблюдавани при миши DC, изолирани от слезка (Sadeghi et al., 2014). Инхибиторният ефект на МСК върху DC изглежда е обратим и зависи предимно от разтворими фактори, тъй като МСК-кондиционираната среда е в състояние да потиска DC почти толкова ефективно, колкото добавянето на МСК в *in vitro* системата (Sadeghi et al., 2014). Предполага се, че PGE2 е един от ключовите фактори, които медиат този инхибиторен ефект (Spaggiari et al., 2009). МСК експресират високи нива на PGE2, който се свързва със своя рецептор EP4 върху DC и упражнява инхибиторни ефекти (Spaggiari et al., 2009). Има и други разтворими фактори, които медиат инхибирането на DC от МСК, като IL-10 и TGF $\beta$  (Djouad et al., 2007) (X.-X. Jiang et al., 2005), както и междуклетъчните контакти по пътя на Notch. Директният контакт между МСК и DC активира пътя на Notch и потиска пролиферацията на DC (Ramasamy et al., 2007). Добавянето на неутрализиращи антитела срещу TGF $\beta$  или инхибитори на Notch към *in vitro* системата е в състояние да потисне инхибиторните ефекти на МСК.

Друг възможен механизъм на действие на МСК върху DC може да се крие в индуцирането на Tregs (Y.-P. Li et al., 2008b). МСК инхибират и диференциацията на DC от моноцити или CD34<sup>+</sup> ХСК, което води до производство на незрели DC. Вероятно е МСК да могат също така да превключват зрелите DC в супресивен незрял фенотип чрез Jagged1 или IL10-SOCS3 пътя (Cahill et al., 2015; X. Liu et al., 2012; B. Zhang et al., 2009).

Мезенхимните стволови клетки компрометират антиген-представящите способности на DC, като потискат експресията на HLA II, CD80, CD86 и IL-12 секрецията от DC (Abumaree et al., 2013; English et al., 2008; Nauta et al., 2006), което

отново води до инхибиране на процесите на съзряване и активиране на DC (Chiesa et al., 2011; Consentius et al., 2015; X.-X. Jiang et al., 2005; W. Zhang et al., 2004).

При зрели DC, МСК могат да потиснат миграцията на DC чрез понижаване на CCR7 и CD49d $\beta$ 1 и намаляване на секрецията на възпалителни фактори (Chiesa et al., 2011; Consentius et al., 2015). Мезенхимните стволови клетки също могат да насочват DC към противовъзпалителен фенотип и чрез понижаване секрецията им на провъзпалителни фактори (TNF $\alpha$  и IL-12) и повишаване секрецията им на противовъзпалителните фактори, като IL-10, PGE2 и M-CSF (макрофаг колония-стимулиращ фактор) (Y. Deng et al., 2014; Djouad et al., 2007). В допълнение, МСК индуцират DC да секретират IL-10, който води до потискане на Т-клетъчната активация и стимулира диференциацията на Т ефекторните клетки в Tregs. (Aggarwal & Pittenger, 2005). Освен това, МСК блокират клетъчното взаимодействие между DC и лимфоцитите – следствие от блокиране на сигналите за съзряване на DC и експресията на CD80, CD86, CD40 и МНС II (Aldinucci et al., 2010).

Важно е да се отбележи, че както беше коментирано и при макрофагите, комуникацията между МСК и DC не еднопосочна. Като пример за това може да послужи фактът, че DC от своя страна подпомагат оцеляването на МСК чрез експресия на лимфотоксин-7 $\beta$  (Romieu-Mourez et al., 2009).

#### 4.1.3. В клетки

Въпреки че подробните механизми все още не са известни и резултатите по темата са противоречиви, е доказано, че МСК инхибират В-клетъчната диференциация, пролиферация, активация и производство на антитела индиректно или директно (Asari et al., 2009; Che et al., 2012; K.-A. Cho, Lee, et al., 2017; Comoli et al., 2007; Corcione et al., 2006; Franquesa et al., 2012, 2015; O. Liu et al., 2013; Rafei et al., 2008; Rasmusson, Le Blanc, et al., 2007; Rosado et al., 2015; Tabera et al., 2007).

Известно е, че В клетките, активирани от IL-2, IL-4, IL-10, CD40, LPS (липополизахариди) и CpG олигонуклеотиди в *in vitro* условия, намаляват производството си на имуноглобулини и пролиферацията си в присъствието на МСК (Corcione et al., 2006). МСК секретират IL-1Ra, чрез който инхибират съзряването на В клетките (Luz-Crawford et al., 2016). МСК секретират също и CCL2, който инхибира активацията на STAT3 и индуцира експресията на PAX5, за да потисне производството на антитела в В клетките (Rafei et al., 2008). Добавянето на кондиционирана среда от активирани МСК също има инхибиторен ефект върху В клетките. Кондиционираната

среда от култивирани, но неактивирани МСК няма същия ефект (Augello et al., 2005). Тези резултати показват, че само в активирано състояние МСК са в способни да оказват имуносупресивен ефект върху В клетките. Изглежда, че МСК са в състояние да инхибират В клетките, дори ако те не са в контакт и се култивират разделени от transwell системи, което предполага ролята на разтворимите фактори като основни медиатори на тези взаимодействия (Asari et al., 2009; Corcione et al., 2006). Групата на Asari et al. 2009 открива, че под влияние на разтворими фактори, секретирани от МСК, в В лимфоцитите се установява потисната експресия на иРНК за Blimp-1 – фактор, който е ключов за терминалната диференциация на В клетките в плазматични клетки.

Наред с влиянието на секреторните фактори, има данни, които подкрепят ролята на прекия междуклетъчен контакт за осъществяването на имуномодулаторното действие на МСК върху В лимфоцитите. Augello et al. 2005 откриват, че взаимодействието на PD-1/PD-L1 и инхибирането на пътищата на BCR (В-клетъчен рецептор) са отговорни за инхибирането на В клетките от МСК (Augello et al., 2005; Schena et al., 2010). Schena et al. 2010 установяват, че ефектът е независим от IDO и предполагат контактен път на инхибиция, обусловен от взаимодействията PD-1/PD-L, като предварителното излагане на МСК на екзогенен IFN $\gamma$  е задължително за супресивния им ефект върху В клетките (Schena et al., 2010).

Въпреки че е показано, че МСК повишават жизнеспособността на В клетките (Tabera et al., 2007), те ги блокират на етап G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> от клетъчното делене (Corcione et al., 2006; Tabera et al., 2008) и инхибират диференцирането им в плазматични клетки и последващо образуване на имуноглобулини. Някои автори установяват, че този ефект може да е индиректен чрез инхибиране на индуцираното от pDC съзряване на В клетки (Tabera et al., 2007).

#### *Регулаторни В клетки*

Подобно на Treg клетките, в литературата са описани регулаторни В (Breg) клетки, за които се смята, че имат имуносупресивни функции, посредством секрецията на IL-10, IL-35 и TGF $\beta$ . Мезенхимните стволови клетки могат да стимулират производството на Breg (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> при хора и CD19<sup>+</sup>CD1d<sup>high</sup>CD5<sup>+</sup> при мишки) чрез секреция на IL-10 (Y. Guo et al., 2013; M.-J. Park et al., 2015). Експанзията на Breg клетките, стимулирана от МСК, може да е причина за общото нарастване на В-клетките, установено при някои проучвания (Healy et al., 2015).

#### 4.1.4. Т клетки

Т клетките са един от първите видове клетки, за които се съобщава, че се повлияват от МСК (Bartholomew et al., 2002). Имуносупресивните ефекти на МСК върху Т лимфоцитите са изследвани в най-голяма дълбочина, като са натрупани множество данни, които недвусмислено доказват, че МСК потискат активацията и пролиферацията на Т клетките.

Както беше многократно споменато, най-общо МСК използват пряк контакт, секреторни фактори и комбинация между двете за инхибиране на множество типове клетки на имунната система, сред които са и Т клетките. Както секреторния, така и прекия контакт могат да бъдат разделени на директен или индиректен (чрез клетка посредник). Докладваните данни както за клетъчния контакт, така и за освобождаването на разтворими фактори при МСК-медирана Т-клетъчна супресия са много в литературата и са изследвани множество кандидат-медиатори: PGE<sub>2</sub>, IDO, NO, IL-10, IL-27, TGFβ, MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), HLA-G, ICAM-1 и други (English et al., 2009; Tatara et al., 2011; W. Zhao et al., 2008; Lim et al., 2010; Ge et al., 2010). Въпреки това, ролите на различните разтворими фактори в експериментални условия понякога са противоречиви. Например, при инжектиране на IL-10-трансгенни МСК може да се предотврати GVHD, докато инжектирането на IL-10 самостоятелно не е достатъчно за постигане на същия ефект (Min et al., 2007). В модел на ревматоиден артрит, IL-10-трансгенните МСК не са в състояние да предотвратят колаген-индуциран артрит, въпреки че са мощни Т-клетъчни супресори в MLR *in vitro* (Djouad et al., 2005). Добавянето на COX (cyclo-oxygenase) инхибитори е в състояние да блокира инхибиторното влияние на МСК, което също предполага влиянието на PGE<sub>2</sub> в МСК-медирано инхибиране на Т клетки *in vitro* (Yañez et al., 2010; Schurgers et al., 2010).

Друг механизъм на имуносупресивното действие на МСК върху Т клетки е секрецията на IL-6. Секретиращите IL-6 МСК потискат диференциацията на моноцитите в дендритни клетки и антиген-представящата функция на дендритните клетки. По този начин се формира популация от незрели толерогенни дендритни клетки, секретиращи IL-10. Секрецията на IL-10 от своя страна води до формиране на регулаторни Т клетки. Известно е, че IFNγ и TNFα действат синергично, за да индуцират високи нива на експресия на IL-6 в МСК при *in vitro* условия. (G. Xu et al., 2009). МСК също секретират HLA-G1, TGFβ и HGF, чрез които инхибират пролиферацията на Т клетките, като понижават синтеза на фосфоретинобластома (pRb), циклин D и циклин A, докато

повишават синтеза на циклин-зависим инхибитор на киназа 1B (p27Kip1), което води до спиране на клетъчния цикъл до фаза G<sub>1</sub> (Giuliani et al., 2011).

Друг начин за потискане на Т клетките е секрецията на IDO. МСК не секретират конститутивно IDO, но го правят, когато са третирани с IFN $\gamma$  (Ling et al., 2014; Y. He et al., 2015; D. S. Kim et al., 2018). Когато се използва IDO инхибитор или IDO<sup>-/-</sup>МСК, се наблюдава частично намаляване на ефекта на потискане на Т клетките от МСК както *in vitro*, така и *in vivo* (Hong et al., 2016; Z. Zhang et al., 2015). Секрецията на IDO от МСК също е свързана с увеличен брой Treg клетки (Ge et al., 2010). МСК от див тип или от IDO knockout C57BL/6 мишки са инжектирани интравенозно в BALB/c реципиенти 24 часа след като са получили бъбречна присадка. Реципиентите, третирани с див тип МСК, са постигнали толерантност към алографта с нормална хистология, неоткриваеми нива на антидонорни антитела, нарушени CD4<sup>+</sup> Т клетъчни отговори и повишени честоти на CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> регулаторни Т клетки, открити в реципиентните далаци и донорските присадки. Докато при IDO knockout не е постигната толерантност към алографта.

NO е друг важен медиатор на имуносупресивните свойства на МСК върху Т клетките. Доказано е, че миши МСК повишават експресията на iNOS след стимулиране с IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  или IL-1 (Ren et al., 2008; G. Xu et al., 2009). Когато се използва L-NMMA (NOS инхибитор) или iNOS<sup>-/-</sup>МСК, се наблюдава намалено потискане на Т клетките (Sato et al., 2007). Освен това, *in vivo* експериментите с GVHD демонстрират подобряване на заболяването, когато се използват МСК от див тип, в сравнение с IFN- $\beta$ 1<sup>-/-</sup> или iNOS<sup>-/-</sup>МСК (Ren et al., 2008).

Галектините се разтворими фактори, чиято секреция от човешки и миши МСК се стимулира в MLR. Те са способни да потискат пролиферацията на Т клетките. Няколко проучвания показват, че малка интерферираща РНК (siRNA) срещу галектини 1 и 3 пречи на потискащите ефекти на човешките МСК върху Т клетките (Lepelletier et al., 2010; Sioud, 2011; Sioud et al., 2010). Въпреки това, дали потискането е медирано от пряко влияние върху Т клетките или чрез инхибиране на АПК, или чрез индукция на Treg клетки, все още не е напълно проучено.

Мезенхимните стволови клетки инхибират пролиферацията и активирането на Т клетките, независимо от вида и тъканния им произход (Bartholomew et al., 2002; Beyth et al., 2005; Di Nicola et al., 2002; Djouad et al., 2003; Glennie et al., 2005; Krampera et al., 2003; Krampera, Pasini, et al., 2006; Le Blanc, Tammik, Sundberg, et al., 2003; Petrini et al., 2009; Ramasamy et al., 2008). Bartholomew et al. 2002 установяват, че системно

инжектирани МСК, са в състояние да удължат преживяемостта на кожен алографт и да инхибират алоспецифичния отговор на Т клетките. Тогава се разбира, че МСК са мощни Т-клетъчни супресори и могат да инхибират пролиферацията на Т клетките в отговор на митогени (фитохемаглутинин, антитела срещу CD3 $\epsilon$ ) или алогенни клетки в MLR по дозозависим начин (Bartholomew et al., 2002; Di Nicola et al., 2002; Krampera et al., 2003; Sheng et al., 2008; Le Blanc et al., 2004; Meisel et al., 2004), докато самите стволови клетки нямат достатъчно имуногенен потенциал (Rasmusson, Uhlin, et al., 2007).

Предварителното излагане на МСК на провъзпалителни цитокини от активирани Т клетки (като IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ ) е достатъчно, за да индуцира техните противовъзпалителни свойства (Sheng et al., 2008) (Krampera, Cosmi, et al., 2006). Блокирането на IFN $\gamma$  рецепторите е достатъчно условие, за да отмени имуносупресивните свойства на МСК върху Т клетките (Polchert et al., 2008; Krampera, Cosmi, et al., 2006; Schurgers et al., 2010), но трябва да се отбележи, че има резултати които оспорват зависимостта на функциите на МСК върху Т клетките от IFN $\gamma$  (Gieseke et al., 2007; Ryan et al., 2007; English et al., 2007).

Контактният път също взема участие в имунната супресия, осъществявана от МСК върху Т клетките. Директния контакт-опосредстван ефект би могъл да бъде илюстриран чрез факта, че МСК експресират еритропоетин-продуциращ хепатоцелуларен (EPH) рецептор B2 (EPHB2) и ефринB2, докато Т клетките експресират EPHB4 и ephrinB1 (Ramasamy et al., 2008). Директното взаимодействие между МСК и Т клетките чрез EPHB2/ephrinB1 и ephrinB2/EPHB4 е от съществено значение за имуносупресивните ефекти, тъй като блокирането на тези взаимодействия намалява супресивния ефект на МСК. Освен това тези взаимодействия засилват експресията на IDO и iNOS (Ramasamy et al., 2008). Третирането с EPHB2 и ephrinB2 намалява експресията на TNF $\alpha$ , IL-2 и IL-17 от Т клетките (Т. М. Nguyen et al., 2013). Наред с това типичен пример за контакт опосредствена инхибиция на Т клетките от МСК е взаимодействието на експресирания от тях PD-L1 с PD-1 върху Т клетките, механизъм разгледан по-подробно в глава „Дискусия“.

Ефектите на потискане на Т клетките от МСК разчитат също на високото клетъчно съотношение на МСК към Т клетките (Krampera et al., 2003). Ниското клетъчно съотношение стимулира пролиферацията на Т клетките (Le Blanc, Tammik, Sundberg, et al., 2003). МСК в състояние на покой дори предпазват Т клетките от апоптоза (Benvenuto et al., 2007).

Взаимодействието между МСК и Т лимфоцитите е двупосочно. Така например, Groh et al. предполагат, че CD14<sup>+</sup> клетките активират МСК чрез IL-1 $\beta$  при съвместно култивиране и след това МСК инхибират Т клетъчния отговор чрез TGF $\beta$ , за който е доказано, че може да инхибира Т-клетъчния отговор (Groh et al., 2005; Yoshimura & Muto, 2010).

#### *Регулаторни Т клетки*

Мезенхимните стволови клетки осъществяват имунорегулаторното си действие не само директно върху ефektorните клетки на имунния отговор, но и по индиректен път, като действат върху други имуносупресори. Съществуват множество доказателства, че субпопулацията на Treg клетките е силно хетерогенна. Най-общо според начина си на формиране, могат да се разделят на естествени (nTregs, произхождат от тимуса) и индуцирани (iTregs, получени вследствие на стимулация на конвенционални Т клетки в периферията). Установено е, че МСК увеличават пролиферацията на Treg клетките както *in vitro*, така и *in vivo*. Например, процентът на Treg клетки се увеличава, когато МСК се добавят към MLR (Selmani et al., 2008; English et al., 2009). Този ефект е контактно зависим, когато се използват пречистени CD4<sup>+</sup> Т клетки, докато директните контакти не са необходими в случай, че се използват мононуклеарни клетки от периферна кръв. Това предполага роля за посредничеството на миелоидни клетки (English et al., 2009). В *in vitro* условия, PGE<sub>2</sub>, HLA-G5, TGF $\beta$ 1 и IDO са предложени като ефektorни молекули, отговорни за индуцирането на Treg клетки от МСК (Selmani et al., 2008; English et al., 2009; Ge et al., 2010). *In vivo*, МСК, инжектирани интравенозно преди аlogenна трансплантация на органи, увеличават броя на Treg клетките, което от своя страна потиска отхвърлянето и подобрява степента на преживяемост на присадката (Casiraghi et al., 2008; Ge et al., 2010). Има и автори, които не откриват никаква индукция на Treg клетки от МСК *in vitro* (Carrion et al., 2011; Krampera, Cosmi, et al., 2006; Sheng et al., 2008).

Мезенхимните стволови клетки засилват диференциацията на Treg клетки както чрез директен клетъчен контакт, така и чрез паракринни ефекти (чрез PGE<sub>2</sub>, TGF $\beta$ , HLA-G5 и IL-10) (English et al., 2009; Ghannam et al., 2010). МСК могат директно да индуцират диференциация на Treg чрез пътя на TLR-Notch1 и секрецията на TGF $\beta$ 1, IDO и iNOS (индуцируема синтаза на азотен оксид) (Del Papa et al., 2013; Rashedi et al., 2017). МСК също засилват секрецията на IL-10 и инхибират секрецията на IFN $\gamma$  и IL-17, което води до засилване на диференциацията Treg от CD4<sup>+</sup> Т клетки и потискане на Th1 и Th17

диференциацията (Luz-Crawford et al., 2013). Освен това, МСК експресират GILZ (глюкокортикоид-индуциран левцинов цип), за да индуцират Treg клетки (Luz-Crawford et al., 2015; N. Yang et al., 2015).

Наред чрез прякото цитокиново действие МСК могат да инхибират Т клетките и чрез „клетки посредници“, както и чрез контакт опосредствани взаимоотношения. Като пример за индиректно действие служи факта, че МСК инхибират Т клетките чрез индуциране на супресивните Tr1 ( $CD4^+IL-10^+$  клетки) и Treg клетки ( $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  или  $CD4^+IL-10^+IFN\gamma^+$ ) (Hsu et al., 2013; Lin et al., 2013).

Инжектирането на МСК в различни експериментални условия (експериментален автоимунен енцефаломиелит, индукция на алергия и трансплантация на кожен трансплант) показва индуциране на Tregs в *in vivo* модели (Bai et al., 2009; Luz-Crawford et al., 2013; F. P. Barry et al., 2005). Това може да бъде причинено от директно потискане на Т клетките, стимулиращо натрупването на Treg клетки и чрез инхибиране на узряването на АПК, водещо до толерогенни миелоидни клетки, които от своя страна предизвикват формиране на Tregs (Cutler et al., 2010; Q. Wang et al., 2008; Aksu et al., 2008).

МСК оказват ефект и върху други Т регулаторни клетки. Така например, МСК повишават получаването и активността на  $CD8^+CD28^-$  Т регулаторни клетки, чрез увеличаване на IL-10 и FasL (Q. Liu et al., 2015). МСК също засилват производството на  $IL10^+Tr1$  и  $TGF\beta^+Th3$  чрез HO-1.

#### *Th1 клетки*

Въздействието на МСК е най-категорично доказано при Th1 субпопулацията на Т хелперните лимфоцити. Мезенхимните стволови клетки упражняват имunosупресивни ефекти чрез инхибиране на секрецията на тип Th1 провъзпалителни фактори (като  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  и  $IL-1\beta$ ) и засилване на секрецията на Th2 тип фактори. МСК също инхибират активирането на Th1 клетки индиректно чрез потискане на DC и NK клетки (Consentius et al., 2015). Метаболитите на триптофан също индуцират апоптоза в Th1 клетки (Fallarino et al., 2002).

#### *Th2 клетки*

Данните свързани с влиянието на МСК върху Th2 цитокиновата секреция са по-малко. Някои автори съобщават за увеличен брой Th2 клетки и съответно увеличена секреция на IL-4 при *in vitro* експерименти (Aggarwal & Pittenger, 2005). Мезенхимните стволови клетки индуцират диференциацията и съзряването на Th2 клетки чрез IDO

секреция, което води до изчерпване на триптофан и натрупване на метаболити на триптофана (Ge et al., 2010).

#### *Th17 клетки*

Th17 клетките се характеризират със секрецията на IL-17 и осъществяват имунен отговор срещу патогени на мукозните повърхности, за които Th1 или Th2 имунитетът не е достатъчно ефективен. При липса на възпалителен стимул МСК повишават експресията на CD54 и привличат Th17 клетки чрез CCR6-CCL20 (Ghannam et al., 2010). В активирано състояние мезенхимните стволови клетки могат да инхибират директно или индиректно Th17 клетъчната диференциация (Duffy et al., 2011). Предполаганите пътища, чрез които се осъществява това са чрез повишаване на PD-1, IL-10, CCS318 и инхибиране на STAT3 пътя (X. Liu et al., 2015; Luz-Crawford et al., 2012). Инхибирането на STAT3 пътя намалява диференциацията на Th17 чрез понижаване на експресията на ROR $\gamma$ t и IL-17. Въпреки че някои проучвания показват, че МСК могат да стимулират получаването на Th17, (Eljaafari et al., 2012; Z. Guo et al., 2009) тези проучвания имат известни ограничения. Например, Z. Guo et al. 2009 демонстрират, че КМ-МСК засилват секрецията на IL-17 и диференциацията на Th17 клетките в експерименти с MLR (Z. Guo et al., 2009). Въпреки това, тези изследователи не са открили повишаване на Treg клетките, което обикновено трябва да се наблюдава при този тип анализ. Следователно, качеството и количеството на МСК могат да повлияят изводите от направените експерименти.

#### *4.1.5. NK клетки*

NK клетките притежават цитотоксичност без предварително активиране или сенсibiliзация срещу клетки, които нямат експресия на протеини от МНС клас I, което често се случва при инфектирани с вирус, трансформирани клетки или такива в състояние на стрес. Важна характеристика на NK клетките е тяхната фина настройка според експресията на МНС протеини върху клетката, която може да служи за тяхна потенциална мишена (Bozzano et al., 2017). Всеки организъм има индивидуална комбинация от гени кодиращи МНС протеините от клас I. NK клетките по време на съзряването си коригират експресията на инхибиторните МНС рецептори на повърхността си, за да могат да разпознаят комбинацията от МНС I молекули на техния конкретен организъм (Y. He & Tian, 2017). Ако в случая на макрофагите и DC влиянието на МСК е демонстрирано в множество проучвания, много по-малко се знае за взаимодействията на МСК с NK клетките. Наличната информация предполага, че МСК

са в състояние да инхибират активирането на NK клетките, но данните са непълни. Натрупаната информация показва също, че в голяма степен взаимодействията между МСК и NK клетките са двупосочни.

МСК могат да инхибират пролиферацията, активацията на NK клетките, тяхната секреция на  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$ , и техния цитотоксичен ефект (DelaRosa, Sánchez-Correa, et al., 2012; Michelo et al., 2016; Sotiropoulou et al., 2006; Spaggiari et al., 2006, 2008). Инхибиторните ефекти на МСК върху NK клетките изискват високо клетъчно съотношение на МСК спрямо NK клетките (Sotiropoulou et al., 2006), докато МСК подпомагат пролиферацията на NK клетките при ниско клетъчно съотношение на МСК към NK клетки (Boissel et al., 2008). IDO и PGE2 играят важна роля в тези потискащи ефекти (Spaggiari et al., 2008). Spaggiari et al. 2006 предполагат, че МСК първо се стимулират от неактивирани NK клетки с умерено освобождаване на  $IFN\gamma$  и тези МСК, от своя страна, блокират литичната им способност. Други автори също показват, че МСК засилват секрецията на  $IFN\gamma$  от IL-12- или IL-18-стимулирани NK клетки (Thomas et al., 2014). Следователно, антипролиферативният ефект на МСК върху NK клетките, подобно на действията им върху други имунокомпетентни клетки се индуцира при възпалителни състояния, като богата на  $IFN\gamma$  микросреда.

МСК индуцират NK клетките да засилят експресията си на CD73 (Chatterjee et al., 2014). CD73 може да преобразува AMP в аденозин, който има противовъзпалителен ефект (X. Chen et al., 2016). В допълнение, TLR4 (експресиран върху МСК), също медира директен контакт с NK клетките (Lu et al., 2015).

Ко-култивирането на IL-2 третирани NK клетки с клетки-мишени (туморни или инфектирани с вирус клетки) заедно с МСК намалява експресията на рецепторите CD132, CD56, NKR2B4, NKG2D, протеин, свързан с NKp30 (NKp30) и NKp44 върху NK клетките (Aggarwal & Pittenger, 2005; Poggi et al., 2005; Selmani et al., 2008), като по този начин не им позволява да упражняват своята цитотоксичност върху целевите клетки. IDO,  $TGF\beta 1$ , PGE2 и HLA-G5 поемат посредничеството при инхибиторната функция на МСК (Sotiropoulou et al., 2006; Spaggiari et al., 2008; Selmani et al., 2008).

Взаимодействията на МСК и NK клетките могат да имат голямо значение при трансплантацията на органи. Известно е, че остро отхвърляне на трансплантите не е свързано с NK клетки. NK клетките, обаче, могат да имат роля в този процес, като разпознават неправилните трансплантирани МНС протеини и секретират големи количества имуностимулиращи цитокини (Benichou et al., 2011). Когато

имуносупресивният ефект на МСК върху антидонорната реактивност на реципиента е изследван преди и след трансплантация на човешки бъбрек, МСК инхибират пролиферацията не само на CD4 и CD8 Т лимфоцити в MLR преди и след трансплантация, но също и на NK клетките (Crop et al., 2009). Показано е, че инхибирането на пролиферацията на NK клетките зависи само от разтворими фактори секретирани от МСК.

Както вече беше споменато, взаимодействията между МСК и NK клетките е двустранно. МСК могат да се разглеждат като супресори на NK клетките, но в същото време самите те могат да бъдат техни мишени. Така например, секретираният от NK клетките IFN $\gamma$  действа върху МСК и засилва експресията на CCL2, който допълнително засилва секрецията на IFN $\gamma$  от NK клетките (Cui et al., 2016). NK клетките също секретират CCL5 и CXCL7, чрез които привличат МСК (Almeida et al., 2016). В допълнение, при определени условия активираните NK клетки могат да предизвикат смърт на МСК (Götherström et al., 2011). Така например, ниската експресия на протеини от МНС клас I от МСК ги прави възможни мишени на NK клетките. Трябва също да се отбележи, че NK клетките са в състояние да убиват както автоложни, така и хетероложни МСК и че се смята, че активирането на NK клетките се медира от NKp30 и рецепторно-лигандна двойка състояща се от LFA-1 и ICAM-1 (Poggi et al., 2005). NK клетки, култивирани в присъствие на IL-2 или IL-15 могат ефективно да убиват МСК (Crop et al., 2011). Въпреки това, излагането на МСК на IFN $\gamma$  е в състояние да регулира експресията им на МНС клас I протеини и да подобри оцеляването им в присъствието на NK клетки (Crop et al., 2011).

#### *NKT клетки*

NKT клетките са сравнително новооткрит член на имунните клетки, които имат важен ефект върху останалите членове на имунната система, въпреки малкия им брой. Те са истински Т клетки с Т-клетъчен рецептор (TCR), но за разлика от конвенционалните Т клетки, които разпознават пептидни антигени, представени от класически МНС, NKT клетките разпознават липидни антигени, представени от CD1d, (некласическа МНС молекула).

Има данни, че МСК инхибират формирането и активността на NKT клетките чрез директен клетъчен контакт и паракринни модулатори (B. Wang et al., 2017; X. Zhu et al., 2013), като PGE2 (Prigione et al., 2009), IDO (Milosavljevic et al., 2017) и iNOS

(Gazdic et al., 2018). МСК активират и инхибират пролиферацията и на  $\gamma\delta$ T клетки и инвариантни NKT клетки (iNKT) (Prigione et al., 2009).

#### 4.1.6. ILC

Вродените лимфоидни клетки (ILC) са наскоро описана популация от лимфоидни ефекторни клетки, които имат важна роля в имунната защита, възпалението и ремоделирането на тъканите. Предполага се, че ILC представляват "вродени" хомолози на диференцирани ефекторни T клетки и са категоризирани в три групи въз основа на тяхната секреция на цитокини - ILC1, ILC2 и ILC3. Както ILC2, така и ILC3 имат тъканно-протективни функции, сред които противовъзпалително действие и засилване на тъканната регенерация (Eberl et al., 2015; Vivier et al., 2018). Наскоро е доказано, че ILC3 може да поддържа и генерира Treg клетки чрез секреция на IL-2 (L. Zhou et al., 2019). Мезенхимните стволови клетки поддържат диференциацията на ILC2 (група 2 вродени лимфоидни клетки) (Koga et al., 2018) и намножаването и активността на ILC3 (група 3 вродени лимфоидни клетки) (van Hoveven et al., 2018). Има данни, че взаимодействието между ILC и МСК може да е двустранно и, че ILC3 от своя страна също засилват активността на МСК (van Hoveven et al., 2018).

#### 4.1.7. MDSC (миелоидни супресорни клетки)

MDSC са хетерогенна миелоидна популация с имunosупресивни функции. Въпреки че първоначално са описани в експериментални модели и при пациенти с ракови заболявания, MDSC впоследствие са открити и при хронични/остри инфекции, и автоимунни заболявания. Механизмите на действие на MDSC са разнообразни и вероятно изискват директен контакт или секреция на разтворими фактори.

МСК водят до генерирането и увеличаването на MDSC ( $CD14^+CD11b^+CD33^+$  при хора и  $Gr-1^+CD11b^+$  при мишки) (Yen et al., 2013). МСК могат да индуцират MDSC да експресират iNOS и аргиназа, които потискат активността на T клетките и засилват получаването на Treg клетки. Тези ефекти върху MDSC възникват чрез HGF секреция от МСК. HGF взаимодейства със своя рецептор с-Met, експресиран от MDSC, индуцира фосфорилиране на STAT3 и по този начин води до пролиферацията на MDSC (Yen et al., 2013).

#### *4.1.8. Неутрофили*

МСК потискат привличането и активирането на неутрофили, както и секрецията на протеаза чрез секретирание на супероксид дисмутаза-3 (D. Jiang et al., 2016; Munir et al., 2016; Y. Zhu et al., 2014). Въпреки това, някои доклади показват, че МСК предпазват неутрофилите от апоптоза и подпомагат тяхната функция чрез IL-6 и STAT3 (Cassatella et al., 2011; Raffaghello et al., 2008) и стимулират привличането на неутрофили чрез IL-8 и MIF (фактор инхибиращ миграцията на макрофаги), секретирани от МСК (Brandau et al., 2010). Тази функция е свързана с провъзпалителния фенотип на МСК (Brandau et al., 2014; P. F. Yu et al., 2017). Следователно модулацията на неутрофили от МСК зависи от това дали те се намират в провъзпалителен или противовъзпалителен фенотип.

#### *4.1.9. Мастоцити*

Мезенхимните стволови клетки могат да инхибират имунната активност на мастоцитите, като действат върху секрецията на възпалителни цитокини, върху процеса на дегранулация и способността им за хемотаксис, чрез COX2-PGE2 и TGFβ1 пътища (Brown et al., 2011; A. Kim et al., 2016; H.-S. Kim et al., 2015; J. Liu et al., 2016; W.-R. Su et al., 2011). Както беше многократно споменавано, МСК секретират PGE2 чрез повишаване на COX2. След това PGE2 разпознава и активира EP4 рецептора, експресиран върху мастоцити, което води до тяхното потискане (J. Liu et al., 2016).

Таблица 1. Обобщени данни за имunosupресивните взаимодействия на МСК и основните клетки на имунната система.

Клетъчен тип	Ефект от взаимодействието	Ключови механизми на действие	Източници
<b>Дендритни клетки</b>	Инхибиране на съзряването; Намалена експресия на костимулиращи молекули;	TGF $\beta$ IL-6 Експресия на Jagged (лиганд за Notch рецептори) PGE2 Индукция на Treg клетки	(Djouad et al., 2007; X.-X. Jiang et al., 2005; Y.-P. Li et al., 2008b; Spaggiari et al., 2009)
<b>Макрофаги</b>	Намалена експресия на провъзпалителни цитокини; Повишена фагоцитна активност; Индукция на фенотип тип 2;	TSG6 IL-10 IL-1Ra sTNFR1 PGE2 NO	(Choi et al., 2011; François et al., 2012; Maggini et al., 2010; Németh et al., 2009; Ortiz et al., 2007; Vasandan et al., 2016; Zheng et al., 2018)
<b>НК клетки</b>	Намалена експресия на CD132, CD56, NKR2B4, NKG2D, NKp30 и NKp44; Намалена цитотоксичност;	TGF $\beta$ PGE2 IDO Вероятни директни контакти клетки-клетка	(Aggarwal & Pittenger, 2005; Poggi et al., 2005; Selmani et al., 2008, 2008; Sotiropoulou et al., 2006; Spaggiari et al., 2008)
<b>В клетки</b>	По-слаба пролиферация; Нарушен синтез на имуноглобулини; Намалена експресия на хемокинови рецептори;	PD-1/PD-L1	(Asari et al., 2009; Augello et al., 2005; Corcione et al., 2006)
<b>T клетки</b>	Инхибиране на пролиферацията; Потискане на цитотоксичността и освобождаване на цитокини; Индукция на анергия; Индукция на Tregs;	HGF TGF $\beta$ IL-10 IL-27 PDL1 и PDL2 Galectin-1 и -3 PGE2 IDO Инхибиране на АПК	(Aggarwal & Pittenger, 2005; English et al., 2009; Ge et al., 2010; Groh et al., 2005; Lim et al., 2010; Ren et al., 2008; Schurgers et al., 2010; Tatara et al., 2011; Yañez et al., 2010; W. Zhao et al., 2008)

Множеството натрупани данни предполагат, че имуносупресивните свойства на МСК са медиирани чрез секреторни или контактни механизми, чиято цел е да се „образоват“ имунните клетки и в крайна сметка да се регулира специфичната за заболяването микросреда (Y. Li, Zhang, et al., 2019; Takizawa et al., 2017). Често ефектът на цитокините е директен (имунорегулаторната клетка секретира цитокин, който влияе на таргетната клетка), но често се реализира чрез множество посредничества, като ефектът е върху клетки посредници, които от своя страна секретират цитокини, които действат върху таргетната клетка. Аналогична е ситуацията и по отношение на контактните механизми на имунна регулация осъществявана от МСК – те също могат да бъдат директни (клетка-клетка) или индиректни (клетка-посредник-клетка). Различни повърхностни молекули медиират директната комуникация клетка-клетка, като хемокинови рецептори, коинхибиторни молекули, цитокинови рецептори и адхезионни молекули (Ma et al., 2017; C. Zhang et al., 2019; K. Zhou et al., 2018). От друга страна, секреторният път на комуникация се постига чрез извънклетъчни везикули, секретирани от МСК, които включват HGF, TSG-6, TGF $\beta$ , PGE2, IDO, IL-10, NO и HO-1 (Bulati et al., 2020; Y. He et al., 2015; Ni et al., 2019; H. Wang et al., 2017; Z. Zhang et al., 2019). Струва си да се отбележи, че някои повърхностни молекули могат да бъдат и секретирани, като секретиремата форма на PD-L1 (J.-Y. Kim et al., 2012; Y. M. Li et al., 2018).

#### ***4.2. Имуни модулатори, експресирани и секретирани от МСК***

МСК модулират имунния отговор в предимно супресивна насока, като са описани множество фактори ангажирани с тази функция. Най-общо те могат да бъдат разделени на фактори действащи чрез пряк междуклетъчен контакт между МСК и клетките мишени, и секреторни фактори. След като описахме ефекта на МСК върху имунните клетки, следва да се спрем и на най-важните представители на имунните модулатори експресирани и/или секретирани от МСК.

##### ***4.2.1. ICAM-1***

Адхезионните молекули медиират първата стъпка в комуникацията между МСК и целевите клетки. МСК експресират ICAM-1, VCAM-1 и P-селектин, които взаимодействат със съответните рецептори, представени от целевите клетки (Rüster et al., 2006; B. Tang et al., 2018). От адхезионните молекули ICAM-1 е експесиран в най-голяма степен.

ICAM-1, известен също като CD54, е трансмембранен протеин, който принадлежи към суперсемейството на имуноглобулините. ICAM-1 се експресира главно от еднотелни клетки, левкоцити, фибробласти и туморни клетки (Anbarasan et al., 2015). Възпалителни цитокини като  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  и  $IL-1\beta$  могат да засилят свързването на ICAM-1 с неговите лиганди LFA-1 или Mac-1 и след това да медиират миграцията на левкоцитите към тъканите с локално възпаление (J. Guo et al., 2018). ICAM-1 може да играе решаваща роля в регулирането на имуносупресивните свойства на МСК. Може да действа като адхезионна молекула за директно лицензиране на имунните клетки *in vivo* и *in vitro* (Ren et al., 2010). Добре известно е, че МСК могат да индуцират поляризация на макрофагите към М2 фенотипа чрез ICAM-1/LFA-1 (Tatebayashi et al., 2019). Освен това, МСК са способни да препрограмират микроглия в „подобен на М2“ фенотип (J.-Y. Kim et al., 2012). В допълнение към макрофагите, ICAM-1 също медира пролиферацията на Т клетките (Benvenuto et al., 2015). МСК с по-висока експресия на ICAM-1 могат да инхибират узряването на DC и имунния отговор на Т клетките и дори да покажат обещаващи ефекти за намаляване на отхвърлянето на транспланти (B. Tang et al., 2018). Тези проучвания показват, че директната комуникация клетка:клетка чрез ICAM-1 е от съществено значение за МСК при имуномодулирането и контролирането на различни имунни клетки. Нещо повече, ICAM-1 не само функционира чрез директно взаимодействие клетка:клетка, но също така стимулира паракринния ефект на МСК, които от своя страна синергично насърчават имунната толерантност (Ren et al., 2010).

#### 4.2.2. Т-клетъчен имуноглобулин и ITIM домейн (TIGIT)

TIGIT, известен също като Vstm3, VSig9 или WUCAM, е новоидентифициран коинхибиторен рецептор (X. Yu et al., 2009). Установено е, че TIGIT се експресира в различни имунни клетки, включително НК клетки, паметови Т клетки, М2 макрофаги, Treg клетки, тумор-инфилтриращи лимфоцити (TIL) и отделни имунорегулаторни клетки (например, туморни клетки и МСК) (Pauken & Wherry, 2014; X.-M. Zhou et al., 2018). Известно е, че TIGIT и CD226 се експресират от МСК, докато техните лиганди CD155 и CD112 се откриват върху повърхността на АПК. При свързването им може да се индуцират коинхибиторни сигнали. CD112 може също да достави инхибиторен сигнал, когато е свързан с TIGIT. Интересно е, че TIGIT се експресира само върху М2 макрофаги, но не и М1 макрофаги, което предполага, че експресията на TIGIT стимулира М2 поляризацията (Noguchi et al., 2019).

#### 4.2.3. CXCR4 (CD184)

CXCR4, известен също като CD184, е един от най-важните хемокинови рецептори и основният фактор, влияещ върху насочването на МСК, под действието на който те мигрират към целевите тъкани и взаимодействат с лигандния стромален клетъчен фактор-1 (SDF-1) (X. Li, Lan, et al., 2019). При взаимодействие със SDF-1, CXCR4<sup>+</sup> клетките мигрират към целевото място според градиента на SDF-1.

Добре известно е, че повишената регулация на CXCR4 може да подобри миграцията на МСК. Под индукцията на SDF-1, CXCR4<sup>+</sup> МСК могат да мигрират към мястото за регенерация. По подобен начин нивото на експресия на CXCR4 върху МСК е свързано с локалната микросреда. Предварителното третиране с SDF-1 може да стимулира експресията на CXCR4 в МСК (Q.-J. Deng et al., 2018). Условието на хипоксия или други състояния на оксидативен стрес имат същия ефект като предварителната обработка с SDF-1 (L. Li et al., 2017). Тъй като възпалителният отговор засилва секрецията на SDF-1, МСК могат да експресират повече CXCR4 при възпалителни състояния. От една страна, МСК с високо ниво на CXCR4 имат по-стабилни имуномодулиращи способности чрез намаляване на броя на DC и Th17 клетките и увеличаване на броя на M2 макрофагите и Treg клетките (Nan et al., 2018). От друга страна, дефицитът на CXCR4 потиска имуномодулаторните и насочващите способности на МСК (Wynn et al., 2004).

#### 4.2.4. CD200

CD200, който е член на суперсемейството на трансмембранните повърхностни иммуноглобулини, се експресира върху различни видове клетки, като Т и В клетки, съдови ендотелни клетки и АПК, както и МСК (Minas & Liversidge, 2006). Освен това, лигандът CD200R се експресира върху миелоидни клетки, особено моноцити и макрофаги.

Интересно е, че нивото на CD200 върху МСК може да се повиши при възпалителни или хипоксични състояния (Amouzegar et al., 2017; Pontikoglou et al., 2016). Bruno Delorme et al. 2008 откриват, че CD200 може да бъде експресиран върху култивирани и намножени КМ-МСК, и потвърждава, че експресията на CD200 може да бъде свързана с имунорегулаторните свойства на МСК (Delorme et al., 2008). Последните проучвания допълнително показват, че CD200 е свързан с намаляване на инфилтрацията на възпалителни клетки (J. Wang et al., 2014). Друг механизъм може да бъде свързан със засилване на освобождаването на противовъзпалителни фактори, като TGF $\beta$  и IL-4. По

този начин, инхибирането на експресията на CD200 чрез shRNA или чрез антагонист-медирана неутрализация е ефективно за потискане на имунорегулаторните свойства на МСК. Имуносупресивните свойства на МСК зависят от пътя на CD200/CD200R и са свързани с макрофагите. Веднъж „образовани“ от CD200<sup>+</sup> МСК, макрофагите губят своите провъзпалителни свойства и започват да се поляризират в M2 макрофаги (Pietilä et al., 2012).

Като цяло, пътят на CD200/CD200R не само стимулира имуносупресивните свойства на МСК и секрецията им на противовъзпалителни цитокини, но също така обучава провъзпалителните имунни клетки да се поляризират в противовъзпалителен фенотип.

#### 4.2.5. TLR (*Toll-like рецептори*)

Вродената имунна система е първата линия на неспецифична защита, която да устои на инвазията от патогенни микроорганизми, по време на която Toll-подобните рецептори (TLR) играят важна роля. TLR са група от рецепторни молекули, експресирани на повърхността на вродени ефекторни клетки, които могат да разпознават сигнали за опасност като липополизахариди (LPS), двойноверижна РНК и ендотоксини (Kawai & Akira, 2011). В резултат на това се стига до масовото освобождаване на провъзпалителни цитокини като TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$ .

МСК могат да усетят различни сигнали за опасност чрез TLR (Opitz et al., 2009; Romieu-Mourez et al., 2009; Tomchuck et al., 2008; Waterman et al., 2010). МСК експресират TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 и TLR9. Нивата на експресия на тези TLR варират значително в зависимост от техния тъканен произход (DelaRosa, Dalemans, et al., 2012a). Активираните МСК реагират на TLR лиганди и освобождават противовъзпалителни фактори. По този начин, TLR имат важна роля в модулирането на имунните отговори от МСК (DelaRosa, Dalemans, et al., 2012a)

Както вече беше споменато, МСК експресират изобилие от TLR, особено TLR3 и TLR4 (Pevsner-Fischer et al., 2007). Интересно проучване показва, че TLR3 и TLR4 имат различни роли в имуномодулиращите свойства на МСК. TLR3-праймирани МСК имат противовъзпалителен профил (МСК2), докато TLR4-праймирани МСК са провъзпалителни (МСК1) (Waterman et al., 2010). Това обаче не винаги е така. Чрез използване на полиинозинова:полицитидилова киселина и LPS за стимулиране на TLR3 и TLR4 на МСК, и при двата метода МСК могат да инхибират активността на Т клетките, като влошат Notch сигнализацията (Liotta et al., 2008). От друга страна, активирането на

TLR3 и TLR4 на МСК може да индуцира Т-регулаторната клетъчна активност. С други думи, както TLR3-праймирани, така и TLR4-праймирани МСК показват противовъзпалителни характеристики (Rashedi et al., 2017). Различните експерименти използват различни концентрации на TLR лиганди за стимулиране на МСК, което може също да повлияе на възпалителните и противовъзпалителните свойства на МСК (Ren et al., 2008) и даде обяснение на противоречивите резултати.

#### 4.2.6. PD-L1 и PD-L2

PD-1 се експресира главно върху Т клетки, НК клетки, макрофаги, DC и В клетки. PD-L1, известен също като B7-H1 (CD274), и PD-L2, известен също като B7-DC или CD273, са лиганди на PD-1. PD-L1 се експресира както върху нехематопоеични стволови клетки, така и върху специфични субпопулации от хематопоеични стволови клетки (Ahmad et al., 2016; Ben Nasr et al., 2017; L. C. Davies et al., 2017). Обратно, PD-L2 се експресира предимно от инактивирани АПК, като DC и макрофаги. Освен това може да се индуцира върху повърхността или в цитоплазмата на туморни клетки и други имунорегулаторни клетки като МСК (Pai et al., 2016). PD-1 може не само да се свърже с PD-L1 и PD-L2, но също така да се свърже с CD80 и RGMb (Pai et al., 2016). PD-L1 обикновено е с по-високо ниво на експресия от PD-L2 (Ghiotto et al., 2010). Афинитетът на свързване на PD-L1 за PD-1 и PD-L2 за PD-1 е сходен - стойности на  $K_d = 10$  nM. Поразителни разлики се наблюдават по отношение на силата на свързване и дисоциация, а нивото на експресия на PD-L1 е значително по-високо от PD-L2 върху широк спектър от човешки и миши клетки, така че PD-L1 е основна отрицателна имунна контролна точка в семейството на programmed death ligand протеините (Keir et al., 2008).

МСК експресират PD-L1 (B7H1) и PD-L2 (B7DC) спонтано и при стимулация с IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  (Chinnadurai et al., 2014; L. C. Davies et al., 2017; Sheng et al., 2008). Блокирането на PD-L1 и PD-L2 пътищата значително уврежда имуносупресивните ефекти на МСК (Chinnadurai et al., 2014; Sheng et al., 2008). Експресираните и секретирани от МСК PD-L1/L2 се свързват с PD-1 и инхибират пролиферацията на лимфоцити (Augello et al., 2005; L. C. Davies et al., 2017). PD-L1 и PD-L2 могат да потиснат CD4<sup>+</sup> Т-клетъчната активация, да намалят секрецията на IL-2, да потиснат Т клетките и да индуцират Т-клетъчна смърт. Тези фактори могат също така да инхибират фосфорилирането на АКТ и да регулират експресията на Foxp3, което води до производство на Treg (L. C. Davies et al., 2017).

Тъй като PD-1 е една от основните молекули на имунната контролна точка, експресирана върху Т клетки, след като PD-1 се ангажира с PD-L1, той може да инхибира пътя на PI3K/Akt и фосфорилирането на ZAP70 и PKC $\theta$  и впоследствие може да потисне Т-клетъчно активиране чрез инхибиране на сигнализицията през TCR (Parry et al., 2005; Sheppard et al., 2004). Когато е установено, че PD-L1 е силно експресиран върху МСК, ролята му привлича много внимание (Camilleri et al., 2016). Проучванията също така установяват, че PD-L1, експресиран върху МСК, е от съществено значение за поддържане на имunosупресивните свойства на тези стволови клетки (Y. Liu et al., 2018). Освен това е интересно, че PD-L1 и PD-L2 имат и секретирани форми, които се детектират в супернатанта от човешки МСК (L. C. Davies et al., 2017).

Действието на PD-1/PD-L1 е от голямо значение за имunosупресивните свойства на МСК върху Т клетките. Когато сигнализицията на PD-L1 върху МСК е блокирана, имunosупресивният капацитет на МСК е значително намален (Chinnadurai et al., 2014). Серия от проучвания за взаимодействието на PD-1/PD-L1 между МСК и Т клетки показват, че МСК имат различни регулаторни ефекти върху различните фенотипове Т клетки. Секретията на възпалителния цитокин IL-17 от Th17 се потиска от МСК-медирано PD-1/PD-L1 взаимодействие (K.-A. Cho, Park, et al., 2017). МСК могат да инхибират Th1 клетките, като същевременно стимулират поляризацията на Th2 клетките (J. Zhu et al., 2017). Въпреки това, както Th1, така и Th2 клетките изглеждат са индуцирани към апоптични пътища в различна степен. МСК водят до значително повишение на количеството на Treg клетките, което може да бъде причинено от директна комуникация клетка:клетка между Т клетките и МСК или секретията на IL-10 и TGF $\beta$  от МСК (D. Chen et al., 2018; Sun et al., 2018). В допълнение към Т клетките, PD-1/PD-L1-медираният сигнален път също участва в регулирането на други видове имунни клетки. Проучванията показват, че МСК могат да инхибират активирането, пролиферацията и имунната функция на микроглиалните клетки и да потискат пролиферацията, диференциацията, миграцията и имуноглобулин-секретиращите свойства на В клетките (O. Liu et al., 2013).

PD-L1, експресиран върху МСК, не е стабилно експресиран. Доказано е, че възпалителни цитокини като IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  са свързани с повишено ниво на PD-L1 върху МСК и повлияват имunosупресивните свойства на МСК (L. C. Davies et al., 2017). Освен това, други разтворими фактори като GM-CSF и полиинозинова-полицитидилова киселина също могат да увеличат експресията на PD-L1 (M. Yang et al., 2017). В заключение, във възпалителна микросреда, провъзпалителните фактори могат да

увеличат експресията на PD-L1 на повърхността на МСК и в крайна сметка да доведат до необратима хиперергия и клетъчна смърт на Т клетките, и да стимулират образуването на Treg клетки с имunosупресивни свойства (Yan, Zhuansun, Chen, et al., 2014; Yan, Zhuansun, Liu, et al., 2014). Потискането на експресията на PD-L1 върху МСК или блокирането на PD-1/PD-L1 сигналния път води до намаляване на имunosупресивната функция на клетките (Wu et al., 2014).

#### 4.2.7. CD39 и CD73

МСК експресират CD39 и CD73. CD39 катаболизира АТР до АМР, а CD73 катаболизира АМР до аденозин. Извънклетъчният АТР има провъзпалителни ефекти, докато аденозинът има противовъзпалителни ефекти чрез пътищата на сАМР и РКА. По този начин CD39 и CD73 могат да разцепят извънклетъчния АТР до аденозин и да превключват от провъзпалителна към противовъзпалителна среда (M. Chen et al., 2013; Kerkelä et al., 2016).

#### 4.2.8. IL1Ra

IL1Ra (интерлевкин-1 рецепторен антагонист), експресиран от МСК, може да стимулира поляризацията на М2 макрофагите и генерирането на Treg с повишена експресия на IL-10, и да потиска активността на CD4<sup>+</sup> Т клетките. Освен това, IL1Ra може да потисне В-клетъчната диференциация и производството на антитела (Luz-Crawford et al., 2016; Martino et al., 2016).

#### 4.2.9. Протеини, свързани със системата на комплемента

МСК експресират C3aR (C3a рецептор) и C5aR (C5a рецептор), които могат да бъдат активирани от C3a и C5a в местата на възпаление. Активираният C3aR/C5aR може да повиши устойчивостта на МСК към оксидативен стрес и апоптоза (Le Blanc & Mougiakakos, 2012). От друга страна, CD46, CD55 и CD59, експресирани на повърхността на МСК, могат да инхибират активирането на системата на комплемента и да предпазят МСК от клетъчен лизис (Le Blanc & Mougiakakos, 2012; Tu et al., 2010). След като веднъж клетъчният лизис се активира от системата на комплемента, описаните молекули не са достатъчни, за да се спре процеса на клетъчна смърт (Y. Li & Lin, 2012). Комбинираното третиране с IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  значително увеличава способността на МСК да секретират фактор Н, който е ключова участваща молекула в инхибирането на активирането на системата на комплемента (Tu et al., 2010).

Въпреки че директният клетъчен контакт е важен за имunosупресивните ефекти на МСК, множество проучвания показват, че имуномодулаторите, секретирани от МСК, са с критично значение. Сред тях са IDO, PGE2, iNOS, TGF $\beta$ , IL-10, HGF, HLA-G, галектини, CCL2, HO-1 и тумор некротизиращ фактор стимулиращ ген 6 (TSG6). Ще се спрем по-подробно на най-важните от тях.

#### 4.2.10. IDO

IDO има две изоформи, IDO1 и IDO2. Тези изоформи катализират триптофан, важна есенциална аминокиселина, в различни метаболити, което води до изчерпването на триптофана (Meisel et al., 2004). Тъй като триптофанът е от съществено значение за пролиферацията на Т клетките (Munn et al., 1999), изчерпването му превключва метаболитния път от гликолиза към окислително фосфорилиране, което води до арест на Т клетките (Böttcher et al., 2016). Редукцията на триптофан също индуцира натрупването на незаредена триптофан tRNA в имунните клетки, което може да активира стрес киназата GCN2 и eIF2 (еукариотен транслационен фактор 2) - медиирани пътища, водещи до намаляване на протеиновия синтез, инхибиране на клетъчната пролиферация и Fas-медирана лимфоцитна апоптоза (Munn & Mellor, 2013). Активирането на пътя на GCN2 също стимулира диференциацията на Treg, като същевременно потиска Th17 отговора чрез понижаване на IL-6 (M. D. Sharma et al., 2009). Изчерпването на триптофан може да индуцира генериране на Treg чрез производство на толерогенни DC, понижаване на експресията на костимулиращи молекули и повишаване на инхибиторния рецептор ILT3 (имуноглобулиноподобен транскрипт 3) и ILT4 (имуноглобулиноподобен транскрипт 4) на DC (Brenk et al., 2009). Метаболитите на триптофан (кинуренин, хинолинова киселина и пиколинова киселина) са по-токсични за CD4<sup>+</sup>Th1 и CD8<sup>+</sup>T клетките и по-малко токсични за Th2 клетките, като по този начин Т хелперните клетки превключват от Th1 към Th2 фенотип (H. Xu et al., 2008). Освен това, метаболитът на триптофана кинуренин може директно да се свърже с AhR (арил въглеродороден рецептор) и да стимулира CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg диференциацията, като същевременно потиска генерирането на Th17 и намалява имуногенността на DC (N. T. Nguyen et al., 2010).

IDO се секретира предимно от антиген-представящи клетки (Munn & Mellor, 2013). МСК също използват IDO за медиране на имунна супресия (Ren et al., 2009). IDO не се секретира от МСК в състояние на покой, но може да бъде индуциран от IFN $\gamma$  и усилен от PGE2. При стимулация с IFN $\gamma$  се свързват активираният STAT1 (сигнален

трансдюсер и активатор на транскрипция 1), IRF-1 (интерферонов регулаторен фактор-1) и NF- $\kappa$ B и засилват експресията на IDO гена (Chon et al., 1996; Dai & Gupta, 1990).

#### 4.2.11. PGE2

PGE2 се произвежда от COX-1 (циклооксигеназа-1, конститутивната изоформа) или COX-2 (циклооксигеназа-2, индуцируема изоформа) от арахидоновата киселина, освободена от мембранните фосфолипиди. PGE2 взаимодейства с EP2 и EP4 рецептори, експресирани на повърхността на имунните клетки и проявява своите противовъзпалителни ефекти. Взаимодействието между PGE2 и EP2 или EP4 рецепторите индуцира регулацията на цикличен AMP (сAMP), който след това активира PKA (протеин киназа A) и PI3K (фосфатидилинозитол-3 киназа). сAMP индуцира секрецията на противовъзпалителни фактори (IL-4, IL-5 и IL-10) и инхибира секрецията на провъзпалителни фактори (IL-12p70, TNF- $\alpha$ , CCL3 и CCL4) чрез потискане на IL-2 пътя. В допълнение, сAMP стимулира диференциацията на макрофагите в M2 фенотип и Th2 клетките и инхибира производството на Th1 (Betz & Fox, 1991; Meyer et al., 2003; Ylöstalo et al., 2012). Въпреки това, някои проучвания показват, че PGE2 може да има провъзпалителни ефекти, като повишава узряването на DC и пролиферацията на T клетките (Sreeramkumar et al., 2012). Проучванията показват, че ниската концентрация на PGE2 стимулира възпалителен отговор, докато висока концентрация го инхибира (Sreeramkumar et al., 2012). PGE2 засилва производството на Foxp3<sup>+</sup> Treg клетки (S. Sharma et al., 2005). PGE2 също така засилва секрецията на TGF $\beta$  от моноцити и индуцира генериране на MDSC, които биха могли да потиснат активността на NK клетките и CD8<sup>+</sup> T клетките (Fujita et al., 2011; Mao et al., 2014).

PGE2 потиска IL-12 и засилва секрецията на IL-23. IL-12 (IL-12p70) се състои от IL-12p35 и IL-12p40. Потискането на IL-12 от PGE2 се медуира чрез инхибиране на IL-12p35, но не и на IL-12p40. PGE2 може да увеличи експресията на IL-23p19, който може да образува IL-23 с IL-12p40. По този начин PGE2 индуцира експресия на IL-23, което е важно за формиране на Th17 клетките (Khayrullina et al., 2008; Rodríguez et al., 2014).

Секрецията на PGE2 от MCK може да бъде допълнително засилена от възпалителни стимули или комбинация от третиране с IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  (English et al., 2007; Aggarwal & Pittenger, 2005). Следователно, тези клетки произвеждат големи количества PGE2 за потискане на имунния отговор (Croy et al., 2010).

#### 4.2.12. *iNOS*

Мезенхимните стволови клетки експресират *iNOS*, който метаболизира L-аргинин, за да генерира NO (азотен оксид) (Sato et al., 2007). NO потиска пътищата на IL-2 (Bingisser et al., 1998; Mazzoni et al., 2002; Moriggl et al., 1999). NO също индуцира T-клетъчна апоптоза и инхибира експресията на МНС II (Harari & Liao, 2004). NO потиска секрецията на Th1 и Th2 цитокини (Bauer et al., 1997; Taylor-Robinson et al., 1994). Когато МСК се стимулират с възпалителни фактори, *iNOS* генът се регулира.

МСК от мишки, зайци, плъхове и хамстери упражняват основно супресивни функции чрез *iNOS*, докато МСК, получени от хора, прасета и маймуни, упражняват супресивни функции предимно чрез IDO (J. Su et al., 2014). Така подробните механизми на имunosупресивните функции на МСК от различни видове може се различават.

#### 4.2.13. *TGFβ*

TGFβ и IL-10 са основните имунорегулаторни цитокини, секретирани от МСК (Mattar & Vieback, 2015; Najjar et al., 2016). TGFβ се секретира конститутивно от МСК и допълнително се регулира от възпалителни фактори, като IFNγ и TNFα (Melief et al., 2013; Ryan et al., 2007). TGFβ инхибира IL-2, МНС II и експресията на костимулаторния фактор в DC и T клетки (Mattar & Vieback, 2015; Najjar et al., 2016). Както Th1 диференциацията, така и Th2 диференциацията могат да бъдат инхибирани от TGFβ (Gorelik et al., 2002). TGFβ стимулира формирането на Treg и Breg клетки (Mattar & Vieback, 2015). TGFβ е един от ключовите регулатори на експресията на Foxp3 (Mattar & Vieback, 2015; Najjar et al., 2016). Супресивните ефекти на КМ-МСК, стимулирани с IFNγ и TNFα, се прекратяват след добавяне на TGFβ, в резултат на инхибиране на експресията на *iNOS* и IDO (C. Xu et al., 2014).

#### 4.2.14. *IL-10*

В допълнение към TGFβ, IL-10 е друг основен имunosупресивен цитокин, секретирани от МСК. Експресията на IL-10 може да бъде допълнително засилена от TLR лиганди (Saraiva & O'Garra, 2010). IL-10 може да инхибира съзряването на антиген-представящи клетки и експресията на МНС и костимулаторни молекули. IL-10 инхибира производството на провъзпалителни фактори, пролиферацията на T клетки и образуването на паметови T клетки (Moore et al., 2001). IL-10 потиска генерирането на Th17 и стимулира образуването на Treg (Chaudhry et al., 2011). IL-10 упражнява своите противовъзпалителни ефекти чрез JAK1-TYK2-STAT3-SOCS3 пътя (Walter, 2014).

#### 4.2.15. HGF

МСК експресират HGF, който също има имуносупресивни ефекти. HGF индуцира експресия на IL-10 в моноцити, инхибира активността на Th1 и DC и стимулира IL-10-позитивните Treg клетки (Benkhoucha et al., 2010; P.-M. Chen et al., 2014). HGF, генериран от МСК, води и до увеличаване на имуносупресивните MDSC (Yen et al., 2013).

#### 4.2.16. HLA-G

МСК секретират HLA-G5 (секретирема изоформа на неklasически MHC клас I с имуносупресивни функции) при стимулиране с IL-10, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  (Selmani et al., 2008). HLA-G се свързва с рецепторите на ILT2 и ILT4, които са експресирани от моноцити/макрофаги, DC, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T клетки, B клетки и NK клетки (Carosella et al., 2011). HLA-G инхибира цитотоксичната функция на CD8<sup>+</sup>T и NK клетките, производството на цитокини от Th1 и Th17 клетките, индуцира Treg и увеличава MDSC клетките (Agaugué et al., 2011; Rizzo et al., 2008). Въпреки това, имуносупресивните ефекти на HLA-G могат също да бъдат зависими от концентрацията. Доказано е, че високата концентрация на HLA-G води до генериране на Treg, докато ниската концентрация стимулира развитието на Th1 клетките (Karasi et al., 2000).

#### 4.2.17. Галектини

Галектините (Gal) са известни като семейство от  $\beta$ -галактозид-свързващи животински лектини, секретирани на повърхността на различни клетки. Те са разтворими протеини, които се свързват с гликопротеините на клетъчната повърхност. Лектинът, експесиран върху клетъчната повърхност, може да образува решетки и да взаимодейства с други клетки чрез свързване със съответния рецептор (Grigorian et al., 2009). Понастоящем 11 от 15-те галектини са идентифицирани в човешките тъкани. Като цяло, галектините медиират много биологични процеси, включително регулиране на клетъчния растеж, апоптоза, пре-мРНК сплайсинг, клетъчна адхезия, подвижност, диференциация, трансформация и сигнална трансдукция, както и вродения/адаптивен имунитет (Arikawa et al., 2009; Chou et al., 2018). В човешката имунна система галектините играят решаваща роля в регулирането на хомеостазата на микросредата. Галектин-1 (Gal-1), галектин-3 (Gal-3) и галектин-9 (Gal-9) привличат най-голямо внимание сред галектините, способни да медиират имуносупресия.

МСК експресират три изоформи на Gal: Gal-1, Gal-3 и Gal-9 чрез които инхибират активността на Т-клетките (Gieseke et al., 2010, 2013; G.-Y. Liu et al., 2013).

#### *Gal-9*

Gal-9 е 36 или 39 kDa тандемно повтарящ се галектин с два неидентични домена за разпознаване на въглехидрати (Gieseke et al., 2013). През последните години Gal-9 се разглежда като молекула за контролна точка и като маркер за идентифициране на терапевтичната сила на МСК (Ungerer et al., 2014). Gal-9-медиираният имуносупресивен механизъм в МСК може да стимулира апоптозата на Т клетките или да потисне активността им. След като Gal-9 се свърже с лиганда TIM-3 на повърхността на Т клетките, сигналните пътища на NF-κB и АКТ се активират и стимулират апоптозата на Т клетките (Ji et al., 2013; Zhuo et al., 2017). Gal-9 потиска пролиферацията на В и Т клетките (Ungerer et al., 2014). Когато АТ-МСК са ко-култивирани с активирани РВМС, секретията на Gal-9 се увеличава допълнително. Литературните данни показват, че Gal-9 е противовъзпалителен медиатор и може да бъде индуциран от възпалителната среда. Инхибирането на експресията на Gal-9 чрез базиран на ретровирус подход или блокирането на пътя на Gal-9/TIM-3 с инхибитори може ефективно да намали имунорегулаторните способности на МСК (S. Kim et al., 2015). По-нататъшни проучвания върху животни показват подобни резултати *in vitro* - в култура на МСК с РВМС с рекомбинантен Gal-9, Th1 клетките се инхибират, докато Th2-секретираните цитокини са преобладаващи (M. He et al., 2018). Добре известно е, че МСК упражняват своите имуномодулиращи ефекти, като стимулират поляризацията на провъзпалителните макрофаги (M1 фенотип) в противовъзпалителен макрофаг (M2 фенотип). Интересното е, че Gal-9 също участва в този процес.

#### *Gal-1 и Gal-3*

За разлика от Gal-9, имуномодулиращите свойства на Gal-1 върху МСК все още са в процес на дебат. Въпреки че Gal-1 на повърхността на МСК може да предизвика апоптоза на активирани Т клетки *in vitro*, все още липсват *in vivo* проучвания, които да покажат, че дефицитът на Gal-1 върху МСК може да понижи имуносупресивния капацитет на МСК (Fajka-Boja et al., 2016). Gal-1 може да не е съществена част от директното медиране на имуносупресивните свойства на МСК. Въпреки това, той все още може да участва в регулирането на другите функции на МСК, като подвижност и диференциация. Изследване на Yun et al. разкрива, че Gal-1 може да стимулира миграцията на МСК чрез модулиране на NF-κB и Smad2/3 пътища (Yun et al., 2014). Gal-1 се свързва с Th1 и Th17, но не и Th2 клетки и индуцира клетъчна апоптоза (Toscano et

al., 2007). Освен това, Gal-1 засилва секрецията на IL-10 от Th1 и Th17 клетки (Thiemann et al., 2015) и потиска миграцията на имуногенни DC (Thiemann et al., 2015). Gal-1 и Sema-3A се свързват с NRP1 (невропилин 1, експресиран на Т-клетъчната повърхност) и блокират Т клетките във фаза G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Lepelletier et al., 2010).

Въпреки това, в сравнение с Gal-1, Gal-3 е по-подобен на Gal-9 по своите имunosупресивни свойства. Проучване на Liu et al. 2013 показва, че блокирането на гена на Gal-3 премахва инхибиторния ефект на МСК върху активирани мононуклеарни клетки от периферна кръв (PBMC) (G.-Y. Liu et al., 2013). Освен това, Gal-3, секретирани от МСК изолирани от кръв от пъпна връв, има положителен ефект върху инфаркт на миокарда (Peng et al., 2019).

#### 4.2.18. CCL2

CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1) е ключов хемокин, който се секретира от моноцити, ендотелни клетки, микроглия, НК клетки и регулира миграцията и инфилтрирането на клетките в тъканите. Мезенхимните стволови клетки експресират CCL2 и свързаните с тях металопротеинази, които са отговорни за разцепването на CCL2. Скъсеният CCL2 функционира като CCR2 антагонист и инхибира миграцията на имунни клетки. Докато CCL2 с пълна дължина се свързва със своя рецептор CCR2, който се експресира от активирани Th1, Th17 и НК клетки и ги привлича в местата на възпаление, скъсеният CCL2 има критична роля в потискането на автореактивните реакции от МСК. Има множество данни, че влияе върху Т-клетъчния имуноен отговор, като предизвиква превключване към Th2 и засилва секрецията на IL-4. Секрецията на CCL2 от МСК засилва Fas-L зависимата апоптоза на Т клетките. Апоптотичните Т лимфоцити стимулират секреция на TGFβ от макрофагите, който от своя страна е свързан с формирането на CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т регулаторни клетки.

#### 4.2.19. HO-1

Както човешките, така и плъшите МСК експресират високи нива на HO-1 в състояние на покой (Chabannes et al., 2007). Блокирането на HO-1 намалява имunosупресивните ефекти на МСК. HO-1 може да засили генерирането на IL10<sup>+</sup> Tr1 и TGFβ<sup>+</sup> Tr3, два типа Т регулаторни клетки. Въпреки това, след като МСК се активират от провъзпалителни фактори, експресията на HO-1 намалява бързо и имunosупресивната функция на МСК се поема от други потискащи фактори, като iNOS (Mougiakakos et al., 2011).

#### 4.2.20. TSG6

Когато се намират в определни сферични конфигурации, МСК експресират TSG6, който е важен имуносупресивен фактор (Bartosh et al., 2013; Sala et al., 2015). TSG6 може да намали пролиферацията на лимфоцити и неутрофили и да намали металопротеиназната активност и експресията на IL-6 и IFN $\gamma$ . От друга страна, TSG6 може да стимулира Foxp3<sup>+</sup> Treg клетките и експанзията IL10<sup>+</sup>iNOS<sup>+</sup> регулаторните макрофаги (Sala et al., 2015).

#### 4.3. Възможности за клинично приложение

Мезенхимните стволови клетки се използват в клиниката за клетъчна терапия от приблизително 20 години. Като се започне от животински модели до клинични изпитвания, МСК са обещаващ подход при лечението на множество заболявания. Ние ще се спрем на някои от тях, при които е прилагана терапия с МСК, като трябва да се има предвид, че темата е изключително мащабна, бързо развиваща се и съдържаща все още много въпросителни относно начина и безопасността на приложение на тези клетки.

Има редица проучвания, които демонстрират благоприятния ефект от инжектирането на МСК при модел на остър миокарден инфаркт поради противовъзпалителна им активност. Lee et al. инжектират човешки МСК интравенозно в мишки по време на ранния етап на артериално лигиране и съобщават за благоприятен ефект, въпреки че не наблюдават трайно присаждане на МСК, които изчезват напълно от тялото на реципиента в рамките на 48 часа. Изглежда, че повечето от инжектираните клетки се задържат в белите дробове. Независимо от това, инжектираните МСК показват активиран фенотип и анализът на генната експресия разкрива диференциална експресия на повече от 50 гена, сред които е открит TNF $\alpha$ -индуциран секретирани протеин-6 (TSG6). TSG6-дефицитните МСК не са в състояние да окажат своя благоприятен ефект (R. H. Lee et al., 2009). Luger et al. демонстрират намалена степен на дисфункция на лявата камера по време на миокардна исхемия и ефектът е причинен, поне частично, от системните противовъзпалителни действия на инжектираните МСК. Човешки МСК (2x 10<sup>6</sup>), инжектирани 24 часа след лигиране на артериите при мишки слабо се задържат в увреденият тъкан, но авторите наблюдават значително намаляване на възпалението на миокарда и също така подобрена сърдечна функция в сравнение с контролните мишки (Luger et al., 2017).

МСК са в състояние да индуцират противовъзпалителни ефекти в модел на увреждане на роговицата при плъхове. Роговицата на животните е била изложена на

алкохол и механични повреди. Ако животните впоследствие са били инжектирани с МСК, интравенозно или интраперитонеално, или са били инжектирани с рекомбинантен TSG6, възпалението на роговицата и непрозрачността значително намаляват в сравнение с контролните животни (Roddy et al., 2011).

Няколко модела на перитонит и сепсис показват положителния ефект на МСК и техния кръстосан разговор с макрофагите (Мф). Choi et al. показват, че индуцираното от зимозан системно възпаление се подобрява значително, ако се инжектират МСК. Отново, според *in vivo* и *in vitro* експерименти, TSG6, генериран от МСК, е предложен като един от основните фактори за потискане на активацията на Мф (Choi et al., 2011). Németh et al. демонстрират, че в случай на индуциране на сепсис при мишки, тези животни, на които са инжектирали МСК интравенозно, показват по-добра преживяемост, по-ниски нива на TNF $\alpha$  и IL-6 и по-високо ниво на IL-10. Както вече беше описано, инжектираните МСК се откриват само в белите дробове в рамките на 24 часа след инжектирането и не се наблюдава трайно присаждане (Németh et al., 2009). Други автори в подобно изследване демонстрират, че мишките инжектирани с МСК имат по-добра преживяемост и по-успешно се справят с бактериалното възпаление (Mei et al., 2010).

В модел на индуцирано от липополизахарид (LPS) системно възпаление, човешки МСК, инжектирани интраперитонеално в третирани с LPS мишки, са в състояние да намалят възпалението чрез секреция на разтворим TNF $\alpha$  рецептор-1 (sTNFR1) (Yagi et al., 2010).

Интраартикуларното инжектиране на МСК намалява възпалението и увреждането на хрущяла при миши антиген-индуциран артрит, както е показано в проучването на Kehoe et al. 2014. Локално на мястото на нараняване са инжектирани МСК, получени от костен мозък ( $0.5 \times 10^6$ ), по време на ранен стадий на колаген-индуциран автоимунен артрит. Авторите наблюдават намалено подуване на увредения крайник, понижено ниво на възпалителни цитокини и само умерено включване на МСК в увредената тъкан, въпреки че дългосрочното оцеляване на вградените клетки не е анализирано (Kehoe et al., 2014). Bartholomew et al. доказват, че системно инжектираните МСК са в състояние да потиснат алогенното отхвърляне на присадката на кожата при бабуини (въпреки че не са го предотвратили напълно). Проучването им *in vitro* разкрива значителния инхибиторен ефект на МСК върху пролиферацията на Т клетки при смесена лимфоцитна реакция (MLR) (Bartholomew et al., 2002). Хаплоидентичните МСК имат

значителен положителен ефект при остра стероидно-резистентна форма на GVHD (Le Blanc et al., 2008).

Duijvestein et al. показват подобрене на индекса на активност на болестта на Crohn при някои от пациентите, инжектирани с автоложни МСК ( $1-2 \times 10^6$  клетки на килограм телесно тегло на пациента са инжектирани интравенозно два пъти), получени от костен мозък, без сериозни нежелани странични реакции (Duijvestein et al., 2010). Прилагането на МСК за лечение при автоимунни заболявания, клинично или експериментално индуцирани, също доказва противовъзпалителните свойства на МСК (Yamout et al., 2010) (Zappia et al., 2005) (Munir & McGettrick, 2015).

В заключение е очевидно, че МСК упражняват своите противовъзпалителни ефекти при множество експериментални модели и клинични изследвания. Механизмът на действие осъществяван от МСК е сложен и разчита на множество фактори и процеси: подмяна на увредените клетки, секреция на фактори, които насочват възстановяването на тъканите и съдовия растеж (растежни фактори и хемокини), и имуносупресивна и противовъзпалителна активност.

## **5. IFN $\gamma$ - механизъм на действие и функции**

Интерфероните (IFN) са описани за първи път през 1957 г. от Issacs и Lindenmann като вещества, които ограничават репликацията на вирусите. В средата на 1960 г. Wheelock съобщава, че човешките левкоцити, стимулирани с фитохемаглутинин, експресират фактори с инхибиторен ефект, чиято природа е много подобна на интерфероните (Wheelock, 1965). Тези IFN-подобни вещества имали по-слаба устойчивост на топлина и киселина от интерфероните, описани по-рано. През 70-те години на миналия век тези вещества са допълнително характеризирани и първо са наречени „Immune IFN“, а по-късно тип II IFN. Първоначално тази номенклатура е предмет на известен дебат, тъй като се смята, че IFN от тип II е физикохимично и биологично различен от интерфероните от тип I (IFN-a, IFN-b, IFN-o и IFN-t) (Billiau & Matthys, 2009). През 1980 г. група от експерти признава разликите между IFN тип I и тип II и дава на IFN тип II името „IFN $\gamma$ “.

### **5.1. IFN $\gamma$ и IFN $\gamma$ -рецепторен комплекс**

Основните източници на IFN $\gamma$  са естествени клетки убийци (NK), Т клетки и NKT клетки. NK и NKT клетките конститутивно експресират IFN $\gamma$  иРНК, която се задържа в ядрото, което позволява бърза секреция на IFN $\gamma$  при стимулация. В Т клетките

ефективността на  $IFN\gamma$  се повишава след активиране (Hodge et al., 2002; Schoenborn & Wilson, 2007). Експресията на  $IFN\gamma$  се индуцира от цитокини, например IL-12 и IL-18, секретирани от антиген-представящи клетки и се потиска от IL-4, IL-10, TGF $\beta$  и глюкокортикоиди.  $IFN\gamma$  иРНК съдържа силно консервативен регион, богат на AU в 3'-нетранслирания регион (UTR), който медира стабилността на иРНК. Активната молекула  $IFN\gamma$ , кодирана от ген с единично копие, се състои от два антипаралелни и интеркалиращи полипептида, които след това се нагъват в симетрична двойна ос. Образуването на димер и нагъването са важни за биологичната функция и е доказано, че процесът е консервативен сред гръбначните животни (Savan et al., 2009).

Биологичната активност на  $IFN\gamma$  се иницира при свързване на димера с неговия рецептор.  $IFN\gamma$  рецепторът се състои от две лиганд-свързващи  $IFN\gamma R1$  вериги и две  $IFN\gamma R2$  вериги, предаващи сигнала. Тези протеини са кодирани от отделни гени (съответно  $IFNGR1$  и  $IFNGR2$ ), които са разположени на различни хромозоми (Bach et al., 1997). И двете вериги са конститутивно експресирани в повечето клетки. Докато нивото на експресия на  $IFN\gamma R1$  обикновено е силно, нивото на експресия на  $IFN\gamma R2$  зависи от клетъчните типове, етапите на диференциация и състоянието на активиране на клетките. Т клетките имат по-ниско ниво на експресия на  $IFN\gamma R2$  от В клетките и моноцитите. В сравнение с  $CD4^+$  Th2 клетките, Th1 клетките имат значително по-ниска експресия на  $IFN\gamma R2$ .  $IFN\gamma$  първо се свързва с  $IFN\gamma R1$  и  $IFN\gamma:IFN\gamma R1$  олигомеризацията предизвиква свързването му с  $IFN\gamma R2$ , което след това иницира сигналните събития надолу по веригата (Schroder et al., 2004). Доказано е, че взаимодействието между  $IFN\gamma:IFN\gamma R1$  и  $IFN\gamma R1:IFN\gamma R2$  е видовоспецифично, например мишият  $IFN\gamma$  не взаимодейства с човешките  $IFN\gamma$  рецептори.

## ***5.2. $IFN\gamma$ сигнализация***

Образуването на  $IFN\gamma:IFN\gamma$  рецепторен комплекс задейства Janus киназа (JAK)/сигнален трансдюсер и активатор на транскрипцията (STAT) пътя. Неактивните JAK1 и JAK2 конститутивно свързват  $IFN\gamma R1$  и  $IFN\gamma R2$ , съответно, чрез техните N-терминални домени. След образуването на лиганд рецепторен комплекс, непосредствената близост на JAK1 и JAK2 им позволява да се трансактивират един друг. След това активираните JAK фосфорилират Tyr440 остатъка на всяка  $IFN\gamma R1$  верига, за да образуват мястото за докинг за латентни STAT1 мономери чрез SH2-домени. След това STAT1 се фосфорилират в остатъка Tyr701 от JAK. Фосфорилирането позволява на

двата STAT1 да образуват хомодимер и да се дисоциират от IFN $\gamma$ R1. След това хомодимерът STAT1 се премества в ядрото, свързва се с гама-активираната последователност (GAS, TTCNNNGAA) в промоторната област на IFN отговорни гени (ISG) и иницира транскрипцията на целевите гени (Saha et al., 2010). Активността на STAT1 хомодимера е значително повишена, когато остатъкът ser727 е фосфорилиран от серин кинази като p38 митоген-активирана протеин киназа (MAPK) и фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3K) (Gough et al., 2008).

Първичните генни продукти от стимулацията на IFN $\gamma$  са транскрипционни фактори, например, интерферон-регулирани фактори (IRF), които след това иницират вторичната транскрипция на ISG. И IRF-1, и IRF-2 взаимодействат с интерферон-стимулирания отговорен елемент (ISRE, NGAAANNGAAAG/CN) на ISG. Докато IRF-1 иницира транскрипцията на гени, като NOS2, IL-12 и CИТА, IRF-2 потиска генната експресия. Интересно е, че IRF-8 и IRF-9 не могат да се свържат с ISRE и регулират ISG транскрипцията чрез свързване с други транскрипционни фактори, например IRF-8 образува димер с IRF-1 и IRF-9 образува тример със STAT1 и STAT2 (Savitsky et al., 2010).

IFN $\gamma$  също може да активира STAT1-независими пътища, въпреки че все още изисква активиране на JAK. Стимулирането с IFN $\gamma$  задейства пътя на MAP киназа. JAK активират свързаните с IFN $\gamma$ R1 Raf1 и Rap1 серин кинази, които след това фосфорилират ERK киназа. p38 MAP киназата също се активира след третиране с IFN $\gamma$ . Пътят на PI3K е друг път, стимулиран от IFN $\gamma$ , който активира протеин киназа C (PKC)  $\alpha$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$  изотипове. PKC $\alpha$  директно увеличава транскрипцията на ISG. Обратно, PKC $\epsilon$  усилва транскрипцията чрез фосфорилиране на MAP киназа, докато PKC $\delta$  прави това чрез фосфорилиране на ser727 върху STAT1. Доказано е също, че IFN $\gamma$  стимулирането активира NF- $\kappa$ B пътя чрез разграждане на инхибитора на  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) и задейства фосфорилирането на IKK $\alpha$  и  $\beta$  субединиците (Gough et al., 2008).

Пътят на JAK-STAT е основният сигнален път, инициран от стимулация с IFN- $\gamma$ . С активирането на JAK, сигналът се усилва допълнително чрез инициране на други пътища на сигнална трансдукция и максимизиране на STAT1 активността. За да се избегне неконтролирана експресия на специфични гени, водеща до увреждане на тъканите и автоимунитет, сигнализицията на IFN $\gamma$  трябва да бъде строго регулирана. Това се постига чрез механизъм за отрицателна обратна връзка, който води до индуцирана от IFN $\gamma$  експресия на супресора на цитокиновите сигнални гени (SOCS).

SOCS протеините регулират негативно  $IFN\gamma$  сигнализацията чрез инхибиране на каталитичната активност на JAK. В рамките на часове след третирането с  $IFN\gamma$  сигналният път се потиска (Croker et al., 2008).

### **5.3. Биологични функции на $IFN\gamma$**

Антивирусният ефект е първата наблюдавана биологична функция на  $IFN\gamma$  и по този начин се обяснява първоначалното му обозначение като интерферон.  $IFN\gamma$  упражнява своята антивирусна активност чрез модулиране както на вродения, така и на адаптивния имунен отговор. По време на вирусна инфекция,  $IFN\gamma$  задейства експресията на dsRNA-регулирана протеин киназа и dsRNA-специфична аденозин деаминаза - протеини, които инхибират синтеза на вирусни протеини. В допълнение,  $IFN\gamma$  увеличава антивирусната защита на клетките чрез засилване на експресията на  $IFN$  тип I и образуването на ISGF3, основният протеинов комплекс, участващ в стимулирането на генна експресия на тип I  $IFN$ .  $IFN\gamma$  също играе роля в предаването на антивирусни сигнали от вродения към адаптивния имунен отговор. Повишените нива на комплексите хемокини/хемокинови рецептори, индуцирани от  $IFN\gamma$ , привличат Т клетки към мястото на инфекцията. При получаване на сигнал от  $IFN\gamma$ , АПК повишават експресията на МНС клас II, нивата на експресия на пептиден комплекс и костимулиращи молекули, като по този начин улесняват специфичното  $CD4^+$  Т-клетъчно активиране и иницирането на адаптивния имунен отговор срещу вирусна инфекция.  $IFN\gamma$  може също да ограничи вирусната инфекция чрез регулиране на пътя на МНС клас I, което позволява на клетките да представят по-голямо количество и по-разнообразен пептиден репертоар на  $CD8^+$  Т клетките (Schroder et al., 2004). При модулирането на адаптивните имунни отговори,  $IFN\gamma$  улеснява и поддържа ангажираността на  $CD4^+$  Т клетките към Th1 линията, която е от решаващо значение за контролиране на вирусната инфекция.  $IFN\gamma$  също индуцира експресията на IL-12 от АПК. IL-12 не само активира NK клетките, основен антивирусен компонент на вродения имунитет, но също така стимулира развитието на Th1. Освен това,  $IFN\gamma$  улеснява развитието на Th1 и своята собствена експресия чрез индуциране на T-bet експресия и потискане на експресията на GATA3, протеин, който задвижва Т клетъчната Th2 диференциация. За по-нататъшно затвърждаване на диференциацията към Th1 линията,  $IFN\gamma$  сигнализацията също инхибира съществения за Th2 клетките IL-4-STAT6 сигнален път (Hu et al., 2008).

Друга важна биологична функция на  $IFN\gamma$  е активирането на макрофагите, критичен компонент при контролиране на микробната инфекция от гостоприемника. Всъщност първоначално  $IFN\gamma$  е бил наречен „макрофаг-активиращ фактор“. Веднъж стимулирани с  $IFN\gamma$ , макрофагите са подготвени и по-чувствителни към провъзпалителни медиатори, като TNF и toll-подобни рецепторни (TLR) лиганди. Праймирането с  $IFN\gamma$  усилва сигнализацията през TLR в макрофагите както чрез увеличаване на експресията на TLR, така и чрез активиране на транскрипционния фактор NF- $\kappa$ B. В резултат на това макрофагите повишават експресията на възпалителни медиатори и имунни ефектори, включително множество цитокини и хемокини (Hu et al., 2008).  $IFN\gamma$  потиска противовъзпалителната сигнализация, задействана от IL-10 и TGF $\beta$ , като по този начин претретираните с  $IFN\gamma$  макрофаги са в състояние да убиват погълнатите патогени чрез генериране на NADPH оксидаза и синтаза на азотен оксид, свързани с производството на реактивни кислородни радикали и реактивни азотни междинни съединения, съответно (Saha et al., 2010). Освен това, в отговор на  $IFN\gamma$ , макрофагите повишават експресията на компонентите от системата на комплемента, които опсонизират извънклетъчните патогени.

Модулирането на противовъзпалителния отговор е друг основен аспект на биологичната функция на  $IFN\gamma$ . IL-17 е провъзпалителен цитокин, продуциран от Th17 клетки. IL-17 генерира възпалителна среда чрез засилване на производството на провъзпалителни цитокини и хемокини. По този начин Th17 отговорът е жизненоважен за защита срещу извънклетъчни патогени. Въпреки това, ако отговорът не е регулиран, може да се стигне до увреждане на тъканите.  $IFN\gamma$  инхибира развитието на Th17 клетки чрез инхибиране на ефектите на IL-6, IL-1, TGF $\beta$ , IL-21 и IL-23, които водят до развитието на Th17 клетки. STAT1 инхибира STAT3, критичен компонент, използван от сигналните пътища на IL-6, IL-23 и IL-21. В допълнение,  $IFN\gamma$  понижава експресията както на IL-23, така и на IL-1 рецепторите върху Th17 клетки (Bettelli et al., 2007).  $IFN\gamma$  също играе критична роля в поддържането на хомеостазата на имунния отговор. Когато се стимулират с  $IFN\gamma$ , Foxp3<sup>+</sup>T клетките засилват експресията си на T-bet. Тези Foxp3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> регулаторни T клетки (Treg) са специализирани в ограничаване на Th1 имунния отговор (Koch et al., 2009).  $IFN\gamma$  също индуцира STAT1-зависима апоптоза в макрофагите чрез повишаване нивата на каспазите-1, за да се намали възпалението в резултат на инфилтрация на макрофаги. За T клетките ефектът на апоптоза е свързан със силата на действието на  $IFN\gamma$ . Когато се третират с високи нива на  $IFN\gamma$ , T клетките

спират интернализацията на  $IFN\gamma R2$ . Свърхекспресията на  $IFN\gamma R2$  индуцира експресията на Fas лиганд (FasL), водейки до Fas-зависима апоптоза (Regis et al., 2006).

В обобщение, публикуваните досега данни ясно показват, че има две направления на биологични функции на  $IFN\gamma$ : провъзпалителни и противовъзпалителни, и двете са критични за постигането на балансиран имуен отговор. Сложната, но деликатна сигнална мрежа позволява на  $IFN\gamma$  да приспособи имунния отговор или за защита срещу инфекция, или за поддържане на хомеостазата на организма.

#### ***5.4. $IFN\gamma$ : приятел или враг на аутоимунните заболявания***

Заради своите провъзпалителни свойства,  $IFN\gamma$  се свързва с различни аутоимунни заболявания. Системният лупус еритематозус (SLE) е комплексно аутоимунно заболяване и основната му характеристика е генерирането на аутоантитела от активираните В клетки. Комплексът антитяло-комплемент причинява локално и системно възпаление и може да доведе до бъбречна недостатъчност. Наличието на  $IFN\gamma$  изостря заболяването.  $IFN\gamma$  повишава експресията на  $IFN\alpha$ , чиято сигнализация индуцира транскрипцията на фактора за активиране на В клетките (BAFF). BAFF води до размножаване на В клетките и производство на аутоантитела. Освен това, макрофагите и фибробластите повишават секрецията на комплементни протеини в отговор на  $IFN\gamma$ , което води до отлагане на елементи от системата на комплемента в бъбреците. В допълнение,  $IFN\gamma$  допринася за разпространяване на възпалението като индуцира хемокини, които да привличат моноцити към различни органи. Като цяло, различни нови миши модели на лупус-подобна болест показват, че ниските нива на  $IFN\gamma$ , ако са персистиращи, са способни да стимулират аутоимунитет.

За разлика от SLE, при множествена склероза (МС) е доказано, че  $IFN\gamma$  смекчава тежестта на заболяването. МС е аутоимунно заболяване, причинено от инфилтрация на лимфоцити в централната нервна система. Тъй като има повишени нива на  $IFN\gamma$  в мозъка на пациенти с МС, се предполага, че автореактивните Th1 клетки може да са отговорни за стимулиране на процеса на разрушаването на миелиновата обвивка. Въпреки това, експерименталните резултати получени при използване на неутрализиращи анти- $IFN\gamma$  антитела в експериментален животински модел на аутоимунен енцефаломиелит показват друго. Инжектирането с анти- $IFN\gamma$  антитела не облекчава симптомите, дори всъщност влошава заболяването. Освен това, последните доклади откриват множество полиморфизми в гените, кодиращи  $IFN\gamma/IFN\gamma R$  при пациенти с МС. Лечението с  $IFN\gamma$  при пациенти с МС често води до рецидив на заболяването, като скоросен доклад

предполага, че ефектът на IFN $\gamma$  върху пациентите може да се различава в зависимост от степента на демиелинизацията (Lees & Cross, 2007).

По отношение на друго аутоимунно заболяване, ревматоиден артрит (РА), ефектът на IFN $\gamma$  зависи от стадия на заболяването. Ревматоидният артрит се характеризира с натрупване на ефекторни Т клетки, които са насочени към синовиалната мембрана, хрущяла и костите. При животински модел на колаген-индуциран артрит се наблюдава ускоряване на прогресията на заболяването, когато се третира с IFN $\gamma$  в ранната фаза на индуциране на заболяването. Както се очаква, симптомите се подобряват, когато животните се третират с анти-IFN $\gamma$  антитела; симптомите, обаче се влошават, когато антителата са инжектирани по време на по-късния стадий на заболяването (Saha et al., 2010). Възможно е IFN $\gamma$  да стимулира активността на ефекторните Т клетки по време на инициране на заболяването и да потиска имунните отговори по време на прогресията на заболяването чрез индуциране на апоптоза на ефекторни Т клетки и генериране на Tregs.

По отношение на аутоимунните заболявания, експерименталните проучвания досега показват, че ефектите на IFN $\gamma$  варират в зависимост от видовете и статуса на прогресия на заболяването. За да се използват IFN $\gamma$  или антитела за неутрализиране на IFN $\gamma$  като лечение на аутоимунно заболяване, е необходима повече информация, за да се разбере по-добре патогенезата на заболяването.

### ***5.5. IFN $\gamma$ и злокачествени заболявания***

Хроничното и нелекувано възпаление е един от основните фактори при злокачествени заболявания. Честотата на тези заболявания има тенденция да се увеличава с времето в развитите страни. Ефектът на IFN $\gamma$  върху ограничаване на туморната прогресия и растеж е добре документиран. IFN $\gamma$  увеличава имуногенността на туморните клетки чрез засилване на представянето на туморните антигени към тумор-специфични Т клетки и NK клетки. IFN $\gamma$  също засилва антитуморната активност на Т и NK клетките. Например, доказано е, че IFN $\gamma$  може да индуцира FasL върху туморни клетки, което може да доведе до Fas-зависима апоптоза. Освен това, IFN $\gamma$  инхибира растежа и пролиферацията на туморните клетки чрез блокиране на клетъчния цикъл (Saha et al., 2010). Също така, изчерпването на IFN $\gamma$  стимулира растежа на химически индуцирани тумори. Въпреки това, скорошен доклад предполага, че възпалителната среда, задвижвана от IFN $\gamma$ , може да играе роля в оцеляването на раковите клетки и имunosупресията на отговора на гостоприемника при UVB-индуциран меланом (Zaidi et

al., 2011). Резултатът предполага, че ефектът на IFN $\gamma$  върху туморите вероятно зависи от локалната туморна среда.

Провъзпалителните цитокини IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  синергично променят способността на МСК да регенерират и да се диференцират чрез NF- $\kappa$ B-медирано активиране. Продължителното излагане на високи нива на IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  води до повишена предразположеност към злокачествена трансформация в МСК, поради повишената регулация на онкогените c-Fos и c-Myc по NF- $\kappa$ B сигналния път. При мишки с овариектомия, изчерпването на IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  елиминира тенденцията към злокачествена трансформация в МСК (L. Wang et al., 2013).

IFN $\gamma$  е изключителен плейотропен цитокин. Той може не само да засили както вродения, така и адаптивния имунен отговор срещу патогени и тумори, но също така има способността да поддържа имунната хомеостаза. IFN $\gamma$  има толкова разнообразни функции, тъй като ефектът му се различава в зависимост от клетъчния тип и нивото на активиране на отговора при задействане на интерфероновия рецептор. Използването на IFN $\gamma$  за клинични изпитвания при терапия на автоимунни заболявания и рак е с променлив успех към момента. Експерименталните данни, получени досега, показват, че трябва да се вземе предвид финия баланс между про- и противовъзпалителните ефекти на IFN $\gamma$ , когато се обмисля ефективна клинична употреба на този важен имунорегулиращ протеин.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да изследва как МСК от пъпна връв реагират на процеса на възпаление, по отношение на техните основни характеристики и поведение, когато са третирани с ключовия провъзпалителен цитокин, Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ).

За реализиране на поставената цел беше необходимо изпълнението на следните експериментални задачи:

1. Да се изолират и култивират мезенхимни стволови клетки от човешка пъпна връв.
2. Да се докаже стволовия характер на култивираните клетки чрез проследяване на параметри като пролиферативен капацитет, имунофенотип, клоногенност, както и потенциал за остеогенна и адипогенна диференциация.
3. Да се определи експериментално подходяща концентрация на IFN $\gamma$  за третиране на МСК.
4. Да се изследва ефекта, който IFN $\gamma$  оказва върху морфологията на МСК.
5. Да се изследва влиянието на IFN $\gamma$  върху основните свойства на МСК: пролиферативен капацитет, клоногенност, потенциал за остеогенна и адипогенна диференциация.
6. Да се изследва влиянието на IFN $\gamma$  върху повърхностната експресия на някои молекули.
7. Да се изследва степента на апоптоза на МСК под влиянието на IFN $\gamma$ .
8. Да се проследи влиянието на IFN $\gamma$  върху стабилността на кариотипа на МСК.
9. Да се изследва цитокиновата секреция на МСК под влиянието на IFN $\gamma$ .
10. Да се изследва имуномодулиращия ефект на третирани с IFN $\gamma$  МСК, като се анализира повърхностната експресия на Т-клетъчни молекули и секрецията на цитокини.

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

## МАТЕРИАЛИ

### 1. Проби от човешка пълна връв

Проби от човешка пълна връв (дължина 6-15 см) бяха получени от 35 пациентки в хода на оперативно или естествено родоразширение, проведено в САГБАЛ „Д-р Щерев“, София, България, след подписване на информирано съгласие. Като изключващи критерии бяха приети сърдечно-съдови, туморни, метаболитни, автоимунни и психични заболявания. Пробите бяха съхранени в стерилен физиологичен разтвор на 4°C и обработени до 24 часа в Тъканна банка БулГен АД, в съответствие с Приложение 1-А към Договор за вземане, изследване и съхраняване на мезенхимни стволови клетки от тъкан от пълна връв. Обобщена информация за донорите на човешка пълна връв е представена в Таблица 2.

Таблица 2. Обобщена информация за донорите на пълна връв (GW - гестационна седмица, P.N. – *partus normalis*, нормално раждане, S.C. - *Sectio caesarea*, оперативно раждане).

Но проба	Възраст	GW	Раждане	Пол	Но проба	Възраст	GW	Раждане	Пол
UCMSC 01	33	38+4	S.C.	момиче	UCMSC 19	26	39+6	P.N.	момиче
UCMSC 02	32	39+0	S.C.	момиче	UCMSC 20	43	40+2	P.N.	момиче
UCMSC 03	40	39+3	P.N.	момиче	UCMSC 21	29	39+2	S.C.	момиче
UCMSC 04	38	39+0	P.N.	момиче	UCMSC 22	33	38+4	P.N.	момиче
UCMSC 05	35	37+5	P.N.	момиче	UCMSC 23	34	39+0	P.N.	момиче
UCMSC 06	37	40+6	S.C.	момиче	UCMSC 24	34	40+0	S.C.	момиче
UCMSC 07	37	39+2	P.N.	момиче	UCMSC 25	35	39+2	P.N.	момиче
UCMSC 08	37	38+2	S.C.	момиче	UCMSC 26	29	40+6	P.N.	момиче
UCMSC 09	45	38+6	S.C.	момиче	UCMSC 27	30	40+5	S.C.	момиче
UCMSC 10	34	41+0	P.N.	момиче	UCMSC 28	41	39+5	P.N.	момиче
UCMSC 11	40	39+4	S.C.	момиче	UCMSC 29	36	39+0	P.N.	момиче
UCMSC 12	27	39+2	P.N.	момиче	UCMSC 30	34	39+6	P.N.	момиче
UCMSC 13	31	41+2	S.C.	момиче	UCMSC 31	35	38+2	P.N.	момиче
UCMSC 14	41	38+4	P.N.	момиче	UCMSC 32	34	40+2	S.C.	момиче
UCMSC 15	35	39+2	P.N.	момиче	UCMSC 33	41	39+4	P.N.	момиче
UCMSC 16	36	38+2	S.C.	момиче	UCMSC 34	35	40+2	S.C.	момиче
UCMSC 17	32	39+2	P.N.	момиче	UCMSC 35	37	41+0	P.N.	момиче
UCMSC 18	28	42+2	P.N.	момиче					

### 2. Проби периферна венозна кръв от здрави донори

Проби периферна венозна кръв от здрави доброволци (на възраст между 22 и 48 год.) бяха получени след подписване на информирано съгласие. Като изключващи критерии бяха приети сърдечно-съдови, туморни, метаболитни, автоимунни и психични заболявания. От всеки донор бяха взети между 8 и 15 ml периферна венозна кръв във

вакуумни епруветки BD Vacutainer EDTA 4 ml. Непосредствено след пробовземането започваше процедурата по изолиране и култивиране на човешки моноклеарни клетки от периферна кръв (РВМС). Обобщена информация за донорите на периферна венозна кръв е представена в Таблица 3.

Таблица 3. Обобщена информация за здравите донори на периферна венозна кръв.

№ проба	Пол	Възраст (год.)	Количество периферна венозна кръв (мл)	Общ брой изолирани РВМС	Посяти РВМС/ямка
1	мъж	33	15	1.31x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>6</sup>
2	мъж	40	12	1.6x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>6</sup>
3	жена	27	9	1.27x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>6</sup>
4	жена	27	9	1.35x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>6</sup>
5	мъж	31	8	1.84x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>6</sup>
6	жена	23	9	1.56x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>6</sup>
7	жена	49	9	1.2x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>6</sup>
8	жена	48	9	1.13x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>6</sup>
9	жена	22	9	0.6x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>6</sup>
10	мъж	29	9	1.21x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>6</sup>

### 3. Хранителни среди и реактиви за клетъчно култивиране

#### 1.3.1 Основна среда DMEM/F12 1:1 (PAN Biotech, Germany)

w: stab. Glutamine / w:1.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>

- DMEM/F12 1:1 - 500 ml
- Глюкоза - 3.151 g/l
- L-глутамин - 543.85 mg/l
- На-пируват - 110 mg/l
- Амино киселини и витамини

#### 1.3.2 Trypsin-EDTA (PAN Biotech, Germany) в HBSS w/o: Ca, Mg, w: Phenol red

- Trypsin - 0.5 g/l HBSS (0.05%)
- EDTA 4Na - 0.2 g/l HBSS (0.02%)

#### 1.3.3 Phosphate buffered saline (Sigma, USA) – таблетки

Една таблетка се разтваря в 200 mL дестилирана вода, за да се получи 0.01M фосфатен буфер (pH 7.4, at 25 °C):

- 0.0027 M KCl
- 0.137 M NaCl

1.3.4. *Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B mix* във 0.85% физиологичен разтвор

- 10 000 U/ml Penicillin
- 10 mg/ml Streptomycin
- 25 µg/ml Amphotericin B

1.3.5. *Рекомбинантен човешки Interferon-γ (E. coli)*

- Молекулно тегло: 16.700 Da
- Концентрация: 100 000U/ml в 0.1M PBS (pH 7.0), 2.5% захароза (w/v), 2.5% човешки серумен албумин (w/v), филтруван през филтър с мембрана на порите 0.2µm.

## МЕТОДИ



Фигура 3. Схематично обобщение на използваните методи в рамките на дисертационния труд.

### 1. Изолиране и култивиране на човешки мезенхимни стволови клетки от пъпна връв

Човешки мезенхимни стволови клетки от пъпна връв (WJ-МСК) бяха изолирани от здрави донори (n=35, 37-40 гестационна седмица) след подписване на информирано

съгласие одобрено от Етичната комисия на САГБАЛ „Д-р Щерев“, София, България. Парчетата пъпна връв (между 6 см и 15 см) бяха промити за кратко с 70% етанол и прехвърлени в стерилен физиологичен разтвор. Кръвоносните съдове бяха отстранени внимателно и остатъкът от тъканта беше нарязан на малки парчета, които в последствие бяха инкубирани в 0.25% колагеназа (w/v) (Genaxxon, Germany), 40 mg/ml хиалуронидаза (Genaxxon, Germany) и 1% пеницицил/стрептомицин/амфотерицин В микс (PAN Biotech, Germany) за минимум 2 часа в инкубатор (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) на шейкър. След края на инкубационния период хомогенизираната тъкан беше разреждана със стерилен физиологичен разтвор и прекарана през клетъчно сито (70 µm). Пробата беше центрофугирана за 10 мин при 300 x g и клетъчната утайка беше посята в 25 cm<sup>2</sup> фласкове (Biologix, USA) за клетъчно култивиране в концентрация 1x10<sup>4</sup> клетки/cm<sup>2</sup> в среда DMEM/F12 обогатена с 10% фетален телешки серум (FBS, PAN Biotech, Germany), 10 ng/ml rHuFGF-b (Genaxxon, Germany) и 1% пеницицил/стрептомицин/амфотерицин В микс. На следващия ден бяха отстранени неадхериралите клетки чрез промиване със стерилен физиологичен разтвор, след което беше добавена свежа културална среда (5ml/фласк). На третия ден от началното посяване, достигналите над 90% конfluентност прилепнали мезенхимни стволови клетки бяха трипсинизирани (0,05% Трипсин/0,02% EDTA) в продължение на 4 мин. и препосяхи. Свежа културална среда беше добавяна на всеки 48 часа.

### ***1.1. Клетъчно култивиране***

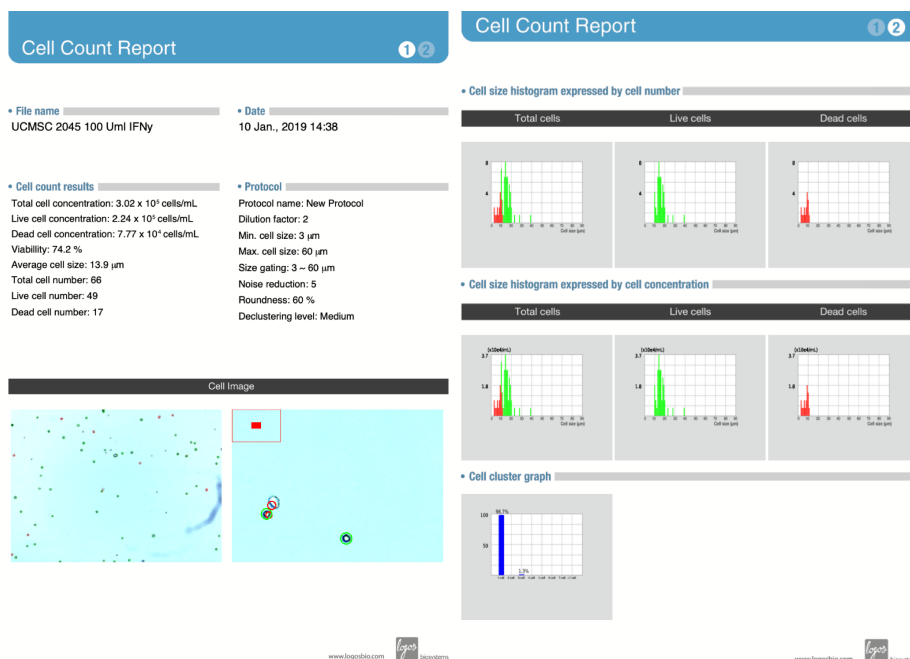
Първичните клетъчни култури, използвани в експерименталната работа, бяха поддържани в хранителна среда DMEM/F12 + 10% (v/v) FBS + 10 ng/ml rHuFGF-b в 6-, 24- или 96-ямкови стерилни плаки (Greiner Bio-One, Austria) и 25 cm<sup>2</sup> фласкове в зависимост от целта на конкретния експеримент. Инкубациите бяха извършвани в CO<sub>2</sub>-инкубатор Thermo Scientific Heracell 150i при температура 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажност на въздуха. Всички манипулации с клетки бяха осъществявани в стерилен ламинарен бокс Thermo Scientific клас II, а растежът на клетките беше проследяван под инвертен микроскоп (Leica, Germany). Културалната среда беше сменяна на 48 часа, като при достигане до определена плътност (80% - 90%) клетките бяха препосяхвани след трипсинизиране. Клетъчните култури бяха поддържани в продължение на 3-5 последователни пасажа, като клетки от различни пасажи бяха замразявани в течен азот.

### *1.1.1. Трипсинизиране на клетки*

При пасажирание клетките бяха промивани със стерилен физиологичен разтвор, след което бяха третираны с 0,05% трипсин/0,02% EDTA в продължение на 3 - 4 минути на 37°C, на шейкър. Ензимното действие на трипсина беше блокирано с добавяне на DMEM/F12, съдържаща 10% (v/v) FBS, при съотношението трипсин : културална среда = 1 : 5. Клетките бяха отмивани от повърхността на съда за култивиране с помощта на пастърова пипета, събирани в стерилна епруветка и центрофугирани на 300 x g за 10 мин. Утаените клетки бяха ресуспендирани в подходящ обем среда за култивиране и бяха посявани в нужната концентрация.

### *1.1.2. Броене на клетки*

За броене на клетки бяха използвани хемоцитометър на Bürker и LUNA II Automated cell counter (Logos biosystems, South Korea). В камерата на Bürker се изброяваха клетките в 25 малки квадрата (два диагонала от по 12 квадрата + един произволен квадрат), равняващи се на общ обем от 0.1 mm<sup>3</sup>. При изброяването на клетките беше спазвано правилото на Bürker: във всеки квадрат се изброяват клетките намиращи се вътре в квадрата и които докосват отвън или отвътре две съседни страни на квадрата. Камерата има височина 0.1 mm. Един малък квадрат в камерата има обем 1/250 µl. Броят клетки в 1 ml е равен на броя изброени клетки x коефициента на Bürker - 10<sup>4</sup>. За определяне броя на клетките се взимаше средно аритметичната сума от две преброявания на клетки в камерата на Bürker. В случаите, в които се използваше LUNA II Automated cell counter, клетките се преброяваха според инструкциите на производителя.



Фигура 4. Репрезентативно броене на МСК на LUNA II Automated cell counter.

### 1.1.3. Замразяване на клетки

При достигане на плътност над 90%, клетките бяха трипсинизирани, събирани в стерилна пластмасова епруветка (10 ml; SPL Life Sciences, Korea) и центрофугирани за 10 мин. на 300 x g. Утаената фракция беше ресуспендирана в 2 ml DMEM/F12 + 10 % (v/v) FBS и броят на клетките беше определян с камера на Bürker. Преброените клетки бяха центрофугирани (300 x g, 10 мин.), след което утайката беше разтваряна в охладен фетален телешки серум, съдържащ 10% (v/v) диметилсулфоксид (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA). По 1 ml клетъчна суспензия беше пренасяна в криоепруветки (Greiner Bio-One, Austria), които бяха оставяни последователно за 15 мин. на лед; 15 мин. на -20°C, а след това – на -80°C за 24 часа. За по-продължително време замразените клетки бяха съхранявани в парите на течен азот (-196°C). Друг метод за замразяване на клетки, който беше използван е чрез NALGENE™ Freezing Container (Sigma-Aldrich, USA) с изопропанол на стайна температура. Контейнерът за замразяване се прехвърля възможно най-бързо във фризер (-80°C), като изопропанолът в него осигурява скорост на охлаждане на криовиалките много близка до -1°C/минута. Криовиалките се прехвърлят в контейнер с течен азот след 1 до 14 дни.

#### *1.1.4. Размразяване на клетки*

В стерилна пластмасова 15 ml епруветка бяха поставяни 10 ml затоплена среда DMEM/F12 + 10 % (v/v) FBS. Криоепруветка със замразени клетки (MCK) беше пренасяна от контейнера с течен азот върху лед. С пастъорова пипета (Biologix, USA) беше взимана малко среда от епруветката и беше поставяна в криовиалката, съдържаща замразени клетки. Клетките бяха ресуспендирани, след което суспензията беше прехвърляна отново в епруветката. Процедурата беше повтаряна до изчерпване съдържанието на криовиалката. Работеше се бързо, поради наличието на DMSO в средата, в която са били замразени клетките, тъй като той е токсичен за тях при стайна температура. Епруветката беше центрофугирана за 10 мин. на 300 x g, след което средата беше отстранявана с пастъорова пипета и утаените клетки бяха ресуспендирани в необходимия обем свежа среда със серум с или без 10 ng/ml rHuFGF-b. Клетъчната суспензия беше посявана в шестямкова плака (Greiner Bio-One, Austria) и пренасяна в CO<sub>2</sub>-инкубатор при температура 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажност на въздуха.

#### *1.1.5. Определяне на клетъчна виталност*

Определянето на виталност на клетки се основава на способността на багрилото Trypan blue да преминава безпрепятствено през мембраните на мъртви клетки и да ги оцветява. По този начин живите клетки изглеждат светли, а мъртвите сини. Клетките бяха събирани и центрофугирани за 10 мин. на 300 x g, след което бяха промивани два пъти в PBS за отстраняване на феталния телешки серум от средата, чиито белтъци дават силна реакция с багрилото. Равни обеми (1:1) от клетъчната суспензия и 0.4% (w/v) разтвор на багрилото Trypan blue (Sigma-Aldrich, USA) бяха смесвани и инкубирани за 3 мин. на стайна температура. Клетките бяха броени 5 мин. след инкубацията в камера на Bürker или LUNA II Automated cell counter. Жизнеността на клетките, изразена в проценти, беше изчислявана по формулата:

$$V[\%] = (C1/C2) \times 100$$

V е жизнеността на клетките, C1 е концентрацията на живите клетки (брой живи клетки на милилитър), C2 е концентрацията на всички клетки (общ брой клетки на милилитър).

#### ***1.2. Имунофлуоресценция на MCK от пънна връв за Vimentin***

Експресията на мезенхимния клетъчен маркер Vimentin беше детектирана посредством имунофлуоресценция. Култивираните MCK от пънна връв (пасаж 3, над 80%

конфлуентност) бяха трипсинизирани, преброени, ресуспендирани в културална клетъчна среда DMEM/F12 + 10 % FBS и накрая посяти върху стерилни стъклени ламелки (3.25 cm<sup>2</sup>) в концентрация 0.5 x 10<sup>4</sup> клетки/cm<sup>2</sup>. Седемдесет и два часа по-късно прилепналите и достигнали оптимална плътност (50% – 60%) фибробластоподобни клетки бяха фиксирани с 4% разтвор на параформалдехид (pH=7.5) за 10 мин. и пермеабелизирани с 0.1% разтвор на Triton X-100 (Merck, Germany) в PBS в продължение на 5 мин. на стайна температура. След трикратно промиване с PBS клетките бяха инкубирани за 2 часа при стайна температура във водна камера с Alexa Fluor® 488 Mouse Anti-Human Vimentin антитяло (BD Biosciences). Последва измиване 3 пъти с PBS и включване на клетките в Mowiol (Sigma-Aldrich, USA). Флуоресцентната реакция беше наблюдавана на флуоресцентен микроскоп Leica (Germany).

## **2. Третиране на мезенхимни стволови клетки с различни концентрации на IFN $\gamma$**

МСК от пъпна връв бяха третирани с различни концентрации рекомбинантен IFN $\gamma$  (Roche, Switzerland): 100 IU/ml, 200 IU/ml и 500 IU/ml. Третираните клетки бяха култивирани в среда DMEM/F12+10% FBS и 1% пеницилин/стрептомицин/амфотерицин В микс. Културалната среда беше сменяна на всеки 48-72 часа, при което беше добавян свеж IFN $\gamma$ . Продължителността на третиране на клетките с IFN $\gamma$  се определяше от типа на експеримента.

В рамките на дисертационния труд с цел удобство и прегледност МСК третирани с IFN $\gamma$  са обозначени като „МСК $\gamma$ “, съответно МСК от пъпна връв третирани с IFN $\gamma$  – „WJ-МСК $\gamma$ “.

## **3. Флоуцитометричен анализ на МСК $\gamma$ и контролната група нетретирани МСК по отношение на експресирани повърхностни маркерни белтъци**

МСК от пъпна връв на втори пасаж бяха препосаяти в концентрация 1x10<sup>5</sup> клетки/cm<sup>2</sup> и култивирани в присъствие на различна концентрация IFN $\gamma$  (100 IU/ml, 200 IU/ml и 500 IU/ml) за пет дни. Контролните клетъчни култури бяха култивирани в среда без IFN $\gamma$ . Клетките бяха трипсинизирани (Trypsin 0.05%/EDTA 0.02%; 3 – 5 мин.; 37°C), преброени (хемоцитометър Bürker) и 1x10<sup>6</sup> клетки/проба бяха центрофугирани за 10 мин. на 300 x g. Клетките бяха измити с 300  $\mu$ l миещ разтвор (CellWash solution, Becton Dickinson, USA) и маркирани с флуорохром-конюгирани антитела за 15 мин. на тъмно. След маркирането, клетките бяха измити отново и фиксирани с FIX solution (BD, USA).

Повърхностните клетъчни маркери на МСК от пъпна връв бяха анализирани с помощта на следните антитела: anti-CD45-FITC/CD34-PE, -CD73-PE, -CD90-FITC, -CD105-PerCP/Cy5-5, -CD44-FITC, -CD29-PE, -CD146-PE, -HLA-I-FITC, -PD-L1-PE (всички от eBioscience, USA). Епруветките бяха вортексирани 2-3 пъти с резки кратки движения (клетките се смесват с антителата), след което бяха инкубирани за 15 минути на стайна температура, на тъмно. След края на инкубационния период клетките бяха вортексирани отново и ресуспендирани в  $\times 2$  ml CellWash solution/епруветка, след което бях центрофугирани 10 мин. на 300  $\times$  g. Супернатантите бяха отделени, а утаените клетки бяха фиксирани в  $\times 0.5$  ml Cell Fix/епруветка (Becton Dickinson, USA). Неспецифичната флуоресценция беше определяна с помощта на негативни контроли. Специфичното флуоресцентно белязване беше определяно на флуцитометър FACSCalibur (BD, USA), като се използваше софтуеър BD CellQuest Pro (BD, USA).

#### **4. Изследване за клоногенен клетъчен растеж на първични култури от МСК, третирани с IFN $\gamma$ и контролната група нетретирани МСК**

Тестът за клоногенност е класически подход за установяване на стволови или прогениторни клетки в дадена тъкан. Именно поради съчетанието на клоногенни свойства с характерна фибробластоподобна морфология, мезенхимните стволови клетки се обозначават още и като фибробластни колония-формиращи единици (CFU-F). Тестовите за CFU-F са показателни за клетки с клоногенни свойства, а освен това, се приемат и като репрезентативни за по-бързо пролифериращите от тях в дадена култура, поради което са се наложили като стандартна *in vitro* процедура за идентифициране на клетки със стволови характеристики в мезенхимните тъкани. МСК от пъпна връв на втори пасаж бяха посяти в 25 cm<sup>2</sup> PVC матраци в концентрация 20 клетки/cm<sup>2</sup> и култивирани в DMEM/F12 +10% FBS + 1% пеницицил/стрептомицин/амфотерицин В микс и 100 IU/ml IFN $\gamma$ . Свеж IFN $\gamma$  беше добавян към клетъчните култури на всеки 48-72 часа. Контролните клетки бяха поддържани в стандартна клетъчна среда без да се добява IFN $\gamma$ . Клетките бяха култивирани при стандартни условия (37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажност на въздуха). Ежедневно беше извършвано микроскопско наблюдение с помощта на инвертен микроскоп (Leica Microsystems), за да се проследи произхода на всеки клон от единична клетка.

#### **4.1. Оцветяване на колонии**

След 14 дни формираните клетъчни колонии бяха третирани с фиксиращ/оцветяващ разтвор: 0.05 % Crystal violet solution, 1% формалдеhid, 10% фосфатен буфер и 10% метанол за 20 мин. на стайна температура. Излишната боя беше отмита с дестилирана вода. Наличието на клетъчни колонии беше установено с помощта на инвертен светлинен микроскоп (Leica Microsystems) и фотографирано посредством цифрова фотокамера Canon Powershot G1X. Колониите бяха преброени с помощта на стереомикроскоп.

При изчислението на клоногенна ефективност на третираните с IFN $\gamma$  и контролните МСК от пъпна връв, бяха взети предвид само колонии състоящи се от минимум 50 клетки. Колониите бяха преброени (3 повторения) и беше изчислена клоногенна ефективност по следната формула:

$$EK[\%] = \text{броя на преброените колонии} / \text{броя на посятите клетки} \times 100$$

#### **5. Пролиферативен тест на първични култури от МСК, третирани с IFN $\gamma$ и контролната група нетретирани МСК**

Методът на AlamarBlue® (AB) (Bio-Rad Laboratories) измерва индиректно клетъчната концентрация и дава линейни резултати с високи специфичност и чувствителност. AlamarBlue® методът беше използван за да се определи клетъчната виталност и пролиферативна скорост. МСК от пъпна връв бяха трипсинизирани (Trypsin 0.05%/EDTA 0.02%; 3 – 5 мин.; 37°C) и препосяти в 96-ямкова плака в концентрация 500 клетки/ямка, в четири повторения. Клетките бяха третирани с 100 IU/ml IFN $\gamma$  по време на целия експеримент, докато контролните култури бяха поддържани в стандартна среда. Клетъчната пролиферация беше измервана всеки ден в рамките на седем-дневен период, като се използва AlamarBlue® (Bio-Rad Laboratories), според инструкциите на производителя. Накратко, МСК от пъпна връв бяха инкубирани за 4 часа на 37°C, 5% CO $_2$  и 95% влажност на въздуха с 1/10 обема на АВ в културалната среда. След края на инкубационния период, флуоресценцията беше измервана при дължини на вълната 544 nm (абсорбция) and 590 nm (емисия) на FLUOstar OPTIMA microplate reader (BMG Labtech). Скоростта на клетъчната пролиферация и времето за удвояване на клетъчната популация (population doubling time, PDT) за всеки експеримент бяха изчислени с помощта на стандартна крива, построена чрез измерване на флуоресценцията на AlamarBlue® (AB) на контролни нетретирани клетки посяти в известни концентрации. Времето за удвояване на клетъчната популация беше изчислено със следната формула:

$$PDT = (t - t_0) \times \log_2 / \log (C - C_0),$$

където  $t-t_0$  е времето за култивиране (часове);  $C$  е крайната клетъчна концентрация; и  $C_0$  е началната клетъчна концентрация.

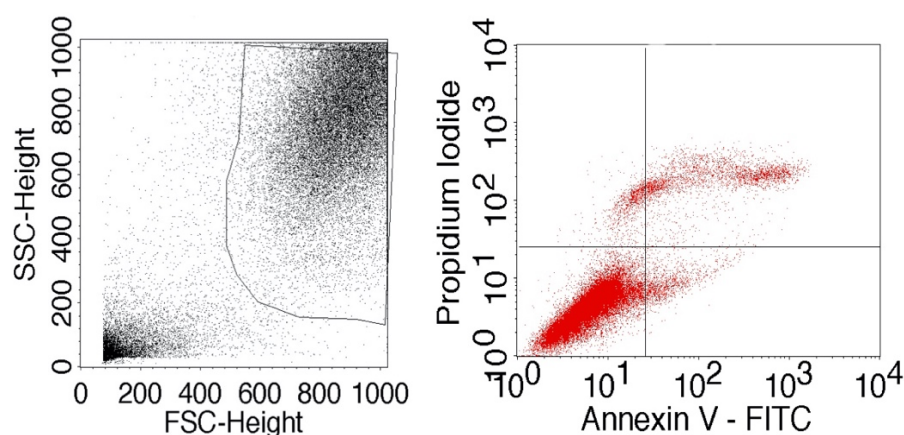
#### **6. Определяне на процент апоптотични клетки в култури от МСК, третирани с IFN $\gamma$ и контролната група нетретирани МСК**

FITC Анексин V се използва за количествено определяне на процента клетки в популацията, които са активно подложени на апоптоза. Той се основава на свойството на клетките да губят мембранна асиметрия в ранните фази на апоптоза. В апоптотичните клетки мембранныят фосфолипид фосфатидилсерин (PS) се премества от вътрешната страна на плазмената мембрана към външната, като по този начин PS се излага на повърхността. Анексин V е калций-зависим фосфолипид-свързващ протеин, който има висок афинитет към PS и се използва за идентифициране на апоптотични клетки с повърхностен PS. Пропидиевият йодид (PI) е стандартно използван за разграничаване на живи от нежизнеспособни клетки. Живите клетки с непокътнати мембрани не пропускат PI, докато мембраните на мъртвите и увредените клетки са пропускливи за PI. Клетки, които се оцветяват положително за FITC Анексин V и отрицателни за PI, са в процес на апоптоза. Клетките, които се оцветяват положително както за FITC Анексин V, така и за PI, са или в краен стадий на апоптоза или са подложени на некроза, или вече са мъртви. Клетките, които са негативни както за FITC Анексин V, така и за PI, са живи и не се намират в етап на апоптоза, която може да се отчете.

МСК от пъпна връв на втори пасаж бяха посяти в концентрация  $1 \times 10^5$  клетки/cm<sup>2</sup> и култивирани в DMEM/F12 + 10% FBS + 1% пеницицил/стрептомицин/амфотерицин В микс в присъствие или отсъствие на 100 IU/ml IFN $\gamma$  в продължение на осем дни. Клетките бяха трипсинизирани и събирани на ден едно, четири и осем и процентът клетки в ранна (FITC Annexin V положителни и пропидиев йодид (PI) отрицателни) и късна апоптоза (FITC Annexin V и PI положителни) беше определян като се използваше FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD, USA), според инструкциите на производителя.

- Клетъчните утайки бяха ресуспендирани в 2 ml Cell Wash и центрофугирани на 300 x g за 10 мин.
- Промиване със студен Cell Wash (4-8°C) последвано от центрофугиране на 300 x g за 5 мин.
- Приготвяне на работен разтвор на Binding buffer (10X stock разтвор): за 2 епруветки се приготвя 1 ml: 100  $\mu$ l 10 X Binding buffer + 900  $\mu$ l дестилирана вода.

- Клетките се ресуспендираха в 100  $\mu$ l 1 X Binding buffer (проба и контрола от съответния ден).
- Накапване по 5  $\mu$ l Annexin V (FITC) и 5  $\mu$ l PI във всяка епруветка.
- Внимателно се вортексира и епруветките се инкубират за 15 мин. на стайна температура, на тъмно.
- Към всяка епруветка се добавят по 400  $\mu$ l 1 X Binding buffer.
- Пробите се анализират в рамките на един час на флуоцитометър FACSCalibur, като се използваше BD CellQuest Pro софтуер (Фигура 5).



Фигура 5. Фенотипно определяне на процент *WJ-MCK* и *WJ-MCK* $\gamma$  в ранна и късна апоптоза. Първоначално беше гейтирано върху облак *MCK* (ляв панел) въз основа на физичните характеристики на клетките, след което беше определен процентът на Annexin V-FITC и PI положителни клетки (десен панел). Клетките на етап ранна апоптоза са положителни за Annexin V-FITC и отрицателни за PI (долен десен квадрант), а тези в стадий на късна апоптоза са двойноположителни (горен десен квадрант).

## 7. Цитогенетично изследване на клетки третирани с IFN $\gamma$ и контролната група нетретирани *MCK* от пъпна връв

Ефектът на възпалителния цитокин IFN $\gamma$  върху кариотипа на *MCK* от пъпна връв беше изследван върху клетки на първи или втори пасаж. Клетките бяха посяти в концентрация  $1 \times 10^5$  клетки/ $\text{cm}^2$  и култивирани в стандартна среда обогатена с 100 IU/ml IFN $\gamma$  за 10-14 дни. Клетките бяха събирани при достигане на  $\sim 70\%$  конfluентност. Контролните клетъчни култури бяха поддържани в DMEM/F12 + 10% FBS + 1% пеницицил/стрептомицин/амфотерицин В микс. Клетките бяха инкубирани с разтвор на

демеколдин, 10 µg/ml в HBSS (Sigma-Aldrich, USA) за ~3.5 часа на 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажност на въздуха, за да се блокира образуването на микротубули. Точното време за инкубиране с колцемид се определяше чрез регулярно наблюдение под инвертен микроскоп – ако се виждаха множество окръглени двойни клетки, клетките бяха трипсинизирани с 0.05% Трипсин/0.02% EDTA и събирани за последваща обработка. Събраните клетки се центрофугираха (400 x g за 10 мин.) и ресуспендираха в затоплен разтвор на 0.075M KCl за 10 мин. на 37°C, след което бяха отново центрофугирани на 400 x g за 10 мин. Супернатантите бяха изхвърлени и утайките бяха ресуспендирани в ледено-студен фиксиращ разтвор (метанол/оцетна киселина в съотношение 3:1), който се добавя бавно и на капки при едновременно вортексиране, инкубирани за 15 минути на стайна температура и центрофугирани за 10 мин. на 400 x g. Пробите бяха промивани с фиксиращ разтвор по описания начин най-малко три пъти преди да бъдат накапани върху предметни стъкла. Получената утайка се ресуспендираше в 800 µl фиксиращ разтвор и се съхранява на -20 °C. От получената суспензия се накапва, от височина ~30 см, x70 µl върху обезмаслени и изстудени предметни стъкла. Получените препарати се оставят да изсъхнат и „остаряват“ за няколко дни на стайна температура.

Кариотипът се анализира чрез G-banding (Giemsa banding) техника. Пригответените предварително предметни стъкла се инкубират в инкубатор при температура 37°C за два часа непосредствено преди оцветяването им. За да се получат ясни ивици се използва следния метод на оцветяване: 1) Готовите стъкла се потапят в 0.05 % Trypsin (стайна температура) за 30 сек.; 2) Промиват се за кратко с изстуден буфериран с фосфат физиологичен разтвор; 3) Потапят се в студен разтвор на Giemsa (1:7) за 90 сек., при което се получават Giemsa (GTG) ивици; 4) Промиват се с дестилирана вода и се оставят да изсъхнат на стайна температура. Ефективността на оцветяването се проследява чрез микроскоп и времената за трипсинизиране и оцветяване се коригират, ако е необходимо. За всяка проба се анализират минимум 11 метафазни пластинки. Установената хромозомна аберация се смята за значима, ако се среща в поне две от анализираните метафази. Хромозомните аберации се дефинират и изписват според International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2013).

## **8. Остегенна диференциация на третиран с IFN $\gamma$ МСК, индуцирана чрез специфични химични средства и контролната група нетретиран МСК**

За индуциране на остеогенна диференциация, достигналите над 80% конfluентност МСК от пъпна връв на втори пасаж бяха препосаяти в 24-ямокни плаки (2 cm<sup>2</sup>, SPL Life

Sciences, Korea ) в концентрация  $5 \times 10^4$  клетки/ $\text{cm}^2$  и култивирани в клетъчна среда DMEM/F12 в присъствие на 10% фетален телешки серум и следните специфични диференциращи фактори:

dexamethasone (Sigma-Aldrich)	100 nM
ascorbic acid-2-phosphate (Sigma-Aldrich)	0.2 mM
$\beta$ -glycerophosphate (Sigma-Aldrich)	10 mM

Свежа остеогенна културална среда и 100 IU/ml IFN $\gamma$  бяха добавяни на всеки 48-72 часа в продължение на 3 седмици (21 дни). Паралелно, контролни клетки бяха култивирани единствено в остеогенна културална среда (положителна контрола) или само в DMEM/F12 + 10% FCS (отрицателна контрола). В края на стимулационния период, степента на остеогенна диференциация беше определена:

- с прилагане на колориметричен метод за количествено отчитане на алкално-фосфатазна активност
- чрез специфично хистологично оцветяване за доказване отлагането на  $\text{Ca}^{2+}$  в екстрацелуларния матрикс

### **8.1. Доказване на алкално-фосфатазна активност**

Третираните с остеогенни фактори клетки с или без IFN $\gamma$ , както и недиференцираните контролни клетки бяха промити с PBS, след което във всяка експериментална ямка бяха добавени по 150  $\mu\text{l}$  алкално-фосфатазен буфер (0.05 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; pH = 9.5), съдържащ 0.1% (v/v) Triton X-100 (Merck, Germany). Плаката беше замразена на  $-80^\circ\text{C}$  (5 мин.) и веднага след това размразена. Тази процедура беше извършена три пъти. В ямките с вече лизирани клетки бяха прибавени по 150  $\mu\text{l}$  от разтвора на алкално-фосфатазния субстрат 4-p-nitrophenylphosphate (3.5 mM в алкално-фосфатазен буфер) и получената цветна реакция беше отчетена спектрофотометрично на micro-ELISA reader (Dynatech AG, USA) при дължина на вълната 405 nm.

### **8.2. Оцветяване по von Kossa**

Остеогенно диференцираните клетки бяха промити еднократно с дестилирана вода, след което бяха третирани с 1% (w/v) разтвор на сребърен нитрат ( $\text{AgNO}_3$ ; Sigma-Aldrich, USA) при облъчване с ултравиолетова светлина ( $\lambda = 366$  nm; трансилюминатор Camag Reprostar 3, Switzerland) в продължение на 60 мин. При интензивно осветяване/UV

облъчване на калциев карбонат или калциев фосфат в присъствие на  $\text{AgNO}_3$ , сребърните катиони се свързват с карбонатните/фосфатните аниони, при което формиралите се соли ( $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  или  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ ) се оцветяват в черно. За отстраняване на остатъчното количество  $\text{AgNO}_3$ , клетките бяха промити с дестилирана вода. Наличието на  $\text{Ca}^{2+}$  минерални отлагания с характерно черно оцветяване беше детектирано на инвертен светлинен микроскоп (Leica, Germany).

### **8.3. Оцветяване с ализарин ред**

Диференцираните и контролните клетки бяха промити еднократно с PBS, след което бяха фиксирани с 10% (v/v) неутрален формалин (Merck, Germany) за 30 минути на стайна температура. Клетките бяха промити еднократно с дестилирана вода и оцветени с 2% разтвор на Alizarin red S (Sigma-Aldrich, USA) за 40 минути. За успешното оцветяване е важно разтворът на багрилото да е с pH 4.1 – 4.3 (коригира се с 0.1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), след което разтворът се филтрува и съхранява на тъмно за не повече от месец. След края на оцветяването ямките бяха промити трикратно с дестилирана вода. При наличие на  $\text{Ca}^{2+}$  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).

## **9. Адипогенна диференциация на третиран с $\text{IFN}\gamma$ МСК, индуцирана чрез специфични химични средства и контролната група нетретиран МСК**

Клетъчни култури от МСК от пъпна връв (пасаж 2), достигнали над 80% конфлуентност, бяха трипсинизирани, препосяти в 24-ямкови плаки в концентрация  $5 \times 10^4$  клетки/ $\text{cm}^2$  и култивирани в специфична индуцираща адипогенна среда, DMEM/F12 в присъствие на 10% фетален телешки серум и следните специфични диференциращи фактори:

dexamethasone (Sigma-Aldrich)	1 $\mu\text{M}$
bovine insulin (Sigma-Aldrich)	5 $\mu\text{g/ml}$
3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX) (Sigma-Aldrich)	0.25 mM
indomethacin (Sigma-Aldrich)	60 $\mu\text{M}$

Средата индуцираща адипогенна диференциация с или без 100 IU/ml  $\text{IFN}\gamma$  беше сменяна на всеки 3 дни. На 21-ия ден след началото на експеримента, формирането на

вакуоли с неутрални липиди в стимулираните клетки беше установено чрез оцветяване с багрило Oil Red O (Sigma-Aldrich, USA). Едновременно с експерименталните култури, нестимулирани контролни клетки бяха поддържани единствено в хранителна среда DMEM/F12 + 10% FBS без наличие на диференциращи фактори.

### **9.1. Оцветяване с Oil Red O**

Първоначално клетките бяха промити с PBS, след което бяха фиксирани с 10% (v/v) неутрален формалинов разтвор (Merck, Germany) в продължение на 30 мин. на стайна температура. Фиксираните клетки бяха промити еднократно с дестилирана вода и оцветени с прясно приготвен 0.6% (w/v) разтвор на Oil red O (3 части 1% разтвор на Oil Red O в изопропанол се смесват с 2 части дестилирана вода) за един час на стайна температура. Излишното багрило беше отстранено чрез промиване с дестилирана вода. Наличието на оцветяване беше наблюдавано под инвертен светлинен микроскоп (Leica, Germany).

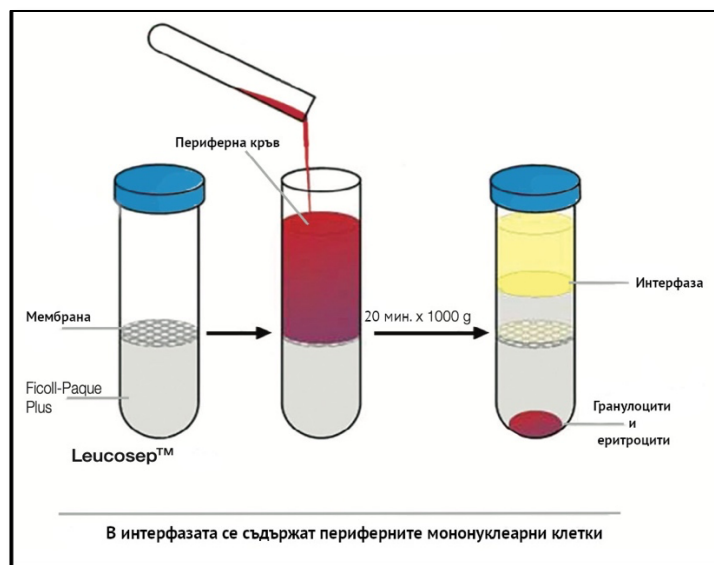
## **10. Изолиране на човешки мононуклеарни клетки от периферна кръв (PBMC)**

За изолиране на човешки мононуклеарни клетки от периферна кръв бяха използвани епруветки Greiner Bio-One™ LeucoSEP™ Polypropylene Tubes (Greiner Bio-One, Austria), които са разработени за оптимално отделяне на лимфоцити и периферни мононуклеарни клетки от човешка пълна кръв и костен мозък. Полипропиленовите епруветки Greiner Bio One™ LeucoSep™ разполагат с прозрачна, пореста, биологично инертна HDPE (полипропилен с висока плътност) мембрана за ефективно отделяне на PBMC (плътност 1.077 g/ml) (Фигура 6). По данни на производителя очакваните резултати след сепарирането са:

- ◆ Жизнеспособни клетки в %:  $95 \pm 5$ ;
  - ◆ Лимфоцити в % от първоначалния брой:  $60 \pm 20$ ;
  - ◆ Състав на обогатената клетъчна фракция:  $95 \pm 5$  % мононуклеарни клетки,  $5 \pm 5$  % гранулоцити,  $<1$  % еритроцити;
  - ◆ Състав на лимфоцитна фракция:  $83 \pm 3$ % Т клетки,  $6 \pm 3$ % В клетки,  $11 \pm 2$ % НК клетки;
- Преди работа с Leucoser™ tubes, епруветките се центрофугират за 1 мин. на 400 x g, за да се съберат капките сепарираща среда по стените на епруветките.
- Епруветките с периферна кръв се разклащат няколко пъти и кръвта (между 3 и 5 EDTA епруветки ) се прехвърля в епруветка Leucoser™ tube (една епруветка на

проба).

- Центрофугира се 20 мин. на 1000 x g, след което внимателно се отделя плазмата (горният слой) до ~1см от лимфоцитния слой (интерфаза).



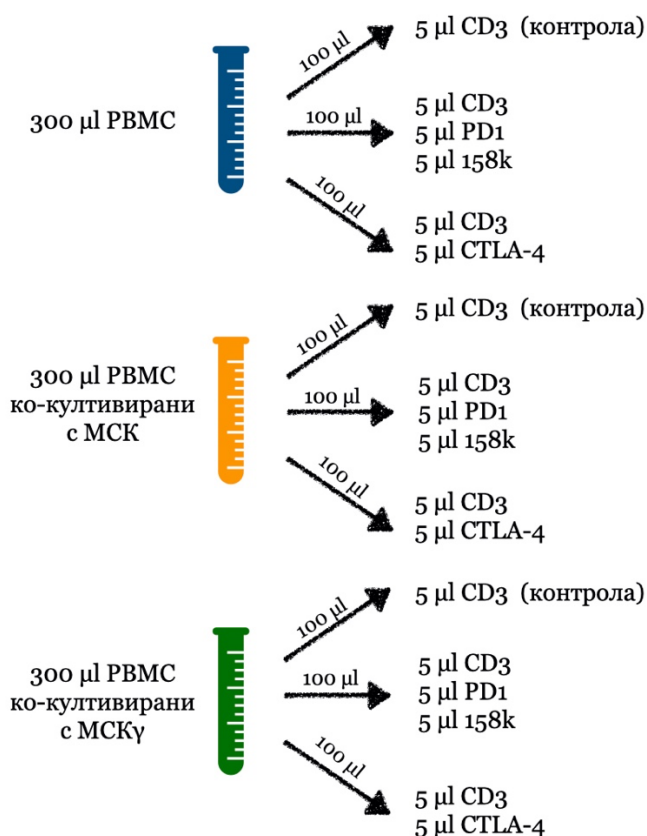
Фигура 6. Схематично представяне на метода за изолиране на човешки мононуклеарни клетки от периферна кръв.

- Фракцията с РВМС се събира в нова стерилна 50 ml епруветка. Към събраната суспензия от РВМС се добавя стерилен PBS (pH 7.2-7.4) до 50 ml.
- Центрофугира се 10 мин. на 350 x g.
- Клетъчната утайка се ресуспендира в 1 ml среда за клетъчно култивиране: RPMI-1640 + 10% FBS + антибиотик/антимикотик + 10 mM L-glutamine.
- Отделят се 10  $\mu$ l клетъчна суспензия за броене.
- Броене на клетките: към 10  $\mu$ l клетъчна суспензия се добавят 490  $\mu$ l PBS (50x разреждане). Отделят се 10  $\mu$ l от разредената клетъчна суспензия, към които се добавят 10  $\mu$ l 0.4% Тгуран blue (2x разреждане). Брои се на камера на Въркер в две повторения, като крайното разреждане, което се взема предвид при изчисленията е 100x.

## 11. Флуцитометричен анализ на РВМС ко-култивирани с МСК в присъствие на IFN $\gamma$ и контролната група нетретирани МСК

МСК от пъпна връв на първи пасаж бяха трипсинизирани и препосяти в концентрация  $6 \times 10^4$  клетки/ямка (6-ямкова плака) и култивирани в среда DMEM/F12 в присъствие на 10% фетален телешки серум и 100 IU/ml IFN $\gamma$  в рамките на 4-5 дни, като

свеж IFN $\gamma$  беше добавян на всеки 48 часа. Към тях бяха добавяни  $2 \times 10^6$  клетки/ямка РВМС. Отделно бяха посявани само РВМС ( $2 \times 10^6$  клетки/ямка) и култивирани в среда DMEM/F12 + 10% FBS с или без 100 IU/ml IFN $\gamma$ . След 48 часа РВМС от всяка ямка бяха събирани и центрофугирани за 10 мин. на 300 x g. Клетките бяха ресуспендирани в 300  $\mu$ l миещ разтвор (CellWash solution, Becton Dickinson, USA) и маркирани с флуорохром-конюгирани антитела за 15 мин. на тъмно (Фигура 7).



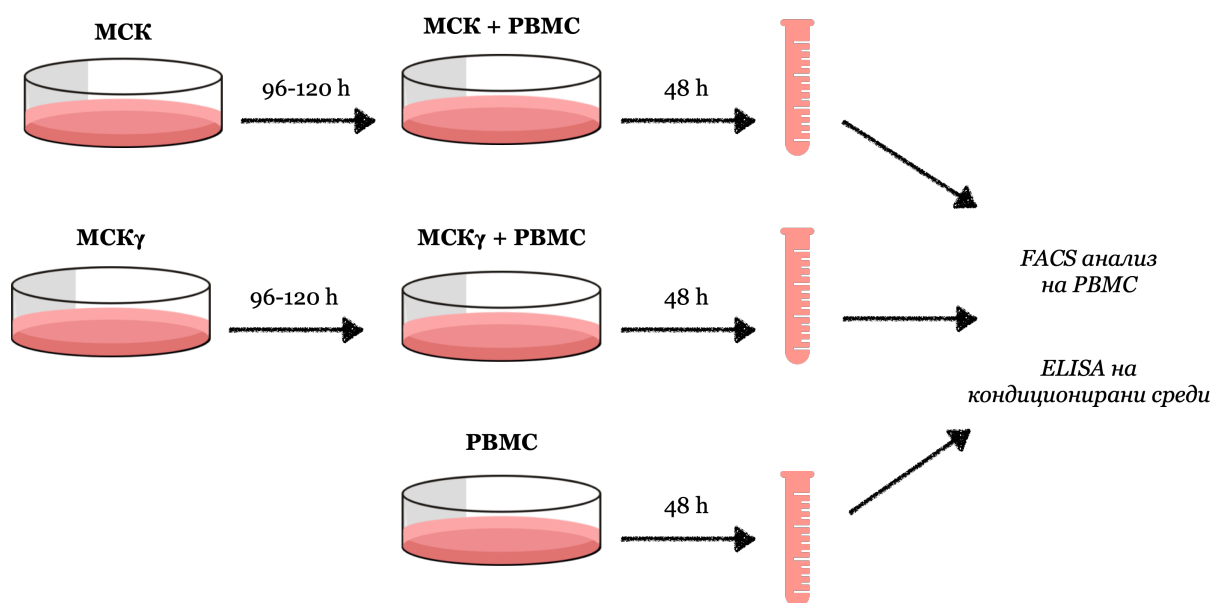
Фигура 7. Маркиране с флуорохром-конюгирани антитела на РВМС ко-култивирани с МСК в присъствие на IFN $\gamma$ .

След маркирането, клетките бяха измити отново и фиксирани с Cell Fix (BD, USA). Повърхностните клетъчни маркери на РВМС бяха анализирани с помощта на следните антитела: FITC Mouse Anti-Human-CD3, APC Anti-human CD152 (CTLA4), Anti-Human APC CD273 (PD1) и PE Anti-Human KIR3DL2 (158k) (всички от BD Bioscience, USA). Епруветките бяха вортексирани 2-3 пъти с резки кратки движения (клетките се смесват с антителата), след което бяха инкубирани за 15 минути на стайна температура, на тъмно. След края на инкубационния период клетките бяха вортексирани отново и ресуспендирани в x 2 ml CellWash solution/епруветка, след което бяха центрофугирани 10 мин. на 300 x g. Супернатантите бяха отделени, а утаените клетки

бяха фиксирани в  $x$  200  $\mu$ l Cell Fix/епруветка (400  $\mu$ l във всяка контрола) (Becton Dickinson, USA). Специфичното флуоресцентно белязване беше определяно на флоуцитометър FACSCalibur (BD, USA), като се използваше софтуеър BD CellQuest Pro (BD, USA).

## 12. Получаване на кондиционирана среда от мезенхимни стволови клетки

Кондиционирани среди бяха необходими за изследване на съдържащите се в тях цитокини.



Фигура 8. Получаване на кондиционирани среди от МСК.

По време на експерименталната работа бяха събирани културални среди от следните типове проби (Фигура 8):

- МСК достигнали конfluентност над 80% (6-ямкова плака), култивирани в среда DMEM/F12+10% FBS+antibiotic/antimycotic за 48 часа (Контрола);
- МСК достигнали конfluентност над 80% (6-ямкова плака), култивирани в среда DMEM/F12+10% FBS+antibiotic/antimycotic +100 IU/ml IFN $\gamma$  за 48 часа (МСК $\gamma$ );
- PBMC ( $2 \times 10^6$  клетки в ямка/6-ямкова плака) култивирани в среда DMEM/F12+10% FBS+antibiotic/antimycotic за 48 часа (PBMC);
- МСК ( $6 \times 10^4$  клетки в ямка/6-ямкова плака) + PBMC ( $2 \times 10^6$ ) култивирани в среда DMEM/F12 + 10% FBS + antibiotic/antimycotic за 48 часа (МСК+PBMC);
- МСК ( $6 \times 10^4$  клетки в ямка/6-ямкова плака) + PBMC ( $2 \times 10^6$ ) култивирани в среда DMEM/F12 + 10% FBS + antibiotic/antimycotic +100 IU/ml IFN $\gamma$  за 48 часа

(MCK+PBMC+IFN $\gamma$ );

Културалните среди бяха събирани и аликвотирани на порции по 1 ml, за да се избегне многократно замразяване-размразяване, след което съхранявани на -80°C.

### **13. Изследване на кондиционирани среди за наличието на IL-10, TGF $\beta$ и IDO**

За определяне на концентрацията на секретирани в културалните среди IL-10, TGF $\beta$  и IDO, беше използван ензим-свързан имуносорбентен тест (ELISA). През периода на третиране на WJ-MCK с IFN $\gamma$ , кондициониратата среда от всяка ямка (3ml/ямка) беше събирана на всеки 72 часа и замразявана на -80°C. Паралелно със събирането на кондиционирана среда от третираните с IFN $\gamma$  WJ-MCK, беше събирана и среда от контролни клетъчни линии, култивирани в стандартна среда.

#### ***13.1. Изследване на кондиционирани среди за наличието на IL-10***

Наличието на IL-10 в събраните културални среди беше количествено определено с помощта на търговски ELISA кит Human IL-10 ELISA Kit cat. № 950.060.096 (Diacclone), като бяха следвани инструкциите на производителя.

##### ⇒ Принцип на метода

Използваният кит е от тип твърдофазови „сандвич“ ELISA за *in vitro* количествено определяне на цитокини в биологични проби. Първо антитяло, силно специфично за IL-10, е натоварено върху ямките на микротитърна плака. IL-10 в проби и известни стандарти се свързва с първото антитяло в плаката. По време на следващия инкубационен период настъпва свързването на биотинилираното анти-IL-10 второ антитяло. След това излишното несвързано второ антитяло се отстранява. Разтворът на HRP (horse-radish peroxidase) със стрептавидин, който се свързва с биотина, се добавя към всяка ямка, включително нулевите (контролни) ямки, след инкубиране излишният конюгат се отстранява чрез внимателно промиване. Субстратът (тетраметилбензидин, TMB) се добавя към ямките, което води до прогресивно развитие на синьо оцветен комплекс с конюгата. След това развитието на цветната реакция се спира чрез добавяне на киселина (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), превръщайки получения краен продукт в жълто. Интензитетът на получения оцветен комплекс е право пропорционален на концентрацията на IL-10, присъстващ в пробите и стандартите. Спектрофотометрично се измерва абсорбцията на цветния комплекс и генерираните стойности на OD за всеки стандарт се нанасят спрямо очакваната концентрация, образувайки стандартна крива. Тази стандартна крива може

да се използва за точно определяне на концентрацията на IL-10 във всяка изследвана проба.

Отчитането на получената цветна реакция беше направено спектрофотометрично на FLUOstar OPTIMA microplate reader (BMG Labtech) при дължина на вълната 450 nm. За построяване на стандартна права и за изчисляване на неизвестните концентрации на IL-10 беше използвана компютърна програма CurveExpert Basic (v1.4, Hyams Development).

⇒ Събиране, обработка и съхранение на проби

При работа със супернатанти на клетъчни култури е важно да се отстранят частиците и агрегатите чрез центрофугиране на ~1000 x g за 10 минути. Ако не се анализират веднага, пробите трябва да бъдат разделени на аликвоти (250-500 µl), за да се избегнат повтарящи се цикли на замразяване-размразяване и да се съхраняват замразени при -70°C. Препоръчително е да не се размразяват чрез нагриване при 37°C или 56°C, а на стайна температура, докато пробите са напълно размразени и хомогенни.

⇒ Изпълнение на метода

→ Приготвяне на стандарт: лиофилизираният стандарт беше разтворен в 1 ml Standard Diluent според указанията на производителя. Бяха приготовени двукратни падащи разреждания в Standard Diluent (от 12.5 pg/ml до 400 pg/ml) в две повторения (100 µl/ямка).

→ Накапване на проби, стандарт и контроли (Standard Diluent Buffer 1x): 100 µl/ямка, в две повторения.

→ Плаката се покрива и инкубира на стайна температура (18 до 25°C) за 1 час.

→ Миене с миеш буфер (3 x 5 мин.), 300 µl/ямка.

→ Инкубиране с биотинилирано свързващо анти-IL-10 второ антитяло (разредено в Biotinylated Antibody Diluent непосредствено преди работа)- 50 µl/ямка, за една час на стайна температура.

→ Миене с миеш буфер (3 x 5 мин.), 300 µl/ямка.

→ Инкубиране със Streptavidin-HRP (разреден в Streptavidin-HRP Diluent непосредствено преди работа) за 30 мин. на стайна температура (100 µl/ямка).

→ Миене с миеш буфер (3 x 5 мин.), 300 µl/ямка.

→ Инкубиране със субстрат: тетраметилбензидин (Tetramethylbenzidine, TMB), по 100 µl/ямка, след което плаката се инкубира за 10-15 мин. на стайна температура, на тъмно.

→ Спиране на реакцията: 100  $\mu$ l/ямка от Stop Reagent ( $H_2SO_4$ ).

⇒ Анализ на получените данни

Изчисляват се средните стойности на абсорбция за всеки набор от повторения на стандарти, контроли и проби. В идеалния случай повторенията трябва да са в рамките на 20% от средната стойност. Концентрацията на използвания стандарт, разтворен в 1 ml Standard Diluent Buffer 1x е **114 +/- 29 pg/ml**. Построява се стандартна крива, средната абсорбция на всеки стандарт е по вертикалната ос спрямо съответната стандартна концентрация на IL-10 по хоризонталната ос. Количеството IL-10 във всяка проба се определя чрез екстраполиране на стойностите на OD спрямо стандартните концентрации на IL-10, като се използва стандартната крива.

⇒ Ограничения на анализа

- ◆ Стандартната крива не трябва да се екстраполира извън максималната точка, зависимостта е нелинейна в този регион и е трудно да се постигне точност на резултата. Концентрираните проби над максималната стандартна концентрация трябва да бъдат разредени с буфер, за да се получи стойност на OD в рамките на стандартната крива. След анализ на такива проби винаги се умножават резултатите по необходимия коефициент на разреждане, за да се получи действителната крайна концентрация.
- ◆ Влиянието на различните лекарства върху крайните резултати не е изследвано.
- ◆ Бактериално или гъбично замърсяване биха могли да доведат до нереални резултати.
- ◆ Неправилното или недостатъчно измиване на всеки етап от процедурата може да доведе до фалшиво положителни или фалшиво отрицателни резултати.
- ◆ Както при повечето биологични анализи, условията могат да варират при всеки анализ, следователно трябва да се изготвя нова стандартна крива за всеки анализ.

⇒ Чувствителност и специфичност на метода

Чувствителността или минималната откриваема концентрация на IL-10, използвайки този кит (Diaclone Human IL-10 ELISA), е **4.9 pg/ml**. Анализът е специфичен както за естествен, така и рекомбинантен човешки IL-10. Не е наблюдавана кръстосана реактивност за нито един от тествани протеини: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-17A, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ .

### ***13.2. Изследване на кондиционирани среди за наличието на TGFβ1***

Наличието на TGFβ1 в събраната културална среда беше количествено определено с помощта на търговски ELISA кит Human TGF-β1 ELISA Kit cat. № 650.010.096 (Diacclone), като бяха следвани инструкциите на производителя.

#### **⇒ Принцип на метода**

Използвана е „сандвич“ ELISA, при която първото антитяло, силно специфично за TGFβ е натоварено върху ямките на микротитърната плака. През първия етап се осъществява свързването на TGFβ1 в проби и известни стандарти със свързващото антитяло. По време на следващия инкубационен период се осъществява свързването на конюгирано с биотин анти-TGFβ1 детектиращо антитяло. След това разтворът на стрептавидин-HRP (Horseradish peroxidase) се добавя към всяка ямка, включително контролните ямки, след инкубиране излишният конюгат се отстранява чрез внимателно промиване. Добавя се субстрат тетраметилбензидин (Tetramethylbenzidine, TMB) към ямките, което води до прогресивно развитие на синьо оцветен комплекс. Реакцията се спира чрез добавяне на киселина (Stop Solution), превръщайки получения краен продукт в жълто оцветен разтвор. Интензитетът на получения оцветен комплекс е право пропорционален на концентрацията на TGFβ1, присъстващ в пробите и стандартите. Измерва се абсорбцията на цветния комплекс и генерираните стойности на OD за всеки стандарт се нанасят спрямо очакваната концентрация, образувайки стандартна крива. Отчитането на получената цветна реакция беше направено спектрофотометрично на FLUOstar OPTIMA microplate reader (BMG Labtech) при дължина на вълната 450 nm.

Стандартната крива да се използва за точно определяне на концентрацията на TGFβ1 във всяка тествана проба. За построяване на стандартна крива и за изчисляване на неизвестните концентрации на TGFβ1 беше използвана компютърна програма CurveExpert Basic (v1.4, Hyams Development).

#### **⇒ Събиране, обработка и съхранение на проби**

При работа със супернатанти на клетъчни култури е важно да се отстранят частиците и агрегатите чрез центрофугиране на ~1000 x g за 10 минути. Ако не се анализират веднага, пробите трябва да бъдат разделени на аликвоти (250-500 µl), за да се избегнат повтарящи се цикли на замразяване-размразяване и да се съхраняват замразени при -70°C. Препоръчително е да не се размразяват чрез нагриване при 37°C или 56°C, а на стайна температура, докато пробите са напълно размразени и хомогенни.

#### **⇒ Изпълнение на метода**

- Миене с миещ буфер (3 x 5 мин.), 300 µl/ямка.
- Приготвяне на пробите: пробите са пре-третирани с 20 µl/проба 1N HCl, миксирани и инкубирани за 1 час на стайна температура. След края на инкубационния период киселината се неутрализира с 20 µl/проба 1N NaOH и се вортексира.
- Приготвяне на стандарт: лиофилизираният стандарт беше разтворен в 1 ml дестилирана вода според указанията на производителя. Бяха приготовени двукратни падащи разреждания в Assay Buffer (от 2000 pg/ml до 62.5 pg/ml) в две повторения (100 µl/ямка).
- Накапване на проби (в две повторения): 60µl Assay Buffer + 40 µl пре-третирана проба
- Плаката се покрива и инкубира на стайна температура (18 до 25°C) за 2 часа, на клатачка (400 грm).
- Миене с миещ разтвор (3 x 5 мин.), 300 µl/ямка.
- Инкубиране с биотинилирано свързващо анти-TGFβ1 второ антитяло (разредено в Assay Buffer, 1:100, непосредствено преди работа)- 100 µl/ямка, за една час на стайна температура, на клатачка (400 грm).
- Миене с миещ буфер (3 x 5 мин.), 300 µl/ямка.
- Инкубиране със Streptavidin-HRP (100 µl/ямка) - разреден в Assay Buffer, 1:100, непосредствено преди работа, 1 час. на стайна температура, на клатачка (400 грm).
- Миене с миещ буфер (3 x 5 мин.), 300 µl/ямка.
- Инкубиране със субстрат (Substrate Solution): по 100 µl/ямка, след което плаката беше инкубирана за 30 мин. на стайна температура, на тъмно.
- Спиране на реакцията: 100 µl/ямка от Stop Solution.

⇒ Анализ на получените данни

Изчисляват се средните стойности на абсорбция за всеки набор от повторения на стандарти, контроли и проби. В идеалния случай повторенията трябва да са в рамките на 20% от средната стойност. Концентрацията на използвания стандарт, разтворен в 1 ml дестилирана вода е **4000 pg/ml**. Серийните разреждания на стандарта осигуряват концентрация в диапазон от **2000** до **62.5 pg/ml**. Построява се линейна стандартна права, като количеството TGFβ1 във всяка проба се определя чрез екстраполиране на стойностите на OD спрямо стандартните концентрации на TGFβ1, като се използва

построената стандартната права.

⇒ Ограничения на анализа

Ограниченията на анализа са аналогични с описаните в *т. 2.11.1.*

⇒ Чувствителност и специфичност на метода

Границата на откриване за човешки TGFβ1, определена като концентрацията на антигена, водеща до абсорбция, значително по-висока от тази на средата за разреждане (средна стойност плюс 2 стандартни отклонения), е определена от производителя на **8.6 pg/ml** (средно от 6 независими анализа).

Анализът детектира както естествен, така и рекомбинантен човешки TGFβ1. Кръстосаната реактивност с TGFβ2, TGFβ3, TNFβ, IL-8, IL-6, IL-2, TNFα, IL-1β, IL-4, IFNγ, IL12p70, IL -5 и IL-10 са оценени чрез добавяне им във физиологично значими концентрации в серума. Не е открита кръстосана реактивност.

### **13.3. Изследване на кондиционирани среди за наличието на IDO**

Наличието на IDO в събраната културална среда беше количествено определено с помощта на търговски ELISA кит DuoSet® ELISA DEVELOPMENT SYSTEM Human Indoleamine 2,3-dioxygenase/IDO, Cat. № DY6030-05 (R&D Systems), като бяха следвани инструкциите на производителя. Използвана е „сандвич“ ELISA, при която първото антитяло, силно специфично за IDO се натоварва върху ямките на микротитърната плака. Отчитането на получената цветна реакция беше направено спектрофотометрично на FLUOstar OPTIMA microplate reader (BMG Labtech) при дължина на вълната 450 nm. За построяване на стандартна крива и за изчисляване на неизвестните концентрации на IDO беше използвана компютърна програма CurveExpert Basic (v1.4, Hyams Development).

⇒ Изпълнение на метода

→ Capture Antibody се разрежда до работната концентрация в PBS. Накапват се по 100 μL на ямка в 96-ямкова микроплака. Плаката се покрива и инкубира за една нощ на стайна температура.

→ Миене с миеш буфер (3 x 5 мин.), 400 μl/ямка.

→ Блокиране на плаката с 300 μL/ямка Reagent Diluent за минимум 1 час на стайна температура.

→ Миене с миеш буфер (3 x 5 мин.), 400 μl/ямка.

→ Накапват се по 100 μL проба/стандарт разредени в Reagent Diluent. Плаката се

- залепва с фолио и инкубира за 2 часа на стайна температура.
- Миене с миещ буфер (3 x 5 мин.), 400  $\mu$ л/ямка.
  - Добавят се по 100  $\mu$ л/ямка Detection antibody, разрежено в Reagent Diluent. Плаката се покрива с фолио и инкубира за 2 часа на стайна температура.
  - Миене с миещ буфер (3 x 5 мин.), 400  $\mu$ л/ямка.
  - Добавят се по 100  $\mu$ л от приготвения разтвор на Streptavidin-HRP към всяка ямка. Плаката се покрива и инкубира за 20 минути на стайна температура, като се избягва излагането на светлина.
  - Миене с миещ буфер (3 x 5 мин.), 400  $\mu$ л/ямка.
  - Добавят се по 100  $\mu$ л Substrate Solution към всяка ямка. Инкубира се 20 минути на стайна температура, като се избягва излагането на светлина.
  - Накапват се по 50  $\mu$ л Stop Solution към всяка ямка. Плаката се разклаща внимателно, за да се постигне пълно смесване.
  - Определя се оптичната плътност на всяка ямка, като се използва ELISA reader и дължината на вълната 450 nm.

#### ⇒ Анализ на получените данни

Изчисляват се средните стойности на абсорбция за всеки набор от повторения на стандарти, контроли и проби. Препоръчва се построяването на стандартна крива от седем точки, използваща двукратни серийни разреждания. Концентрацията на използвания стандарт, разтворен в 0.5 ml Reagent Diluent е **60 ng/ml**. Серийните разреждания на стандарта осигуряват концентрация в диапазон от **30** до **0.469 ng/ml**. Построява се стандартна крива, като количеството IDO във всяка проба се определя чрез екстраполиране на стойностите на OD спрямо стандартните концентрации на IDO, като се използва построената стандартната крива.

#### **14. Статистическа обработка и интерпретация на получените резултати**

Статистическата обработка на данните е направена с програмата SigmaPlot (v12.5, Systat Software, Inc.). Резултатите са представени като средна аритметична стойност  $\pm$  стандартно отклонение (SD). В зависимост от конкретните случаи са приложени следните статистически методи за свързани извадки: чифтен тест на Student (Student's paired t-test); еднофакторен дисперсионен анализ (one-way repeated-measures ANOVA); непараметричен тест на Wilcoxon (Wilcoxon signed-rank test). При всички тестове е

прието ниво на статистическа значимост  $p \leq 0.05$ . Регресионните анализи са извършени с помощта на програмата CurveExpert Basic (v1.4, Hyams Development).

## РЕЗУЛТАТИ

### 1. Изолиране и култивиране на МСК от пънна връв

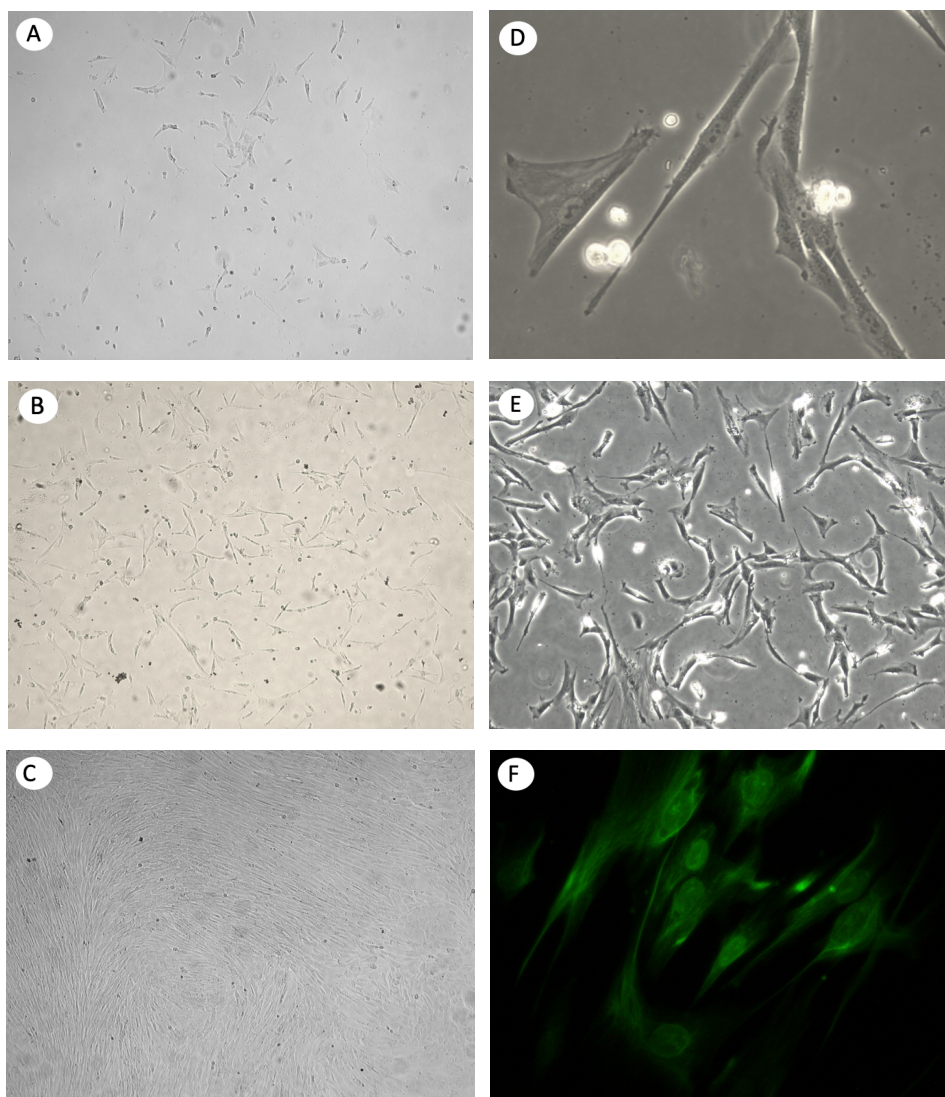
Човешки МСК бяха изолирани от проби пънна връв ( $n=35$ ) взети от здрави донори след оперативно или нормално родоразширение (гестационна седмица 37-42), след подписване на информирано съгласие, съобразно нормите на Етичния комитет на САГБАЛ „Д-р Щерев”, София и *Приложение 1-А към Договор за вземане, изследване и съхраняване на мезенхимни стволови клетки от тъкан от пънна връв* на Тъканна Банка БулГен. Пробите бяха пренесени в лабораторията и обработени в рамките на същия ден. WJ-МСК бяха изолирани по утвърдени в специализираната литература методики, основаващи се на свойство им спонтанно да прилепват върху твърда поливинилхлоридна (polyvinyl-chloride) повърхност. Обобщени данни за обработените тъканни проби от пънна връв, успеваемостта на изолиране, както и средният клетъчен добив са отразени в Таблица 4.

Таблица 4. Обобщени данни за обработените тъканни проби от пънна връв.

Възраст на донорите	Количество обработени проби	Количество успешно обработени проби	Успеваемост [%]	Среден клетъчен добив
27 – 45 г.	35	35	100%	$3 \times 10^6$ клетки/ проба

След култивиране при описаните в Материали и Методи условия за 12-24 часа изолираните клетки спонтанно прилепнаха върху PVC плаки. Между втори и осми ден след началното посяване на изолираните МСК, в първичните култури ясно се наблюдаваха прилепнали фибробластоподобни клетки. В началото беше наблюдавана появата на първите единични прилепнали фибробластоподобни клетки с вретеновидна форма и сравнително малки размери, дифузно разпръснати измежду множество неадхерирали клетъчни типове. Между 7 и 12 ден клетките формираха плътен конфлуентен слой съставен изключително от удължени вретеновидни фибробластоподобни клетки (Фигура 9). Интензивната клетъчна пролиферация и хомогенността на културите се запазваха в продължение на 5 - 7 последователни пасажа. Изследването на WJ-МСК беше допълнено чрез имунофлуоресценция за Vimentin

(интермедиерен филамент при мезенхимни клетки). Отчетена беше силна позитивна реакция с характерно цитоскелетно оцветяване, в съответствие с вътреклетъчната му локализация (Фигура 9F).

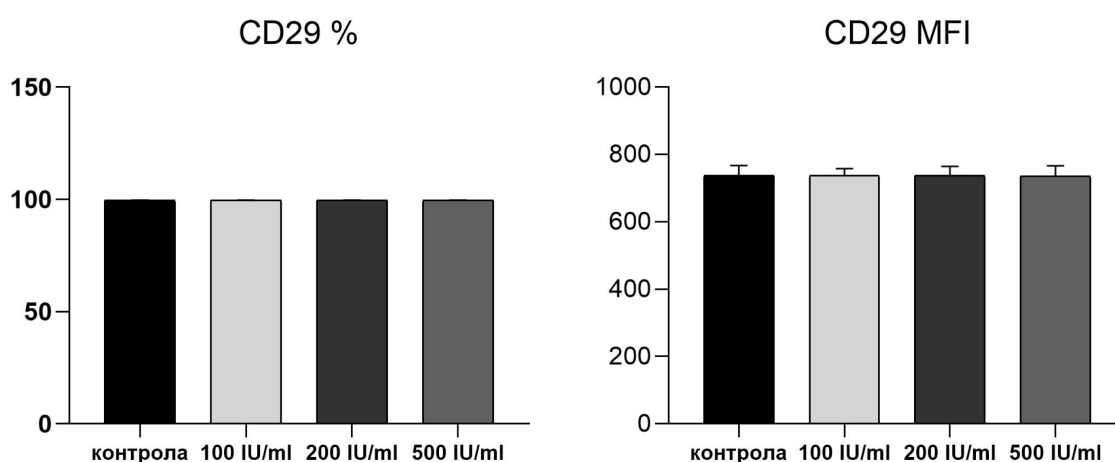


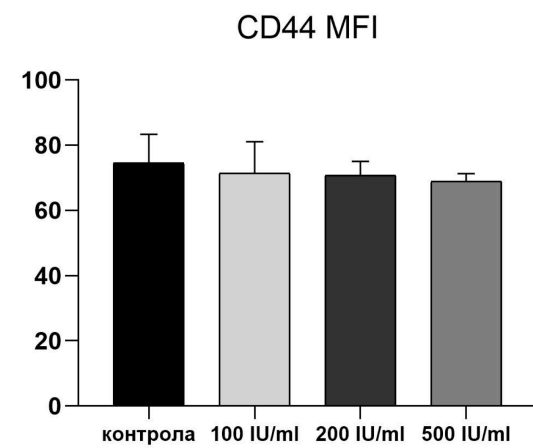
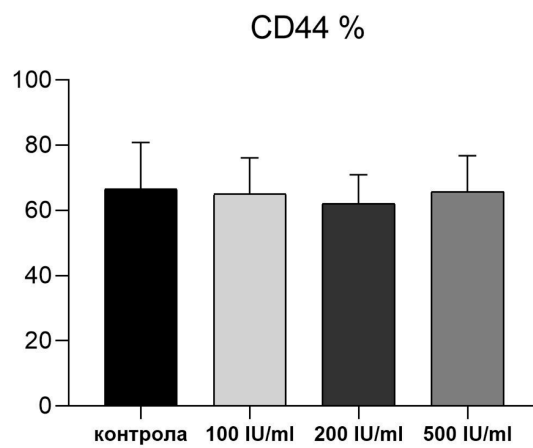
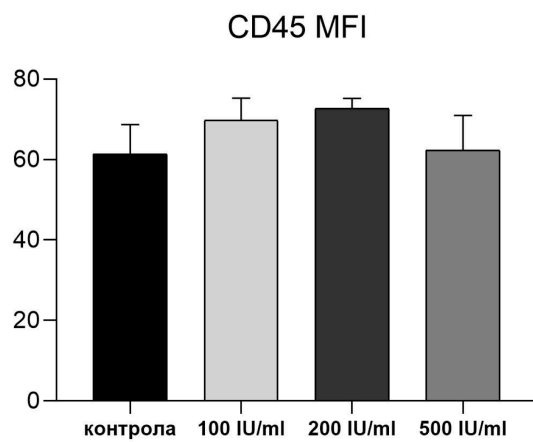
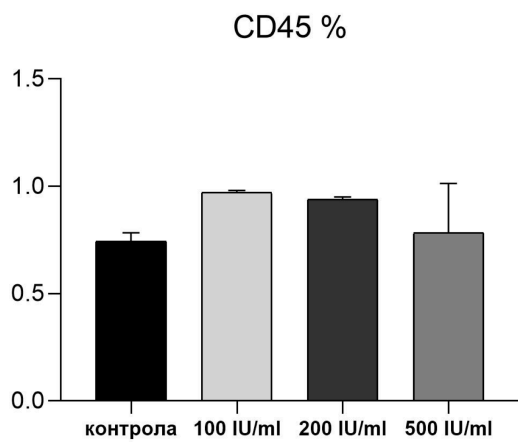
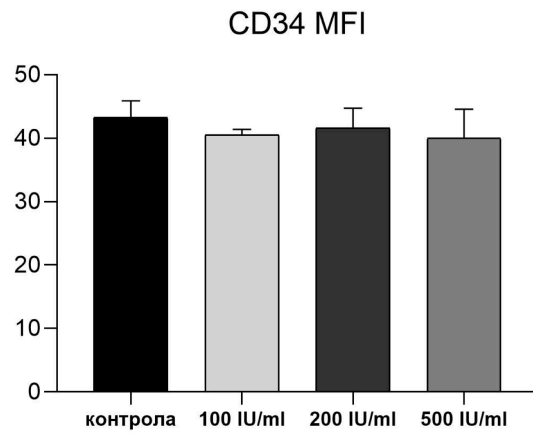
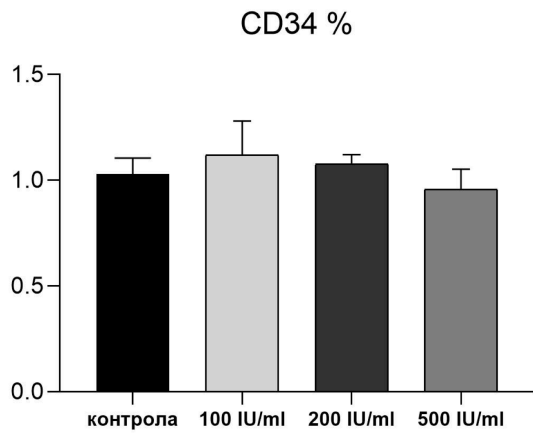
Фигура 9. Светлинно-микроскопски снимки, представящи морфологията и степента на конfluентност на МСК от първа връв на различни етапи от развитието на първичната клетъчна култура. (А) На ден 1 прилепналите клетки притежават фибробластоподобна морфология. (В) Ден 3 от началното посяване на МСК. (С) Клетките образуват плътен монослой между 7 и 10 ден (увеличение  $\times 50$ ). (D) Фазово-контрастна микроскопска снимка на МСК (увеличение  $\times 400$ ). (E) Фазово-контрастна микроскопска снимка на МСК (увеличение  $\times 100$ ). (F) Имунофлуоресценция на МСК за Vimentin (увеличение  $\times 400$ ).

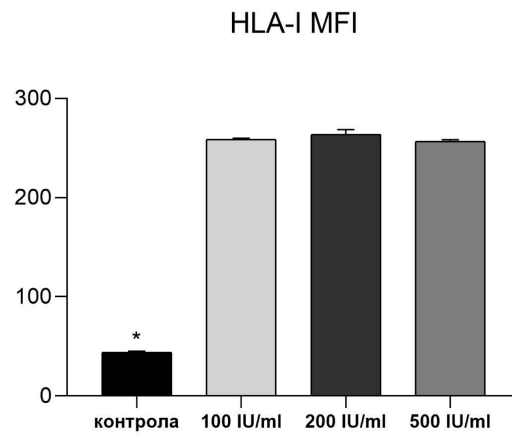
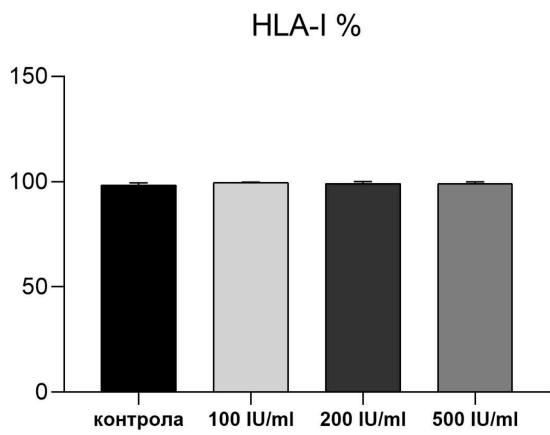
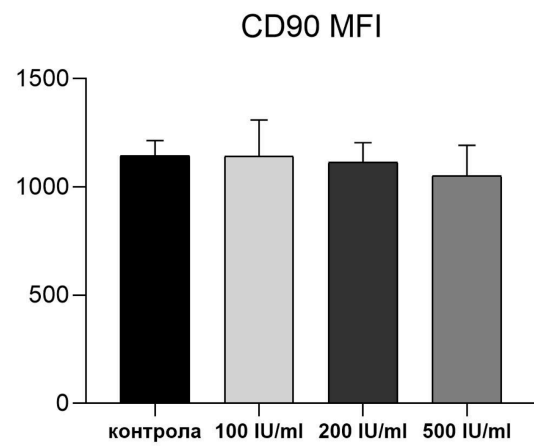
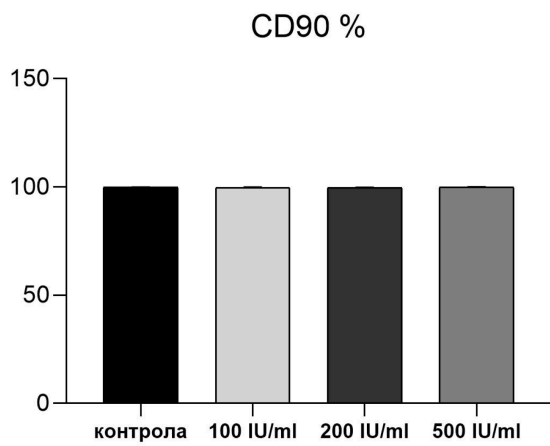
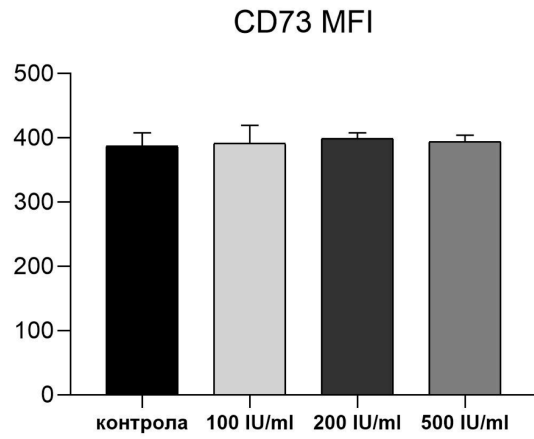
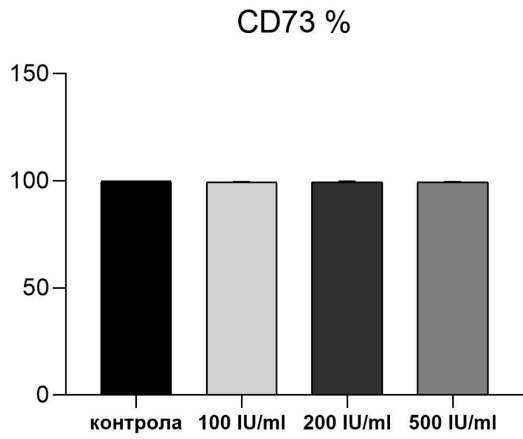
Следователно нашите резултати показаха, че успешно усвоените и оптимизирани от нас работни протоколи („Материали и методи“) ни позволиха да постигнем ефективни процедури за получаване на първични клетъчни култури от WJ-MСК.

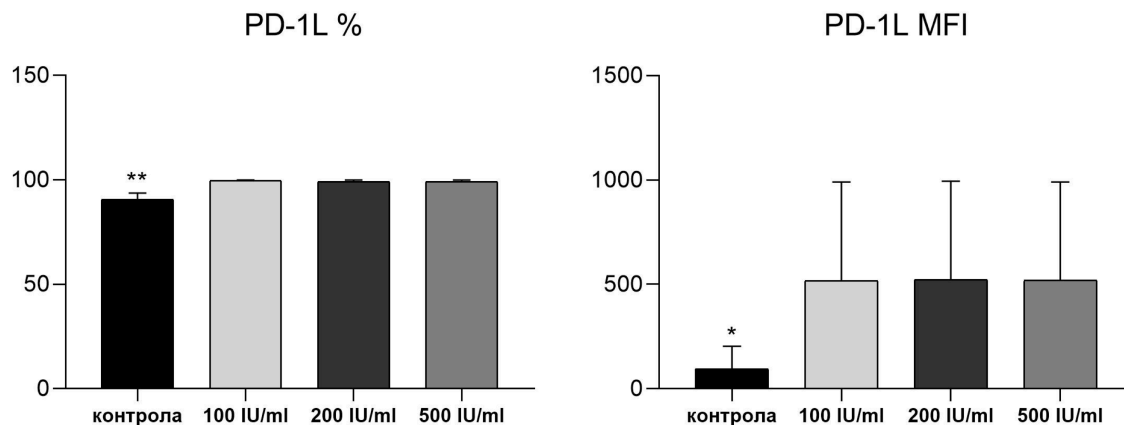
## 2. Третиране на МСК с различни концентрации на IFN $\gamma$

За да се определи подходяща концентрация на IFN $\gamma$  за третирането на клетките в последващите експерименти, клетките бяха посяти в концентрация  $1 \times 10^5$  клетки/ямка в 6-ямкови PVC плаки и третирани със следните концентрации IFN $\gamma$ : 100 IU/ml, 200 IU/ml и 500 IU/ml за 5-7 дни (W. K. Chan et al., 2008; Prasanna et al., 2010). Свеж IFN $\gamma$  се добавяше на всеки 48 часа. Флоуцитометричният анализ не отчете значими разлики в експресията на характерните за МСК маркери и свързаните с процеса на имуносупресия между трите варианта на третиране с IFN $\gamma$  (Фигура 10). Не се наблюдаваха и разлики в растежа и морфологията на клетките между трите използвани концентрации (Фигура 11). Представените данни са средни стойности  $\pm$  стандартни отклонения от три независими експеримента.

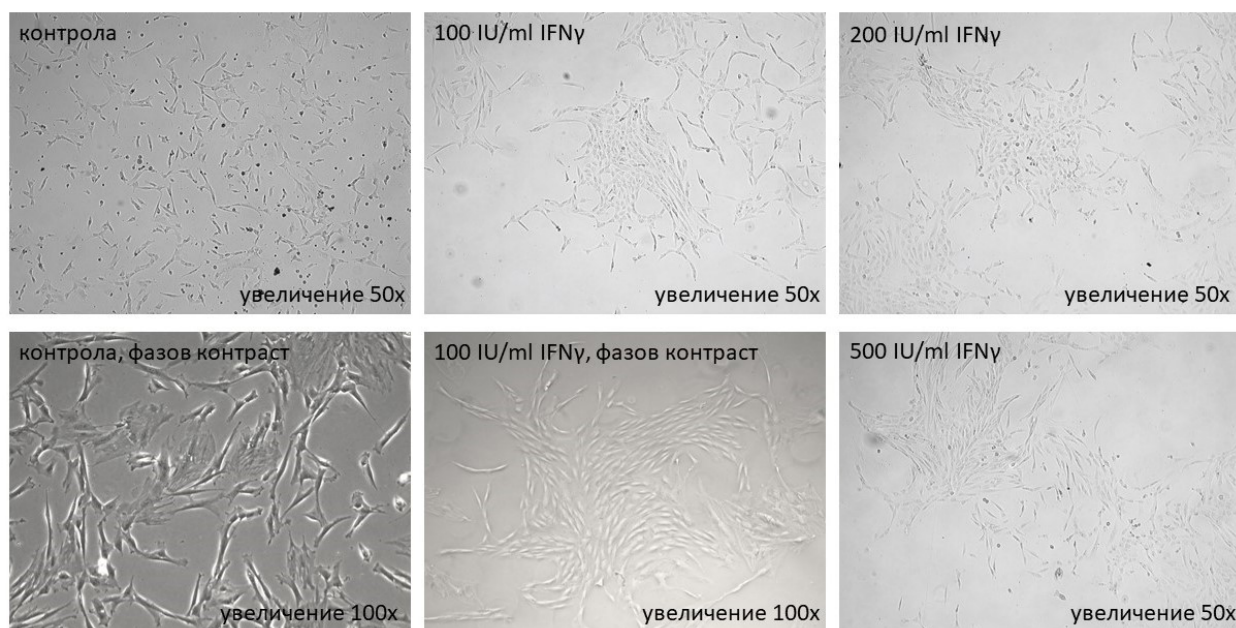








Фигура 10. Флуоцитометричен анализ (%- процент позитивно маркирани клетки, MFI-среден интензитет на флуоресценция) на МСК от пънна връв третиран с различни концентрации на  $IFN\gamma$  – 100 IU/ml, 200 IU/ml и 500 IU/ml (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

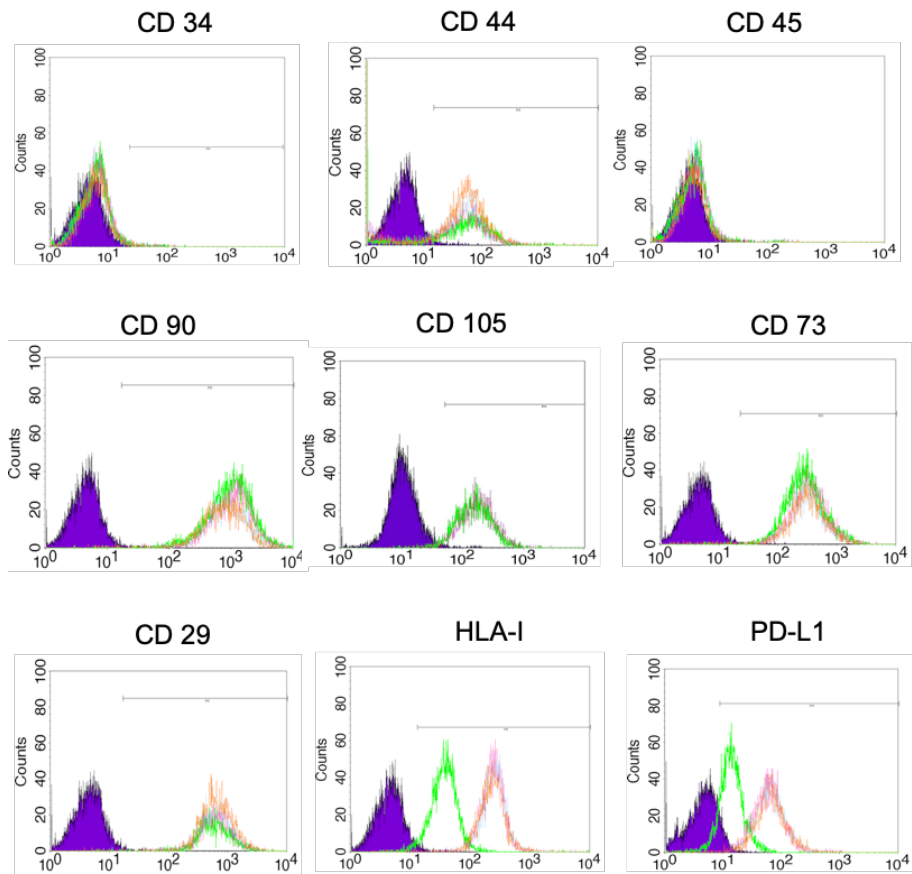


Фигура 11. Морфология на МСК от пънна връв третиран с различни концентрации на  $IFN\gamma$  – 100 IU/ml, 200 IU/ml и 500 IU/ml.

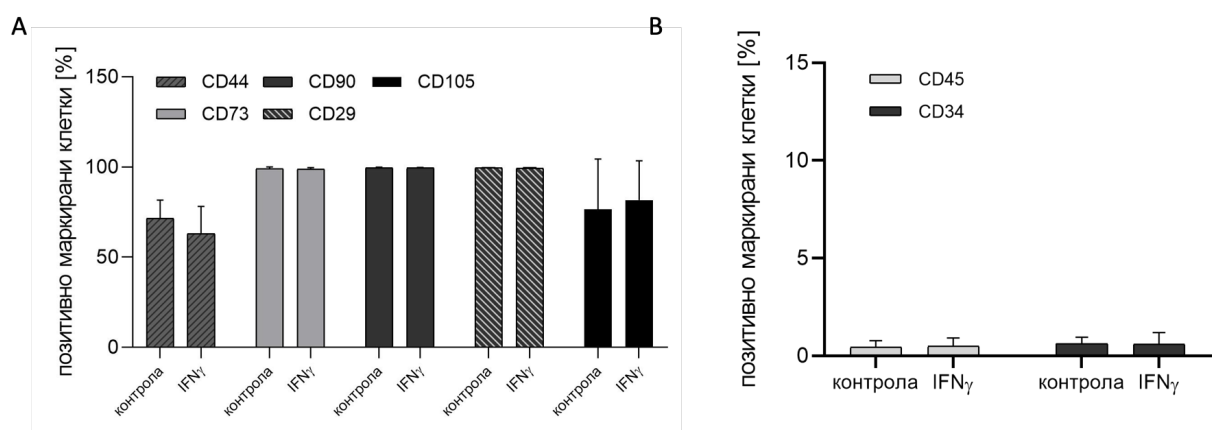
Резултатите от проведеното сравнително проучване не разкриха разлика в морфологията на клетките и експресията на нито един от посочените маркери при третираните с три различни концентрации на  $IFN\gamma$  клетки. Следователно, за последващите експерименти беше избрано клетките да се третират с 100 IU/ml  $IFN\gamma$ .

### 3. Фенотипизиране на МСК от пъпна връв третирани с IFN $\gamma$ (FACS анализ)

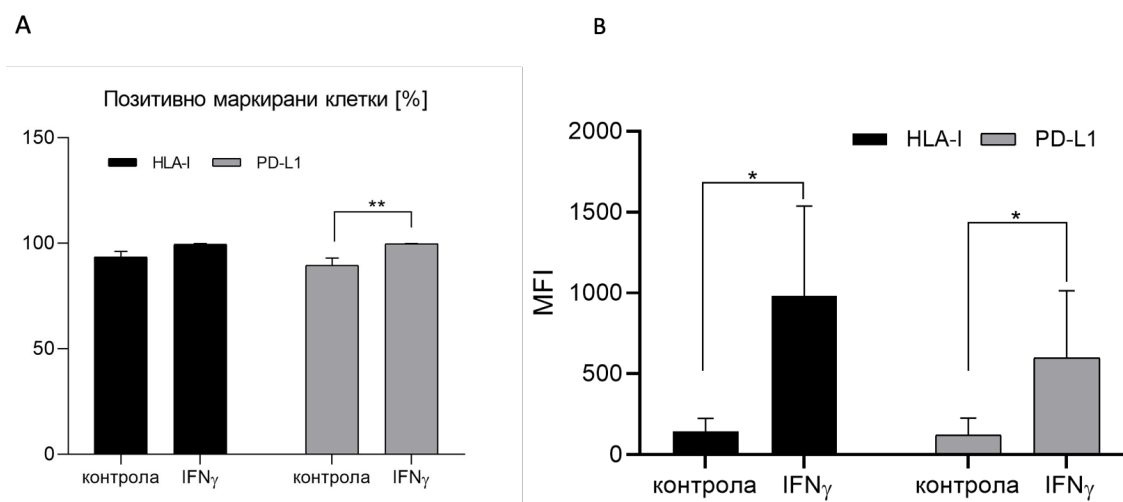
Култивираните МСК от пъпна връв от всички изследвани линии ( $n = 8$ ) силно експресираха маркерните молекули характерни за МСК (представени като средна аритметична стойност  $\pm$  SD от процента позитивни клетки): CD29 ( $99.6 \pm 0.05$ ), CD44 ( $71.5 \pm 10.14$ ), CD73 ( $99.0 \pm 0.99$ ), CD90 ( $99.6 \pm 0.32$ ) и CD105 ( $93.5 \pm 2.60$ ) (Фигури 12 и 13A), и бяха негативни по отношение на хематопоетичните маркери CD45 ( $0.44 \pm 0.34$ ) и CD34 ( $0.63 \pm 0.33$ ) (Фигури 12 и 13B). Нетретирани контролни МСК също бяха позитивни за HLA-I ( $93.52 \pm 2.60$ ) и programmed death ligand 1 (PD-L1,  $89.53 \pm 3.41$ ) (Фигури 12 и 14). След третирането на клетките с провъзпалителния цитокин IFN $\gamma$  в продължение на пет дни, не се установи статистически значима разлика ( $p = ns$ ) в процента позитивни клетки по отношение на следните маркери: CD29 ( $99.5 \pm 0.20$ ), CD44 ( $63.0 \pm 15.16$ ), CD73 ( $98.9 \pm 0.80$ ), CD90 ( $99.6 \pm 0.25$ ), CD105 ( $81.7 \pm 21.77$ ), CD45 ( $0.49 \pm 0.42$ ), CD34 ( $0.61 \pm 0.59$ ), HLA-I ( $99.47 \pm 0.32$ ) (Фигура 13). Значително се увеличи процентът клетки, които експресират PD-L1 ( $99.7 \pm 0.14$ ) ( $p < 0.01$ ) (Фигура 14A). Средната интензивност на флуоресценция (median fluorescence intensity, MFI) също беше анализирана и беше установено, че третираните с IFN $\gamma$  МСК притежават значително по-високи нива на MFI за следните маркери: HLA-I ( $980.43 \pm 556.64$ ) и PD-L1 ( $598.04 \pm 416.90$ ) в сравнение с MFI на нетретирани клетки за същите маркери – HLA-I ( $144.97 \pm 78.5$ ) и PD-L1 ( $122.05 \pm 103.83$ ) ( $p < 0.05$ ) (Фигура 14B).



Фигура 12. Репрезентативно имунофенотипизиране на мезенхимни стволови клетки култивирани в присъствие на  $IFN\gamma$  чрез FACS анализ (— автофлуоресцентна контрола; — контролни нетретирани клетки; — MCK +  $IFN\gamma$ ).



Фигура 13. Фенотипизиране на MCK от пълна връв на втори пасаж култивирани в присъствие на  $IFN\gamma$ . (A) MCK ( $n = 8$ ) бяха позитивни за повърхностната експресия на CD44, CD73, CD90, CD29 и CD105, и (B) отрицателни за CD45 и CD34.

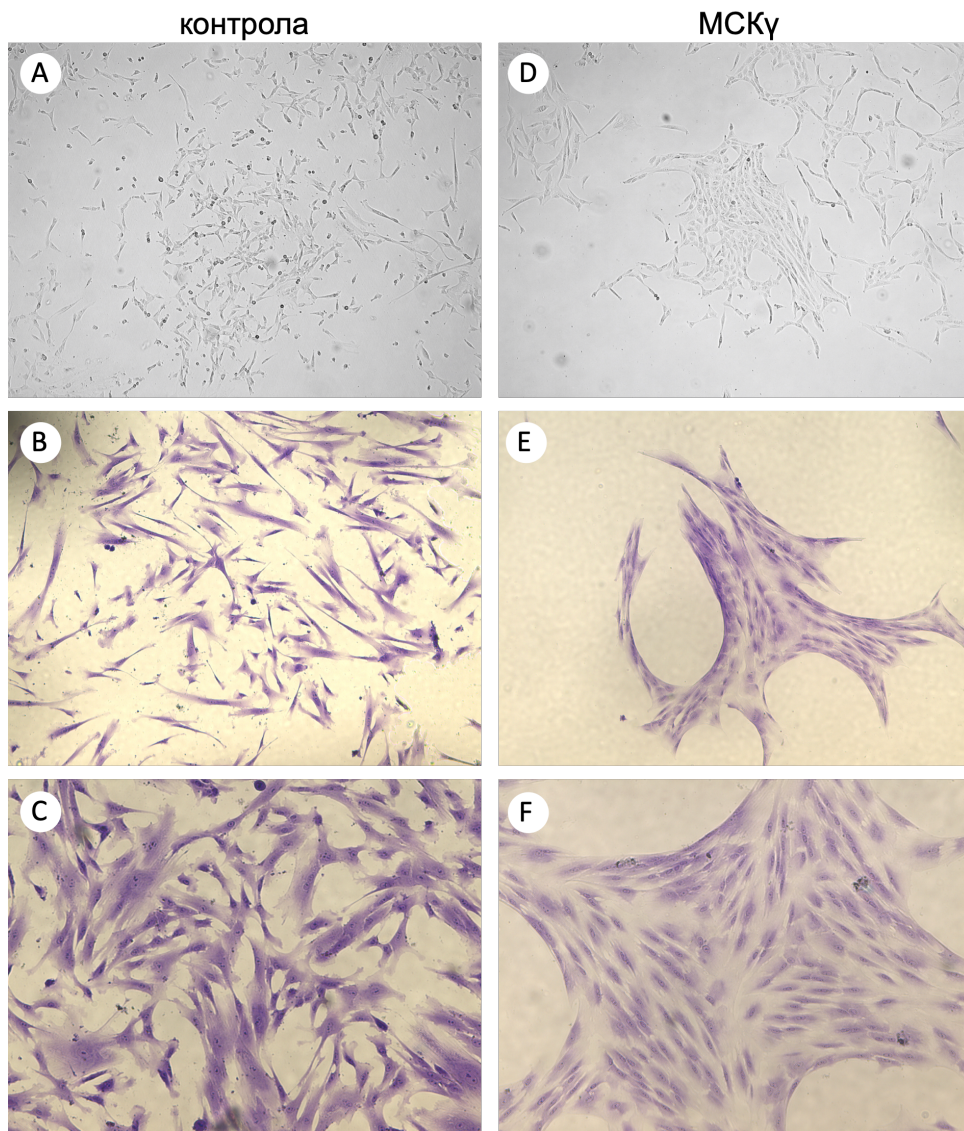


Фигура 14. Фенотипизиране на МСК от пънна връв на втори пасаж култивирани в присъствие на IFN $\gamma$ . (А) Процент позитивно маркирани клетки за HLA-I и PD-L1 (\*\* $p < 0.01$ ). (В) Средните аритметични стойности на флуоресцентния интензитет (MFI) за HLA-I и PD-L1 на третирани и контролни МСК (\* $p < 0.05$ ). Резултатите са представени като средни аритметични стойности  $\pm$  SD.

Нашите резултати не разкриха експресия на нито един от посочените хемopoетични маркери, с което беше потвърдена високата степен на чистота на клетъчната култура и изключена възможността за контаминиращо присъствие на клетки, принадлежащи към хемopoетичния ред (Фигури 12 и 13В). По отношение на характерния за МСК фенотипен комплекс от маркери CD73, CD90, CD29, CD105 и CD44, положителна реакция беше отчетена при анализираниите клетки (Фигури 12 и 13А), с което беше потвърдена съответно тяхната идентичност. Провъзпалителният цитокин IFN $\gamma$  не промени експресията на хемopoетичните и характерните за МСК маркери, но повиши експресията на PD-L1 (процент клетки и MFI) и HLA-I (MFI) (Фигури 12, 13 и 14).

#### 4. Морфология на третираниите с IFN $\gamma$ МСК от пънна връв

След добавянето на IFN $\gamma$  бяха наблюдавани промени в клетъчната морфология и начина на растеж на клетките. Третираниите клетки образуваха плътни колонии с неправилна форма и структури подобни на мрежа (Фигура 15D, Е, F), докато контролните клетки запазиха фибробластната си морфология и равномерно разпределение върху съда за клетъчно култивиране (Фигура 15А, В, С).



Фигура 15. Морфология на МСК третиран с  $IFN\gamma$ .

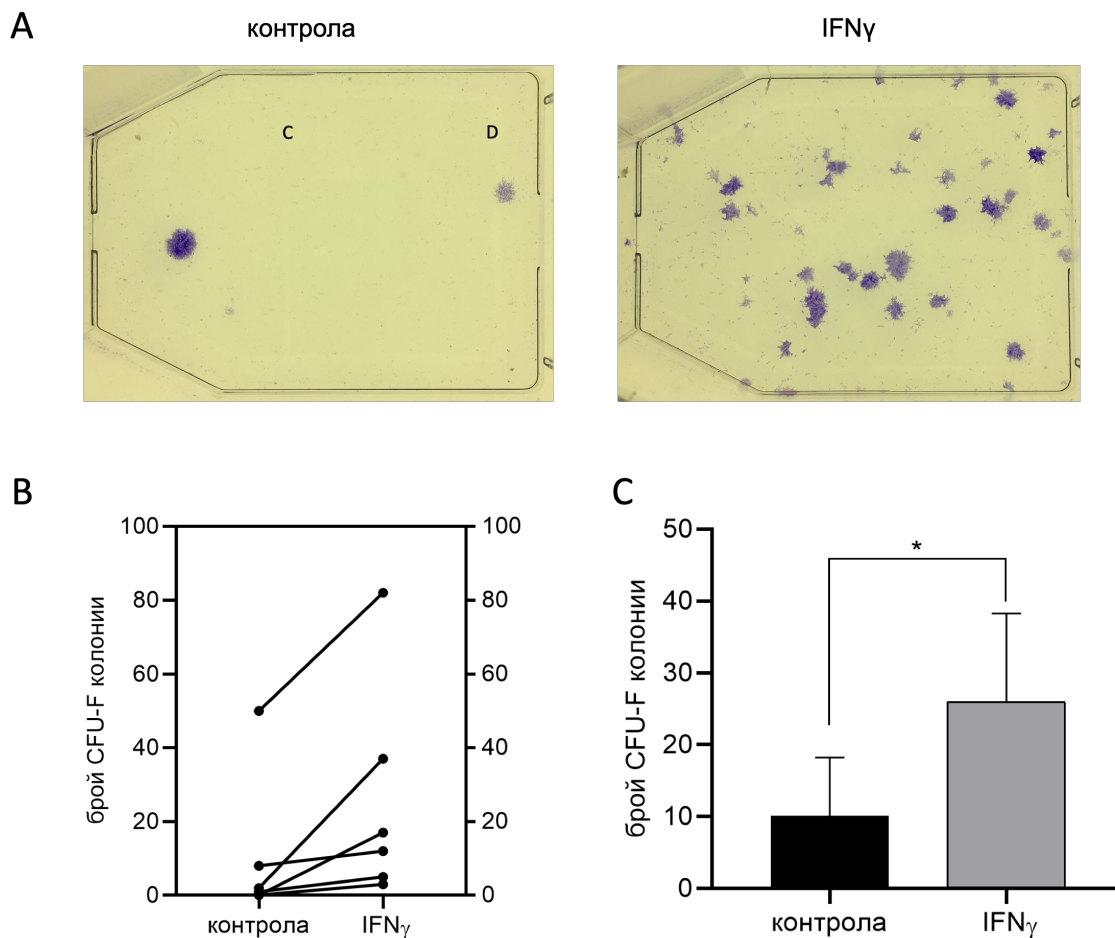
(A) Контролни МСК (увеличение, 50x). (B) Контролни клетки оцветени с *Crystal violet* (увеличение, 50x). (C) Контролни клетки оцветени с *Crystal violet* (увеличение, 100x). (D) Клетки третиран с  $IFN\gamma$  на ден 5 (увеличение, 50x). (E) МСК $\gamma$  на ден 5 оцветени с *Crystal* (увеличение, 50x). (F) МСК $\gamma$  на ден 5 оцветени с *Crystal* (увеличение, 100x). Клетките култивирани в присъствие на  $IFN\gamma$  стават по-окръглени, формирайки компактни колонии с неправилна форма.

Следователно нашите резултати показваха, че  $IFN\gamma$  води до промяна в морфологията и начина на растеж на култивираните в присъствие на провъзпалителния цитокин WJ-МСК.

## 5. Клоногенна ефективност на МСК от пъпна връв третирана с IFN $\gamma$

Отличителна черта на мезенхимните стволови клетки с определящо значение за функционалния им потенциал, е способността на единични клетки да образуват колонии в процеса на тяхното *in vitro* възпроизвеждане. Прекурсорните клетки с клоногенни свойства се означават още като фибробластни колонио-формиращи единици (CFU-F) и обикновено относителният им дял [%] корелира с прогениторния капацитет на популацията МСК.

След като клетките бяха посяти в ниски концентрации, култивирани в продължение на две седмици и оцветени с Crystal violet, формираните колонии бяха макроскопски ясно видими (Фигура 16А). Резултатите от шестте експеримента показаха, че съществува ясна тенденция – третираните с IFN $\gamma$  клетки притежават по-голям потенциал за клоногенен растеж спрямо контролните клетки (Фигура 16В). Резултатите от теста за клоногенна ефективност показаха, че когато образуваните колонии (над 50 клетки) бяха преброени за всяка линия и представени като средни стойности  $\pm$  SD, контролните клетки образуват значително по-малко колонии спрямо третираните с IFN $\gamma$  клетки ( $10.2 \pm 8.0$  срещу  $26.0 \pm 12.2$ , респективно;  $p < 0.05$ ) (Фигура 16С).



Фигура 16. Клоногенен растеж на контролни и третирани с IFN $\gamma$  MCK от пъпна връв. (A) Репрезентативен експеримент за определяне на броя CFU-F колонии образувани от контролни и третирани с IFN $\gamma$  клетки, оцветени с *Crystal violet* след култивиране в продължение на 14 дни *in vitro*. (B) Сравнение на клоногенната ефективност между контролни и третирани с IFN $\gamma$  клетки за всяка клетъчна линия. (C) Средни стойности  $\pm$  SD на CFU-F образуваните колонии (\* $p < 0.05$ ).

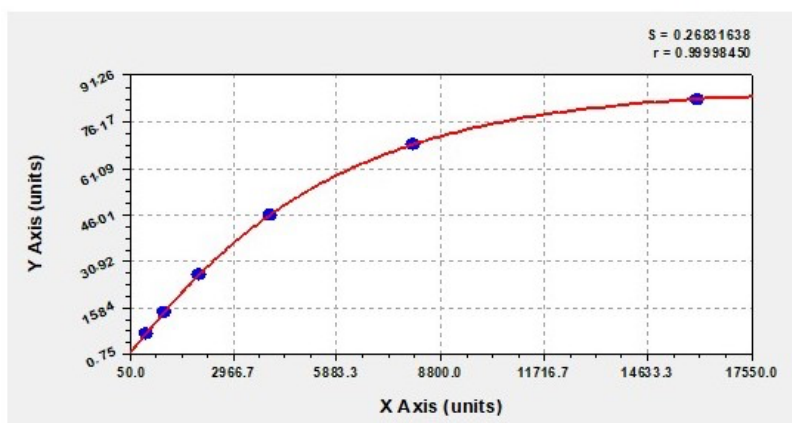
Резултатите показаха, че IFN $\gamma$  засилва клоногенната ефективност на WJ-MCK, като характерна особеност на колониите може да се посочи неправилната форма и наличието на плътен контакт между съставляващите ги клетки.

## 6. Растежна крива и генерационно време на клетъчните култури третирани с IFN $\gamma$

Една от основните характеристики на мезенхимните стволови клетки, показателна за недиференцирания им статус, е високата им *in vitro* пролиферативна активност. За оценка и съпоставка на пролиферативния потенциал на контролни и третирани с IFN $\gamma$  МСК, беше приложен колориметричен тест (Alamar Blue assay), посредством който беше проследена динамиката на растеж на културите и определено времето на популационно удвояване. Стандартните криви, отразяващи зависимостта „брой клетки – абсорбция“ (Фигура 17А), бяха построени на база спектрофотометричните показатели, отчетени за серия контролни култури, всяка от които е съставена от точно определен и предварително известен брой клетки.

С използване на компютърната програма CurveExpert 1.34 бяха изведени необходимите математически уравнения (Фигура 17В), чрез които на всеки 24 часа в продължение на 8 дни беше отчитано количеството клетки в експерименталните култури от WJ-МСК. Събраните данни послужиха за построяване на съответните графики на растежни криви и за определяне кинетичните параметри на клетъчния растеж.

А



В

Рационална функция:  
 $y = a \cdot b \cdot \exp(-c \cdot x^d)$

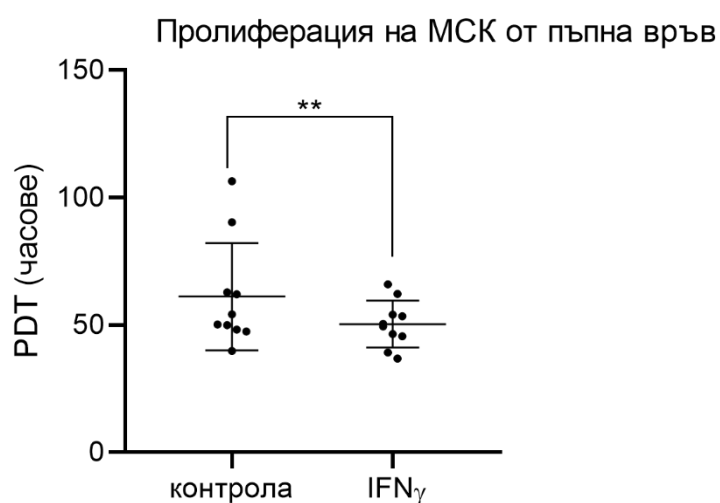
Коефициентни стойности:

a =	8.70E+01
b =	8.60E+01
c =	1.10E-04
d =	1.06E+00

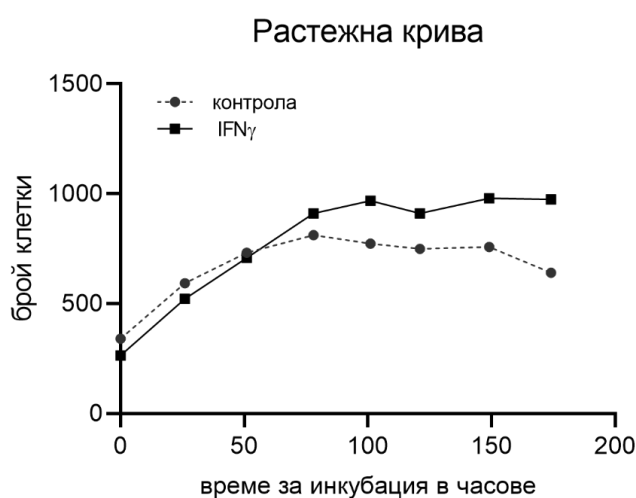
S = стандартна грешка  
r = корелационен коефициент  
X-axis – брой клетки  
Y-axis – процент редукция

Фигура 17. (А) Репрезентативна стандартна крива за зависимостта на процента редукция от броя на МСК. (В) – Функция за определяне количеството на МСК в експерименталните култури

Времето за популационно удвояване (population doubling time, PDT) на десет различни клетъчни линии беше изчислено и се установи, че МСК култивирани в присъствие на  $IFN\gamma$  удвояват популацията си за по-кратко време спрямо контролните култури ( $50.345 \pm 9.155$  срещу  $61.135 \pm 21.110$ , респективно;  $p < 0.01$ ) (Фигура 18). Както е показано на репрезентативната растежна крива (Фигура 19), клетките влизат в log фазата на културален растеж много бързо и растат експоненциално до  $\sim 78$  h, когато достигат до плато, като клетките култивирани в присъствие на  $IFN\gamma$  достигат до по-високи крайни концентрации.



Фигура 18. Време за популационно удвояване (PDT) на контролни и култивирани в присъствие на  $IFN\gamma$  МСК, изчислено като се използва Alamar Blue assay (\*\* $p < 0.01$ ).



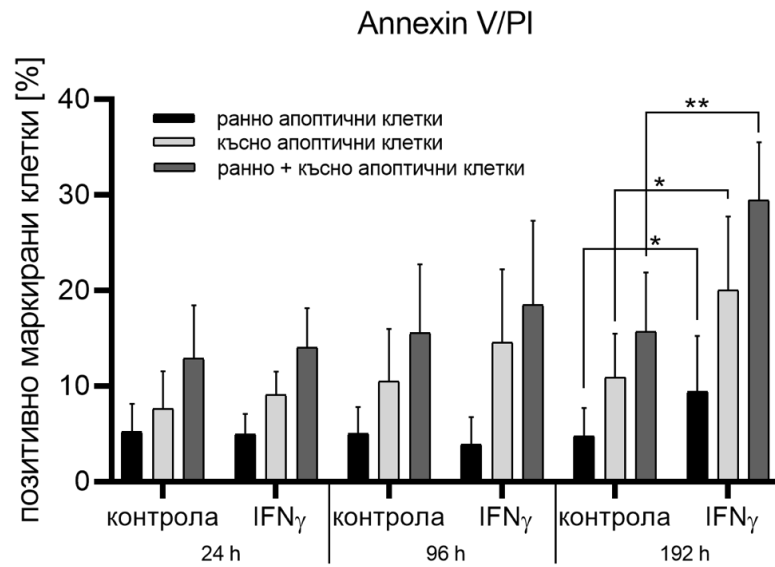
Фигура 19. Динамика на пролиферацията на МСК от пъпна връв третирани с възпалителния цитокин  $IFN\gamma$ . Репрезентативна растежна крива.

Следователно нашите резултати показаха, че времето за популационно удвояване на WJ-MCK култивирани в присъствие на IFN $\gamma$  е по-кратко спрямо контролните клетки.

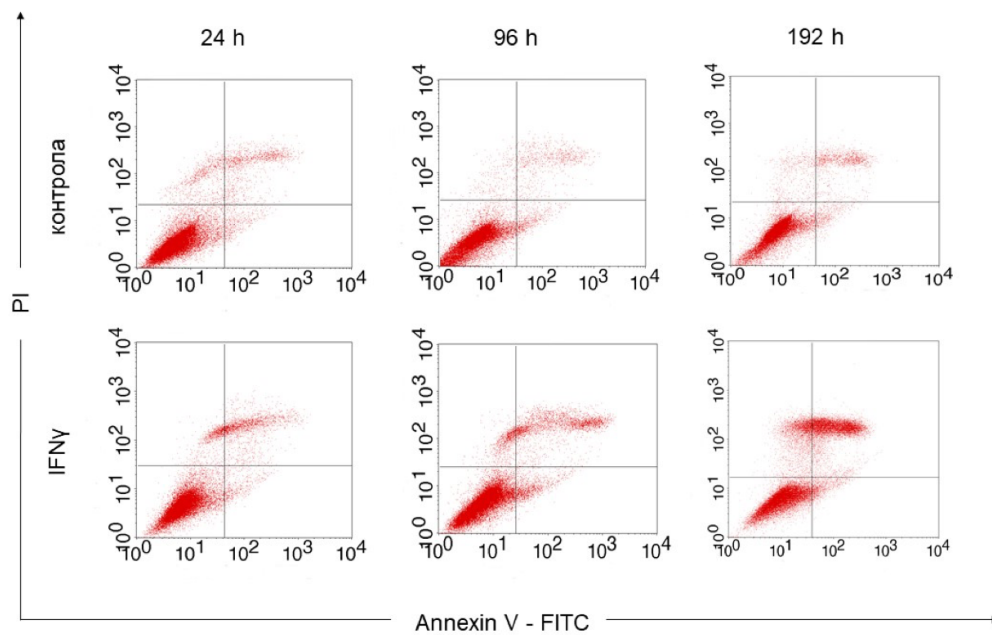
## 7. Тест за клетъчна апоптоза

Процентът апоптични клетки беше проследяван в продължение на осем дни ( $n = 8$ ). Процентът клетки в ранна апоптоза (FITC Annexin V позитивни и PI негативни), късна апоптоза (FITC Annexin V позитивни и PI позитивни), и общият процент на клетки в апоптоза бяха измервани на три етапа. Контролните клетки бяха поддържани само в стандартна среда за клетъчно култивиране без IFN $\gamma$ . Беше установено, че на осмия ден процентът клетки, които са третирани с IFN $\gamma$  в ранна ( $9.418 \pm 5.847$ ) и късна апоптоза ( $20.052 \pm 7.702$ ) е по-голям в сравнение с процентът клетки в ранна ( $4.782 \pm 2.951$ ) и късна апоптоза ( $10.926 \pm 4.565$ ) при контролните клетки, култивирани само в среда ( $p < 0.05$ ) (Фигура 20A). Същият резултат беше получен и по отношение на общия процент апоптични клетки. На ден осем сумарният процент клетки в апоптоза (Annexin V+/Annexin V+ и PI+) култивирани в присъствие на IFN $\gamma$  беше по-висок спрямо нетретираниите клетки ( $29.470 \pm 6.59$  спрямо  $15.708 \pm 6.190$ , респективно;  $p < 0.01$ ) (Фигура 20A). Не беше открита статистически значима разлика между контролните и третираните с IFN $\gamma$  клетки на 24-ия и 96-ия час от стартирането на експеримента.

A



B



Фигура 20. Annexin V/PI флоуцитометричен анализ на процента МСК от пълна връв третирани с IFN $\gamma$  намиращи се в ранна и късна апоптоза, както и общия процент апоптични клетки. (A) Процент позитивно маркирани клетки измерен на три различни етапа. Резултатите са представени като среди аритметични стойности  $\pm$  SD от 8 независими експеримента; (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ). (B) Репрезентативни флоуцитометрични панели.

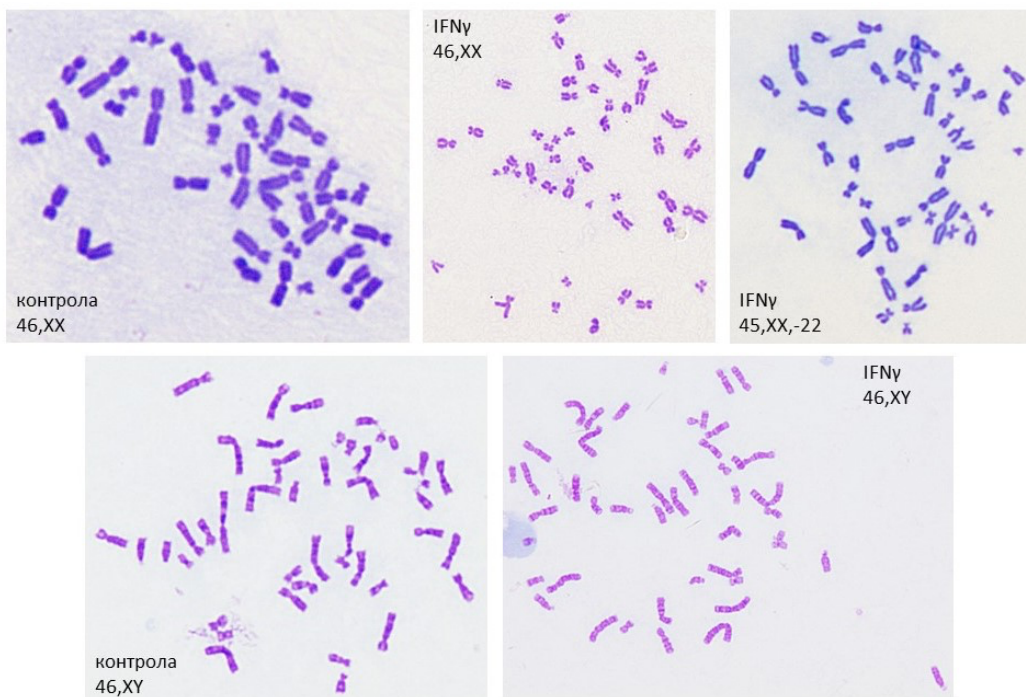
Следователно нашите резултати показаха, че под действието на IFN $\gamma$  на осмия ден от третирането с провъзпалителния цитокин, процентът МСК от пъпна връв, при които настъпва апоптоза се повишава значително.

### 8. Цитогенетично изследване на клетки третирани с IFN $\gamma$ и контролната група нетретирани МСК

За да се изследва дали третирането на клетките с IFN $\gamma$  повлиява стабилността на клетъчния кариотип, от контролни и третирани с IFN $\gamma$  WJ-МСК бяха получени метафазни препарати. Обобщение на получените резултати е представено в Таблица 5. Бяха анализирани общо 67 метафази от контролни клетъчни култури и 56 от третирани с IFN $\gamma$  МСК. Всички кариотипи бяха изписани като нормални (Фигура 21). Установихме само една метафаза с липсваща хромозома 22 при третираните с IFN $\gamma$  клетки (кариотип: 45, XX, -22), която най-вероятно се дължи на лабораторните процедури по култивиране на клетките и получаване на метафазите и не е с достатъчна честота, за да се определи като клонална аберация според International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2013).

Таблица 5. Резултати от цитогенетични изследвания на МСК от пъпна връв анализирани след култивиране в присъствие или отсъствие на провъзпалителния цитокин IFN $\gamma$ .

Проба	Кариотип контролни клетки	Кариотип IFN $\gamma$ третирани клетки
1	46, XX (18)	46, XX (10)/45,XX,-22 (1)
2	46, XX (13)	46, XX (11)
3	46, XY (13)	46, XY (11)
4	46, XX (12)	46, XX (12)
5	46, XY (11)	46, XY (11)
<i>общ брой анализирани метафази</i>	67	56



Фигура 21. Репрезентативни микроскопски снимки на метафази получени от контролни и третирани с  $IFN\gamma$  клетъчни култури от WJ-MCK (увеличение  $\times 1000$ ).

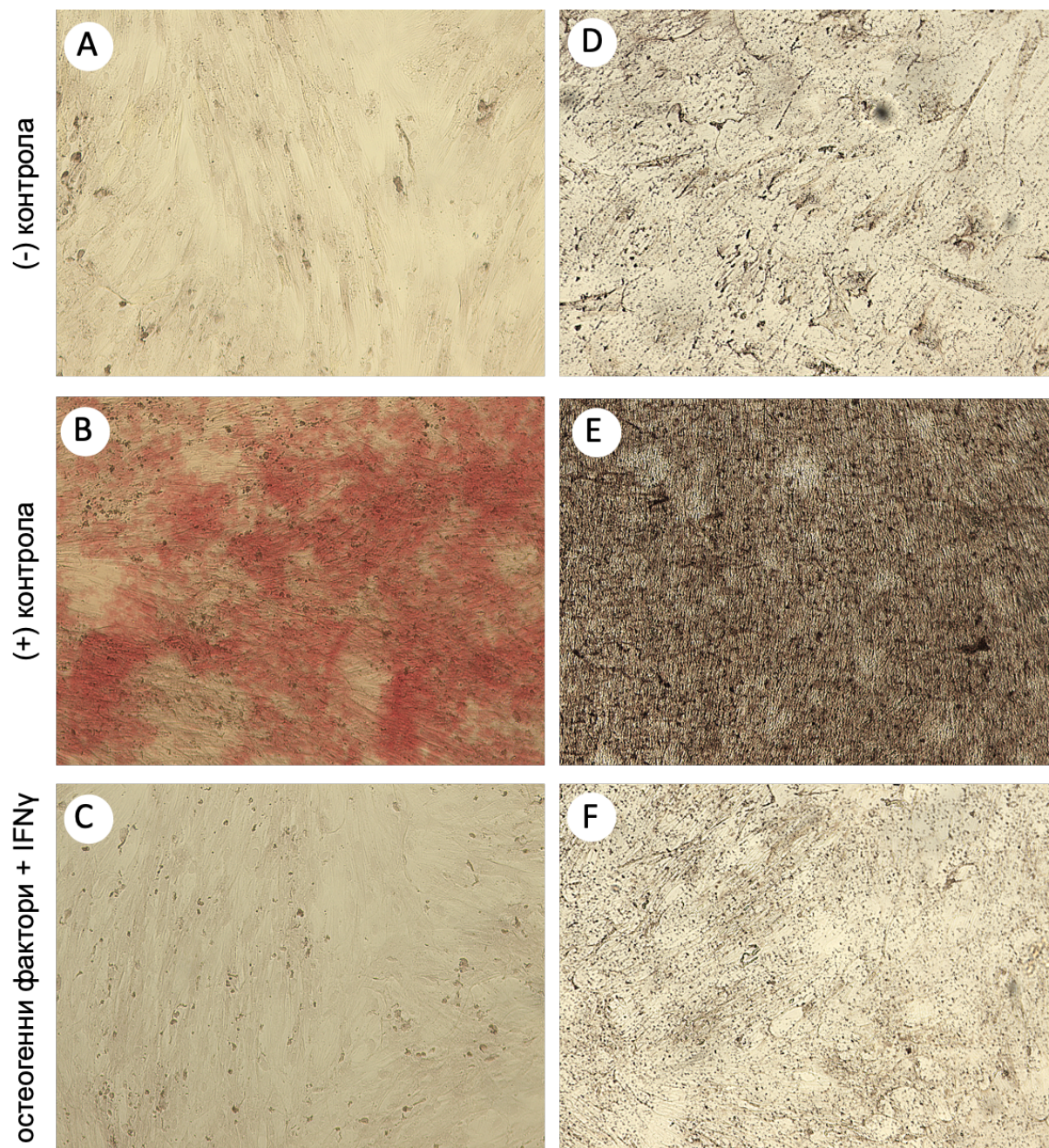
Следователно нашите резултати показаха, че WJ-MCK запазват своята хромозомна стабилност в присъствие на  $IFN\gamma$ .

## 9. Остеогенна диференциация

Известно е, че остеогенно-диференцираните *in vitro* мезенхимни стволови клетки се отличават с някои характерни свойства, сред които отлагане на  $Ca^{2+}$  кристали в екстрацелуларния матрикс и повишена алкално-фосфатазна активност. Определена беше степента на остеогенна диференциация на изследваните МСК чрез специфично оцветяване за  $Ca^{2+}$  кристали и количествено определяне на алкално-фосфатазната активност.

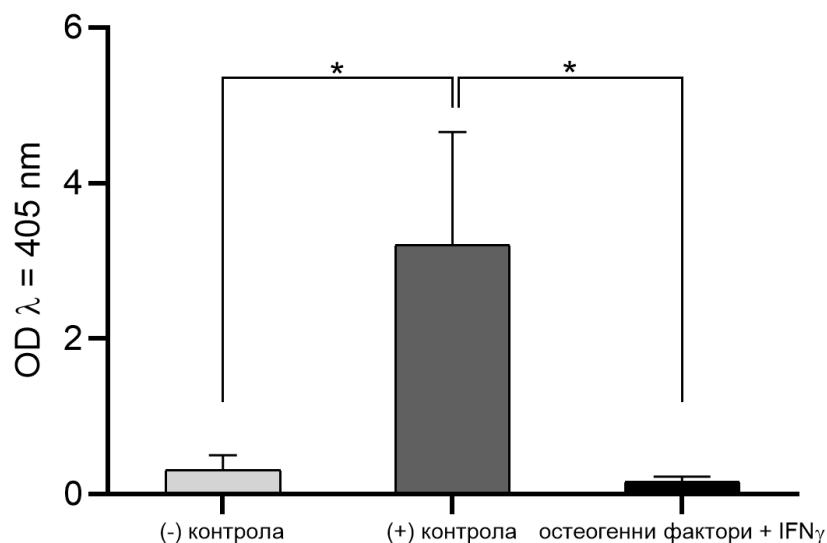
След инкубиране на МСК с разтвор на  $AgNO_3$  (оцветяване по von Kossa), при третираниите в продължение на три седмици с диференциращи агенти МСК беше наблюдавано под инвертен микроскоп характерно черно оцветяване (Фигура 20Е), което е показател за наситеното присъствие на  $Ca_3PO_4$  в екстрацелуларния матрикс. След фиксиране на клетките и оцветяване с багрило ализарин ред беше наблюдавано ярко червено оцветяване, с което беше потвърден успешно индуцирания процес на остеогенеза при изследваните клетки (Фигура 22В). При контролните култури от МСК (Фигура 22А и D), поддържани в среда без диференциращи фактори, не бяха

детектирани минерални  $\text{Ca}^{2+}$  и при двата типа оцветяване. Клетките култивирани в присъствие на  $\text{IFN}\gamma$  не се диференцираха *in vitro* и не се установи специфично оцветяване на  $\text{Ca}^{2+}$  кристали с Alizarin red и Von Kossa (Фигура 22С и F). Този резултат се потвърди и от данните за алкално-фосфатазната активност – при клетките третирани с  $\text{IFN}\gamma$  се установиха 19.9- пъти по-ниски нива на активността на алкалната фосфатаза ( $0.161 \pm 0.06$ ) спрямо активността при клетки третирани само с фактори за остеогенна диференциация (позитивна контрола) ( $3.209 \pm 1.44$ ) ( $p < 0.05$ ). Измерените стойности при третираните с  $\text{IFN}\gamma$  клетки бяха близки до тези на клетките култивирани само в стандартна среда ( $0.314 \pm 0.18$ ) (Фигура 23).



Фигура 22. Ефект на  $IFN\gamma$  върху способността за остеогенна диференциация на МСК от пълна връв *in vitro*. (A-F) Остеогенната диференциация беше потвърдена чрез специфични оцветявания - Alizarin red (A-C, A – контролни МСК, нетретирани с остеогенни фактори, B – успешно диференцирани клетки, C – клетки третирани с фактори за остеогенна диференциация и  $IFN\gamma$ ); Von Kossa (D-F, D – контролни МСК, нетретирани с остеогенни фактори, E – успешно диференцирани клетки, F – клетки третирани с фактори за остеогенна диференциация и  $IFN\gamma$ )

## Алкално-фосфатазна активност



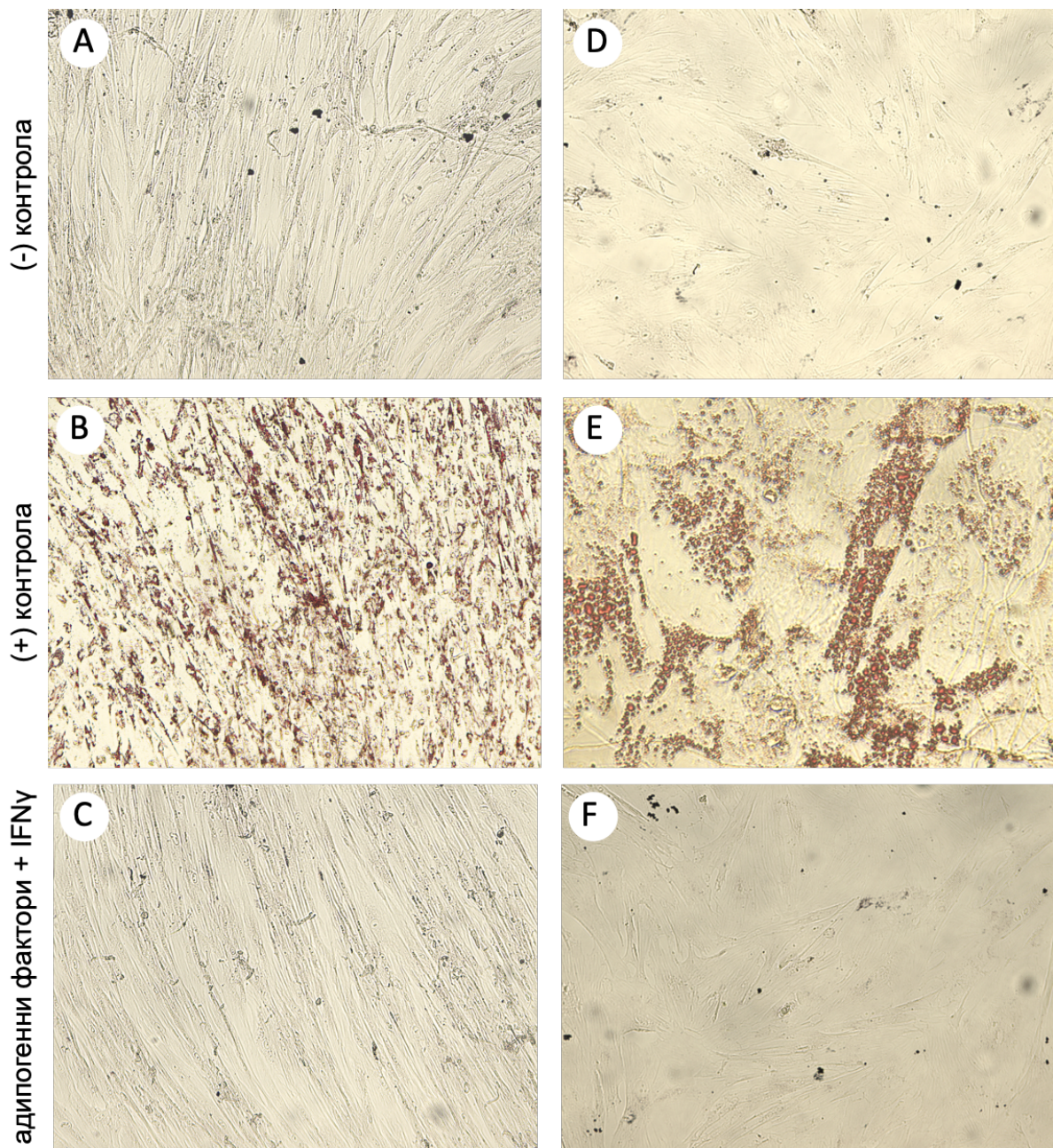
Фигура 23. Ефект на IFN $\gamma$  върху способността за остеогенна диференциация на МСК от пъпна връв *in vitro*. Количествено измерване на алкално-фосфатазната активност (резултатите представят средни аритметични стойности  $\pm$  SD от 8 независими експеримента; \* $p < 0.05$ ).

Получените резултати показват, че в присъствие на IFN $\gamma$  МСК от пъпна връв губят способността си да се диференцират остеогенно.

### 10. Адипогенна диференциация

МСК от пъпна връв бяха диференцирани адипогенно в продължение на 21 дни. При наличие на адипогенна диференциация в цитозола на клетките се формираха богати на неутрални липиди (триглицериди) вакуоли, обагрящи се в червено след хистологично оцветяване с багрилото Oil red O. Между ден 14 и ден 21 от култивирането в среда с индуциращи агенти, клетките показваха признаци за адипогенна диференциация, доказателство за което беше детекцията на ярко оцветени в червено агрегати от цитоплазмени липидни вакуоли (позитивна контрола) (Фигура 24В и Е). При недиференцираните контролни клетки, култивирани паралелно в среда без индуциращи фактори не се наблюдаваха липидни вакуоли и не беше установено оцветяване (Фигура 24А и D). Клетките третирани с IFN $\gamma$  и фактори за адипогенна диференциация не се диференцираха и не се установи характерното ярко червено оцветяване на липидни вакуоли (Фигура 24С и F), като след хистологичното оцветяване препаратите

изглеждаха по аналогичен на недиференцираните клетки (отрицателните контроли) начин.



Фигура 24. Ефект на IFN $\gamma$  върху способността за адипогенна диференциация на МСК от пънна връв *in vitro*. (A-F) Оцветяване с Oil red O на натрупаните в клетките липидни вакуоли (A и D – контролни недиференцирани клетки, B и E – позитивна контрола на диференциация, C и F – клетки третирани с IFN $\gamma$  и адипогенни фактори); A, B и C – увеличение  $\times 100$ , D, E и F – увеличение  $\times 400$ .

Нашите резултати показват, че под действието на IFN $\gamma$  МСК от пъпна връв губят потенциала си за адипогенна диференциация.

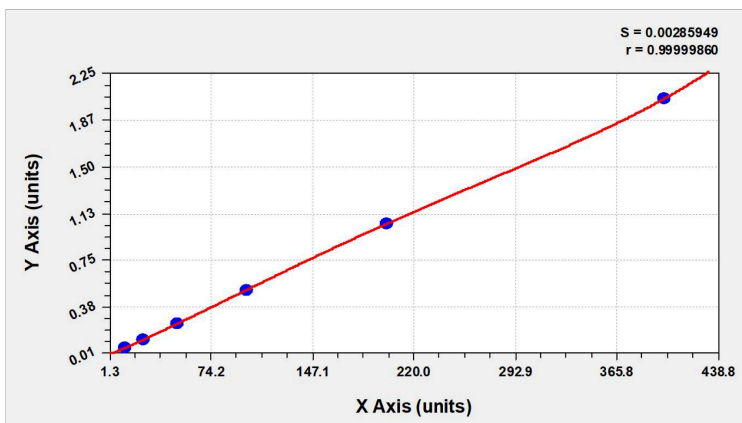
### **11. Изследване на кондиционираните среди от човешки мезенхимни стволови клетки третирани с IFN $\gamma$ и контролната група нетретирани МСК за наличието на IL-10, TGF $\beta$ 1 и IDO**

Концентрацията на секретираниите от третирани с IFN $\gamma$  мезенхимните стволови клетки IL-10, TGF $\beta$ 1 и IDO беше определена чрез индиректен ензим-свързан имуносорбентен тест (ELISA) в кондиционирани среди (48 часа). Концентрацията на изброените цитокини се измерваше и в средата от контролните ямки, в които клетките бяха култивирани само в хранителна среда.

За точното определяне на концентрациите на изследваните цитокини, се построиха линейни стандартни криви (Фигура 25А и Фигура 26А), като по вертикалната ос се нанесе средната абсорбция на всеки стандарт спрямо съответната стандартна концентрация на IL-10/TGF $\beta$  по хоризонталната ос. С използване на компютърната програма CurveExpert 1.34 бяха изведени необходимите математически уравнения (Фигура 25В и Фигура 26В), чрез които се определи количеството IL-10 и TGF $\beta$  във всяка проба чрез екстраполиране на стойностите на OD спрямо стандартните концентрации на IL-10 и TGF $\beta$ . Поради липса на информативна стойност и невъзможност за интерпретация, суровите данни за IDO не са обработени и представени.

Резултатите за IL-10 и TGF $\beta$ 1 са представени като средни аритметични стойности  $\pm$  SD от измерванията на 8 неразредени проби, всяка в две повторения. Данните са представени като pg/ml. Резултатите показаха, че под влиянието на IFN $\gamma$ , секрецията на IL-10 от МСК намалява ( $12.808 \pm 6.317$  спрямо  $9.414 \pm 5.121$ , респективно;  $p < 0.05$ ) (Фигура 27). Обратно, при третираниите с IFN $\gamma$  МСК от пъпна връв се наблюдаваше тенденция за увеличаване на секрецията на TGF $\beta$ 1 спрямо контролните култури, въпреки че резултатите нямаха статистическа значимост ( $135.729 \pm 172.582$  срещу  $504.060 \pm 434.329$ , респективно;  $p = ns$ ) (Фигура 27).

A

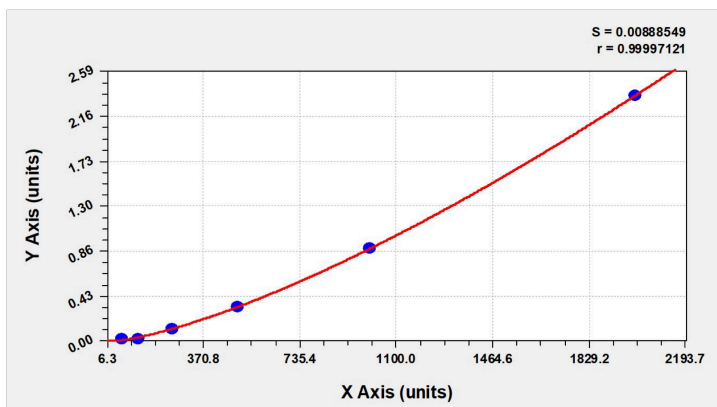


B

4th Degree Polynomial Fit	
$y = a + bx + cx^2 + dx^3 + ex^4$	
Коефициентни стойности:	
a =	-0,007144444
b =	0,004714316
c =	9,21454E-06
d =	-4,48961E-08
e =	6,1189E-11

Фигура 25. (A) Стандартна крива на IL-10. (B) Функция за определяне количеството на IL-10 в изследваните проби.

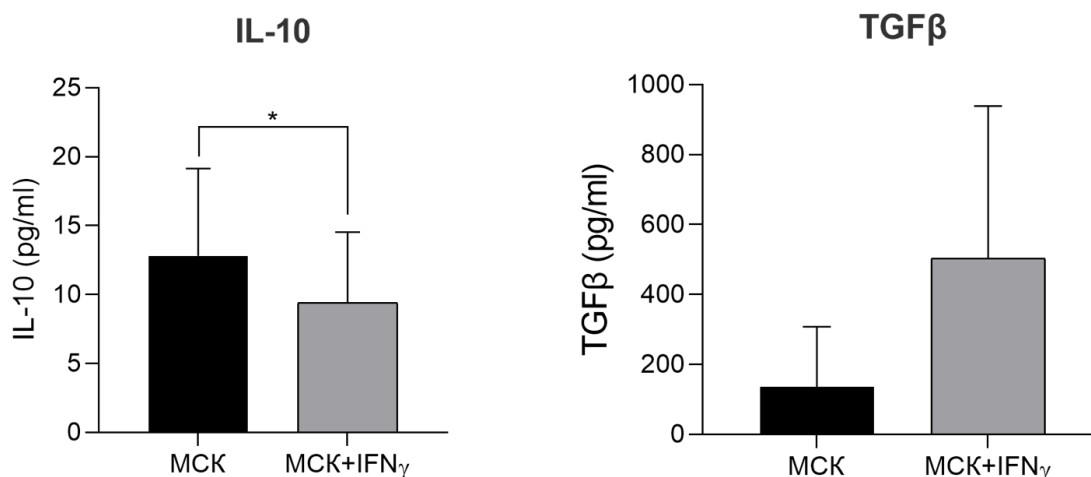
A



B

Vapor Pressure Model	
$y = \exp(a + b/x + c \ln(x))$	
Коефициентни стойности:	
a =	-9,623773416
b =	-26,28240612
c =	1,380567197

Фигура 26. (A) Стандартна крива на TGFβ1. (B) Функция за определяне количеството на TGFβ1 в изследваните проби.



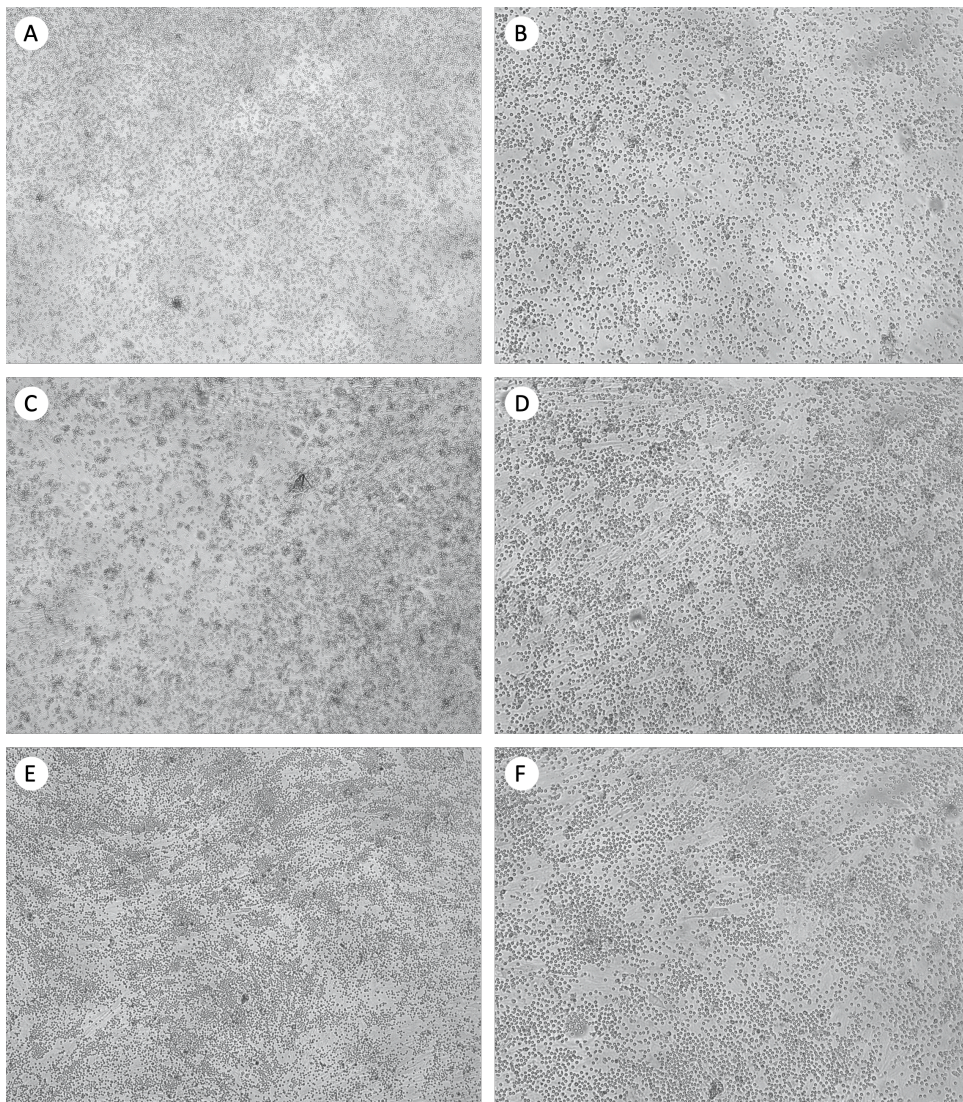
Фигура 27. Секреция на IL-10 и TGFβ1 от MCK, култивирани в присъствие на IFN $\gamma$  (\*  $p < 0.05$ ).

Следователно нашите резултати показаха, че под влиянието на IFN $\gamma$ , секрецията на IL-10 от WJ-MCK намалява, докато тази на TGFβ1 има тенденция да се увеличава.

## 12. Определяне на маркери върху Т лимфоцити под влиянието на IFN $\gamma$

Влиянието на мезенхимни стволови клетки от пъпна връв, третирани с IFN $\gamma$ , върху повърхностната експресия на Т лимфоцити беше изследвано в култури от човешки периферни мононуклеарни клетки (PBMC). В първия етап на опитната постановка изолираните MCK на първи пасаж бяха посявани и „праймирани“ с 100 IU/ml IFN $\gamma$  в рамките на 4-5 дни, като свеж IFN $\gamma$  беше добавян на всеки 48 часа. Паралелно бяха култивирани контролни MCK в стандартна среда. В следващия етап към MCK $\gamma$  бяха добавяни  $2 \times 10^6$  клетки/ямка PBMC. Отделно бяха посявани само PBMC ( $2 \times 10^6$  клетки/ямка) и култивирани в среда DMEM/F12 + 10% FBS с или без 100 IU/ml IFN $\gamma$  (Фигура 28). PBMC бяха ко-култивирани с MCK $\gamma$  за 48 часа, след което експресията на CD152 (CTLA4), CD273 (PD1) и KIR3DL2 (158k) от Т лимфоцити беше анализирана чрез флуоцитометричен анализ, като клетките бяха гейтирани по експресията си на CD3. Резултатите показаха, че под влиянието на MCK (култивирани в стандартна среда) средната интензивност на флуоресценция (median fluorescence intensity, MFI) на CTLA-4 намалява ( $192.714 \pm 35.631$ ) спрямо култивираните само в среда PBMC ( $211.286 \pm 42.106$ ,  $p < 0.05$ ). Когато PBMC се ко-култивират с „праймирани“ MCK (MCK $\gamma$ ),

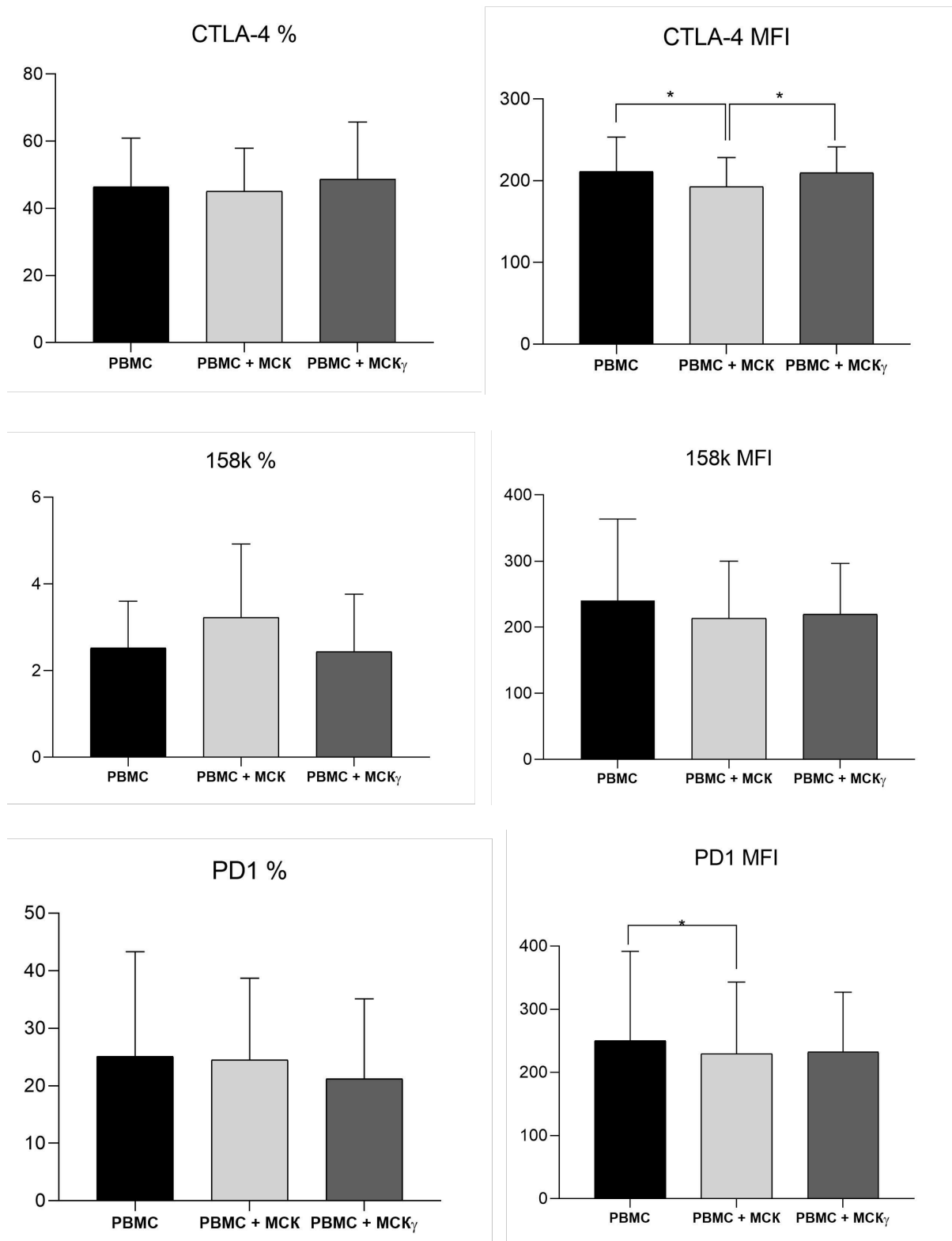
интензивността на експресия на CTLA-4 отново се покачва ( $209.571 \pm 31.68$ ,  $p < 0.05$ ). Не се установиха статистически значими разлики в процента експресиращи CTLA-4 изследвани клетки: РВМС ( $46.4 \pm 14.5$ ), РВМС + МСК ( $45.1 \pm 12.8$ ), РВМС + МСК $\gamma$  ( $48.7 \pm 17$ ),  $p = ns$ . По отношение на клетките експресиращи 158k, не се установиха статистически значими разлики както за процента експресиращи клетки, така и за интензитета на експресия ( $p = ns$ ). Процентът Т лимфоцити експресиращи PD1 не се промени значимо след ко-култивирането им с МСК и МСК $\gamma$  ( $p = ns$ ). Въпреки това, при ко-култивиране на РВМС с МСК интензитетът на експресия (MFI) се намали значимо ( $250.0 \pm 141.563$  спрямо  $229.125 \pm 113.843$ , респективно,  $p < 0.05$ ) (Фигура 29 и Таблица 6).



Фигура 28. (A и B) Репрезентативни микроскопски снимки на PBMC култивирани само в среда. (C и D) PBMC + MCK. (E и F) PBMC + MCK $\gamma$ . Снимки A, C и E са с увеличение 50x; снимки B, D и F са с увеличение 100x.

Таблица 6. Данни от FACS анализа на PBMC ко-култивирани с MCK/MCK $\gamma$ , представени като средни аритметични стойности  $\pm$  SD от измерванията.

	CTLA-4 (CD152)		158k (KIR3DL2)		PD1 (CD273)	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI
<b>PBMC</b>	46.4 $\pm$ 14.5	211.286 $\pm$ 42.106	2.521 $\pm$ 1.08	240.5 $\pm$ 123.27	25.1 $\pm$ 18.2	250.0 $\pm$ 141.563
<b>PBMC + MCK</b>	45.1 $\pm$ 12.8	192.714 $\pm$ 35.631	3.226 $\pm$ 1.693	213.5 $\pm$ 86.396	24.5 $\pm$ 14.2	229.125 $\pm$ 113.843
<b>PBMC + MCK<math>\gamma</math></b>	48.7 $\pm$ 17	209.571 $\pm$ 31.68	2.438 $\pm$ 1.327	219.25 $\pm$ 77.212	21.2 $\pm$ 13.9	232.25 $\pm$ 94.725



Фигура 29. FACS анализ на PBMC ко-култивирани с MCK/MCK<sub>γ</sub>. Данните са представени като средни аритметични стойности ± SD (\* $p < 0.05$ ).

Нашите резултати показаха, че когато PBMC се ко-култивират с WJ-MCK, интензитетът на експресията от Т лимфоцитите CTLA-4 значително намалява, докато третираните с IFN $\gamma$  WJ-MCK засилват обратно нивото на експресия на CTLA-4. Получените от нас данни сочат, че експресията на PD-1 от Т лимфоцитите намалява под действието на MCK, независимо дали са „праймирани“ с IFN $\gamma$  или не. По отношение на 158k, не установихме статистически значими разлики между данните получени от различните експериментални постановки.

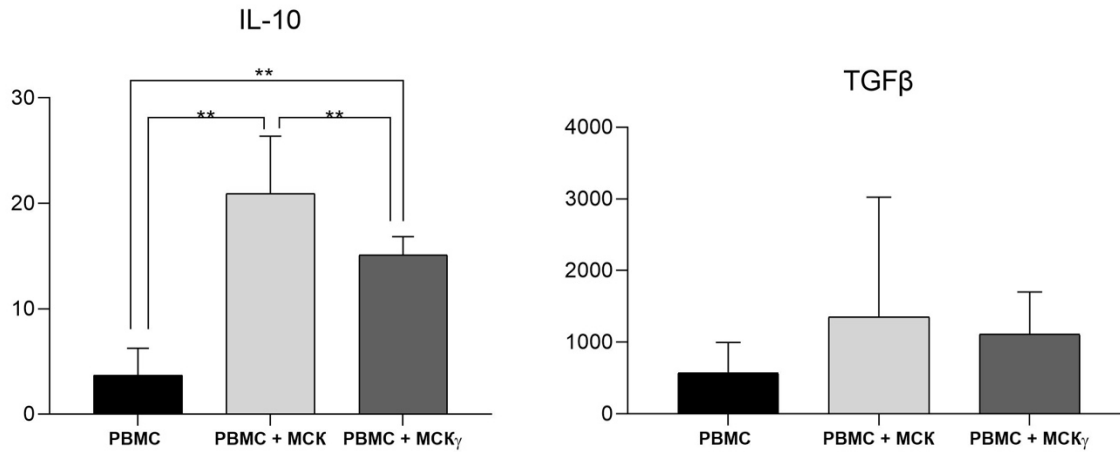
### 13. Изследване на кондиционираните среди от човешки PBMC ко-култивирани с MCK третирани с IFN $\gamma$ за наличието на IL-10, TGF $\beta$ 1 и IDO

Концентрацията на IL-10, TGF $\beta$ 1 и IDO в кондиционирани среди (48 часа) получени след ко-култивиране на PBMC с „праймирани“ MCK, беше определена чрез индиректен ензим-свързан имуносорбентен тест (ELISA) Концентрацията на цитокините се измерваше и в средата от контролните ямки, в които клетките бяха култивирани само в хранителна среда. Поради липса на информативна стойност и невъзможност за интерпретация, суровите данни за IDO не са обработени и представени.

Резултатите за IL-10 и TGF $\beta$ 1 са представени като средна стойност от измерванията на 10 неразредени проби, всяка в две повторения. Когато PBMC се ко-култивират с контролни MCK (нетретирани с IFN $\gamma$ ) секрецията на IL-10 се повишава значително (\*\* $p < 0.01$ ). Ако се използват MCK $\gamma$  концентрацията на IL-10 намалява (\*\* $p < 0.01$ ), но остава значително по-висока спрямо измерената при PBMC (\*\* $p < 0.01$ ). Аналогична е тенденцията по отношение на TGF $\beta$ 1, макар че резултатите нямаха статистическа значимост ( $p = ns$ ) (Фигура 30 и Таблица 7).

Таблица 7. Данни за концентрациите на IL-10 и TGF $\beta$  измерени в кондиционирани среди от PBMC ко-култивирани с MCK/MCK $\gamma$ , представени като средни аритметични стойности (pg/ml)  $\pm$  SD.

	PBMC	PBMC + MCK	PBMC + MCK $\gamma$
IL-10	3.719 $\pm$ 2.549	20.913 $\pm$ 5.462	15.125 $\pm$ 1.709
TGF $\beta$ 1	572.513 $\pm$ 425.092	1352 $\pm$ 1672.393	1111.901 $\pm$ 588.61



Фигура 30. Графично представени данни за концентрациите на IL-10 и TGFβ1 измерени в кондиционирани среди от PBMC ко-култивирани с MCK/MCK<sub>γ</sub>, представени като средни аритметични стойности (pg/ml) ± SD (\*\* $p < 0.01$ ).

Следователно нашите резултати показаха, че концентрацията на IL-10 се увеличава когато PBMC се ко-култивират с WJ-MCK. Когато се използват MCK от пъпна връв третиран с IFN<sub>γ</sub> се отчита намаляване на IL-10, но стойностите се запазват значително по-високи отколкото в кондиционирани среди само от PBMC. По отношение на TGFβ1 се наблюдава аналогична тенденция, но без статистическа значимост на резултатите.

## ОБСЪЖДАНЕ

Смята се, че мезенхимните стволови клетки изпълняват своите имunosупресивни функции в микросредата, където се намират. Възпалителните фактори, освободени по време на имуноен отговор, отключват имunosупресивния потенциал на МСК. Няколко проучвания показват, че праймирането с възпалителни цитокини е от съществено значение за медираната от МСК имunosупресия. Провъзпалителният цитокин интерферон- $\gamma$  е най-обстойно изследваният фактор за праймиране на МСК. Международното дружество за клетъчна терапия (ISCT) го препоръчва като стандартен метод за първична оценка на имunosупресивния капацитет на МСК *in vitro*. IFN $\gamma$  е мощен провъзпалителен цитокин, продуциран от множество типове клетки, включително активирани Т клетки, NK клетки, NKT клетки и макрофаги и играе съществена и сложна роля както във вродения, така и в адаптивния имуноен отговор.

Всяко тъканно увреждане е придружено от процес на възпаление, което е последвано от активиране на имуни клетки, не само макрофаги и неутрофили, но и клетки на адаптивния имуноен отговор, включително CD4<sup>+</sup> Т клетки, CD8<sup>+</sup> Т клетки и В лимфоцити, които са привлечени от фактори, секретирани от апоптотичните и некротичните клетки и разрушената микроваскулатура. Междувременно фагоцитните клетки произвеждат възпалителни фактори като IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , свободни радикали, хемокини и левкотриени. В резултат на протичащите възпалителни процеси, МСК се мобилизират към мястото на възпаление. МСК потискат активирането на Т-клетките, индуцират Т-клетъчна негативна сигнализация, изместват Т-клетъчния фенотип от провъзпалителен Th1 към Th2, взаимодействат с антиген-представящи клетки и регулират Т регулаторните клетки. МСК не са спонтанно имunosупресивни. За имunosупресия медирана от МСК е необходимо излагането им на възпалителни цитокини (като IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-1) (Meisel et al., 2004).

IFN $\gamma$  е цитокин, който се произвежда главно от клетките на имунната система на вродения и адаптивния имуноен отговор. Сигнализацията се осъществява чрез IFN $\gamma$  рецептора, който има две субединици (IFN $\gamma$ R1 и IFN $\gamma$ R2), които се експресират в повечето, а може би дори и във всички типове клетки. Секрецията на IFN $\gamma$  може да бъде индуцирана от цитокини (главно IL-12 и IL-18) или след активиране на pattern recognition рецептори (pattern recognition receptors, PRR), което води до ранно повишаване на секрецията на IFN $\gamma$  още преди проявата на антиген-специфичен имуноен отговор. Във

всички изследвани типове клетки активирането на IFN $\gamma$ R активира сигналния път на JAK-STAT.

### **1. Мезенхимни стволови клетки от пъпна връв – хетерогенна популация клетки**

Добре известен факт е, че МСК от различни тъкани не притежават напълно еднакви характеристики. Това важи с особена сила за репродуктивните тъкани, където по време на бременност МСК са подложени на въздействието на огромно разнообразие от цитокини, продуцирани от различните имунни клетки, които се откриват там (Hass et al., 2011).

Човешката пъпна връв е обещаващ източник на мезенхимни стволови клетки. Освен забележителните си предимства, като безболезнена процедура при пробовземане и по-бързо самообновяване, МСК от пъпна връв са доказали способността си да се диференцират в трите зародишни слоя, да се акумулират в увредените тъкани и възпалените участъци, да стимулират възстановяването на тъканите и да модулират имунния отговор. Съществуват различни протоколи и методи за изолиране и култивиране на МСК от различните части на пъпната връв, като Wharton's jelly (WJ), кръвоносни съдове, субамнион и периваскуларни региони.

Пъпната връв съдържа две пъпни артерии и една пъпна вена, вградени в специфична мукозна съединителна тъкан, известна като Wharton's jelly, която е покрита с амниотичен епител. Тази тъкан осигурява опора на съдовете и също така ги предпазва от прегъване и усукване по дължината на връвта от плацентата до растящия плод (Joerger-Messerli et al., 2016). Тази желеобразна съединителна тъкан, която е описана за първи път от Томас Уортън през 1656 г., не е инервирана и е аваскуларна, имайки известна контрактилна способност, осигурена от наличието на миофибробласти, получени при диференциацията на мезенхимни стволови клетки (J. E. Davies et al., 2017).

МСК от пъпна връв могат да бъдат изолирани както от Wharton's jelly, така и от кръвта от пъпната връв. Интересно е, че някои първоначални проучвания съобщават, че човешката кръв от пъпна връв не е възможен източник за изолиране на МСК (Wexler et al., 2003). Последващите изследвания обаче показаха, че не само МСК могат да бъдат получени от кръв от пъпна връв, но също така, че може да се постигне по-голям добив на клетки в сравнение с клетките изолирани от костен мозък и мастна тъкан (Bieback et al., 2004; Kern et al., 2006; O. K. Lee et al., 2004).

Въпреки широко разпространеното вярване в дихотомична парадигма по отношение на стволовите клетки (в която клетката „е“ или „не е“ по същество стволова клетка), изглежда ясно, че стволовите клетки се характеризират с широк спектър от свойства, които зависят от множество фактори. В този случай хетерогенността на стволовите клетки между различните стволови клетъчни линии може да се разглежда като норма, а не изключение, като тази вариабилност е свързана с няколко фактора, включително особеностите на индивидуалния донор, източника на клетките, условия на култивиране, както и случайни вариации в процеса на култивиране (Markov et al., 2007). Като се вземат предвид множеството променливи, дори ако се фокусираме конкретно в подгрупата на мезенхимни стволови клетки, изолирани от пъпна връв (която включва МСК, получени от Wharton's jelly или кръвта от пъпна връв) (Doi et al., 2016), може да се очакват множество вариации в свойствата и поведението на клетките.

Няколко фактора, включително възраст, пол и фенотип, вече са установени като потенциални причини за хетерогенност на МСК (Siegel et al., 2013). Han et al. сравняват четири източника на МСК (костен мозък, мастна тъкан, пъпна връв и плацента) от 22 индивида. Забелязва се значителна вариабилност в пролиферативната способност, въпреки идентичните методи на култивиране в отделните проби (Z. C. Han et al., 2017). Дори в рамките на един и същ индивид се наблюдава значителна хетерогенност в четирите различни тъканни източника, въпреки еднаквите методология и условия. Друго проучване изследва техниките за изолиране на МСК, получени от пъпна връв. Авторите откриват не само разлики в профила на клетъчна пролиферация между отделните техники, но и различен отговор на всяка проба към една и съща техника (Paladino et al., 2016).

Стволови клетки могат да бъдат изолирани от ембрионални, фетални и възрастни тъкани. Ембрионалните стволови клетки (ЕСК) са водещ кандидат за тъканно инженерство поради високия им капацитет за самообновяване и плурипотентност (способност да се диференцират във всички зародишни слоеве) *in vitro* и *in vivo*. Независимо от това, в допълнение към етичните ограничения, клиничните приложения на ЕСК са силно ограничени от технически трудности при култивирането им *in vitro* свързани с изчерпването на недиференцирани клетки, което може да доведе до образуването на тератоми.

Обратно, соматичните стволови клетки, като тези в кожата, костния мозък и мастната тъкан, могат да имат по-широко клинично приложение. От друга страна, автоложната употреба понякога е ограничена от броя на клетките и свързаните с

възрастта промени, като например намален капацитет за растеж и диференциация (Baksh et al., 2007; Mueller & Glowacki, 2001).

McElreavey et al. за първи път съобщават за изолиране на фибробластоподобни клетки от Wharton's jelly на човешка пъпна връв през 1991 г. (McElreavey et al., 1991). Клетките, получени от пъпна връв, имат подобен повърхностен фенотип, прилепват върху съдове за клетъчно култивиране и притежават мултипотентност като тези на МСК, получени от други източници.

В сравнение с КМ-МСК и ЕСК, МСК от пъпна връв имат профил на генна експресия, по-близък до този на ЕСК и по-бързо самообновяване, отколкото КМ-МСК (Fong et al., 2011; Hsieh et al., 2010). В допълнение пъпната връв се счита за медицински отпадък и изолирането на МСК е неинвазивно и не е обременено с етични проблеми. Ето защо, ние избрахме в настоящия дисертационен труд да работим именно с МСК изолирани от човешка пъпна връв, като вземем предвид възможните вариации спрямо публикуваните от други автори резултати работещи с МСК от различни тъкани.

Представените в настоящия дисертационен труд резултати условно могат да бъдат разделени в две групи, като първата обхваща данни, получени от характеристика на изолирани, *in vitro* култивирани и третирани с  $IFN\gamma$  WJ-МСК по отношение на основни параметри като морфология, клоногенност, динамика на пролиферация, имунофенотип, ниво на апоптоза, хромозомна стабилност и потенциал за диференциация в остеогенна и адипогенна насока. Тази група изследвания имаше две основни направления. Първото от тях е свързано с необходимостта клетките да бъдат изчерпателно характеризирани и идентифицирани като МСК, съобразно критериите, определени от Международната асоциация по клетъчна терапия (Dominici et al., 2006), които засягат някои от споменатите по-горе биологични (цитологични) показатели. Според минималните изисквания за дефиниране, МСК задължително: а) представляват адхезивна популация от клетки при стандартни условия за култивиране, които б) експресират повърхностните молекули CD73, CD90 и CD105, но не и хемопоеични маркери и в) проявяват мултипотентни свойства като се диференцират в остеоласти, адипоцити и/или хондроцити (Dominici et al., 2006). Второто направление беше паралелно да се проследи ефекта на  $IFN\gamma$  върху всички описани по-горе параметри. Другата група резултати представени в дисертационния труд се отнася за влиянието на  $IFN\gamma$  върху имуномодулиращата активност на WJ-МСК.

С цел постигане на максимална обективност и достоверност на данните експериментите, които проведехме бяха до голяма степен съобразени с необходимостта да бъдат избегнати (или сведени до минимум) страничните фактори, които биха могли да повлияят и дори компрометират достоверността на получените резултати. За постигане на посочените изисквания бяха съблюдавани следните условия: експериментални постановки, изпълнени при едни и същи условия; използване в проучванията на култури WJ-МСК с еднакъв пасаж на културата и поддържани при едни и същи *in vitro* условия (съдове за култивиране; изходна гъстота на клетките; температура; съдържание на CO<sub>2</sub>; условия за трипсинизиране и препосяване; културална среда; период за смяна на средата и т.н.).

В резултат на нашите експерименти успешно бяха получени адхезивни фибробластоподобни активно делящи се клетки от Wharton's jelly на общо 35 клинично здрави раждащи жени на възраст между 26 и 45 години, като експериментално бяха доказани способността им за бърз клонален растеж и продължително *in vitro* култивиране в рамките на няколко последователни пасажа – свойства, характерни за МСК. Този факт очертава някои от основните качества на WJ-МСК като удобен материал както за изследователска дейност, така и за активно клинично приложение – бързи и достъпни процедури за пробовземане; съхранени висока клетъчна жизненост и функционална ефективност; възможност за поддържане на тези показатели за продължителни периоди от време при строго контролирани *in vitro* условия.

Принадлежността на култивираните от нас хомогенни популации WJ-МСК, както и функционалната им пълноценност, бяха категорично доказани след фенотипни и диференциационни анализи. С помощта на флоуцитометричен анализ беше изследвана експресията от страна на изолираните клетки на редица идентифициращи повърхностни протеини. Резултатите показаха, че клетките са отрицателни за ключовите повърхностни хемопоеични маркери CD34; CD45, но експресират типичните за мезенхимните стволови клетки CD29, CD44, CD73, CD90 и CD105. Установи се също така, че клетките се позитивират за Vimentin. Тези данни изключват възможността за отношение на изследваните от нас клетки към хемопоеичния ред, като същевременно потвърждават фенотипния им облик на мезенхимни стволови клетки. Освен това, резултатите от проведените проучвания върху диференциационния потенциал показаха, че след третирането им с диференциращи агенти са налице всички признаци (екстрацелуларно отлагане на Ca<sup>2+</sup>; повишена алкално-фосфатазна активност; клетъчни включения от

неутрални липиди), доказващи бипотентните им (остеогенни и адипогенни) свойства, което е сигурен показател за принадлежността им към мезенхимните стволови клетки.

Въз основа на всичко изложено дотук може да се обобщи, че съчетанието на редица особености, присъщи за изолираните от пълна връв клетки, като адхезивни свойства, фибробластна морфология, клонален растеж и възможност за поддържане *in vitro* като бързо растящи хомогенни култури в продължение на множество последователни пасажи, както и способността за диференциране като остеогенни клетки и адипоцити в допълнение на фенотипната им характеристика, дават достатъчно основание те да бъдат определени като мезенхимни стволови клетки.

Както вече беше подчертано, разгледаните по-горе характеристики, са определящи за МСК, като повечето от тях биха могли да се приемат и като важен показател както за степента на терапевтичния потенциал на МСК и ефективността при неговата реализация, така и, в чисто научен аспект, за значението на локалната микросреда, от която произлизат и упражняваното от нея регулаторно влияние върху функционалното състояние на МСК. По тази причина, характеризирането на МСК от различни тъкани в условията на възпаление, включващо основни показатели като морфология, динамика на пролиферация, клоногенна ефективност и диференциация, е необходим етап в изучаването на МСК.

## **2. Влияние на IFN $\gamma$ върху природата и свойствата на МСК**

Има много изследвания върху имуномодулаторния ефект на претретираните с IFN $\gamma$  МСК, но няма достатъчно информация за това дали и как възпалителната среда влияе на природата и свойствата на мезенхимните стволови клетки. IFN $\gamma$  е цитокин, който се продуцира главно от клетките на имунната система, които са част от вродения и придобития имунен отговор. Сигнализацията се осъществява през IFN $\gamma$ -рецептор, който се състои от две субединици (IFN $\gamma$ R1 или CD119 и IFN $\gamma$ R2), които се експресират на практика от почти всички клетъчни типове (W. K. Chan et al., 2008). Както вече стана ясно, IFN $\gamma$  е един от основните, но не е единственият цитокин във възпалителната среда, неговата концентрация може да варира в зависимост от конкретното заболяване или възпалително състояние. Това са фактори, които трябва да се вземат предвид при интерпретацията на получените данни в контекста на възможно клинично приложение на МСК $\gamma$ .

## **2.1. Ефект на IFN $\gamma$ върху морфологията на МСК от пънна връв**

Известно е, че МСК от различни тъкани имат повече или по-малко сходни имуномодулиращи свойства. Въпреки това те могат да реагират различно на процеса на възпаление. Данните за морфологията на МСК $\gamma$  в литературата са оскъдни и в повечето случаи противоречиви, като не позволяват еднозначно тълкуване. При третираните с IFN $\gamma$  мезенхимни стволови клетки от пънна връв, ние наблюдавахме ясни и характерни морфологични промени – клетките се окръглиха и формираха компактни колонии с неправилна форма. Тези резултати не съвпадат с литературните данни, които се отнасят до WJ-МСК $\gamma$ . Някои автори съобщават, че когато МСК от костен мозък се култивират *in vitro* и третират с провъзпалителни цитокини като IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ , се наблюдава промяна в тяхната морфология (KM-МСК $\gamma$  са по-големи, с повече цитоплазма и неправилна форма), въпреки че други автори не откриват никакви трансформации (D. S. Kim et al., 2018; Prasanna et al., 2010). В допълнение, под влиянието на IFN $\gamma$ , AT-МСК увеличават диаметъра си (Crop et al., 2010). Обратно, WJ-МСК $\gamma$  не показват никакви морфологични промени, когато са праймирани със същите провъзпалителни цитокини. Тези данни се отличават съществено от направените от нас заключения, според които МСК от пънна връв третирани с IFN $\gamma$  придобиват различна морфология и начин на растеж в *in vitro* условия, промени вероятно свързани с промяната във функциите и секретото им. Едно възможно обяснение за противоречивите резултати сред авторите е, че локалната микросреда, от която произлизат МСК, има регулаторно влияние върху функционалното им състояние. Важно е да се отбележи, че Prasanna et. al. 2010 третират клетките не с един, а с два провъзпалителни цитокина, докато нашите наблюдения са за ефекта само на IFN $\gamma$ .

## **2.2. Ефект на IFN $\gamma$ върху фенотипа на МСК от пънна връв**

По отношение на експресията на повърхностни маркери, нашите данни сочат, че експресията (както процента положително маркирани клетки, така и MFI нивата) на характерните маркери за МСК (CD29, CD44, CD105, CD73 и CD90) остава непроменена след култивиране на клетките в присъствие на IFN $\gamma$ . Други автори документират аналогични резултати, но само за част от споменатите маркери изследвани при AT-МСК (CD90, CD105, и CD166) (Crop et al., 2010). KM-МСК $\gamma$  имат същите нива на експресия на CD73 и SSEA4 като непраймираните клетки (Prasanna et al., 2010). Нашите резултати ни дават достатъчно основание да заключим, че третираните с IFN $\gamma$  WJ-МСК не

променят характерния за тях фенотипен профил, като прегледът на специализираната литература показва, че подобни анализи не са правени при конкретно МСК от пънна връв.

### ***2.3. Ефект на IFN $\gamma$ върху генната експресия на МСК***

Данните в научната литература убедително показват, че IFN $\gamma$  оказва значителен ефект върху генната експресия на МСК, като голяма част от засегнатите гени са свързани с имуномодулиращите функции на МСК. Така например, профилът на генната експресия на праймирани с IFN $\gamma$  КМ-МСК е значително засегнат – автори откриват 512 регулирани гена, 4 от които кодират протеини, участващи в имуносупресията на МСК – хемокинови лиганди CXCL9, CXCL10, CCL8 и IDO (D. S. Kim et al., 2018). IFN $\gamma$  повлиява експресията на различни гени. Някои гуанилат-свързващи протеини (GPB5, GPB4, GPB2 и GPB1) и резистентни към миксовирус гени 1 и 2 също са силно регулирани при АТ-МСК. Експресията на TNF суперсемејството (TNFSF) член 10 и член 13В също се повишава. IFN $\gamma$  повлиява експресията на Т клетъчни хемоатрактанти (CXCL9, CXCL10) с по-нисък ефект върху хемоатрактантите на неутрофилите, моноцитите и еозинофилите (CXCL1 и CXCL6).

Когато МСК от човешкото фетално сърце са третирани с IFN $\gamma$ , клетките проявяват значителни транскрипционни промени, най-вече свързани с експресията на гени, участващи в представянето на антигена, контрола на клетъчния цикъл и интерфероновата сигнализация. При продължително излагане на IFN $\gamma$ , МСК експресират високи нива на IFN $\gamma$ R1, човешки левкоцитни антигени и PD-L2. От друга страна, изчерпването на IFN $\gamma$  и последващо култивиране на клетките за 48 часа водят до значително намаляване на флуоресцентния интензитет на PD-L2 и PD-L1. IFN $\gamma$  повишава експресията и на разтворимите форми на programmed death ligand (sPD-L1 и sPD-L2) (Grinnemo et al., 2019). В рамките на дисертационния труд, ние успяхме да докажем, че IFN $\gamma$  отключва и засилва повърхностната експресия на PD-L1 от WJ-МСК. Изследването на разтворимите форми sPD-L1 и sPD-L2 при „праймирани“ WJ-МСК е логично продължение на този резултат и е заложено като обект на бъдещи наши разработки.

### ***2.4. Ефект на IFN $\gamma$ върху пролиферацията и клоногенността на МСК от пънна връв***

Нашите резултати показаха, че МСК $\gamma$  имат по кратко време за популационно удвояване (PDT) спрямо контролните клетки, достигайки по-висока концентрация за седем дни. Тези резултати съответстват с данните ни за клоногенната ефективност на

МСК от пънна връв в условия на възпаление – не само, че клетките растяха по-бързо, но и се отчете по-голям брой CFU-F спрямо контролните култури. Справката ни в литературата намери данни, че възпалителната среда влияе върху динамиката на клетъчна пролиферация на МСК от мастна тъкан, но намереният ефект е противоположен: концентрацията на клетките намалява (Cron et al., 2010). КМ-МСК третирани с възпалителни цитокини също показват по-слаб пролиферативен потенциал спрямо нетретирани клетки (Croitoru-Lamoury et al., 2011; Prasanna et al., 2010). Авторите установили, че процесите свързани с клетъчната пролиферация се инхибират при МСК от костен мозък под действието на IFN $\gamma$ , което е свързано с активацията на кинунериновия път и последващото изчерпване на триптофан (Croitoru-Lamoury et al., 2011). В допълнение, МСК от зъбна пулпа третирани с IFN $\gamma$  запазват пролиферативния си потенциал, но способността им за диференциация намалява значително (Strojny et al., 2015). МСК $\gamma$  експресират IDO1 и IDO2, които са силно регулирани от интерферони тип I (IFN $\beta$ ) и тип II (IFN $\gamma$ ). IFN $\gamma$  инхибира пролиферацията и променя диференциацията на миши МСК чрез активиране на IDO.

Както вече беше отбелязано, от анализа на нашите данни се установи, че третирани с IFN $\gamma$  WJ-МСК имат по-голям клоногенен потенциал и по-бърз темп на растеж. Резултатите описани в настоящия дисертационен труд за ефекта на IFN $\gamma$  върху способността на WJ-МСК да образуват колонии, са първите публикувани данни по темата. Данните в литературата за темпа на пролиферация на МСК $\gamma$  са оскъдни и разнопосочни, като нашите наблюдения не съвпадат с тези на останалите автори. Възможна причина за това е различния произход на МСК използвани в публикуваните проучвания и вариации в протоколите за третирането на клетките с провъзпалителни цитокини.

## **2.5. Ефект на IFN $\gamma$ върху диференциацията на МСК от пънна връв**

Данните за потенциала за остеогенна и адипогенна диференциация на МСК $\gamma$  в литературата отново за много противоречиви. Нашите резултати категорично показаха, че МСК $\gamma$  губят способността си да се диференцират остеогенно и адипогенно в *in vitro* условия. Някои автори съобщават, че IFN $\gamma$  инхибира генната експресия на адипоцитни и остеоцитни маркери (Croitoru-Lamoury et al., 2011). Liu et al. също публикуват данни, че провъзпалителни Т клетки инхибират способността на екзогенни МСК от костен мозък да се диференцират остеогенно, макар че, относително високи концентрации на IFN $\gamma$  са били необходими, за да се наблюдава този ефект (Y. Liu et al., 2011). Важно е да се

отбележи, че избраният от нас подход за остеогенна диференциация се основава не само на хистологично оцветяване, но и на приложението на високо чувствителен колориметричен тест за определяне нивата на алкално-фосфатазна активност, който позволява количествено отчитане с голяма точност на различия в степента на остеогенна диференциация при третираните с  $IFN\gamma$  WJ-MCK.

Lacey et al. 2009 показват, че провъзпалителните цитокини,  $IL-1\beta$  и  $TNF\alpha$ , потискат минерализацията, активността на ALP и експресията на иРНК за *Colla1*, *Runx2* и *osterix* в КМ-МСК, като  $IL-1\beta$  като цяло е ефективен при по-ниска концентрация от  $TNF\alpha$ . Въпреки това,  $IL-1\beta$ , за разлика от  $TNF\alpha$ , не може да предотврати генната експресия на остеоонектин и остеоопонтин по време на диференциацията (Lacey et al., 2009). Има данни, които предполагат, че транскрипционният фактор *Runx2* контролира остеобластната диференциация (Nakashima et al., 2002) и провъзпалителните цитокини потискат неговата експресия (Gilbert et al., 2002). Бихме могли да предположим, че нашите данни за потискащите ефекти на  $IFN\gamma$  върху остеогенната диференциация на МСК от пъпна връв може да се дължат на потискане на генната експресия на същите гени.

Изследователи са се опитали да диференцират човешки и миши МСК в нервни клетки, адипоцити и остеоцити в присъствието на инхибитори на  $IFN\gamma$ , IDO1 и IDO2. Третирането на МСК със 100 IU/ml  $IFN\gamma$  води до инхибиране на експресията на секретирем фосфопротеин 1 (SPP1) и интегрин-свързващ сиалопротеин (IBSP) в миши и човешки МСК. Блокирането на  $IFN\gamma$ -индуцираната IDO секреция с инхибитор на IDO ( $\beta$ -Carboline) значително повишава експресията на SSP. Тези данни потвърждават ролята на IDO в потенциала на МСК за остеогенна диференциация. По подобен начин,  $IFN\gamma$  инхибира експресията на адипоцитните маркери адипсин, *adipoQ* и *Fabp4* на транскрипционно ниво в миши и човешки МСК. Когато се използва IDO инхибитора,  $\beta$ -Carboline, нивата на експресия на адипоцитните маркери се подобрява (Croitoru-Lamourey et al., 2011).

Третирането на мезенхимни стволови клетки от зъбна пулпа (ЗП-МСК) с  $IFN\gamma$  значително намалява техния потенциал за диференциация. От друга страна, потенциалът за миграция на КМ-МСК се увеличава, когато клетките се ко-култивират с  $IFN\gamma$ -третираните ЗП-МСК. Анализът на експресията на РНК показва повишаване на нивата на *Sxc16* и *Sxc12* в КМ-МСК. Освен това, има по-високи нива на проангиогенни фактори VEGF и FGF, секретирани от ЗП-МСК, които са били изложени на  $IFN\gamma$ .

Получените от нас резултати съвпадат с част от публикуваните по темата (Croitoru-Lamoury et al., 2011) и съществено се различават от тези на други автори (Prasanna et al., 2010). Загубата на потенциала за диференциация в МСК в условия на възпаление изглежда логичен. Провъзпалителните цитокини задействат имunosупресивната функция на МСК и те започват да секретират високи нива на имunosупресивни фактори. Докато МСК са ангажирани с имunosупресивната си роля и в организма има активно възпаление, те няма нужда да се диференцират в други клетъчни типове, а точно обратното – да запазят имуномодулиращите си функции активни.

## **2.6. Ефект на IFN $\gamma$ върху степента на апоптоза на МСК от пънна връв**

Нашите данни показват, че повишеният пролиферативен потенциал на клетките върви паралелно с по-висок процент клетки намиращи се в ранна и късна апоптоза на ден осем от култивирането на МСК от пънна връв с IFN $\gamma$ . Liu и др. съобщават, че IFN $\gamma$  синергично засилва предизвиканата от TNF $\alpha$  апоптоза на МСК, но третирането на клетките само с IFN $\gamma$  няма същия ефект върху процесите на апоптоза на МСК от костен мозък (Y. Liu et al., 2011).

Има данни, че възпалителната микросреда индуцира апоптоза на МСК. Едно от проучванията на Dang et al. показва, че възпалителните цитокини, например IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ , индуцират автофагия в МСК синергично чрез индуциране на експресия на Beclin 1 (потиска се ROS/ERK пътя), като в същото време процесът на автофагия възпрепятства имunosупресивния потенциал на МСК. (Dang et al., 2015). Блокирането на Beclin-1 значително подобрява ефекта на МСК при експериментален енцефаломиелит (EAE), като стимулира секрецията на PGE2 (Dang et al., 2015). Въпреки това, дали индуцираната от възпаление автофагия играе роля в регулирането на апоптозата на МСК, остава неясно. Автофагията е еволюционно запазен катаболитен процес, чрез който клетките доставят цитоплазмени компоненти за разграждане в лизозоми. При различни физиологични и патологични състояния може да има роля за оцеляването или за смъртта на клетката (Cecconi et al., 2007; Mizushima et al., 2008). Доказано е, че автофагията предпазва клетките от смърт при условия на глад, липса на растежен фактор и невродегенерация, но също така е критичен фактор, допринасящ за някои видове клетъчна смърт (Degenhardt et al., 2006; L. Yu et al., 2004).

Общоприето е, че ROS (reactive oxygen species, кислородни радикали) индуцират автофагия, а автофагията пък служи за намаляване на окислителните продукти (Azad et

al., 2009). ROS са малки и силно реактивни молекули, като кислородни аниони и свободни радикали, които могат да окисляват протеини, липиди и ДНК. Когато са строго контролирани, ROS участват в жизненоважната клетъчна сигнализация (Jain et al., 2010). Те могат пряко или косвено да взаимодействат с критични сигнални молекули, за да иницират сигнализация в разнообразни клетъчни пътища, като NF- $\kappa$ B, MAP кинази, PI3 киназа и сигнални пътища на протеин тирозин фосфатази (Tal et al., 2009). Доказано е също, че активирането на тези сигнални пътища модулира генната експресия, възпалителните отговори и клетъчното оцеляване (Bulua et al., 2011). ROS медираат клетъчната смърт чрез каспаза-зависима апоптоза или некроза, когато твърде високата концентрация на ROS инактивира каспазите чрез окисление (Azad et al., 2009). ROS може също така да подпомогнат клетъчното оцеляване чрез активиране на транскрипционни фактори за оцеляване, като NF $\kappa$ B, ERK (extracellular signal-regulated kinases) и heatshock протеини, които увеличават експресията на антиапоптотични протеини като Bcl-2 и Bcl-x1 (Morgan & Liu, 2011; Rygiel et al., 2008). Блокирането на ROS и активирането на ERK засилват апоптозата на МСК (Dang et al., 2015). Взети заедно, тези данни показват, че възпалителната цитокин-индуцирана автофагия играе проапоптотична роля в МСК и не в полза на оцеляването на МСК при възпалителни състояния.

В допълнение на описаните механизми, е важно да се обърне внимание на данните, че по-високата доза на TNF $\alpha$  води до потискане на сигнализацията характерна за МСК тип-2 и индуцира апоптотична програма чрез TNF-свързан апоптоза-индуциращ лиганд-рецепторен път 2 (TRAIL-R2) (Putra et al., 2018). Още едно проучване съобщава, че TNF $\alpha$  може да индуцира апоптотичен път чрез TRAIL-R2 път (Z. Liu et al., 2017). TRAIL-R2 е специфичен клетъчен повърхностен рецептор, който принадлежи към суперсемейството на TNF рецепторите (Screaton et al., 1997), който също се експресира в МСК (Szegezdi et al., 2009; Walczak, 1997). След свързване на TNF $\alpha$ , TRAIL-R2 иницира набирането на Fas-свързан death domain (FADD) и прокаспаза-8 за образуване на сигналния комплекс, предизвикващ смърт (DISC), след това активира каспаза-3 и води до апоптоза (Bodmer et al., 2000). Авторите предполагат, че пътят на апоптозата може да бъде активиран от по-високи дози TNF $\alpha$ .

Базирайки се както на собствените ни наблюдения, така и на изложената в специализираната литература информация, можем да твърдим, че възпалителната среда и в частност един от основните цитокини характерен за нея - IFN $\gamma$ , засилва апоптозата

на WJ-МСК $\gamma$  в *in vitro* условия, като механизмите зад този ефект може да се различават при различните видове МСК и използваните експериментални постановки.

## **2.7. Влияние на IFN $\gamma$ върху хромозомната стабилност на МСК от пънна връв**

Потенциалът и възможното използване на мезенхимни стволови клетки в изследвания и терапевтични приложения разчитат на тяхната геномна стабилност. Клетките трябва да бъдат намножени *in vitro*, за да постигнат очаквания терапевтичен ефект. Има висока смъртност на трансплантираните клетки след трансплантация, заради процеса на апоптоза или действието на макрофаги. За съжаление, клетъчната култура също представлява риск – продължителното излагане на стресови условия по време на процеса на обогатяване и диференциация на клетките поражда опасения относно безопасността на терапията със стволови клетки (J.-A. Kim et al., 2015). Досега има малко и противоречиви данни за геномната и/или хромозомната нестабилност на култивирани МСК (Justino Ferreira et al., 2012). Култивирането продължително време може да промени природата на МСК, предизвиквайки промени в техния геном на молекулярно и хромозомно ниво (Justino Ferreira et al., 2012). Въпреки че е доказано, че КМ-МСК и АТ-МСК могат да бъдат култивирани в продължение на ~20 пасажа (Binato et al., 2013), не е ясно колко пасажа могат да бъдат достигнати, преди клетките да придобият хромозомна нестабилност или да загубят мултипотентността си. Кариотипни аберации са наблюдавани в МСК, изолирани от мишки и плъхове (Foudah et al., 2009; Furlani et al., 2009). Направени са някои опити за изследване на такива дефекти при различни концентрации и пасажи на клетките, но резултатите от проучванията са противоречиви. Докато някои групи съобщават за запазване на генетична стабилност до пасаж 3 или 4, други откриват, че човешките МСК остават генетично стабилни при продължително култивиране и поддържат нормален кариотип до 20 пасаж (Furlani et al., 2009, 2009; Izadpanah et al., 2008). Заради противоречивата информация в литературата, ние сметнахме за необходимо да изследваме ефекта на IFN $\gamma$  върху хромозомната стабилност на МСК от пънна връв в *in vitro* условия, особено като вземем предвид данните, които получихме за бързата пролиферация и по-големия процент апоптични клетки в условията на възпаление.

Хромозомните аберации са отличителни белези на малигнизация (Hanahan & Weinberg, 2011) и спорадични съобщения за хромозомни промени, настъпващи по време на продължително култивиране на клетки, подчертават риска от ракова трансформация в стволови клетки, отглеждани *in vitro* (Maitra et al., 2005). По-голямата част от тези

доклади са фокусирани върху ембрионални стволови клетки, въпреки че няколко доклада се отнасят за МСК при възрастни хора (Røsland et al., 2009). Повишен риск от хромозомни аберации също е докладван при култивиране на стволови клетки (Mayshar et al., 2010). Необходимо е редовно да се извършват тестове за безопасност на манипулирани стволови клетки и оценка на хромозомните аберации. Насоките за терапия със стволови клетки препоръчват да се извършват тестове, за да се гарантира безопасността на стволовите клетки, включително конвенционални G-banding, aCGH и FISH анализ (Lovell-Badge et al., 2021).

Възпалителната микросреда може да доведе до дегенеративни заболявания и злокачествени тумори. Провъзпалителните цитокини IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  синергично променят способността на МСК да се регенерират и диференцират чрез NF- $\kappa$ B-медирано активиране. Продължителното излагане на високи нива на IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  води до повишена предразположеност към злокачествена трансформация в МСК, поради повишената регулация на онкогените c-Fos и c-Myc по NF- $\kappa$ B сигналния път. При мишки изчерпването на IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  елиминира тенденцията към злокачествена трансформация в МСК (L. Wang et al., 2013).

Оценката на хромозомните аберации обикновено включва конвенционален хромозомен анализ, известен също като G-banding, който е рентабилен и се извършва рутинно. Нашите резултати показваха, че IFN $\gamma$  сам по себе си не причинява никакви хромозомни аберации, които могат да бъдат открити с помощта на техниката за GTG banding. Данните ни съвпадат с откритите в литературата - кариотипирането на МСК $\gamma$  не показва никакви хромозомни промени в сравнение с нетретираните контролни клетки (Prasanna et al., 2010). Критично ограничение обаче е, че той може да открие само хромозомни аберации в клетките, които се намират в метафаза, а броят на клетките в метафаза представлява само малка част (~0.1%) от всички клетки. Тъй като целият процес на възпаление е изключително сложен и медиран от много фактори, би било полезно да се проучи допълнително неговия дългосрочен ефект върху стабилността на генома на стволовите клетки, за които е известно, че реагират и се активират от възпалителни цитокини. Може би трябва да се използват по-сложни техники с по-висока разделителна способност за откриване на геномна нестабилност за оценка на ефекта от продължително възпаление върху мезенхимните стволови клетки.

### 3. Ефект на IFN $\gamma$ върху МСК и техните имуномодулиращи свойства

През 2002 г. беше публикувано, че МСК могат да модулират имунния отговор. Изследването показва, че МСК от павиан могат да инхибират смесената лимфоцитна реакция *in vitro* и могат да предотвратят отхвърлянето на алогенна кожна присадка *in vivo* (Bartholomew et al., 2002). Оттогава много автори са публикували данни за имunosупресивни МСК изолирани от други животни и хора (Uccelli et al., 2008). МСК предотвратяват съзряването на дендритни клетки чрез инхибиране на експресията на МНС клас II, CD1- $\alpha$ , CD40, CD80 и CD86 и потискане на провъзпалителната секреция на цитокини. МСК също така стимулират макрофагите, произвеждащи IL-10, и секретират разтворими фактори като TGF $\beta$  и простагландин E2 (PGE2), които потискат NK клетките. По отношение на адаптивния имунен отговор, МСК инхибират пролиферацията на Т клетки, като потискат секрецията на IFN $\gamma$  и индуцират Tr1 клетки и FoxP3 регулаторни клетки (Kyurkchiev, 2014). Има данни, че МСК инхибират експресията на ранните маркери за активиране на Т клетките - CD25, CD38 и CD69 (Le Blanc et al., 2004). Един от механизмите, по който МСК инхибират Т-клетъчната активация е чрез секретиранияте от тях разтворими MMP-2 и MMP-9, които разцепват CD25 на Т клетките (Ding et al., 2009).

IFN $\gamma$  се произвежда във високи концентрации от NK клетки и CD8<sup>+</sup> Т клетки и в по-ниски концентрации от CD4<sup>+</sup> Т клетки. Добавянето на IFN $\gamma$ R моноклонално антитяло (mAb) инхибира потискащия ефект на МСК върху CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> и дори върху NK клетки (Krampera, Cosmi, et al., 2006). Тъй като NK клетките секретират изключително високи концентрации на IFN $\gamma$  те частично могат да избягат от mAb-медираното блокиране на IFN $\gamma$ R (Krampera, Cosmi, et al., 2006).

Важно е да се отбележи, че IFN $\gamma$  не е единственият цитокин свързан с наличие на активни възпалителни процеси, като изследванията установяват, че IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  модулират по различен начин имунните свойства на миши МСК. И двата провъзпалителни цитокина не повлияват способността на МСК да потискат пролиферацията, задвижвана от алоантиген в смесена лимфоцитна реакция, както и пролиферацията на Т клетките, задвижвана от митоген. Както IFN $\gamma$ , така и TNF $\alpha$  регулират експресията на COX-2 и PGE2 от МСК. Въпреки това, повърхностната експресия на PD-L1 и секрецията на IDO се индуцират само от IFN $\gamma$ . Чрез използване на блокиращи антитела и биохимични антагонисти, авторите показват, че докато индукцията на PD-L1 не е от съществено значение, секрецията на IDO е необходимо

условие за IFN $\gamma$ -медираната имуномодулация осъществявана от МСК (English et al., 2007).

### ***3.1. Мезенхимни стволови клетки във възпалителната среда***

Острото увреждане на тъканите обикновено е последвано от възпаление, дори когато не е свързано с инфекциозен агент. Клетъчните компоненти, освободени от некротичните клетки и увреждането на микроваскуляцията водят до повишена вазопроницаемост и инфилтрация на макрофаги и неутрофили. Клетките от адаптивния имунен отговор (В клетки, CD4<sup>+</sup> Т клетки и CD8<sup>+</sup> Т клетки) участват в процесите, протичащи на мястото на увреждането (Y. Shi et al., 2012). Фагоцитозата на некротичните клетки води до освобождаване на провъзпалителни фактори, като TNF $\alpha$ , IL-1, IFN $\gamma$ , различни хемокини и левкотриени, и свободни радикали (Y. Shi et al., 2012).

Възпалителната среда предшества способността на МСК да потискат имунните отговори. IFN $\gamma$ , в комбинация с някои други провъзпалителни цитокини като TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  или IL-1 $\beta$ , могат да стимулират МСК да секретират високи нива на имуносупресивни фактори. Експресията на хемокини и адхезионни молекули се увеличава, включително CXCR3 лиганди, CCR5 лиганди, ICAM-1 и VCAM-1. Всичко това води до натрупване на имунни клетки в близост до МСК. МСК могат да потискат Т клетките и чрез използване на механизми, които се осъществяват при контакт клетка:клетка, сред които особено важни са PD-L1 / PD-1 пътя, отрицателната костимулаторна молекула B7-H4 и CD200/CD200R взаимодействието, toll-подобни рецептори (TLRs) и взаимодействието FasL/Fas (Augello et al., 2005).

През последните години МСК печелят слава на основен клетъчен тип, който участва в процеса на възстановяване на тъканите, като МСК намиращи се близо до увреденото място или тези, идващи от костния мозък, мигрират към нараненото място (Y. Shi et al., 2012). Изследванията на El Haddad et al. показват, че МСК експресират матриксни металопроотеинази (MMP), за да нахлуят в извънклетъчния матрикс и хемокинови рецептори, което им позволява да мигрират към мястото на възпалението (El Haddad et al., 2011). Там те взаимодействат с различни стромални и провъзпалителни клетки (Y. Shi et al., 2012). Точните механизми все още не са напълно известни, но факторите, секретирани от МСК, играят решаваща роля. При животински модели кондиционираната среда от МСК може до известна степен да имитира терапевтичния ефект на самите мезенхимни стволови клетки (Y. Shi et al., 2012). Блокирането на някои

гени, кодиращи специфични фактори, като TNF-индуцируем ген шест протеин (TSG6) води до неспособността на МСК да регенерират тъканите (Y. Shi et al., 2012).

МСК могат да постигнат своите регенериращи и имуномодулиращи ефекти, чрез паракринна или ендокринна секреция на цитокини и растежни фактори, като EGF, FGF, PDGF, VEGF, TGF $\beta$ , HGF, инсулинов растежен фактор-1 (IGF-1), SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) и ангиопоетин-1. Повечето от тях се задействат по NF- $\kappa$ B - зависим начин от възпалителни стимули, като IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , липополизахариди или хипоксични условия (Y. Shi et al., 2012). Провъзпалителните цитокини IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  по различен начин влияят на секрецията на цитокини и на миграционните свойства на МСК. Излагането на IFN $\gamma$  индуцира експресията на хемокинови рецептори CCR1, CCR3, CXCR4, CCR5 и CCR10 върху МСК. Това също води до повишен миграционен потенциал към CCL5/RANTES, CCL28/MEC и CCL12/SDF-1 $\alpha$  (Hemeda et al., 2010). МСК $\gamma$  имат по-добър потенциал за насочване към местата на възпаление и по-голям регенеративен потенциал. Микрочипов анализ с помощта на миши модел показва, че третираните с IFN $\gamma$  МСК засилват експресия си на хемокина CXCR7, MMP и адхезионната молекула лектин (Sivanathan et al., 2014). IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  синергично регулират експресията на CD54 от МСК, позволявайки на CCR6 хемокиновия лиганд CCL20 да индуцира адхезията на Th17 клетки към МСК *in vitro*. Следователно, по време на възпаление, МСК медираат адхезията на Th17 клетки чрез CCR6 и проявяват противовъзпалителен ефект чрез индуциране на Treg фенотип в тези клетки (Ghannam et al., 2010).

### **3.2. Ефект на IFN $\gamma$ върху експресията на МНС клас I и клас II**

В литературата има множество данни, че IFN $\gamma$  засилва експресията на МНС клас I молекули и отключва експресията на МНС клас II молекули, което предполага, че е възможно МСК да могат да придобиват свойства на антиген-представящи клетки (J. L. Chan et al., 2006; W. K. Chan et al., 2008; Crop et al., 2010). Освен това, няколко предклинични и клинични изпитания поставят под въпрос имуно-привилегированния статус на МСК, а впоследствие и идеята за използване на универсален донор за терапия с МСК. Въпреки че по-голямата част от проучванията *in vitro* подчертават имуносупресивните свойства на МСК, няколко публикации предоставят доказателства, че несъответстващите между донор и реципиент МСК са имуногенни. Например, докато култивираните *in vitro* МСК експресират ниски нива на МНС клас I и са отрицателни за МНС клас II, МСК, изложени на IFN $\gamma$  или диференцирани в зрели клетъчни типове,

могат да експресират значително повече МНС клас I и МНС клас II (Cutler et al., 2010). Нашите данни също показаха, че под действието на IFN $\gamma$  МСК от пъпна връв засилват експресията си на МНС клас I.

МСК обикновено експресират ниски нива на МНС клас I и липсват HLA-DR и костимулиращите молекули CD80 и CD86. В МСК $\gamma$  експресията на CD54 е силно повишена, но липсват CD95 и CD50 (Prasanna et al., 2010). Под влиянието на IFN $\gamma$  в КМ-МСК експресията на HLA-DR се увеличава (Prasanna et al., 2010). Prasanna et al. 2010 установяват, че човешките фетални МСК също експресират HLA клас I, но не и HLA клас II молекули. След като добавили IFN $\gamma$  към културалната среда за два дни регистрирали вътреклетъчен синтез на HLA-II, но без да има повърхностна експресия до седмия ден от третирането с IFN $\gamma$  (Prasanna et al., 2010).

Както вече споменахме, под влияние на IFN $\gamma$ , МСК могат да се държат като антиген-представящи клетки поради повишената експресия на МНС клас I и II (W. K. Chan et al., 2008). Le Blanc et al. демонстрират, че МСК са положителни за МНС клас II след третирането им в продължение на седем дни с IFN $\gamma$ , но това не води до алогенен T-клетъчен отговор, тъй като им липсват костимулационните молекули CD80, CD86 и CD40. Въпреки това, Stagg et al. посочват, че МСК могат да станат условни АПК (Stagg et al., 2006). След като IFN $\gamma$  се свърже със своя рецептор IFN $\gamma$ R1 и R2, рецептор-асоциираните Janus киназа-1 и -2 (Jak1 и Jak2) се активират с последващо активиране на STAT1 (W. K. Chan et al., 2008). В резултат на това специфичният транскрипционен фактор интерферон-регулаторен фактор-1 (IRF-1) се свързва с неговата усилваща последователност в елемента на активационната последователност на IFN $\gamma$  (GAS) и води до транскрипцията на СИТА (W. K. Chan et al., 2008). Експресията на СИТА е необходима за транскрипцията на МНС клас II. Изследователите отбелязват, че антиген-представящото свойство на МСК се появява по време на тесен прозорец при ниски нива на IFN $\gamma$  и преди тези нива да се повишат. Анализите, използващи IFN $\gamma$ -knockdown МСК и анти-IFN $\gamma$  рецепторно анти тяло потвърждават, че експресията на МНС клас II изисква автокринна стимулация с IFN $\gamma$ . Понижаването на нивото на IFN $\gamma$  корелира с понижаването на експресията на МНС клас II от МСК (J. L. Chan et al., 2006). Под влияние на IFN $\gamma$ , мезенхимните стволови клетки от мастна тъкан и МСК от човешки амнион показват значително по-висок антипролиферативен потенциал върху РВМС чрез експесиране на маркери на непрофесионални антиген-представящи клетки (HLA-DR<sup>+</sup>CD40<sup>med+</sup>CD54<sup>high</sup>) с възможен регулаторен фенотип (PD-L1<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>) (Kronsteiner et

al., 2011). СІТА (основният регулатор на експресията на МНС клас ІІ) се индуцира само в МСК $\gamma$ , което корелира с липсата на HLA-DR в контролните клетки и третирани с TNF $\alpha$  МСК (W. K. Chan et al., 2008). Ниски нива на СІТА транскрипти са открити в МСК от Wharton's jelly третирани с IFN $\gamma$ , въпреки че не е открита повърхностна експресия на HLA-DR. Интересно е също, че тези клетки секретират по-високи нива на PGE2 в сравнение с непраймираните клетки (Prasanna et al., 2010).

Други данни показват, че когато недиференцираните МСК се третират с IFN $\gamma$ , повече от 90% от клетките експресират МНС клас ІІ. МСК, диференцирани в адипоцити, експресират HLA-I и HLA-II слабо и не се наблюдава промяна в експресията след излагане на IFN $\gamma$ . Авторите публикуват подобни резултати за МСК, диференцирани *in vitro* в остеобласти и хондробласти (Le Blanc, Tammik, Rosendahl, et al., 2003).

МСК могат да функционират като фагоцити и като АПК (Patel et al., 2008). Както вече стана ясно втората функция зависи от локалните нива на IFN $\gamma$  (J. L. Chan et al., 2006). Предишни проучвания показват, че високите нива на IFN $\gamma$  водят до намалена експресия на МНС ІІ върху КМ-МСК (J. L. Chan et al., 2006). При високи нива на IFN $\gamma$ , СІТА се задържа в цитоплазмата на МСК, като по този начин контролира способността на клетките да функционират като антиген-представящи клетки (K. C. Tang et al., 2008). Значението на това откритие вероятно се крие в протективният ефект на МСК намиращи се в костния мозък. Обостреното възпаление може да доведе до потискане на функциите на костния мозък (Nishikawa et al., 2000). По този начин, в идеалния случай, би било желателно костният мозък бързо да се изчисти от инфекциозни фактори, без да се стига до явно възпаление. В тази връзка разположението на МСК около кръвоносните съдове им предоставя възможности за бързо изчистване от вредни продукти, най-вече поради техните свойства на антиген-представящи клетки (J. L. Chan et al., 2006). В отговор на представяне на антиген от МСК, се очаква имунните клетки да секретират провъзпалителни цитокини, включително IFN $\gamma$ . При високи нива на IFN $\gamma$  експресията на МНС ІІ се потиска (J. L. Chan et al., 2006), което съвпада с превключването на МСК от имуностимулатори към имуносупресори.

Базирайки се както на собствените ни данни, така и на изложената в специализираната литература информация, с увереност можем да твърдим, че WJ-МСК повишават експресията си на HLA-I под действието на провъзпалителния цитокин IFN $\gamma$ . От съществено значение би било да се изследва и експресията на МНС клас ІІ при WJ-МСК $\gamma$ , което е предвидено като обект на бъдещи наши проучвания.

### **3.3.Ефект на IFN $\gamma$ върху експресията на PD-L1**

Множество публикации водят до заключението, че имуносупресивните свойства на МСК не са конститутивно включени. Вместо това, обкръжаващата ги среда, където различни възпалителни молекули (възпалителни цитокини, като IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , и IL-1) секретирани от имунните клетки, насочват МСК да придобият имуносупресивен фенотип (Augello et al., 2005; Meisel et al., 2004; Sheng et al., 2008). Някои от факторите, които са съществени за имуносупресивната функция на МСК са PGE2, IL-10, PD-L1 и IL-6 (Uccelli et al., 2008). Krampera et al. докладват за първи път ролята на IFN $\gamma$  за имуносупресивните функции на МСК (Krampera, Cosmi, et al., 2006). Присъствието на IFN $\gamma$  е от ключово значение за експресията на PD-L1 молекулата от МСК, която е част от имунологичния контролен пункт, за да може да се свърже с PD-1 върху Т клетки и да се достави негативен регулаторен сигнал, водещ до инхибиране на Т-клетъчните пролиферация и функция (Garcia-Diaz et al., 2017).

Първоначално PD-1 е идентифициран като преференциално експресиран в апоптотични клетки (Ishida et al., 1992), като по-късно се установява, че всъщност е молекула, което е част от критична имунна контролна точка, регулираща антигенния отговор на Т и В клетките. PD-1 и PD-L1 са трансмембранни протеини тип I, които принадлежат към суперсемејството на имуноглобулините (Ig). PD-1 съдържа един Ig-V подобен извънклетъчен домен, трансмембранен домен и цитоплазмен домен с два тирозинови сигнални мотива: имунорецепторен тирозин инхибиторен мотив (ITIM) и имунорецепторен тирозин-базиран превключващ мотив (ITSM) (Ishida et al., 1992). PD-L1 съдържа два извънклетъчни домена (Ig-V- и Ig-C-подобни), трансмембранен домен и къса цитоплазмена опашка, в която няма известни сигнални мотиви. За разлика от CTLA-4, който напълно блокира костимулационния сигнал от CD28 чрез по-силния си афинитет към B7 молекули, PD-1 упражнява своята инхибираща роля по по-индиректен начин.

По време на активиране на Т клетките, PD-1 променя своята конформация след ангажиране с PD-L1 (Agata et al., 1996) или PD-L2 (Latchman et al., 2001). Цитоплазмената опашка на PD-1 се фосфорилира от Src кинази, като тези фосфорилирани тирозинови мотиви служат като свързващо място за тирозин фосфатазите SHP-1 и SHP-2. Въпреки че е установено, че както SHP-1, така и SHP-2 се свързват с PD-1, експерименти проведени с живи клетки разкриват, че само SHP-2 взаимодейства с PD-1 по време на активиране на Т клетките. Свързването на SHP-2 в

близост до TCR отслабва ключови сигнални събития, като Lck-медирано фосфорилиране на ZAP70 (Sheppard et al., 2004) и засяга ключови сигналните пътища.

Вероятно PD-1 повлиява множество биохимични събития свързани със сигнализацията на Т клетките. В допълнение, PD-1 може да инхибира функциите на Т клетките чрез увеличаване на експресията на транскрипционния фактор BATF, който може допълнително да потисне експресията на част от ефекторните гени на Т лимфоцитите. Функционалният резултат от тези ефекти върху Т клетките е многообразен, включително инхибиране на пролиферацията, активацията, производството на цитокини, променен метаболизъм и евентуална смърт на активираните Т лимфоцити.

Francisco et al. демонстрират ролята на PD-L1 за поддържането, развитието и функционирането на *inducible T regulatory cells (iTregs)* (Francisco et al., 2009). Може да се предположи, че по-високите нива на експресия на PD-L1 върху МСК могат потенциално да индуцират функционални Т regs, които са силно имunosупресивни и по този начин позволяват на МСК да инхибират индиректно Т клетъчните имунни отговори.

Много автори свързват данните от предишни проучвания за IFN $\gamma$  като отрицателен регулатор на имунната стимулация от МСК (J. L. Chan et al., 2006; Stagg et al., 2006; K. C. Tang et al., 2008). Sheng et al. 2008 също изследват ролята на експресията на PD-L1 върху МСК (Sheng et al., 2008). В среда на активирани Т клетки, проучването показва повишена регулация на PD-L1 чрез медирана от Т клетки секреция на IFN $\gamma$  (Sheng et al., 2008). По-нататъшните проучвания с knockdown на IFN $\gamma$  потвърждават значението на PD-L1 за имunosупресорните свойства на МСК. Интересно е, че PD-L1 може да предизвиква както инхибиторни, така и имуностимулиращи имунни отговори (Dong & Chen, 2006).

Изследването на Sheng et al. 2008 е важно за по-нататъшното разбиране на механизма, чрез който IFN $\gamma$  може да бъде особено важен за имunosупресивните свойства на МСК. При излагане на стимул, като бактериална инфекция, молекулите на МНС II улесняват антиген-представящите свойства на МСК, което води до активиране на Т клетките, които от своя страна секретират IFN $\gamma$ . При високи нива, IFN $\gamma$  намалява експресията на МНС II, за да изключи способността за представяне на антиген. Едновременно с намалената експресия на МНС II се повишава тази на PD-L1, което медира инхибиторните ефекти върху активираните Т клетки. В обобщение, работата на Sheng et al. 2008 предлага нов механизъм, чрез който активираните Т клетки влияят

негативно върху имуностимулиращите свойства на МСК. Тези данни се потвърждават и от други изследователи (I. K. Jang et al., 2014).

Strauch et al. съобщават, че третирането на МСК от костен мозък с  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$  значително повишава генната експресия на PD-L1 гена (*CD274*), концентрацията му върху повърхността на клетката и неговата секреция (Strauch et al., 2020). Нашите резултати потвърждават данните получени от Strauch et al. 2008 – експресията на PD-L1 (както като процент клетки, така и като интензитет на повърхностна експресия) от МСК от пъпна връв се увеличава значително когато клетките се третират с  $IFN\gamma$ . Тези данни отново доказват, че възпалителната среда е ключов регулатор за имunosупресивните функции на МСК.

### **3.4. Ефект на $IFN\gamma$ върху цитокиновата секреция на МСК**

Подробно описано в литературата е, че  $IFN\gamma$  регулира секрецията на PGE<sub>2</sub>, HGF и TGF $\beta$  от МСК и секрецията на имunosупресивни молекули от МСК вероятно зависи от контакта между клетките и активираните Т лимфоцити (Liang et al., 2018). Разнообразните механизми, водещи до секрецията на различни цитокини от МСК $\gamma$ , тяхното *in vitro* и *in vivo* реализиране и контрол са обект на обстойни проучвания от различни изследователски групи.

#### **3.4.1. Секреция на IL-10 и TGF $\beta$ от МСК $\gamma$**

Един от цитокините, които са много дискутирани в литературата по отношение на имуномодулаторните свойства на МСК е IL-10. Въпреки това данните за неговата секреция от МСК са много противоречиви, като една част от авторите откриват секрецията му (Ben-Ami et al., 2011; Bernardo & Fibbe, 2013; Blaber et al., 2012; Gebler et al., 2012; Ma et al., 2014), а другата част – не (Ivanova-Todorova et al., 2012; Kilroy et al., 2007; Newman et al., 2009; C. W. Park et al., 2009). Съвсем логично е да се подкрепя концепцията, предложена от някои автори, които твърдят, че МСК секретират IL-10 в условия на възпаление и присъствието на цитокини ( $IFN\gamma$ , IL-1b и  $TNF\alpha$ ), които активират определени Toll-подобни рецептори върху МСК (Dazzi & Krampera, 2011; DelaRosa, Dalemans, et al., 2012b; Y. Shi et al., 2010).

IL-10 е един от цитокините, които могат да оказват ефект и върху самите клетки, които го продуцират и заедно с TGF $\beta$  е един от основните цитокини активно свързвани с индукцията на имуноен толеранс, като за разлика от IL-10, литературните данни за TGF $\beta$  и МСК са в голяма степен сходни.

Нашите данни показаха, че под влиянието на IFN $\gamma$  мезенхимни стволови клетки от пъпна връв намаляват секрецията си на IL-10 (статистически значимо) и увеличават секрецията на TGF $\beta$  (без статистическа значимост, но с ясна тенденция). Справката ни в литературата намери данни, че подобно на TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  може да потисне секрецията на IL-10, когато се използва в по-високи дози. Едно възможно обяснение на тези резултати е, че МСК бързо реагират на възпалителната среда и секретират IL-10 в големи количества само в началото. Németh et al. 2009 описват, че концентрацията на IL-10 е повишена на 6 и 12 час и след това намалява на 24 час от началото на възпалението (Németh et al., 2009). МСК се поляризират в имunosупресивен фенотип (МСК тип 2), като след силната секреция на IL-10 неговата концентрация намалява и МСК започват усилено да секретират други цитокини и/или растежни фактори, включително TGF $\beta$  (Németh et al., 2009). От друга страна, Prasanna et al. 2010 откриват, че секрецията на IL-10 от КМ-МСК се повишава, когато клетките са праймирани с IFN $\gamma$  (Prasanna et al., 2010). Нашите данни не проследяват секрецията на IL-10 и TGF $\beta$  във времето, но предвид получените резултати и противоречивата информация в литературата за секрецията на IL-10 от МСК, подобни изследвания ще са част от бъдещи наши проучвания.

#### 3.4.2. МСК $\gamma$ и IDO

Кинурениновият път (КР) на метаболизма на триптофана е свързан с антимикробни ефекти и модулиране на имунните отговори. Индолеамин 2,3-диоксигеназа (IDO) е ензим, който се индуцира от IFN $\gamma$  и изчерпва триптофана, като по този начин инхибира пролиферацията на Т клетките. МСК не експресират IDO конститутивно, но неговата секреция се индуцира от IFN $\gamma$  (Croitoru-Lamoury et al., 2011). Добре известно е, че потискащият ефект на МСК корелира със секрецията на IDO, която понижава пролиферацията на активирани Т клетки и NK клетки (Krampera, Cosmi, et al., 2006). IDO е много важен за имуномодулиращата функция на МСК, което се доказва чрез използване на антагонисти (Ryan et al., 2007). МСК се нуждаят от достатъчно количество IFN $\gamma$ , за да активират имunosупресивната си роля *in vitro*. Блокирането на рецептора за IFN $\gamma$  напълно блокира имunosупресивния ефект на МСК, функция, медирана главно от триптофан катаболизиращия ензим IDO (Sivanathan et al., 2014). Ефектът на IFN $\gamma$  върху МСК зависи от времето и дозата. Prasanna et al. демонстрират *in vitro*, че действието на МСК е зависимо от дозата на IFN $\gamma$ , като най-високата секреция на IDO се отчита след предварително третиране на МСК с 500 IU/ml IFN $\gamma$  (Prasanna et al., 2010). Когато МСК се третират *ex vivo* с IFN $\gamma$ , секрецията на IDO се отключва, което

им позволява да изпълняват своите имуносупресивни функции (D. S. Kim et al., 2018). Когато се използва анти-IFN $\gamma$  антитяло, експресията на IDO е минимална, което доказва, че активирането на експресията на IDO е чрез използвания от IFN $\gamma$  сигнален път (JAK-STAT1) (D. S. Kim et al., 2018). Когато сигнализацията през IFN $\gamma$  рецепторите е блокирана, има значително намаляване на активността на IDO и имуносупресивните функции на МСК. Това наблюдение доказва важността на възпалителния стимул и в частност ефекта на IFN $\gamma$  (DelaRosa et al., 2009) .

В допълнение, активността на IDO (секретиран от МСК) корелира с диференциацията на моноцитите в IL-10 секретиращи M2 имуносупресивни макрофаги (CD14<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>). Тези макрофаги са свързани с потискането на Т-клетъчната пролиферация и по този начин повишаването на имуносупресивния ефект на МСК (François et al., 2012).

Поради липса на информативна стойност и невъзможност за интерпретация, нашите данни за IDO не са обработени и представени. Попълването на липсващата информацията за секрецията на IDO от WJ-МСК $\gamma$  е от важно значение за пълнотата на данните по темата и е предвидено като обект на бъдещи наши изследвания. Въпреки това множеството публикувани по темата разработки и подробно изследваните механизми на действие на IDO, включително и при МСК $\gamma$ , са взети предвид при интерпретацията на данните получени в рамките на дисертационния труд.

### ***3.5. Ефект на МСК $\gamma$ върху Т лимфоцити***

Krampera et al. съобщава за първи път ролята на IFN $\gamma$  за имуносупресивните функции на МСК (Krampera, Cosmi, et al., 2006). Способността на МСК да инхибират CD4<sup>+</sup> Т-клетъчната пролиферация и да потискат CD8<sup>+</sup> Т и NK клетките предполага, че IFN $\gamma$ , секретирани от имунните клетки, потенциално модулира имуномодулиращата роля на МСК. Освен това, Sheng et al. демонстрират, че активирани лимфоцити секретират високи нива на IFN $\gamma$  и когато МСК се култивират съвместно с IFN $\gamma$ -дефицитни Т клетки, имуносупресивният ефект на МСК изчезва (Sheng et al., 2008).

За да изследваме ефекта на МСК $\gamma$  върху Т лимфоцитите, решихме да проследим експресията на някои от важните рецептори и техните лиганди, а именно от страна на Т лимфоцитите – PD-1, CTLA-4 и CD158k, и от страна на МСК – PD-L1 (лиганд на PD-1) и HLA-I.

### 3.5.1. Ефект на МСКу върху експресията на CTLA-4, CD158k и PD-1 от Т лимфоцити

Цитотоксичният Т-лимфоцитен антиген 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4) е инхибиторен рецептор, принадлежащ към подсемейството на CD28 имуноглобулините, експресиран основно от Т клетки. Неговите лиганди, CD80 и CD86, обикновено се намират на повърхността на АПК и могат или да свържат CD28 или CTLA-4, което води до костимулационен или коинхибиторен сигнал, съответно. Поради своя инхибиращ ефект, CTLA-4 е решаващ регулатор на Т-клетъчната хомеостаза. Механизмите, чрез които CTLA-4 упражнява своята инхибиторна функция, могат да бъдат категоризирани като клетъчно-присъщи (засяга експресиращата CTLA-4 Т клетка) или клетъчно-външни (засяга вторични клетки). Изследванията от последното десетилетие показват, че CTLA-4 действа главно чрез конкуренцията си със CD28, CTLA-4-медирана транс-ендоцитоза на CD80 и CD86 и директните му толерогенни ефекти върху взаимодействащата клетка.

При хората гените, кодиращи CD28 и CTLA-4, са разположени един до друг на хромозома 2q33 и техните аминокиселинни последователности споделят приблизително 30% идентичност. CD28 е един от многото протеини, част от подсемейство на костимулаторни рецептори и лиганди. Всички рецептори в това семейство съдържат променлив извънклетъчен имуноглобулиноподобен домен, единичен трансмембранен домен и цитоплазмена опашка, съдържаща важни сигнални мотиви. Друг важен член на това семейство е рецепторът CTLA-4. Въпреки тези прилики, CD28 и CTLA-4 имат противоположни функции, тъй като CTLA-4 инхибира активацията на Т клетките. CTLA-4 също свързва CD80 и CD86 върху АПК, но с по-висок афинитет от CD28 молекулата, като се смята, че това е един от механизмите, които CTLA-4 използва за противодействие на Т-клетъчната активация.

Свързването както на CD28, така и на CTLA-4 с CD80 или CD86 се медира от MYPPPY мотив в извънклетъчния имуноглобулинов домен на рецепторите. Цитоплазмена опашка на CD28 съдържа няколко сигнални мотива като YXN мотива и YMNM мотива, които се подлагат на фосфорилиране върху тирозинови остатъци по време на активиране. При фосфорилиране тези сигнални мотиви свързват протеини, съдържащи SH2 домейн, които след свързването с SH3 от богатия на пролин мотив PYAP ще иницирират сигналната каскада. N-терминалният YXXM мотив е не само характерен за CD28, но се намира и в цитоплазмената опашка на CTLA-4.

CTLA-4 е тип I трансмембранен гликопротеин от суперсемејството на имуноглобулините, експресиран под формата на хомодимер на повърхността на Т клетките. И все пак, за разлика от регулаторните Т клетки, които конститутивно експресират CTLA-4, конвенционалните наивни CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетки извеждат CTLA-4 на повърхността само след активиране (Lindsten et al. 1993), тъй като всички клетки, притежават способността да експресират CTLA-4, който се намира вътреклетъчно в покрити с клатрин везикули, позволявайки неговата бърза транслокация към клетъчната мембрана.

Установено е, че CTLA-4 – освен че има по-висок афинитет на свързване към CD80 и CD86 – също е в състояние да отстрани тези лиганди от клетъчната повърхност на АПК, което е последвано от тяхното разграждане в клетките, експресиращи CTLA-4 – процес, наречен транс-ендоцитоза. По този начин АПК е лишена от потенциала си за активация.

Когато МСК $\gamma$  се култивират съвместно с митоген-стимулирани Т клетки, експресията на CD28 костимулаторната молекула върху Т клетките намалява (Sivanathan et al., 2014). Намаленият CD28 сигнал върху Т клетките предполага, че МСК $\gamma$  индуцират Т клетъчна анергия. Освен това, в тези съвместни култури на МСК $\gamma$  и Т клетки се установява повишаване на CTLA-4 (Sivanathan et al., 2014).

Нашите данни показаха, че при ко-култивиране на РВМС с контролни нетретирани МСК, интензитетът на експресия (MFI) на CTLA-4 намалява значително. След добавянето на IFN $\gamma$ , интензитетът на CTLA-4 отново значително се повишава. Данни на други автори също така сочат, че МСК от пъпна връв третирани с IFN $\gamma$  и ко-култивирани с РВМС имат значителни промени в кинетиката и нивата на експресия на CTLA-4 (Prasanna et al., 2010). На база на нашите данни и информацията в литературата, бихме могли да спекулираме, че при липса на IFN $\gamma$ , когато МСК имат провъзпалителни свойства, те потискат експресията на CTLA-4, за да не се потисне активацията на Т клетките. В среда с IFN $\gamma$ , МСК придобиват супресивен фенотип и повишават експресията на CTLA-4, за да се блокира Т-клетъчната активация.

Друг протеин, чиято експресия от РВМС изследвахме в присъствие на МСК $\gamma$  беше KIR3DL2 (3DL2, p140, CD158k). CD158k е тип I трансмембранен протеин от семейството на p70 killer cell Ig-подобни рецептори (KIR). KIR се експресират върху CD56<sup>dim</sup>NK клетки и Т клетъчни подгрупи, където участват в идентифицирането на нормални и анормални клетки и регулиране на ефекторните функции на вродената

имунна система. KIR3DL2 се експресира в по-голяма степен върху CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т клетки, отколкото други KIR. KIR3DL2 се свързва специфично с HLA-A3 и -A11, но не и -A1, -A2 и -A24. След като нашите резултати показаха, че IFN $\gamma$  засилва експресията на МНС I от WJ-МСК $\gamma$ , логично беше да изследваме и експресията на CD158k от Т лимфоцити в присъствие на „праймирани“ WJ-МСК. Справката ни в литературата не намери информация по темата, но на база на нашите данни бихме могли да заключим, че IFN $\gamma$  не повлиява експресията на CD158k от Т лимфоцити.

Третият повърхностен протеин, чиято експресия върху Т лимфоцити изследвахме в присъствие на WJ-МСК $\gamma$  беше PD-1. Молекулата на имунологичната контролна точка PD-L1 е решаващ регулатор на Т-клетъчния имуен отговор. Свързването на PD-L1 с PD-1 рецептора върху Т клетките потиска тяхната пролиферация и води до апоптоза. Известно е, че възпалителният цитокин IFN $\gamma$  води до увеличаване на повърхностната експресия и секреция на PD-L1, свързано с регулирано посттранслационно N-гликозилиране, което има ключова роля в транспортирането на PD-L1 до клетъчната повърхност и неговата секреция от МСК (Strauch et al., 2020). Нашите резултати показаха, че когато МСК от пъпна връв се ко-култивират с PBMC, експресията на PD-1 върху Т клетките намалява значително. Този резултат може да се дължи на потискането на Т-клетъчния имуен отговор и последващата апоптоза на Т клетките (функционален ефект) или наличие на секретиремата форма на PD-L1 в средата, която да се свързва с PD-1 върху Т лимфоцитите и технически да замаскира неговата експресия.

В литературата има много данни за имуномодулиращите функции на МСК $\gamma$  върху Т клетките. Така например, когато мишки са третиран с автоложни и алогенни МСК $\gamma$ , се наблюдава значително изчерпване на локалните възпалителни цитокини секретирани от Th1 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17A и IL-6), докато Th2 цитокини IL-4 и IL-10 се повишават (Sivanathan et al., 2014). Публикувани са данни, които показват, че третирането на МСК с IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  повишава способността на KM-МСК да потискат митоген-индуцираната лимфоцитна пролиферация и ги прави по-ефективни при понижаване на секрецията на IFN $\gamma$  от PBMC (Prasanna et al., 2010). Когато PBMC се култивират съвместно с KM-МСК $\gamma$ , положителният костимулиращ лиганд CD28 върху Т клетките изчезва, въпреки че субпопулация от CD28<sup>high</sup> лимфоцити се забелязва в ранните етапи на съвместната култура, но само за кратко.

### 3.5.2. Ефект на МСК $\gamma$ върху секрецията на IL-10, TGF $\beta$ и IDO

Въпреки че няма категорично мнение за условията, при които МСК секретират IL-10, тяхната роля е безспорна като фактор, предизвикващ индиректно стимулиране на секрецията на IL-10 от други клетки. Именно заради разнопосочните данни в литературата по отношение на секрецията на IL-10 от МСК, сметнахме за необходимо да проследим неговите концентрации не само в културалните среди от WJ-МСК/WJ-МСК $\gamma$ , но и в кондиционирани среди от WJ-МСК $\gamma$  ко-култивирани с РВМС. Трябва да се обърне внимание, че в експерименталната постановка, при която WJ-МСК/WJ-МСК $\gamma$  са ко-култивирани с РВМС, не бихме могли да определим еднозначно кои клетки секретират детектираните IL-10 и TGF $\beta$ 1, а само да отчетем динамиката в секрецията на цитокините. Изследваните цитокини биха могли да бъдат секретирани както от WJ-МСК/WJ-МСК $\gamma$ , така и от Th2 клетки, моноцити и др.

Когато измерихме концентрацията на IL-10 и TGF $\beta$  в културалните среди събрани след ко-култивиране на РВМС с МСК в присъствие на IFN $\gamma$  установихме, че когато РВМС се култивират с непраймирани МСК, концентрацията на IL-10 се покачва значително. В присъствието на IFN $\gamma$ , обаче, концентрацията на IL-10 значително намалява. Аналогичен ефект върху секрецията на IL-10 е описан от Lotfinia et al., но КМ-МСК не са третирани с провъзпалителни цитокини, а са предварително култивирани в условия на хипоксия за различен период от време. Авторите публикуват, че кондиционираната среда от хипоксичните КМ-МСК потиска секрецията на IL-10 от РВМС (Lotfinia et al., 2017).

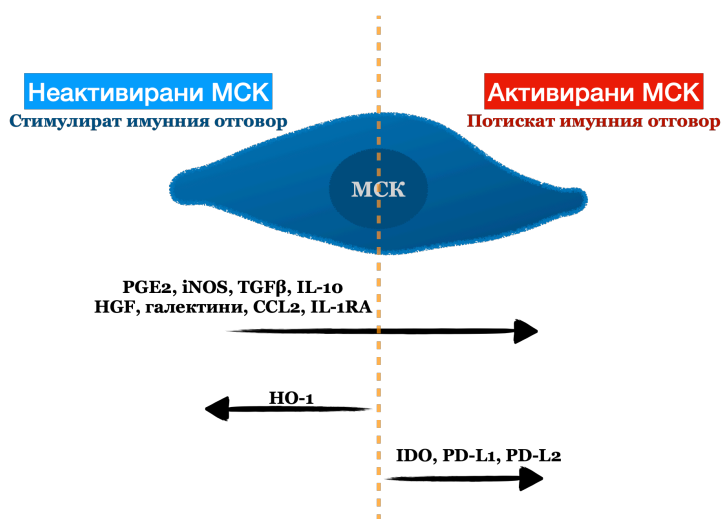
Неочаквано, секрецията на противовъзпалителният цитокин IL-10 намалява, когато РВМС са ко-култивирани с МСК третирани с IFN $\gamma$ , което обаче не влиза в противоречие с имуносупресивната роля на МСК в контекста на множеството литературни данни за плейотропно и често дори провъзпалително действие на IL-10. В допълнение, както вече беше споменато, има данни, че секрецията на IL-10 в условия на възпаление е първоначално силна, но сравнително краткотрайна като намалява на 24 час от началото на възпалението (Németh et al., 2009). Освен това, Laranjeira et al. 2015 установяват, че МСК потискат експресията на IL-10 иРНК и същевременно повишават тази на IL-4 в стимулирани CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т клетки, докато нивата на TGF $\beta$  иРНК са намалени в CD8<sup>+</sup> и увеличени в CD4<sup>+</sup> Т клетки (Laranjeira et al., 2015). Нашите данни показаха, че по време на ко-култивиране с РВМС, МСК не засилват секрецията на TGF $\beta$ 1

в присъствие на  $IFN\gamma$ , което може да намери своето обяснение в сложните и многостранни взаимодействия между имунните клетки и МСК.

### 3.6. МСК като „сензори и превключватели“ на възпалението

МСК експресират много имунни модулатори при различни условия. Някои от тях се експресират както в покой, така и в активирано състояние, включително PGE2, iNOS, TGF $\beta$ , IL-10, HGF, CD39 и CD73, галектини, CCL2, TSG6 (открива се главно когато МСК се култивират под формата на сфери) и IL1RA. Други се експресират само в активирано състояние, включително IDO, PD-L1 и PD-L2 и протеини, свързани със системата на комплемента. Обратното, HO-1 се експресира главно в състояние на покой и намалява рязко когато МСК се активират. Въпреки това, всички те се регулират от провъзпалителни фактори по начин, който е зависим от концентрацията (Фигура 31). Данните показват, че ниските нива на PGE2 и HLA-G имат провъзпалителен ефект, докато високите нива имат противовъзпалителни ефекти.

МСК могат да „усетят“ сигнали за опасност чрез различни рецептори (като TLR) и също така да реагират на прекомерно високи провъзпалителни сигнали чрез рецептори за TNF $\alpha$ ,  $IFN\gamma$  и IL-1 $\beta$ . В зависимост от типа или силата на сигнала, МСК секретират цитокини за стимулиране или потискане на имунните отговори, чрез които поддържат имунния баланс.



Фигура 31. МСК като „сензори и превключватели“ на възпалението

Описаните от нас резултати за експресията на PD-L1 и HLA-I от WJ-МСК $\gamma$ , както и тази на PD-1 и CTLA-4 от Т лимфоцити, в комбинация с данните ни за IL-10 и TGF $\beta$  потвърждават идеята, че МСК се активират от провъзпалителния цитокин  $IFN\gamma$  и

придобиват имуносупресивен фенотип. В контекста на получените данни, е важно да се вземат предвид сложните и многостранни взаимодействия между МСК и имунните клетки, като бихме могли да обобщим, че в зависимост от условията на средата, вида и концентрацията на цитокините в нея, МСК могат да стимулират или потискат имунния отговор.

#### **4. Терапевтични перспективи и предизвикателства на МСК $\gamma$**

Мезенхимните стволови клетки имат голям потенциал за лечение на много заболявания. Те биха могли да бъдат насочени към местата на възпаление, където да упражнят своят ефект. В тази връзка са публикувани не малко проучвания свързани с терапевтичния потенциал на „праймирани“ с възпалителни цитокини МСК. Така например, няколко доклада посочват, че терапевтичните ефекти на алогенните и автоложните МСК $\gamma$  са доста противоречиви *in vivo* и една от причините е, че МСК $\gamma$  експресират повече МНС клас II молекули, което ги прави вероятно по-имуногенни. Установено е, че по време на алотрансплантация, инфузията на алогенни МСК, комбинирана с имуносупресивното лекарство микофенолат мофетил (MMF), удължава преживяемостта на присадката (Eggenhofer et al., 2011). Eggenhofer et al. предполагат, че засиленият имуносупресивен ефект на МСК/MMF се дължи на факта, че MMF не променя производството на IFN $\gamma$  от активирани Т клетки и серумните нива на IFN $\gamma$  *in vivo*. От друга страна, смесването на МСК и CsA (циклоспорин А), който напълно блокира производството на IFN $\gamma$  от Т клетките, води до по-слабо ефективно потискане на имунните отговори (Eggenhofer et al., 2011).

МСК, предварително третирани с IFN $\gamma$ , са използвани като терапевтично средство при колит, предизвикан от декстран натриев сулфат (DSS) и тринитробензен сулфонат (TNBS) при мишки. Мишките, третирани с МСК $\gamma$ , имат по-слабо развита клинична проява на DSS-индуциран колит. Мишките, третирани с МСК $\gamma$ , също имат по-високо тегло, по-нисък резултат за тежестта на колита и по-добра степен на преживяемост от нелекуваните животни. Освен това, серумните нива на амилоид А протеин и нивата на локални провъзпалителни цитокини в тъканите на дебелото черво са значително по-ниски след прилагането на МСК $\gamma$ . В допълнение, МСК $\gamma$  имат по-добра миграционна способност от нетретирани с IFN $\gamma$  клетки. Праймирането на МСК с IFN $\gamma$  повишава способността им да инхибират Th1 про-възпалителния имуноен отговор, което води до по-слабо увреждане на лигавичната тъкан (Duijvestein et al., 2011).

Болестта присадка срещу гостоприемник (GVHD), медирана от донорни Т лимфоцити след алогенна трансплантация на хематопоеични стволови клетки, е свързана с висока смъртност. МСК могат да се използват като лечение за GVHD заради способността им да потискат пролиферацията на донорните Т клетки. Необходими са достатъчни нива на IFN $\gamma$  за активиране на имunosупресивното поведение на МСК, потвърдено *in vivo* при GVHD. Алогенните МСК, инжектирани по време на трансплантация на костен мозък, са неефективни поради ниските серумни нива на IFN $\gamma$  (Polchert et al., 2008). Когато мишките са третирани с IFN $\gamma^{-/-}$  Т клетки, те не реагират на лечението с МСК и развиват GVHD. За разлика от тях, МСК $\gamma$  се активират бързо и потискат GVHD по-ефективно. Когато МСК $\gamma$  са били прилагани по време на трансплантацията на костен мозък, те са били в състояние да предотвратят смъртността от GVHD (100% преживяемост). Активирането на МСК зависи от нивото на експозиция на IFN $\gamma$ , като по-високата експозиция корелира с по-успешно потискане на GVHD (Polchert et al., 2008).

Когато мишки са съвместно трансплантирани с човешки РВМС и МСК $\gamma$ , при животните се наблюдава по-добър процент на преживяемост в сравнение с мишки, трансплантирани само с РВМС. Освен това, комбинираната трансплантация на човешки РВМС и МСК $\gamma$  ефективно намалява клиничните симптоми и инфилтрацията на имунни клетки в кожата и дебелото черво на GVHD мишки. МСК $\gamma$  се локализируют в тъканите на тези GVHD мишки и успешно изпълняват своите имunosупресивни функции чрез секрецията на IDO (D. S. Kim et al., 2018).

Предварително активирани МСК възстановяват еластичността на заздравяващите рани на възрастните мишки до тази характерна за млади организми. МСК $\gamma$  проявяват ефекта си чрез макрофагите на гостоприемника. Този ефект се дължи на свойството на МСК да пренасочват провъзпалителните макрофаги към алтернативно активирания макрофагов фенотип, при който имат по-силни репаративни свойства, повишена секреция на IL-10 и способност да потискат производството на провъзпалителните цитокини IL-1 $\beta$  и IL-17 (S. Lee et al., 2013).

В миши модел на системен лупус еритематозус (SLE), КМ-МСК $\gamma$  са в състояние да инхибират антиген-зависимата пролиферация на В клетките в плазматични клетки във фоликуларните и маргинални зони *in vitro*. Този ефект е зависим от IFN $\gamma$  и се медира от клетъчен контакт с участието на PD-1/PD-L1 пътя (Schena et al., 2010).

Както вече стана ясно, МСК имат нужда от възпалителен процес, за да проявят своята имunosупресивна функция. В изцяло алогенен модел, трансплантирани сърца са

отхвърлени рано, когато реципиентите са предварително третирани с МСК, поради активиране на Т клетки *in vivo*. Когато условията са настроени към възпаление с високи дози конканавалин А (ConA) или провъзпалителни цитокини IFN $\gamma$ , IL-2 или TNF $\alpha$ , МСК са в състояние да инхибират пролиферацията на Т клетките, като ефектът е дозозависим (Renner et al., 2009).

МСК $\gamma$  може да се използват като потенциално лечение и за инсулт. Лечението с МСК $\gamma$  води до значително функционално възстановяване при животински модели. Лечението с МСК $\gamma$  потиска индуцирания от хипоксия провъзпалителен фенотип на микроглията по-ефективно, отколкото с неактивирани МСК. От важно значение е също така фактът, че използването на МСК $\gamma$  води до привличане и диференциация на олигодендроцитни прогениторни клетки в миелин-продуциращи олигодендроцити *in vivo*.

Нашата справка в <https://clinicaltrials.gov> откри 390 активни действащи клинични изпитвания базирани на терапии с мезенхимни стволови клетки, като голямата част от проучванията изучават имуномодулаторното действие на МСК при автоимунни заболявания. Засега терапевтичните подходи базирани се на предварително активирани с възпалителни цитокини МСК се ограничават до животински модели, но нашите и публикуваните по темата резултати биха могли да помогнат на учените и клиницистите да получат по-добра представа за трансформациите на МСК при възпалителни състояния и да се приближат към разработването на по-ефективни терапии на заболявания, базирани на лечение със стволови клетки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вече десетилетия след откриването им, биологията на стволовите клетки все още крие своите тайни и вълнува умовете на изследователите. Твърде дълъг период измина от времената на „родоначалната стволова клетка в костния мозък, която дава начало на целия хематопоетичен ред”. Множество изследвания и открития установиха, че това е само малка част от пъзела, в който участват стволовите клетки и с времето стана ясно, че те са твърде хетерогенна популация по отношение на тяхната „стволовост”, произход, видове и функции. Отдавна вече е известно, че регенеративната функция далеч не е единственото свойство на стволовите клетки и с времето акцентът силно се измести към техните нови и вълнуващи качества, свързани с потенциал за иновативни терапевтични подходи.

Един от представителите на стволовите клетки, а именно мезенхимните стволови клетки с времето се открили като обещаваща възможност, чрез реализация на имunosупресивните си функции да бъде едно ново „оръжие” в борбата с болести, където имунната система от приятел се превръща във враг.

Автоимунните заболявания представляват едно от най-сериозните медицински предизвикателства в съвременния свят, засягайки приблизително 5-8 % от човешката популация и водейки до трайна инвалидизация, скъсена продължителност и увредено качество на живот. Терапията на автоимунните заболявания, въпреки огромния напредък с приложението на биологични средства, все още е съществен проблем поради множеството странични ефекти на медикаментите. От тази гледна точка мезенхимните стволови клетки се явяват потенциална алтернатива, теоретично способна да промени лечението както по отношение на неговата ефективност, така и по отношение на страничните ефекти.

Дълги години МСК бяха разглеждани и изучавани именно в този контекст – като субект, който активно действа и супресира клетките на имунната система. Множество по-нови данни, обаче обръщат внимание на факта, че *in vivo*, мезенхимните стволови клетки се явяват и обект на действие от страна на множество клетки, осъществяващи преки контакти с тях и особено от страна на множество цитокини, основно свързани с тъканно възпаление. Именно „двустранный разговор” в много голяма степен определя и дуалистичната природа на МСК в процеса на възпаление и неговия контрол.

Идеята на настоящата дисертация беше да разгледа мезенхимните стволови клетки именно по този начин – като обект на въздействие от ключовия цитокин за „възпалителната среда”  $IFN\gamma$ , както и последствията за МСК и клетките на имунната система, които са под тяхно действие. Ние вярваме, че без да се обърне внимание на „кръстосания разговор”, имуносупресивните действия на МСК биха останали само *in vitro* феномен. Надяваме се тази дисертация да бъде една, макар и малка стъпка в посока многопластовото изследване на мезенхимните стволови клетки и тяхната роля в сложните процеси на имуногенност и толеранс.

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Abdelrazik, H., Spaggiari, G. M., Chiossone, L., & Moretta, L. (2012). Mesenchymal Stem Cells Expanded in Human Platelet Lysate Display a Decreased Inhibitory Capacity on T and NK Cell Proliferation and Function: 2382. *Transplantation Journal*, 94(10S), 1128. <https://doi.org/10.1097/00007890-201211271-02240>
2. Abumaree, M. H., Al Jumah, M. A., Kalionis, B., Jawdat, D., Al Khaldi, A., Abomaray, F. M., Fatani, A. S., Chamley, L. W., & Knawy, B. A. (2013). Human Placental Mesenchymal Stem Cells (pMSCs) Play a Role as Immune Suppressive Cells by Shifting Macrophage Differentiation from Inflammatory M1 to Anti-inflammatory M2 Macrophages. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(5), 620–641. <https://doi.org/10.1007/s12015-013-9455-2>
3. Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubat, T., Yagita, H., & Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International Immunology*, 8(5), 765–772. <https://doi.org/10.1093/intimm/8.5.765>
4. Agaugué, S., Carosella, E. D., & Rouas-Freiss, N. (2011). Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokinic balance in favor of Th2 versus Th1/Th17. *Blood*, 117(26), 7021–7031. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-294389>
5. Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815–1822. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>
6. Ahmad, S. M., Borch, T. H., Hansen, M., & Andersen, M. H. (2016). PD-L1-specific T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 65(7), 797–804. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1783-4>
7. Aksu, A. E., Horibe, E., Sacks, J., Ikeguchi, R., Breiting, J., Scozio, M., Unadkat, J., & Feili-Hariri, M. (2008). Co-infusion of donor bone marrow with host mesenchymal stem cells treats GVHD and promotes vascularized skin allograft survival in rats. *Clinical Immunology*, 127(3), 348–358. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.02.003>
8. Aldinucci, A., Rizzetto, L., Pieri, L., Nosi, D., Romagnoli, P., Biagioli, T., Mazzanti, B., Saccardi, R., Beltrame, L., Massacesi, L., Cavalieri, D., & Ballerini, C. (2010). Inhibition of Immune Synapse by Altered Dendritic Cell Actin Distribution: A New Pathway of Mesenchymal Stem Cell Immune Regulation. *The Journal of Immunology*, 185(9), 5102–5110. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001332>
9. Almeida, C. R., Caires, H. R., Vasconcelos, D. P., & Barbosa, M. A. (2016). NAP-2 Secreted by Human NK Cells Can Stimulate Mesenchymal Stem/Stromal Cell Recruitment. *Stem Cell Reports*, 6(4), 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.02.012>
10. Amouzegar, A., Mittal, S. K., Sahu, A., Sahu, S. K., & Chauhan, S. K. (2017). Mesenchymal Stem Cells Modulate Differentiation of Myeloid Progenitor Cells During Inflammation: MSCs Modulate Myeloid Progenitor Differentiation. *STEM CELLS*, 35(6), 1532–1541. <https://doi.org/10.1002/stem.2611>
11. Anbarasan, C., Bavaniatha, M., Latchumanadhas, K., & Ajit Mullasari, S. (2015). ICAM-1 molecular mechanism and genome wide SNP's association studies. *Indian Heart Journal*, 67(3), 282–287. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2015.03.005>
12. Arikawa, T., Matsukawa, A., Watanabe, K., Sakata, K., Seki, M., Nagayama, M., Takeshita, K., Ito, K., Niki, T., Oomizu, S., Shinonaga, R., Saita, N., & Hirashima, M. (2009). Galectin-9 accelerates transforming growth factor  $\beta$ -induced differentiation of human mesenchymal stem cells to chondrocytes. *Bone*, 44(5), 849–857. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.01.365>
13. Asari, S., Itakura, S., Ferreri, K., Liu, C.-P., Kuroda, Y., Kandeel, F., & Mullen, Y. (2009). Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Experimental Hematology*, 37(5), 604–615. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.01.005>
14. Augello, A., Tasso, R., Negrini, S., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., & Pennesi, G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European Journal of Immunology*, 35(5), 1482–1490. <https://doi.org/10.1002/eji.200425405>
15. Azad, M. B., Chen, Y., & Gibson, S. B. (2009). Regulation of Autophagy by Reactive Oxygen Species (ROS): Implications for Cancer Progression and Treatment. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(4), 777–790. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2270>
16. Bach, E. A., Aguet, M., & Schreiber, R. D. (1997). THE IFN $\gamma$  RECEPTOR: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. *Annual Review of Immunology*, 15(1), 563–591. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.563>
17. Bai, L., Lennon, D. P., Eaton, V., Maier, K., Caplan, A. I., Miller, S. D., & Miller, R. H. (2009). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*, 57(11), 1192–1203. <https://doi.org/10.1002/glia.20841>
18. Baksh, D., Yao, R., & Tuan, R. S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(6), 1384–1392. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0709>
19. Barry, F., Boynton, R. E., Liu, B., & Murphy, J. M. (2001). Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components. *Experimental Cell Research*, 268(2), 189–200. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5278>
20. Barry, F. P., Murphy, J. M., English, K., & Mahon, B. P. (2005). Immunogenicity of Adult Mesenchymal Stem Cells: Lessons from the Fetal Allograft. *Stem Cells and Development*, 14(3), 252–265. <https://doi.org/10.1089/scd.2005.14.252>
21. Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A., & Hoffman, R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro

- and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*, 30(1), 42–48. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(01\)00769-X](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(01)00769-X)
22. Bartosh, T. J., Ylöstalo, J. H., Bazhanov, N., Kuhlman, J., & Prockop, D. J. (2013). Dynamic compaction of human mesenchymal stem/precursor cells into spheres self-activates caspase-dependent IL1 signaling to enhance secretion of modulators of inflammation and immunity (PGE2, TSG6, and STC1): Activation of IL1-Signaling in MSC Spheres. *STEM CELLS*, 31(11), 2443–2456. <https://doi.org/10.1002/stem.1499>
  23. Bauer, H., Jung, T., Tsikas, D., Stichtenoth, D. O., Frölich, C., & Neumann, C. (1997). Nitric oxide inhibits the secretion of T-helper 1- and T-helper 2-associated cytokines in activated human T cells'pa. *Immunology*, 90(2), 205–211. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1997.00161.x>
  24. Ben Nasr, M., Tezza, S., D'Addio, F., Mamei, C., Usuelli, V., Maestroni, A., Corradi, D., Belletti, S., Albarello, L., Becchi, G., Fadini, G. P., Schuetz, C., Markmann, J., Wasserfall, C., Zon, L., Zuccotti, G. V., & Fiorina, P. (2017). PD-L1 genetic overexpression or pharmacological restoration in hematopoietic stem and progenitor cells reverses autoimmune diabetes. *Science Translational Medicine*, 9(416), eaam7543. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam7543>
  25. Ben-Ami, E., Berrih-Aknin, S., & Miller, A. (2011). Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 10(7), 410–415. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.01.005>
  26. Benichou, G., Yamada, Y., Aoyama, A., & Madsen, J. C. (2011). Natural killer cells in rejection and tolerance of solid organ allografts. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 16(1), 47–53. <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e32834254cf>
  27. Benkhoucha, M., Santiago-Raber, M.-L., Schneiter, G., Chofflon, M., Funakoshi, H., Nakamura, T., & Lalive, P. H. (2010). Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(14), 6424–6429. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912437107>
  28. Benvenuto, F., Ferrari, S., Gerdoni, E., Gualandi, F., Frassoni, F., Pistoia, V., Mancardi, G., & Uccelli, A. (2007). Human Mesenchymal Stem Cells Promote Survival of T Cells in a Quiescent State. *Stem Cells*, 25(7), 1753–1760. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0068>
  29. Benvenuto, F., Voci, A., Carminati, E., Gualandi, F., Mancardi, G., Uccelli, A., & Vergani, L. (2015). Human mesenchymal stem cells target adhesion molecules and receptors involved in T cell extravasation. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 245. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0222-y>
  30. Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell*, 13(4), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>
  31. Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2007). TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature Immunology*, 8(4), 345–350. <https://doi.org/10.1038/ni0407-345>
  32. Betz, M., & Fox, B. S. (1991). Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 146(1), 108–113.
  33. Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E., & Rachmilewitz, J. (2005). Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*, 105(5), 2214–2219. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2921>
  34. Bieback, K., Kern, S., Klüter, H., & Eichler, H. (2004). Critical Parameters for the Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *STEM CELLS*, 22(4), 625–634. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-4-625>
  35. Billiau, A., & Matthys, P. (2009). Interferon- $\gamma$ : A historical perspective. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(2), 97–113. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.02.004>
  36. Binato, R., de Souza Fernandez, T., Lazzarotto-Silva, C., Du Rocher, B., Mencalha, A., Pizzatti, L., Bouzas, L. F., & Abdelhay, E. (2013). Stability of human mesenchymal stem cells during *in vitro* culture: Considerations for cell therapy. *Cell Proliferation*, 46(1), 10–22. <https://doi.org/10.1111/cpr.12002>
  37. Bingisser, R. M., Tilbrook, P. A., Holt, P. G., & Kees, U. R. (1998). Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 160(12), 5729–5734.
  38. Blaber, S. P., Webster, R. A., Hill, C. J., Breen, E. J., Kuah, D., Vesey, G., & Herbert, B. R. (2012). Analysis of *in vitro* secretion profiles from adipose-derived cell populations. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 172. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-172>
  39. Bodmer, J.-L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J., & Tschopp, J. (2000). TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nature Cell Biology*, 2(4), 241–243. <https://doi.org/10.1038/35008667>
  40. Boissel, L., Tuncer, H. H., Betancur, M., Wolfberg, A., & Klingemann, H. (2008). Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Increase Expansion of Cord Blood Natural Killer Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14(9), 1031–1038. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.06.016>
  41. Böttcher, M., D. Hofmann, A., Bruns, H., Haibach, M., Loschinski, R., Saul, D., Mackensen, A., Le Blanc, K., Jitschin, R., & Mougiakakos, D. (2016). Mesenchymal Stromal Cells Disrupt mTOR-Signaling and Aerobic Glycolysis During T-Cell Activation: MSCs Act as a Metabolic Checkpoint for T-Cells. *STEM CELLS*, 34(2), 516–521. <https://doi.org/10.1002/stem.2234>
  42. Bozzano, F., Marras, F., & De Maria, A. (2017). Natural Killer Cell Development and Maturation Revisited: Possible Implications of a Novel Distinct Lin<sup>−</sup>CD34<sup>+</sup>DNAM-1brightCXCR4<sup>+</sup> Cell Progenitor. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00268>

43. Brandau, S., Jakob, M., Bruderek, K., Bootz, F., Giebel, B., Radtke, S., Mauel, K., Jäger, M., Flohé, S. B., & Lang, S. (2014). Mesenchymal Stem Cells Augment the Anti-Bacterial Activity of Neutrophil Granulocytes. *PLoS ONE*, *9*(9), e106903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106903>
44. Brandau, S., Jakob, M., Hemeda, H., Bruderek, K., Janeschik, S., Bootz, F., & Lang, S. (2010). Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *Journal of Leukocyte Biology*, *88*(5), 1005–1015. <https://doi.org/10.1189/jlb.0410207>
45. Brenk, M., Scheler, M., Koch, S., Neumann, J., Takikawa, O., Häcker, G., Bieber, T., & von Bubnoff, D. (2009). Tryptophan Deprivation Induces Inhibitory Receptors ILT3 and ILT4 on Dendritic Cells Favoring the Induction of Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology*, *183*(1), 145–154. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803277>
46. Brown, J. M., Nemeth, K., Kushnir-Sukhov, N. M., Metcalfe, D. D., & Mezey, E. (2011). Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism: Mast cell inhibition by BMSC. *Clinical & Experimental Allergy*, *41*(4), 526–534. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03685.x>
47. Bulati, M., Miceli, V., Gallo, A., Amico, G., Carcione, C., Pampalone, M., & Conaldi, P. G. (2020). The Immunomodulatory Properties of the Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Induced by INF- $\gamma$  Produced by Activated Lymphomonocytes and Are Mediated by Cell-To-Cell Contact and Soluble Factors. *Frontiers in Immunology*, *11*, 54. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00054>
48. Bulua, A. C., Simon, A., Maddipati, R., Pelletier, M., Park, H., Kim, K.-Y., Sack, M. N., Kastner, D. L., & Siegel, R. M. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *Journal of Experimental Medicine*, *208*(3), 519–533. <https://doi.org/10.1084/jem.20102049>
49. Cahill, E. F., Tobin, L. M., Carty, F., Mahon, B. P., & English, K. (2015). Jagged-1 is required for the expansion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells by murine mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, *6*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0021-5>
50. Camilleri, E. T., Gustafson, M. P., Dudakovic, A., Riester, S. M., Garces, C. G., Paradise, C. R., Takai, H., Karperien, M., Cool, S., Sampen, H.-J. I., Larson, A. N., Qu, W., Smith, J., Dietz, A. B., & van Wijnen, A. J. (2016). Identification and validation of multiple cell surface markers of clinical-grade adipose-derived mesenchymal stromal cells as novel release criteria for good manufacturing practice-compliant production. *Stem Cell Research & Therapy*, *7*(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0370-8>
51. Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, *9*(5), 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
52. Carosella, E. D., Gregori, S., & LeMaout, J. (2011). The tolerogenic interplay(s) among HLA-G, myeloid APCs, and regulatory cells. *Blood*, *118*(25), 6499–6505. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-370742>
53. Carrión, F., Nova, E., Luz, P., Apablaza, F., & Figueroa, F. (2011). Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 cell polarization according to the state of CD4<sup>+</sup> T cell activation. *Immunology Letters*, *135*(1–2), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.09.006>
54. Casiraghi, F., Azzollini, N., Cassis, P., Imberti, B., Morigi, M., Cugini, D., Cavinato, R. A., Todeschini, M., Solini, S., Sonzogni, A., Perico, N., Remuzzi, G., & Noris, M. (2008). Pretransplant Infusion of Mesenchymal Stem Cells Prolongs the Survival of a Semiallogeneic Heart Transplant through the Generation of Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, *181*(6), 3933–3946. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3933>
55. Cassatella, M. A., Mosna, F., Micheletti, A., Lisì, V., Tamassia, N., Cont, C., Calzetti, F., Pelletier, M., Pizzolo, G., & Krampera, M. (2011). Toll-Like Receptor-3-Activated Human Mesenchymal Stromal Cells Significantly Prolong the Survival and Function of Neutrophils. *STEM CELLS*, *29*(6), 1001–1011. <https://doi.org/10.1002/stem.651>
56. Castro-Malaspina, H., Gay, R., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., McKenzie, S., Broxmeyer, H., & Moore, M. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*, *56*(2), 289–301. <https://doi.org/10.1182/blood.V56.2.289.289>
57. Cecconi, F., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Fuoco, C., Corazzari, M., Giunta, L., Romagnoli, A., Stoykova, A., Chowdhury, K., Fimia, G. M., & Piacentini, M. (2007). A Novel Role for Autophagy in Neurodevelopment. *Autophagy*, *3*(5), 505–507. <https://doi.org/10.4161/auto.4616>
58. Chabannes, D., Hill, M., Merieau, E., Rossignol, J., Brion, R., Souillou, J. P., Anegon, I., & Cuturi, M. C. (2007). A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood*, *110*(10), 3691–3694. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-075481>
59. Chan, J. L., Tang, K. C., Patel, A. P., Bonilla, L. M., Pierobon, N., Ponzio, N. M., & Rameshwar, P. (2006). Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon- $\gamma$ . *Blood*, *107*(12), 4817–4824. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-0057>
60. Chan, W. K., Lau, A. S.-Y., Li, J. C.-B., Law, H. K.-W., Lau, Y. L., & Chan, G. C.-F. (2008). MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN- $\gamma$  challenge. *Experimental Hematology*, *36*(11), 1545–1555. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.06.008>
61. Chao, Y.-H., Wu, H.-P., Chan, C.-K., Tsai, C., Peng, C.-T., & Wu, K.-H. (2012). Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells for Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2012/759503>
62. Chatterjee, D., Tufa, D. M., Baehre, H., Hass, R., Schmidt, R. E., & Jacobs, R. (2014). Natural killer cells acquire CD73 expression upon exposure to mesenchymal stem cells. *Blood*, *123*(4), 594–595. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-524827>
63. Chaturvedi, P., Gilkes, D. M., Takano, N., & Semenza, G. L. (2014). Hypoxia-inducible factor-dependent signaling between triple-negative breast cancer cells and mesenchymal stem cells promotes macrophage recruitment.

64. Chaudhry, A., Samstein, R. M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M. C., Heinrich, J.-M., Jack, R. S., Wunderlich, F. T., Brünig, J. C., Müller, W., & Rudensky, A. Y. (2011). Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity*, 34(4), 566–578. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.018>
65. Che, N., Li, X., Zhou, S., Liu, R., Shi, D., Lu, L., & Sun, L. (2012). Umbilical cord mesenchymal stem cells suppress B-cell proliferation and differentiation. *Cellular Immunology*, 274(1–2), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.02.004>
66. Chen, D., Tang, P., Liu, L., Wang, F., Xing, H., Sun, L., & Jiang, Z. (2018). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote cell proliferation of multiple myeloma through inhibiting T cell immune responses via PD-1/PD-L1 pathway. *Cell Cycle*, 17(7), 858–867. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1442624>
67. Chen, M., Su, W., Lin, X., Guo, Z., Wang, J., Zhang, Q., Brand, D., Ryffel, B., Huang, J., Liu, Z., He, X., Le, A. D., & Zheng, S. G. (2013). Adoptive Transfer of Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorates Collagen-Induced Arthritis via Suppression of Th1 and Th17 Cells and Enhancement of Regulatory T Cell Differentiation. *Arthritis & Rheumatism*, 65(5), 1181–1193. <https://doi.org/10.1002/art.37894>
68. Chen, P.-M., Liu, K.-J., Hsu, P.-J., Wei, C.-F., Bai, C.-H., Ho, L.-J., Sytwu, H.-K., & Yen, B. L. (2014). Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell-derived hepatocyte growth factor through ERK1/2. *Journal of Leukocyte Biology*, 96(2), 295–303. <https://doi.org/10.1189/jlb.3A0513-242R>
69. Chen, X., Shao, H., Zhi, Y., Xiao, Q., Su, C., Dong, L., Liu, X., Li, X., & Zhang, X. (2016). CD73 Pathway Contributes to the Immunosuppressive Ability of Mesenchymal Stem Cells in Intraocular Autoimmune Responses. *Stem Cells and Development*, 25(4), 337–346. <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0227>
70. Chen, Y., Song, Y., Miao, H., Xu, Y., Lv, M., Wang, T., & Hou, Y. (2015). Gene delivery with IFN- $\gamma$ -expression plasmids enhances the therapeutic effects of MSCs on DSS-induced mouse colitis. *Inflammation Research*, 64(9), 671–681. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0845-6>
71. Chiesa, S., Morbelli, S., Morando, S., Massollo, M., Marini, C., Bertoni, A., Frassoni, F., Bartolome, S. T., Sambucetti, G., Traggiai, E., & Uccelli, A. (2011). Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(42), 17384–17389. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103650108>
72. Chinnadurai, R., Copland, I. B., Patel, S. R., & Galipeau, J. (2014). IDO-Independent Suppression of T Cell Effector Function by IFN- $\gamma$ -Licensed Human Mesenchymal Stromal Cells. *The Journal of Immunology*, 192(4), 1491–1501. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301828>
73. Cho, D.-I., Kim, M. R., Jeong, H., Jeong, H. C., Jeong, M. H., Yoon, S. H., Kim, Y. S., & Ahn, Y. (2014). Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Experimental & Molecular Medicine*, 46(1), e70–e70. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.135>
74. Cho, K.-A., Lee, J.-K., Kim, Y.-H., Park, M., Woo, S.-Y., & Ryu, K.-H. (2017). Mesenchymal stem cells ameliorate B-cell-mediated immune responses and increase IL-10-expressing regulatory B cells in an EB13-dependent manner. *Cellular & Molecular Immunology*, 14(11), 895–908. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.59>
75. Cho, K.-A., Park, M., Kim, Y.-H., Ryu, K.-H., & Woo, S.-Y. (2017). Poly I:C primes the suppressive function of human palatine tonsil-derived MSCs against Th17 differentiation by increasing PD-L1 expression. *Immunobiology*, 222(2), 394–398. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.08.012>
76. Choi, H., Lee, R. H., Bazhanov, N., Oh, J. Y., & Prockop, D. J. (2011). Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- $\kappa$ B signaling in resident macrophages. *Blood*, 118(2), 330–338. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-327353>
77. Chon, S. Y., Hassanain, H. H., & Gupta, S. L. (1996). Cooperative Role of Interferon Regulatory Factor 1 and p91 (STAT1) Response Elements in Interferon- $\gamma$ -inducible Expression of Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 271(29), 17247–17252. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.29.17247>
78. Chou, F.-C., Chen, H.-Y., Kuo, C.-C., & Sytwu, H.-K. (2018). Role of Galectins in Tumors and in Clinical Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 430. <https://doi.org/10.3390/ijms19020430>
79. Comoli, P., Ginevri, F., Maccario, R., Avanzini, M. A., Marconi, M., Groff, A., Cometa, A., Cioni, M., Porretti, L., Barberi, W., Frassoni, F., & Locatelli, F. (2007). Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(4), 1196–1202. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm740>
80. Consentius, C., Akyüz, L., Schmidt-Lucke, J. A., Tschöpe, C., Pinzur, L., Ofir, R., Reinke, P., Volk, H.-D., & Juelke, K. (2015). Mesenchymal Stromal Cells Prevent Allostimulation In Vivo and Control Checkpoints of Th1 Priming: Migration of Human DC to Lymph Nodes and NK Cell Activation: MSC Control Checkpoints of Th1 Priming. *STEM CELLS*, 33(10), 3087–3099. <https://doi.org/10.1002/stem.2104>
81. Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G. L., Pistoia, V., & Uccelli, A. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 107(1), 367–372. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2657>
82. Croitoru-Lamoury, J., Lamoury, F. M. J., Caristo, M., Suzuki, K., Walker, D., Takikawa, O., Taylor, R., & Brew, B. J. (2011). Interferon- $\gamma$  Regulates the Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells via Activation of Indoleamine 2,3 Dioxygenase (IDO). *PLoS ONE*, 6(2), e14698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014698>
83. Croker, B. A., Kiu, H., & Nicholson, S. E. (2008). SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(4), 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.07.010>

84. Crop, M. J., Baan, C. C., Korevaar, S. S., IJzermans, J. N. M., Alwayn, I. P. J., Weimar, W., & Hoogduijn, M. J. (2009). Donor-Derived Mesenchymal Stem Cells Suppress Alloreactivity of Kidney Transplant Patients. *Transplantation*, 87(6), 896–906. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31819b3d72>
85. Crop, M. J., Baan, C. C., Korevaar, S. S., IJzermans, J. N. M., Pescatori, M., Stubbs, A. P., Van IJcken, W. F. J., Dahlke, M. H., Eggenhofer, E., Weimar, W., & Hoogduijn, M. J. (2010). Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Effect of inflammatory conditions on ASC. *Clinical & Experimental Immunology*, 162(3), 474–486. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04256.x>
86. Crop, M. J., Korevaar, S. S., De Kuiper, R., IJzermans, J. N. M., Van Besouw, N. M., Baan, C. C., Weimar, W., & Hoogduijn, M. J. (2011). Human Mesenchymal Stem Cells Are Susceptible to Lysis by CD8<sup>+</sup> T Cells and NK Cells. *Cell Transplantation*, 20(10), 1547–1559. <https://doi.org/10.3727/096368910X564076>
87. Cui, R., Rekasi, H., Hepner-Schefczyk, M., Fessmann, K., Petri, R. M., Bruderek, K., Brandau, S., Jäger, M., & Flohé, S. B. (2016). Human mesenchymal stromal/stem cells acquire immunostimulatory capacity upon cross-talk with natural killer cells and might improve the NK cell function of immunocompromised patients. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 88. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0353-9>
88. Cutler, A. J., Limbani, V., Girdlestone, J., & Navarrete, C. V. (2010). Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells Modulate Monocyte Function to Suppress T Cell Proliferation. *The Journal of Immunology*, 185(11), 6617–6623. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002239>
89. Dai, W., & Gupta, S. L. (1990). Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon-gamma. Upstream control region discriminates between interferon-gamma and interferon-alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 265(32), 19871–19877. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)45453-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)45453-6)
90. Dang, S., Yu, Z., Zhang, C., Zheng, J., Li, K., Wu, Y., Qian, L., Yang, Z., Li, X., Zhang, Y., & Wang, R. (2015). Autophagy promotes apoptosis of mesenchymal stem cells under inflammatory microenvironment. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 247. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0245-4>
91. Davies, J. E., Walker, J. T., & Keating, A. (2017). Concise Review: Wharton’s Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells: Wharton’s Jelly an Enigmatic MSC Source. *STEM CELLS Translational Medicine*, 6(7), 1620–1630. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0492>
92. Davies, L. C., Heldring, N., Kadri, N., & Le Blanc, K. (2017). Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression: MSC Immunomodulation via PD-1 Ligand Secretion. *STEM CELLS*, 35(3), 766–776. <https://doi.org/10.1002/stem.2509>
93. Dazzi, F., & Krampera, M. (2011). Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 24(1), 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2011.01.002>
94. Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., Nelson, D. A., Jin, S., & White, E. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 10(1), 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.001>
95. Del Papa, B., Sportoletti, P., Cecchini, D., Rosati, E., Balucani, C., Baldoni, S., Fettucciari, K., Marconi, P., Martelli, M. F., Falzetti, F., & Di Ianni, M. (2013). Notch1 modulates mesenchymal stem cells mediated regulatory T-cell induction: Immunomodulation. *European Journal of Immunology*, 43(1), 182–187. <https://doi.org/10.1002/eji.201242643>
96. DelaRosa, O., Dalemans, W., & Lombardo, E. (2012a). Toll-Like Receptors as Modulators of Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00182>
97. DelaRosa, O., Dalemans, W., & Lombardo, E. (2012b). Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(6), 978–983. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.05.005>
98. DelaRosa, O., Lombardo, E., Beraza, A., Mancheño-Corvo, P., Ramirez, C., Menta, R., Rico, L., Camarillo, E., García, L., Abad, J. L., Trigueros, C., Delgado, M., & Büscher, D. (2009). Requirement of IFN- $\gamma$ -Mediated Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in the Modulation of Lymphocyte Proliferation by Human Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*, 15(10), 2795–2806. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0630>
99. DelaRosa, O., Sánchez-Correa, B., Morgado, S., Ramírez, C., del Río, B., Menta, R., Lombardo, E., Tarazona, R., & Casado, J. G. (2012). Human Adipose-Derived Stem Cells Impair Natural Killer Cell Function and Exhibit Low Susceptibility to Natural Killer-Mediated Lysis. *Stem Cells and Development*, 21(8), 1333–1343. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0139>
100. Delorme, B., Ringe, J., Gallay, N., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Jorgensen, C., Rosset, P., Sensebé, L., Layrolle, P., Häupl, T., & Charbord, P. (2008). Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood*, 111(5), 2631–2635. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-099622>
101. Deng, Q.-J., Xu, X.-F., & Ren, J. (2018). Effects of SDF-1/CXCR4 on the Repair of Traumatic Brain Injury in Rats by Mediating Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(2), 467–477. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0490-4>
102. Deng, Y., Yi, S., Wang, G., Cheng, J., Zhang, Y., Chen, W., Tai, Y., Chen, S., Chen, G., Liu, W., Zhang, Q., & Yang, Y. (2014). Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Dendritic Cells to Acquire Tolerogenic Phenotypes Through the IL-6-Mediated Upregulation of SOCS1. *Stem Cells and Development*, 23(17), 2080–2092. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0559>
103. Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S., & Gianni, A. M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), 3838–3843. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3838>

104. Dimitrov, R., Kyurkchiev, D., Timeva, T., Yunakova, M., Stamenova, M., Shterev, A., & Kyurkchiev, S. (2010). First-trimester human decidua contains a population of mesenchymal stem cells. *Fertility and Sterility*, *93*(1), 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.09.061>
105. Ding, Y., Xu, D., Feng, G., Bushell, A., Muschel, R. J., & Wood, K. J. (2009). Mesenchymal Stem Cells Prevent the Rejection of Fully Allogeneic Islet Grafts by the Immunosuppressive Activity of Matrix Metalloproteinase-2 and -9. *Diabetes*, *58*(8), 1797–1806. <https://doi.org/10.2337/db09-0317>
106. Djouad, F., Charbonnier, L.-M., Bouffi, C., Louis-Pence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C., & Noël, D. (2007). Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism: MESENCHYMAL STEM CELLS INHIBIT THE DIFFERENTIATION OF DENDRITIC CELLS THROUGH AN INTERLEUKIN-6-DEPENDENT MECHANISM. *STEM CELLS*, *25*(8), 2025–2032. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0548>
107. Djouad, F., Fritz, V., Apparailly, F., Louis-Pence, P., Bony, C., Sany, J., Jorgensen, C., & Noël, D. (2005). Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor  $\alpha$  in collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, *52*(5), 1595–1603. <https://doi.org/10.1002/art.21012>
108. Djouad, F., Pence, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noël, D., & Jorgensen, C. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, *102*(10), 3837–3844. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1193>
109. Doi, H., Kitajima, Y., Luo, L., Yan, C., Tateishi, S., Ono, Y., Urata, Y., Goto, S., Mori, R., Masuzaki, H., Shimokawa, I., Hirano, A., & Li, T.-S. (2016). Potency of umbilical cord blood- and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for scarless wound healing. *Scientific Reports*, *6*(1), 18844. <https://doi.org/10.1038/srep18844>
110. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
111. Dong, H., & Chen, X. (2006). Immunoregulatory role of B7-H1 in chronicity of inflammatory responses. *Cellular & Molecular Immunology*, *3*(3), 179–187.
112. Duffy, M. M., Pindjakova, J., Hanley, S. A., McCarthy, C., Weidhofer, G. A., Sweeney, E. M., English, K., Shaw, G., Murphy, J. M., Barry, F. P., Mahon, B. P., Belton, O., Ceredig, R., & Griffin, M. D. (2011). Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell- differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E<sub>2</sub> via the EP4 receptor. *European Journal of Immunology*, *41*(10), 2840–2851. <https://doi.org/10.1002/eji.201141499>
113. Duijvestein, M., Vos, A. C. W., Roelofs, H., Wildenberg, M. E., Wendrich, B. B., Verspaget, H. W., Kooy-Winkelaar, E. M. C., Koning, F., Zwaginga, J. J., Fidder, H. H., Verhaar, A. P., Fibbe, W. E., van den Brink, G. R., & Hommes, D. W. (2010). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: Results of a phase I study. *Gut*, *59*(12), 1662–1669. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.215152>
114. Duijvestein, M., Wildenberg, M. E., Welling, M. M., Hennink, S., Molendijk, I., van Zuylen, V. L., Bosse, T., Vos, A. C. W., de Jonge-Muller, E. S. M., Roelofs, H., van der Weerd, L., Verspaget, H. W., Fibbe, W. E., te Velde, A. A., van den Brink, G. R., & Hommes, D. W. (2011). Pretreatment with Interferon- $\gamma$  Enhances the Therapeutic Activity of Mesenchymal Stromal Cells in Animal Models of Colitis. *STEM CELLS*, *29*(10), 1549–1558. <https://doi.org/10.1002/stem.698>
115. Eberl, G., Colonna, M., Di Santo, J. P., & McKenzie, A. N. J. (2015). Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science*, *348*(6237), aaa6566. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6566>
116. Eggenhofer, E., Steinmann, J. F., Renner, P., Slowik, P., Piso, P., Geissler, E. K., Schlitt, H. J., Dahlke, M. H., & Popp, F. C. (2011). Mesenchymal stem cells together with mycophenolate mofetil inhibit antigen presenting cell and T cell infiltration into allogeneic heart grafts. *Transplant Immunology*, *24*(3), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2010.12.002>
117. El Haddad, N., Heathcote, D., Moore, R., Yang, S., Azzi, J., Mfarrej, B., Atkinson, M., Sayegh, M. H., Lee, J.-S., Ashton-Rickardt, P. G., & Abdi, R. (2011). Mesenchymal stem cells express serine protease inhibitor to evade the host immune response. *Blood*, *117*(4), 1176–1183. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-287979>
118. El-Ansary, M., Abdel-Aziz, I., Mogawer, S., Abdel-Hamid, S., Hammam, O., Teaema, S., & Wahdan, M. (2012). Phase II Trial: Undifferentiated Versus Differentiated Autologous Mesenchymal Stem Cells Transplantation in Egyptian Patients with HCV Induced Liver Cirrhosis. *Stem Cell Reviews and Reports*, *8*(3), 972–981. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9322-y>
119. Eljaafari, A., Tartelin, M.-L., Aissaoui, H., Chevrel, G., Osta, B., Lavocat, F., & Miossec, P. (2012). Bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal cells promote Th17 cell expansion and activation through caspase 1 activation: Contribution to the chronicity of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, *64*(7), 2147–2157. <https://doi.org/10.1002/art.34391>
120. English, K., Barry, F. P., Field-Corbett, C. P., & Mahon, B. P. (2007). IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunology Letters*, *110*(2), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.04.001>
121. English, K., Barry, F. P., & Mahon, B. P. (2008). Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunology Letters*, *115*(1), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.10.002>
122. English, K., Ryan, J. M., Tobin, L., Murphy, M. J., Barry, F. P., & Mahon, B. P. (2009). Cell contact, prostaglandin E<sub>2</sub> and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of

- CD4<sup>+</sup> CD25<sup>High</sup> forkhead box P3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 156(1), 149–160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03874.x>
123. Fajka-Boja, R., Urbán, V. S., Szebeni, G. J., Czibula, Á., Blaskó, A., Kriston-Pál, É., Makra, I., Hornung, Á., Szabó, E., Uher, F., Than, N. G., & Monostori, É. (2016). Galectin-1 is a local but not systemic immunomodulatory factor in mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 18(3), 360–370. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.12.004>
  124. Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M. C., & Puccetti, P. (2002). T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death & Differentiation*, 9(10), 1069–1077. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401073>
  125. Fang, B. (2012). Osteogenic response of mesenchymal stem cells to continuous mechanical strain is dependent on ERK1/2-Runx2 signaling. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.934>
  126. Fong, C.-Y., Chak, L.-L., Biswas, A., Tan, J.-H., Gauthaman, K., Chan, W.-K., & Bongso, A. (2011). Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9166-x>
  127. Forbes, G. M., Sturm, M. J., Leong, R. W., Sparrow, M. P., Segarajasingam, D., Cummins, A. G., Phillips, M., & Herrmann, R. P. (2014). A Phase 2 Study of Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells for Luminal Crohn's Disease Refractory to Biologic Therapy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 12(1), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.06.021>
  128. Foudah, D., Redaelli, S., Donzelli, E., Bentivegna, A., Miloso, M., Dalprà, L., & Tredici, G. (2009). Monitoring the genomic stability of in vitro cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chromosome Research*, 17(8), 1025. <https://doi.org/10.1007/s10577-009-9090-6>
  129. Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K., & Sharpe, A. H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 3015–3029. <https://doi.org/10.1084/jem.20090847>
  130. François, M., Romieu-Mourez, R., Li, M., & Galipeau, J. (2012). Human MSC Suppression Correlates With Cytokine Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Bystander M2 Macrophage Differentiation. *Molecular Therapy*, 20(1), 187–195. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.189>
  131. Franquesa, M., Hoogduijn, M. J., Bestard, O., & Grinyó, J. M. (2012). Immunomodulatory Effect of Mesenchymal Stem Cells on B Cells. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00212>
  132. Franquesa, M., Mensah, F. K., Huizinga, R., Strini, T., Boon, L., Lombardo, E., DelaRosa, O., Laman, J. D., Grinyó, J. M., Weimar, W., Betjes, M. G. H., Baan, C. C., & Hoogduijn, M. J. (2015). Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Abrogate Plasmablast Formation and Induce Regulatory B Cells Independently of T Helper Cells: Modulation of B-Cell Function by Human ASC. *STEM CELLS*, 33(3), 880–891. <https://doi.org/10.1002/stem.1881>
  133. Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. *Cell Proliferation*, 3(4), 393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
  134. Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., & Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology*, 4(5), 267–274.
  135. Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). HETEROTOPIC TRANSPLANTS OF BONE MARROW. *Transplantation*, 6(2), 230–247.
  136. Fujita, M., Kohanbash, G., Fellows-Mayle, W., Hamilton, R. L., Komohara, Y., Decker, S. A., Ohlfest, J. R., & Okada, H. (2011). COX-2 Blockade Suppresses Gliomagenesis by Inhibiting Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research*, 71(7), 2664–2674. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3055>
  137. Fukada, S., Ma, Y., Ohtani, T., Watanabe, Y., Murakami, S., & Yamaguchi, M. (2013). Isolation, characterization, and molecular regulation of muscle stem cells. *Frontiers in Physiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00317>
  138. Fukuchi, Y., Nakajima, H., Sugiyama, D., Hirose, I., Kitamura, T., & Tsuji, K. (2004). Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. *STEM CELLS*, 22(5), 649–658. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-649>
  139. Furlani, D., Li, W., Pittermann, E., Klopsch, C., Wang, L., Knopp, A., Jungebluth, P., Thedinga, E., Havenstein, C., Westien, I., Ugurlucan, M., Li, R.-K., Ma, N., & Steinhoff, G. (2009). A Transformed Cell Population Derived from Cultured Mesenchymal Stem Cells has no Functional Effect after Transplantation into the Injured Heart. *Cell Transplantation*, 18(3), 319–332. <https://doi.org/10.3727/096368909788534906>
  140. Gao, S., Mao, F., Zhang, B., Zhang, L., Zhang, X., Wang, M., Yan, Y., Yang, T., Zhang, J., Zhu, W., Qian, H., & Xu, W. (2014). Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor-κB and signal transducer and activator of transcription 3 pathways. *Experimental Biology and Medicine*, 239(3), 366–375. <https://doi.org/10.1177/1535370213518169>
  141. Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Moreno, B. H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G. A., Zaretsky, J. M., Sun, L., Hugo, W., Wang, X., Parisi, G., Saus, C. P., Torrejon, D. Y., Graeber, T. G., Comin-Anduix, B., Hu-Lieskovan, S., Damoiseaux, R., Lo, R. S., & Ribas, A. (2017). Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Reports*, 19(6), 1189–1201. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.031>
  142. García-González, P., Ubilla-Olguín, G., Catalán, D., Schinnerling, K., & Aguilón, J. C. (2016). Tolerogenic dendritic cells for reprogramming of lymphocyte responses in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 15(11), 1071–1080. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.07.032>
  143. Gargett, C. E., & Masuda, H. (2010). Adult stem cells in the endometrium. *Molecular Human Reproduction*, 16(11), 818–834. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq061>
  144. Gazdic, M., Simovic Markovic, B., Vucicevic, L., Nikolic, T., Djonov, V., Arsenijevic, N., Trajkovic, V., Lukic, M. L., & Volarevic, V. (2018). 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. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(2). <https://doi.org/10.1002/term.2452>
145. Ge, W., Jiang, J., Arp, J., Liu, W., Garcia, B., & Wang, H. (2010). Regulatory T-Cell Generation and Kidney Allograft Tolerance Induced by Mesenchymal Stem Cells Associated With Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression. *Transplantation*, 90(12), 1312–1320. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181fed001>
  146. Gebler, A., Zabel, O., & Seliger, B. (2012). The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends in Molecular Medicine*, 18(2), 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.10.004>
  147. Ghannam, S., Pène, J., Torcy-Moquet, G., Jorgensen, C., & Yssel, H. (2010). Mesenchymal Stem Cells Inhibit Human Th17 Cell Differentiation and Function and Induce a T Regulatory Cell Phenotype. *The Journal of Immunology*, 185(1), 302–312. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902007>
  148. Ghiotto, M., Gauthier, L., Serriari, N., Pastor, S., Truneh, A., Nunes, J. A., & Olive, D. (2010). PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. *International Immunology*, 22(8), 651–660. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxq049>
  149. Gieseke, F., Böhringer, J., Bussolari, R., Dominici, M., Handgretinger, R., & Müller, I. (2010). Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood*, 116(19), 3770–3779. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-270777>
  150. Gieseke, F., Kruchen, A., Tzaribachev, N., Bentzien, F., Dominici, M., & Müller, I. (2013). Proinflammatory stimuli induce galectin-9 in human mesenchymal stromal cells to suppress T-cell proliferation: Immunomodulation. *European Journal of Immunology*, 43(10), 2741–2749. <https://doi.org/10.1002/eji.201343335>
  151. Gieseke, F., Schütt, B., Viebahn, S., Koscielniak, E., Friedrich, W., Handgretinger, R., & Müller, I. (2007). Human multipotent mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of PBMCs independently of IFN $\gamma$ R1 signaling and IDO expression. *Blood*, 110(6), 2197–2200. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-04-083162>
  152. Gilbert, L., He, X., Farmer, P., Rubin, J., Drissi, H., van Wijnen, A. J., Lian, J. B., Stein, G. S., & Nanes, M. S. (2002). Expression of the Osteoblast Differentiation Factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/PeBP2 $\alpha$ A) Is Inhibited by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 277(4), 2695–2701. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106339200>
  153. Giuliani, M., Fleury, M., Vernochet, A., Ketrroussi, F., Clay, D., Azzarone, B., Lataillade, J. J., & Durrbach, A. (2011). Long-Lasting Inhibitory Effects of Fetal Liver Mesenchymal Stem Cells on T-Lymphocyte Proliferation. *PLoS ONE*, 6(5), e19988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019988>
  154. Glennie, S., Socero, I., Dyson, P. J., Lam, E. W.-F., & Dazzi, F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 105(7), 2821–2827. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3696>
  155. Gneccchi, M., & Melo, L. (2009). Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Expansion, Characterization, Viral Transduction, and Production of Conditioned Medium. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 482, 281–294. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-060-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-060-7_18)
  156. Gordon, S., & Plüddemann, A. (2017). Tissue macrophages: Heterogeneity and functions. *BMC Biology*, 15(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0392-4>
  157. Gorelik, L., Constant, S., & Flavell, R. A. (2002). Mechanism of Transforming Growth Factor  $\beta$ -induced Inhibition of T Helper Type 1 Differentiation. *Journal of Experimental Medicine*, 195(11), 1499–1505. <https://doi.org/10.1084/jem.20012076>
  158. Götherström, C., Lundqvist, A., Duprez, I. R., Childs, R., Berg, L., & le Blanc, K. (2011). Fetal and adult multipotent mesenchymal stromal cells are killed by different pathways. *Cytotherapy*, 13(3), 269–278. <https://doi.org/10.3109/14653249.2010.523077>
  159. Gough, D. J., Levy, D. E., Johnstone, R. W., & Clarke, C. J. (2008). IFN $\gamma$  signaling—Does it mean JAK–STAT? *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 19(5–6), 383–394. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.08.004>
  160. Grigorian, A., Torossian, S., & Demetriou, M. (2009). T-cell growth, cell surface organization, and the galectin-glycoprotein lattice. *Immunological Reviews*, 230(1), 232–246. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00796.x>
  161. Grinnemo, K.-H., Löfling, M., Nathanson, L., Baumgartner, R., Ketelhuth, D. F. J., Beljanski, V., Davies, L. C., & Österholm, C. (2019). Immunomodulatory effects of interferon- $\gamma$  on human fetal cardiac mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 371. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1489-1>
  162. Groh, M., Maitra, B., Szekely, E., & Koc, O. (2005). Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Experimental Hematology*, 33(8), 928–934. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.05.002>
  163. Guo, J., Zhang, H., Xia, J., Hou, J., Wang, Y., Yang, T., Wang, S., Zhang, X., Chen, X., & Wu, X. (2018). Interleukin-1 $\beta$  induces intercellular adhesion molecule-1 expression, thus enhancing the adhesion between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells via the p38 MAPK signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3424>
  164. Guo, Y., Chan, K.-H., Lai, W.-H., Siu, C.-W., Kwan, S.-C., Tse, H.-F., Wing-Lok Ho, P., & Wing-Man Ho, J. (2013). Human Mesenchymal Stem Cells Upregulate CD1d<sup>high</sup> CD5<sup>+</sup> Regulatory B Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Neuroimmunomodulation*, 20(5), 294–303. <https://doi.org/10.1159/000351450>
  165. Guo, Z., Zheng, C., Chen, Z., Gu, D., Du, W., Ge, J., Han, Z., & Yang, R. (2009). Fetal BM-derived mesenchymal stem cells promote the expansion of human Th17 cells, but inhibit the production of Th1 cells. *European Journal of Immunology*, 39(10), 2840–2849. <https://doi.org/10.1002/eji.200839070>
  166. Han, J., Park, J., & Kim, B.-S. (2015). Integration of mesenchymal stem cells with nanobiomaterials for the repair of myocardial infarction. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 95, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.002>
  167. Han, Z. C., Du, W. J., Han, Z. B., & Liang, L. (2017). New insights into the heterogeneity and functional diversity of human mesenchymal stem cells. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 28(s1), S29–S45. <https://doi.org/10.3233/BME-171622>

168. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
169. Harari, O., & Liao, J. (2004). Inhibition of MHC II Gene Transcription by Nitric Oxide and Antioxidants. *Current Pharmaceutical Design*, *10*(8), 893–898. <https://doi.org/10.2174/1381612043452893>
170. Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, *9*(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
171. He, M., Jiang, M., Zhou, Y., Li, F., Yang, M., Fan, Y., Xie, Y., Beejadhursing, R., Feng, L., & Deng, D. (2018). Impaired Gal-9 Dysregulates the PBMC-Induced Th1/Th2 Imbalance in Abortion-Prone Matings. *Journal of Immunology Research*, *2018*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/9517842>
172. He, Y., & Tian, Z. (2017). NK cell education via nonclassical MHC and non-MHC ligands. *Cellular & Molecular Immunology*, *14*(4), 321–330. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.26>
173. He, Y., Zhou, S., Liu, H., Shen, B., Zhao, H., Peng, K., & Wu, X. (2015). Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Transfected Mesenchymal Stem Cells Induce Kidney Allograft Tolerance by Increasing the Production and Function of Regulatory T Cells. *Transplantation*, *99*(9), 1829–1838. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000856>
174. Healy, M. E., Bergin, R., Mahon, B. P., & English, K. (2015). Mesenchymal Stromal Cells Protect Against Caspase 3-Mediated Apoptosis of CD19<sup>+</sup> Peripheral B Cells Through Contact-Dependent Upregulation of VEGF. *Stem Cells and Development*, *24*(20), 2391–2402. <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0089>
175. Hemedda, H., Jakob, M., Ludwig, A.-K., Giebel, B., Lang, S., & Brandau, S. (2010). Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Differentially Affect Cytokine Expression and Migration Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development*, *19*(5), 693–706. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0365>
176. Hennig, T., Lorenz, H., Thiel, A., Goetzke, K., Dickhut, A., Geiger, F., & Richter, W. (2007). Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGF $\beta$  receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *Journal of Cellular Physiology*, *211*(3), 682–691. <https://doi.org/10.1002/jcp.20977>
177. Hodge, D. L., Martinez, A., Julias, J. G., Taylor, L. S., & Young, H. A. (2002). Regulation of Nuclear Gamma Interferon Gene Expression by Interleukin 12 (IL-12) and IL-2 Represents a Novel Form of Posttranscriptional Control. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(6), 1742–1753. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.6.1742-1753.2002>
178. Hof-Nahor, I., Leshansky, L., Shvitiel, S., Eldor, L., Aberdam, D., Itskovitz-Eldor, J., & Berrih-Aknin, S. (2012). Human mesenchymal stem cells shift CD8<sup>+</sup> T cells towards a suppressive phenotype by inducing tolerogenic monocytes. *Journal of Cell Science*, *jcs.108860*. <https://doi.org/10.1242/jcs.108860>
179. Hong, J., Hueckelhoven, A., Wang, L., Schmitt, A., Wuchter, P., Tabarkiewicz, J., Kleist, C., Bieback, K., Ho, A. D., & Schmitt, M. (2016). Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates inhibition of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell proliferation by human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, *18*(5), 621–629. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.01.009>
180. Horie, M., Choi, H., Lee, R. H., Reger, R. L., Ylostalo, J., Muneta, T., Sekiya, I., & Prockop, D. J. (2012). Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen. *Osteoarthritis and Cartilage*, *20*(10), 1197–1207. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.06.002>
181. Horwitz, E., & Dominici, M. (2008). How do mesenchymal stromal cells exert their therapeutic benefit? *Cytotherapy*, *10*(8), 771–774. <https://doi.org/10.1080/14653240802618085>
182. Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Deans, R. J., Krause, D. S., & Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *7*(5), 393–395. <https://doi.org/10.1080/14653240500319234>
183. Hsieh, J.-Y., Fu, Y.-S., Chang, S.-J., Tsuang, Y.-H., & Wang, H.-W. (2010). Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. *Stem Cells and Development*, *19*(12), 1895–1910. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0485>
184. Hsu, W.-T., Lin, C.-H., Chiang, B.-L., Jui, H.-Y., Wu, K. K.-Y., & Lee, C.-M. (2013). Prostaglandin E<sub>2</sub> Potentiates Mesenchymal Stem Cell-Induced IL-10<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells To Control Transplant Arteriosclerosis. *The Journal of Immunology*, *190*(5), 2372–2380. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202996>
185. Hu, X., Chakravarty, S. D., & Ivashkiv, L. B. (2008). Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunological Reviews*, *226*(1), 41–56. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00707.x>
186. Hu, X., Xu, Y., Zhong, Z., Wu, Y., Zhao, J., Wang, Y., Cheng, H., Kong, M., Zhang, F., Chen, Q., Sun, J., Li, Q., Jin, J., Li, Q., Chen, L., Wang, C., Zhan, H., Fan, Y., Yang, Q., ... Wang, J. (2016). A Large-Scale Investigation of Hypoxia-Preconditioned Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Myocardial Repair in Nonhuman Primates: Paracrine Activity Without Remuscularization. *Circulation Research*, *118*(6), 970–983. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307516>
187. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal*, *11*(11), 3887–3895. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x>
188. Ito, T., Sawada, R., Fujiwara, Y., & Tsuchiya, T. (2008). FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF- $\beta$  signaling. *Cytotechnology*, *56*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10616-007-9092-1>
189. Ivanova-Todorova, E., Bochev, I., Dimitrov, R., Belemezova, K., Mourdjeva, M., Kyurkchiev, S., Kinov, P., Altankova, I., & Kyurkchiev, D. (2012). Conditioned Medium from Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induces CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Cells and Increases IL-10 Secretion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/295167>

190. Izadpanah, R., Kaushal, D., Kriedt, C., Tsien, F., Patel, B., Dufour, J., & Bunnell, B. A. (2008). Long-term *In vitro* Expansion Alters the Biology of Adult Mesenchymal Stem Cells. *Cancer Research*, 68(11), 4229–4238. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5272>
191. Jackson, K. A., Mi, T., & Goodell, M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(25), 14482–14486. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.25.14482>
192. Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Bowitz Larsen, K., Atesoh Awuh, J., Øvervatn, A., McMahon, M., Hayes, J. D., & Johansen, T. (2010). P62/SQSTM1 Is a Target Gene for Transcription Factor NRF2 and Creates a Positive Feedback Loop by Inducing Antioxidant Response Element-driven Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22576–22591. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118976>
193. Jang, I. K., Yoon, H. H., Yang, M. S., Lee, J. E., Lee, D.-H., Lee, M. W., Kim, D. S., & Park, J. E. (2014). B7-H1 Inhibits T Cell Proliferation Through MHC Class II in Human Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation Proceedings*, 46(5), 1638–1641. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.12.059>
194. Jang, Y. O., Kim, Y. J., Baik, S. K., Kim, M. Y., Eom, Y. W., Cho, M. Y., Park, H. J., Park, S. Y., Kim, B. R., Kim, J. W., Soo Kim, H., Kwon, S. O., Choi, E. H., & Kim, Y. M. (2014). Histological improvement following administration of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: A pilot study. *Liver International*, 34(1), 33–41. <https://doi.org/10.1111/liv.12218>
195. Ji, X. J., Ma, C. J., Wang, J. M., Wu, X. Y., Niki, T., Hirashima, M., Moorman, J. P., & Yao, Z. Q. (2013). HCV-infected hepatocytes drive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cell development through the Tim-3/Gal-9 pathway: Immunomodulation. *European Journal of Immunology*, 43(2), 458–467. <https://doi.org/10.1002/eji.201242768>
196. Jiang, D., Muschhammer, J., Qi, Y., Kügler, A., de Vries, J. C., Saffarzadeh, M., Sindrilaru, A., Beken, S. V., Wlaschek, M., Kluth, M. A., Ganss, C., Frank, N. Y., Frank, M. H., Preissner, K. T., & Scharffetter-Kochanek, K. (2016). Suppression of Neutrophil-Mediated Tissue Damage—A Novel Skill of Mesenchymal Stem Cells: MSCs Suppress Neutrophil-Mediated Tissue Damage. *STEM CELLS*, 34(9), 2393–2406. <https://doi.org/10.1002/stem.2417>
197. Jiang, R., Han, Z., Zhuo, G., Qu, X., Li, X., Wang, X., Shao, Y., Yang, S., & Han, Z. C. (2011). Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: A pilot study. *Frontiers of Medicine*, 5(1), 94–100. <https://doi.org/10.1007/s11684-011-0116-z>
198. Jiang, X.-X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S.-X., Wu, Y., Yu, X.-D., & Mao, N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 105(10), 4120–4126. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0586>
199. Joerger-Messerli, M. S., Marx, C., Oppliger, B., Mueller, M., Surbek, D. V., & Schoeberlein, A. (2016). Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly and Amniotic Fluid. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 31, 30–44. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.07.006>
200. Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., & Yoo, J. U. (1998). In Vitro Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells. *Experimental Cell Research*, 238(1), 265–272. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3858>
201. Justino Ferreira, R., Carolina Irioda, A., Correa Cunha, R., Cesar Francisco, J., Cesar Guarita-Souza, L., Venkata Naga Srikanth, G., Nityanand, S., Rosati, R., Carlos Chachques, J., & Athayde Teixeira de Carvalho, K. (2012). Controversies About the Chromosomal Stability of Cultivated Mesenchymal Stem Cells: Their Clinical Use is it Safe? *Current Stem Cell Research & Therapy*, 7(5), 356–363. <https://doi.org/10.2174/157488812802481472>
202. Kabat, M., Bobkov, I., Kumar, S., & Grumet, M. (2020). Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004–2018: Is efficacy optimal in a narrow dose range? *STEM CELLS Translational Medicine*, 9(1), 17–27. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0202>
203. Kapasi, K., Albert, S. E., Yie, S.-M., Zavazava, N., & Librach, C. L. (2000). HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response: Effect of HLA-G on allo-CTL response generation. *Immunology*, 101(2), 191–200. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00109.x>
204. Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*, 34(5), 637–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>
205. Kehoe, O., Cartwright, A., Askari, A., El Haj, A. J., & Middleton, J. (2014). Intra-articular injection of mesenchymal stem cells leads to reduced inflammation and cartilage damage in murine antigen-induced arthritis. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 157. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-157>
206. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2008). PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology*, 26(1), 677–704. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>
207. Kerkelä, E., Laitinen, A., Rabinä, J., Valkonen, S., Takatalo, M., Larjo, A., Veijola, J., Lampinen, M., Siljander, P., Lehenkari, P., Alftan, K., & Laitinen, S. (2016). Adenosinergic Immunosuppression by Human Mesenchymal Stromal Cells Requires Co-Operation with T cells: Adenosinergic Immunosuppression by Human MSCs. *STEM CELLS*, 34(3), 781–790. <https://doi.org/10.1002/stem.2280>
208. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *STEM CELLS*, 24(5), 1294–1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>
209. Kestendjieva, S., Kyurkchiev, D., Tsvetkova, G., Mehandjiev, T., Dimitrov, A., Nikolov, A., & Kyurkchiev, S. (2008). Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biology International*, 32(7), 724–732. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.02.002>
210. Kharazih, P., Hellström, P. M., Noorinayer, B., Farzaneh, F., Aghajani, K., Jafari, F., Telkabadi, M., Atashi, A., Honardoost, M., Zali, M. R., & Soleimani, M. (2009). Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: A phase I–II clinical trial. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 21(10), 1199–1205. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e32832a1f6c>

211. Khayrullina, T., Yen, J.-H., Jing, H., & Ganea, D. (2008). In Vitro Differentiation of Dendritic Cells in the Presence of Prostaglandin E<sub>2</sub> Alters the IL-12/IL-23 Balance and Promotes Differentiation of Th17 Cells. *The Journal of Immunology*, 181(1), 721–735. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.721>
212. Kilroy, G. E., Foster, S. J., Wu, X., Ruiz, J., Sherwood, S., Heifetz, A., Ludlow, J. W., Stricker, D. M., Potiny, S., Green, P., Halvorsen, Y.-D. C., Cheatham, B., Storms, R. W., & Gimble, J. M. (2007). Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: Expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *Journal of Cellular Physiology*, 212(3), 702–709. <https://doi.org/10.1002/jcp.21068>
213. Kim, A., Yu, H. Y., Heo, J., Song, M., Shin, J.-H., Lim, J., Yoon, S.-J., Kim, Y., Lee, S., Kim, S. W., Oh, W., Choi, S. J., Shin, D.-M., & Choo, M.-S. (2016). Mesenchymal stem cells protect against the tissue fibrosis of ketamine-induced cystitis in rat bladder. *Scientific Reports*, 6(1), 30881. <https://doi.org/10.1038/srep30881>
214. Kim, D. S., Jang, I. K., Lee, M. W., Ko, Y. J., Lee, D.-H., Lee, J. W., Sung, K. W., Koo, H. H., & Yoo, K. H. (2018). Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- $\gamma$ . *EBioMedicine*, 28, 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.01.002>
215. Kim, H.-S., Yun, J.-W., Shin, T.-H., Lee, S.-H., Lee, B.-C., Yu, K.-R., Seo, Y., Lee, S., Kang, T.-W., Choi, S. W., Seo, K.-W., & Kang, K.-S. (2015). Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cell-Derived PGE<sub>2</sub> and TGF- $\beta$ 1 Alleviate Atopic Dermatitis by Reducing Mast Cell Degranulation: Regulation of Mast Cell Degranulation by MSCs. *STEM CELLS*, 33(4), 1254–1266. <https://doi.org/10.1002/stem.1913>
216. Kim, J., & Hematti, P. (2009). Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology*, 37(12), 1445–1453. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.09.004>
217. Kim, J.-A., Im, K. O., Park, S. N., Kwon, J. S., Kim, S. Y., Oh, K., Lee, D.-S., Kim, M. K., Kim, S. W., Jang, M., Lee, G., Oh, Y.-M., Lee, S. D., & Lee, D. S. (2015). Cytogenetic heterogeneity and their serial dynamic changes during acquisition of cytogenetic aberrations in cultured mesenchymal stem cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 777, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.04.003>
218. Kim, J.-Y., Kim, D. H., Kim, J. H., Lee, D., Jeon, H. B., Kwon, S.-J., Kim, S. M., Yoo, Y. J., Lee, E. H., Choi, S. J., Seo, S. W., Lee, J. I., Na, D. L., Yang, Y. S., Oh, W., & Chang, J. W. (2012). Soluble intracellular adhesion molecule-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell reduces amyloid- $\beta$  plaques. *Cell Death & Differentiation*, 19(4), 680–691. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.140>
219. Kim, S., Lee, H.-J., Jeon, M.-S., Yi, T., & Song, S. U. (2015). Galectin-9 is Involved in Immunosuppression Mediated by Human Bone Marrow-derived Clonal Mesenchymal Stem Cells. *Immune Network*, 15(5), 241. <https://doi.org/10.4110/in.2015.15.5.241>
220. Koch, M. A., Tucker-Heard, G., Perdue, N. R., Killebrew, J. R., Urdahl, K. B., & Campbell, D. J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nature Immunology*, 10(6), 595–602. <https://doi.org/10.1038/ni.1731>
221. Koelling, S., Kruegel, J., Irmer, M., Path, J. R., Sadowski, B., Miro, X., & Miosge, N. (2009). Migratory Chondrogenic Progenitor Cells from Repair Tissue during the Later Stages of Human Osteoarthritis. *Cell Stem Cell*, 4(4), 324–335. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.01.015>
222. Koga, S., Hozumi, K., Hirano, K., Yazawa, M., Teroota, T., Minoda, A., Nagasawa, T., Koyasu, S., & Moro, K. (2018). Peripheral PDGFR $\alpha$ +gp38+ mesenchymal cells support the differentiation of fetal liver-derived ILC2. *Journal of Experimental Medicine*, 215(6), 1609–1626. <https://doi.org/10.1084/jem.20172310>
223. Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13(3), 159–175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
224. Krampera, M. (2011). Mesenchymal stromal cell ‘licensing’: A multistep process. *Leukemia*, 25(9), 1408–1414. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.108>
225. Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., & Annunziato, F. (2006). Role for Interferon- $\gamma$  in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 24(2), 386–398. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0008>
226. Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E., & Dazzi, F. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 101(9), 3722–3729. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2104>
227. Krampera, M., Pasini, A., Pizzolo, G., Cosmi, L., Romagnani, S., & Annunziato, F. (2006). Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(4), 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.02.008>
228. Kratchmarova, I., Blagoev, B., Haack-Sorensen, M., Kassem, M., & Mann, M. (2005). Mechanism of Divergent Growth Factor Effects in Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Science*, 308(5727), 1472–1477. <https://doi.org/10.1126/science.1107627>
229. Kronsteiner, B., Wolbank, S., Peterbauer, A., Hackl, C., Redl, H., van Griensven, M., & Gabriel, C. (2011). Human Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue and Amnion Influence T-Cells Depending on Stimulation Method and Presence of Other Immune Cells. *Stem Cells and Development*, 20(12), 2115–2126. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0031>
230. Kuznetsov, S. A., Krebsbach, P. H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D., & Robey, P. G. (1997). Single-Colony Derived Strains of Human Marrow Stromal Fibroblasts Form Bone After Transplantation In Vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(9), 1335–1347. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.9.1335>
231. Kyurkchiev, D. (2014). Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 6(5), 552. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.552>

232. Lacey, D. C., Simmons, P. J., Graves, S. E., & Hamilton, J. A. (2009). Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: Implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis and Cartilage*, *17*(6), 735–742. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.11.011>
233. Laranjeira, P., Pedrosa, M., Pedreiro, S., Gomes, J., Martinho, A., Antunes, B., Ribeiro, T., Santos, F., Trindade, H., & Paiva, A. (2015). Effect of human bone marrow mesenchymal stromal cells on cytokine production by peripheral blood naive, memory, and effector T cells. *Stem Cell Research & Therapy*, *6*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/scrt537>
234. Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R., Greenfield, E. A., Bourque, K., Bousiotis, V. A., Carter, L. L., Carreno, B. M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., ... Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*, *2*(3), 261–268. <https://doi.org/10.1038/85330>
235. Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M. E., Remberger, M., Dini, G., Egeler, R. M., Bacigalupo, A., Fibbe, W., & Ringdén, O. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: A phase II study. *The Lancet*, *371*(9624), 1579–1586. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60690-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60690-X)
236. Le Blanc, K., & Mougiakakos, D. (2012). Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature Reviews Immunology*, *12*(5), 383–396. <https://doi.org/10.1038/nri3209>
237. Le Blanc, K., Rasmusson, I., Gotherstrom, C., Seidel, C., Sundberg, B., Sundin, M., Rosendahl, K., Tammik, C., & Ringden, O. (2004). Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Expression of CD25 (Interleukin-2 Receptor) and CD38 on Phytohaemagglutinin-Activated Lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, *60*(3), 307–315. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01483.x>
238. Le Blanc, K., & Ringdén, O. (2005). Immunobiology of Human Mesenchymal Stem Cells and Future Use in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *11*(5), 321–334. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2005.01.005>
239. Le Blanc, K., Samuelsson, H., Gustafsson, B., Remberger, M., Sundberg, B., Arvidson, J., Ljungman, P., Lönnies, H., Nava, S., & Ringdén, O. (2007). Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*, *21*(8), 1733–1738. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404777>
240. Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., & Ringdén, O. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, *31*(10), 890–896. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(03\)00110-3](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(03)00110-3)
241. Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S. E., & Ringden, O. (2003). Mesenchymal Stem Cells Inhibit and Stimulate Mixed Lymphocyte Cultures and Mitogenic Responses Independently of the Major Histocompatibility Complex. *Scandinavian Journal of Immunology*, *57*(1), 11–20. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2003.01176.x>
242. Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W.-M., Lee, K.-D., Hsieh, S.-L., & Chen, T.-H. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, *103*(5), 1669–1675. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1670>
243. Lee, R. H., Pulin, A. A., Seo, M. J., Kota, D. J., Ylostalo, J., Larson, B. L., Semprun-Prieto, L., Delafontaine, P., & Prockop, D. J. (2009). Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-inflammatory Protein TSG-6. *Cell Stem Cell*, *5*(1), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.003>
244. Lee, S., Szilagyi, E., Chen, L., Premanand, K., DiPietro, L. A., Ennis, W., & Bartholomew, A. M. (2013). Activated mesenchymal stem cells increase wound tensile strength in aged mouse model via macrophages. *Journal of Surgical Research*, *181*(1), 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.05.040>
245. Lees, J. R., & Cross, A. H. (2007). A little stress is good: IFN- $\gamma$ , demyelination, and multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(2), 297–299. <https://doi.org/10.1172/JCI31254>
246. Lepelletier, Y., Lecourt, S., Renand, A., Arnulf, B., Vanneaux, V., Femand, J.-P., Menasché, P., Domet, T., Marolleau, J.-P., Hermine, O., & Larghero, J. (2010). Galectin-1 and Semaphorin-3A Are Two Soluble Factors Conferring T-Cell Immunosuppression to Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell. *Stem Cells and Development*, *19*(7), 1075–1079. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0212>
247. Li, H., Wang, W., Wang, G., Hou, Y., Xu, F., Liu, R., Wang, F., Xue, J., Hu, T., & Luan, X. (2015). Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  promote the ability of human placenta-derived mesenchymal stromal cells to express programmed death ligand-2 and induce the differentiation of CD4<sup>+</sup>interleukin-10<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>interleukin-10<sup>+</sup>Treg subsets. *Cytotherapy*, *17*(11), 1560–1571. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.07.018>
248. Li, L., Jaiswal, P. K., Makhoul, G., Jurakhan, R., Selvasandran, K., Ridwan, K., & Cecere, R. (2017). Hypoxia modulates cell migration and proliferation in placenta-derived mesenchymal stem cells. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *154*(2), 543–552.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2017.03.141>
249. Li, L., & Xie, T. (2005). *STEM CELL NICHE: Structure and Function*. 30.
250. Li, S., Xie, Q., Zeng, Y., Zou, C., Liu, X., Wu, S., Deng, H., Xu, Y., Li, X. C., & Dai, Z. (2014). A naturally occurring CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> T-cell subset as a memory-like Treg family. *Cellular & Molecular Immunology*, *11*(4), 326–331. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.25>
251. Li, W., Ren, G., Huang, Y., Su, J., Han, Y., Li, J., Chen, X., Cao, K., Chen, Q., Shou, P., Zhang, L., Yuan, Z.-R., Roberts, A. I., Shi, S., Le, A. D., & Shi, Y. (2012). Mesenchymal stem cells: A double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death & Differentiation*, *19*(9), 1505–1513. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.26>
252. Li, X., Lan, X., Zhao, Y., Wang, G., Shi, G., Li, H., Hu, Y., Xu, X., Zhang, B., Ye, K., Gu, X., Du, C., & Wang, H. (2019). SDF-1/CXCR4 axis enhances the immunomodulation of human endometrial regenerative cells in alleviating experimental colitis. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1298-6>

253. Li, Y., Kong, N., Li, Z., Tian, R., Liu, X., Liu, G., Wang, K., & Yang, P. (2019). Bone marrow macrophage M2 polarization and adipose-derived stem cells osteogenic differentiation synergistically promote rehabilitation of bone damage. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(12), 19891–19901. <https://doi.org/10.1002/jcb.29297>
254. Li, Y., & Lin, F. (2012). Mesenchymal stem cells are injured by complement after their contact with serum. *Blood*, *120*(17), 3436–3443. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-420612>
255. Li, Y. M., Shi, Y. Y., Li, Y., Yan, L., Tang, J. T., Bai, Y. J., Wu, X. J., Dai, B., Zou, Y. G., & Wang, L. L. (2018). Soluble Tim-3 and Gal-9 are associated with renal allograft dysfunction in kidney transplant recipients: A cross-sectional study. *International Immunopharmacology*, *55*, 330–335. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.008>
256. Li, Y., Zhang, D., Xu, L., Dong, L., Zheng, J., Lin, Y., Huang, J., Zhang, Y., Tao, Y., Zang, X., Li, D., & Du, M. (2019). Cell–cell contact with proinflammatory macrophages enhances the immunotherapeutic effect of mesenchymal stem cells in two abortion models. *Cellular & Molecular Immunology*, *16*(12), 908–920. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0204-6>
257. Li, Y.-P., Paczesny, S., Lauret, E., Poirault, S., Bordigoni, P., Mekhloufi, F., Hequet, O., Bertrand, Y., Ou-Yang, J.-P., Stoltz, J.-F., Miossec, P., & Eljaafari, A. (2008a). Human Mesenchymal Stem Cells License Adult CD34<sup>+</sup> Hemopoietic Progenitor Cells to Differentiate into Regulatory Dendritic Cells through Activation of the Notch Pathway. *The Journal of Immunology*, *180*(3), 1598–1608. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1598>
258. Li, Y.-P., Paczesny, S., Lauret, E., Poirault, S., Bordigoni, P., Mekhloufi, F., Hequet, O., Bertrand, Y., Ou-Yang, J.-P., Stoltz, J.-F., Miossec, P., & Eljaafari, A. (2008b). Human Mesenchymal Stem Cells License Adult CD34<sup>+</sup> Hemopoietic Progenitor Cells to Differentiate into Regulatory Dendritic Cells through Activation of the Notch Pathway. *The Journal of Immunology*, *180*(3), 1598–1608. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1598>
259. Liang, C., Jiang, E., Yao, J., Wang, M., Chen, S., Zhou, Z., Zhai, W., Ma, Q., Feng, S., & Han, M. (2018). Interferon- $\gamma$  mediates the immunosuppression of bone marrow mesenchymal stem cells on T-lymphocytes *in vitro*. *Hematology*, *23*(1), 44–49. <https://doi.org/10.1080/10245332.2017.1333245>
260. Liebergall, M., Schroeder, J., Mosheiff, R., Gazit, Z., Yoram, Z., Rasooly, L., Daskal, A., Khoury, A., Weil, Y., & Beyth, S. (2013). Stem Cell–based Therapy for Prevention of Delayed Fracture Union: A Randomized and Prospective Preliminary Study. *Molecular Therapy*, *21*(8), 1631–1638. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.109>
261. Lim, J.-H., Kim, J.-S., Yoon, I.-H., Shin, J.-S., Nam, H.-Y., Yang, S.-H., Kim, S.-J., & Park, C.-G. (2010). Immunomodulation of Delayed-Type Hypersensitivity Responses by Mesenchymal Stem Cells Is Associated with Bystander T Cell Apoptosis in the Draining Lymph Node. *The Journal of Immunology*, *185*(7), 4022–4029. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902723>
262. Lin, R., Ma, H., Ding, Z., Shi, W., Qian, W., Song, J., & Hou, X. (2013). Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Favor the Immunosuppressive T Cells Skewing in a *Helicobacter Pylori* Model of Gastric Cancer. *Stem Cells and Development*, *22*(21), 2836–2848. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0166>
263. Ling, W., Zhang, J., Yuan, Z., Ren, G., Zhang, L., Chen, X., Rabson, A. B., Roberts, A. I., Wang, Y., & Shi, Y. (2014). Mesenchymal Stem Cells Use IDO to Regulate Immunity in Tumor Microenvironment. *Cancer Research*, *74*(5), 1576–1587. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1656>
264. Liotta, F., Angeli, R., Cosmi, L., Fili, L., Manuelli, C., Frosali, F., Mazzinghi, B., Maggi, L., Pasini, A., Lisi, V., Santarasci, V., Consoloni, L., Angelotti, M. L., Romagnani, P., Parronchi, P., Krampera, M., Maggi, E., Romagnani, S., & Annunziato, F. (2008). Toll-Like Receptors 3 and 4 Are Expressed by Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Can Inhibit Their T-Cell Modulatory Activity by Impairing Notch Signaling. *Stem Cells*, *26*(1), 279–289. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0454>
265. Liu, G.-Y., Xu, Y., Li, Y., Wang, L.-H., Liu, Y.-J., & Zhu, D. (2013). Secreted galectin-3 as a possible biomarker for the immunomodulatory potential of human umbilical cord mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, *15*(10), 1208–1217. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.05.011>
266. Liu, J., Kuwabara, A., Kamio, Y., Hu, S., Park, J., Hashimoto, T., & Lee, J.-W. (2016). Human Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles Prevent the Rupture of Intracranial Aneurysm in Part by Suppression of Mast Cell Activation via a PGE2-Dependent Mechanism: MSC-Derived MVs Stabilize Intracranial Aneurysm. *STEM CELLS*, *34*(12), 2943–2955. <https://doi.org/10.1002/stem.2448>
267. Liu, J. W., Dunoyer-Geindre, S., Serre-Beinier, V., Mai, G., Lambert, J.-F., Fish, R. J., Pernod, G., Buehler, L., Bounameaux, H., & Kruithof, E. K. O. (2007). Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *5*(4), 826–834. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02381.x>
268. Liu, O., Xu, J., Ding, G., Liu, D., Fan, Z., Zhang, C., Chen, W., Ding, Y., Tang, Z., & Wang, S. (2013). Periodontal Ligament Stem Cells Regulate B Lymphocyte Function via Programmed Cell Death Protein 1. *STEM CELLS*, *31*(7), 1371–1382. <https://doi.org/10.1002/stem.1387>
269. Liu, Q., Zheng, H., Chen, X., Peng, Y., Huang, W., Li, X., Li, G., Xia, W., Sun, Q., & Xiang, A. P. (2015). Human mesenchymal stromal cells enhance the immunomodulatory function of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> regulatory T cells. *Cellular & Molecular Immunology*, *12*(6), 708–718. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.118>
270. Liu, W., Zhang, S., Gu, S., Sang, L., & Dai, C. (2015). Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages to Alleviate Experimental Colitis Through TGF $\beta$ 1. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *35*(3), 858–865. <https://doi.org/10.1159/000369743>
271. Liu, X., Qu, X., Chen, Y., Liao, L., Cheng, K., Shao, C., Zenke, M., Keating, A., & Zhao, R. C. H. (2012). Mesenchymal Stem/Stromal Cells Induce the Generation of Novel IL-10–Dependent Regulatory Dendritic Cells by SOCS3 Activation. *The Journal of Immunology*, *189*(3), 1182–1192. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102996>
272. Liu, X., Ren, S., Qu, X., Ge, C., Cheng, K., & Zhao, R. C. H. (2015). Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cells differentiation via IFN- $\gamma$ -mediated SOCS3 activation. *Immunologic Research*, *61*(3), 219–229. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8612-2>

273. Liu, Y., Jing, H., Kou, X., Chen, C., Liu, D., Jin, Y., Lu, L., & Shi, S. (2018). PD-1 is required to maintain stem cell properties in human dental pulp stem cells. *Cell Death & Differentiation*, *25*(7), 1350–1360. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0077-8>
274. Liu, Y., Wang, L., Kikui, T., Akiyama, K., Chen, C., Xu, X., Yang, R., Chen, W., Wang, S., & Shi, S. (2011). Mesenchymal stem cell–based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *Nature Medicine*, *17*(12), 1594–1601. <https://doi.org/10.1038/nm.2542>
275. Liu, Z., Gao, L., Wang, P., Xie, Z., Cen, S., Li, Y., Wu, X., Wang, L., Su, H., Deng, W., Wang, S., Li, D., Li, J., Ouyang, Y., Wu, Y., & Shen, H. (2017). TNF- $\alpha$  Induced the Enhanced Apoptosis of Mesenchymal Stem Cells in Ankylosing Spondylitis by Overexpressing TRAIL-R2. *Stem Cells International*, *2017*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2017/4521324>
276. Lotfinia, M., Lak, S., Mohammadi Ghahhari, N., Johari, B., Maghsood, F., Parsania, S., Sadegh Tabrizi, B., & Kadivar, M. (2017). Hypoxia Pre-Conditioned Embryonic Mesenchymal Stem Cell Secretome Reduces IL-10 Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Iranian Biomedical Journal*, *21*(1), 24–31.
277. Lovell-Badge, R., Anthony, E., Barker, R. A., Bubela, T., Brivanlou, A. H., Carpenter, M., Charo, R. A., Clark, A., Clayton, E., Cong, Y., Daley, G. Q., Fu, J., Fujita, M., Greenfield, A., Goldman, S. A., Hill, L., Hyun, I., Isasi, R., Kahn, J., ... Zhai, X. (2021). ISSCR Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation: The 2021 update. *Stem Cell Reports*, *16*(6), 1398–1408. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.05.012>
278. Lu, Y., Liu, J., Liu, Y., Qin, Y., Luo, Q., Wang, Q., & Duan, H. (2015). TLR4 plays a crucial role in MSC-induced inhibition of NK cell function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *464*(2), 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.002>
279. Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Müller, W., Roers, A., & Eming, S. A. (2010). Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *The Journal of Immunology*, *184*(7), 3964–3977. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903356>
280. Luger, D., Lipinski, M. J., Westman, P. C., Glover, D. K., Dimastromatteo, J., Frias, J. C., Albelda, M. T., Sikora, S., Kharazi, A., Vertelov, G., Waksman, R., & Epstein, S. E. (2017). Intravenously Delivered Mesenchymal Stem Cells: Systemic Anti-Inflammatory Effects Improve Left Ventricular Dysfunction in Acute Myocardial Infarction and Ischemic Cardiomyopathy. *Circulation Research*, *120*(10), 1598–1613. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310599>
281. Luz-Crawford, P., Djouad, F., Toupet, K., Bony, C., Franquesa, M., Hoogduijn, M. J., Jorgensen, C., & Noël, D. (2016). Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization and Inhibits B Cell Differentiation: MSC-IL1RA Inhibits B Cell Differentiation. *STEM CELLS*, *34*(2), 483–492. <https://doi.org/10.1002/stem.2254>
282. Luz-Crawford, P., Kurte, M., Bravo-Alegria, J., Contreras, R., Nova-Lamperti, E., Tejedor, G., Noël, D., Jorgensen, C., Figueroa, F., Djouad, F., & Carrión, F. (2013). Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Research & Therapy*, *4*(3), 65. <https://doi.org/10.1186/sert216>
283. Luz-Crawford, P., Noël, D., Fernandez, X., Khoury, M., Figueroa, F., Carrión, F., Jorgensen, C., & Djouad, F. (2012). Mesenchymal Stem Cells Repress Th17 Molecular Program through the PD-1 Pathway. *PLoS ONE*, *7*(9), e45272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045272>
284. Luz-Crawford, P., Tejedor, G., Mausset-Bonnefont, A. L., Beaulieu, E., Morand, E. F., Jorgensen, C., Noël, D., & Djouad, F. (2015). Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Governs the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells by Inducing a Switch From Pathogenic to Regulatory Th17 Cells in a Mouse Model of Collagen-Induced Arthritis: GILZ-MEDIATED THERAPEUTIC POTENTIAL OF MSCs. *Arthritis & Rheumatology*, *67*(6), 1514–1524. <https://doi.org/10.1002/art.39069>
285. Ma, S., Chen, X., Wang, L., Wei, Y., Ni, Y., Chu, Y., Liu, Y., Zhu, H., Zheng, R., & Zhang, Y. (2017). Repairing effects of ICAM-1-expressing mesenchymal stem cells in mice with autoimmune thyroiditis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *13*(4), 1295–1302. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4131>
286. Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., & Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death & Differentiation*, *21*(2), 216–225. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.158>
287. Maggini, J., Mirkin, G., Bognanni, I., Holmberg, J., Piazzón, I. M., Nepomnaschy, I., Costa, H., Cañones, C., Raiden, S., Vermeulen, M., & Geffner, J. R. (2010). Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Turn Activated Macrophages into a Regulatory-Like Profile. *PLoS ONE*, *5*(2), e9252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009252>
288. Maitra, A., Arking, D. E., Shivapurkar, N., Ikeda, M., Stastny, V., Kassauci, K., Sui, G., Cutler, D. J., Liu, Y., Brimble, S. N., Noaksson, K., Hyllner, J., Schulz, T. C., Zeng, X., Freed, W. J., Crook, J., Abraham, S., Colman, A., Sartipy, P., ... Chakravarti, A. (2005). Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature Genetics*, *37*(10), 1099–1103. <https://doi.org/10.1038/ng1631>
289. Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling: Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of Pathology*, *229*(2), 176–185. <https://doi.org/10.1002/path.4133>
290. Mao, Y., Sarhan, D., Steven, A., Seliger, B., Kiessling, R., & Lundqvist, A. (2014). Inhibition of Tumor-Derived Prostaglandin-E2 Blocks the Induction of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Recovers Natural Killer Cell Activity. *Clinical Cancer Research*, *20*(15), 4096–4106. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0635>
291. Markov, V., Kusumi, K., Tadesse, M. G., William, D. A., Hall, D. M., Lounev, V., Carlton, A., Leonard, J., Cohen, R. I., Rappaport, E. F., & Saitta, B. (2007). Identification of Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem/stromal Cell Populations with Distinct Growth Kinetics, Differentiation Potentials, and Gene Expression Profiles. *Stem Cells and Development*, *16*(1), 53–74. <https://doi.org/10.1089/scd.2006.0660>

292. Martin, I., De Boer, J., & Sensebe, L. (2016). A relativity concept in mesenchymal stromal cell manufacturing. *Cytotherapy*, 18(5), 613–620. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.02.004>
293. Martino, M. M., Maruyama, K., Kuhn, G. A., Satoh, T., Takeuchi, O., Müller, R., & Akira, S. (2016). Inhibition of IL-1R1/MyD88 signalling promotes mesenchymal stem cell-driven tissue regeneration. *Nature Communications*, 7(1), 11051. <https://doi.org/10.1038/ncomms11051>
294. Matsuda, C., Takagi, M., Hattori, T., Wakitani, S., & Yoshida, T. (2005). Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Chondrocytes for Construction of Three-dimensional Cartilage Tissue. *Cytotechnology*, 47(1–3), 11–17. <https://doi.org/10.1007/s10616-005-3751-x>
295. Mattar, P., & Bieback, K. (2015). Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00560>
296. Mauri, C., & Bosma, A. (2012). Immune Regulatory Function of B Cells. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 221–241. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074934>
297. Mayshar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J.-C., Yakir, B., Clark, A. T., Plath, K., Lowry, W. E., & Benvenisty, N. (2010). Identification and Classification of Chromosomal Aberrations in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 7(4), 521–531. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.017>
298. Mazzoni, A., Bronte, V., Visintin, A., Spitzer, J. H., Apolloni, E., Serafini, P., Zanovello, P., & Segal, D. M. (2002). Myeloid Suppressor Lines Inhibit T Cell Responses by an NO-Dependent Mechanism. *The Journal of Immunology*, 168(2), 689–695. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.2.689>
299. McElreavey, K. D., Irvine, A. I., Ennis, K. T., & McLean, W. H. (1991). Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochemical Society Transactions*, 19(1), 29S. <https://doi.org/10.1042/bst019029s>
300. Mei, S. H. J., Haitzma, J. J., Dos Santos, C. C., Deng, Y., Lai, P. F. H., Slutsky, A. S., Liles, W. C., & Stewart, D. J. (2010). Mesenchymal Stem Cells Reduce Inflammation while Enhancing Bacterial Clearance and Improving Survival in Sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(8), 1047–1057. <https://doi.org/10.1164/rccm.201001-0010OC>
301. Meirelles, L. da S., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119(11), 2204–2213. <https://doi.org/10.1242/jcs.02932>
302. Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., & Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*, 103(12), 4619–4621. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3909>
303. Melief, S. M., Schrama, E., Brugman, M. H., Tiemessen, M. M., Hoogduijn, M. J., Fibbe, W. E., & Roelofs, H. (2013). Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages: MSC Induce Tregs Through Skewing of Monocytes. *STEM CELLS*, 31(9), 1980–1991. <https://doi.org/10.1002/stem.1432>
304. Messina, E., De Angelis, L., Frati, G., Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., Salio, M., Battaglia, M., Latronico, M. V. G., Coletta, M., Vivarelli, E., Frati, L., Cossu, G., & Giacomello, A. (2004). Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells From Human and Murine Heart. *Circulation Research*, 95(9), 911–921. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000147315.71699.51>
305. Meyer, F., Ramanujam, K. S., Gobert, A. P., James, S. P., & Wilson, K. T. (2003). Cutting Edge: Cyclooxygenase-2 Activation Suppresses Th1 Polarization in Response to *Helicobacter pylori*. *The Journal of Immunology*, 171(8), 3913–3917. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.8.3913>
306. Michelo, C. M., Fasse, E., van Cranenbroek, B., Linda, K., van der Meer, A., Abdelrazik, H., & Joosten, I. (2016). Added effects of dexamethasone and mesenchymal stem cells on early Natural Killer cell activation. *Transplant Immunology*, 37, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2016.04.008>
307. Miki, T., & Strom, S. C. (2006). Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Reviews*, 2(2), 133–141. <https://doi.org/10.1007/s12015-006-0020-0>
308. Milosavljevic, N., Gazdic, M., Simovic Markovic, B., Arsenijevic, A., Nurkovic, J., Dolicanin, Z., Djonov, V., Lukic, M. L., & Volarevic, V. (2017). Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury by altering ratio between interleukin 17 producing and regulatory natural killer T cells. *Liver Transplantation*, 23(8), 1040–1050. <https://doi.org/10.1002/lt.24784>
309. Min, C.-K., Kim, B.-G., Park, G., Cho, B., & Oh, I.-H. (2007). IL-10-transduced bone marrow mesenchymal stem cells can attenuate the severity of acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 39(10), 637–645. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705644>
310. Minas, K., & Liversidge, J. (2006). Is the CD200/CD200 Receptor Interaction More Than Just a Myeloid Cell Inhibitory Signal? *Critical Reviews™ in Immunology*, 26(3), 213–230. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v26.i3.20>
311. Mirza, R., DiPietro, L. A., & Koh, T. J. (2009). Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *The American Journal of Pathology*, 175(6), 2454–2462.
312. Miyara, M., Ito, Y., & Sakaguchi, S. (2014). TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 10(9), 543–551. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.105>
313. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069–1075. <https://doi.org/10.1038/nature06639>
314. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annual Review of Immunology*, 19(1), 683–765. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>
315. Morgan, M. J., & Liu, Z. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Research*, 21(1), 103–115. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>

316. Moriggl, R., Topham, D. J., Teglund, S., Sexl, V., McKay, C., Wang, D., Hoffmeyer, A., van Deursen, J., Sangster, M. Y., Bunting, K. D., Grosveld, G. C., & Ihle, J. N. (1999). Stat5 Is Required for IL-2-Induced Cell Cycle Progression of Peripheral T Cells. *Immunity*, *10*(2), 249–259. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80025-4)
317. Morris, R. J., Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., Lin, J. S., Sawicki, J. A., & Cotsarelis, G. (2004). Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nature Biotechnology*, *22*(4), 411–417. <https://doi.org/10.1038/nbt950>
318. Morrison, T. J., Jackson, M. V., Cunningham, E. K., Kissenpfennig, A., McAuley, D. F., O’Kane, C. M., & Krasnodembskaya, A. D. (2017). Mesenchymal Stromal Cells Modulate Macrophages in Clinically Relevant Lung Injury Models by Extracellular Vesicle Mitochondrial Transfer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *196*(10), 1275–1286. <https://doi.org/10.1164/rccm.201701-0170OC>
319. Mougiakakos, D., Jitschin, R., Johansson, C. C., Okita, R., Kiessling, R., & Le Blanc, K. (2011). The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells. *Blood*, *117*(18), 4826–4835. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-324038>
320. Mueller, S. M., & Glowacki, J. (2001). Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Journal of Cellular Biochemistry*, *82*(4), 583–590. <https://doi.org/10.1002/jcb.1174>
321. Muguruma, Y., Yahata, T., Miyatake, H., Sato, T., Uno, T., Itoh, J., Kato, S., Ito, M., Hotta, T., & Ando, K. (2006). Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*, *107*(5), 1878–1887. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2211>
322. Munir, H., Luu, N.-T., Clarke, L. S. C., Nash, G. B., & McGettrick, H. M. (2016). Comparative Ability of Mesenchymal Stromal Cells from Different Tissues to Limit Neutrophil Recruitment to Inflamed Endothelium. *PLOS ONE*, *11*(5), e0155161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155161>
323. Munir, H., & McGettrick, H. M. (2015). Mesenchymal Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease: Risks and Rewards. *Stem Cells and Development*, *24*(18), 2091–2100. <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0008>
324. Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2013). Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends in Immunology*, *34*(3), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.10.001>
325. Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., & Mellor, A. L. (1999). Inhibition of T Cell Proliferation by Macrophage Tryptophan Catabolism. *Journal of Experimental Medicine*, *189*(9), 1363–1372. <https://doi.org/10.1084/jem.189.9.1363>
326. Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J.-L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., ... Wynn, T. A. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*, *41*(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
327. Najar, M., Raicevic, G., Fayyad-Kazan, H., Bron, D., Toungouz, M., & Lagneaux, L. (2016). Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy*, *18*(2), 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.011>
328. Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., & de Crombrughe, B. (2002). The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell*, *108*(1), 17–29. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00622-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00622-5)
329. Nan, Z., Fan, H., Tang, Q., Zhang, M., Xu, M., Chen, Q., Liu, Y., Dong, Y., Wu, H., & Deng, S. (2018). Dual expression of CXCR4 and IL-35 enhances the therapeutic effects of BMSCs on TNBS-induced colitis in rats through expansion of Tregs and suppression of Th17 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *499*(4), 727–734. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.043>
330. Nauta, A. J., & Fibbe, W. E. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, *110*(10), 3499–3506. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-069716>
331. Nauta, A. J., Kruijselbrink, A. B., Lurvink, E., Willemze, R., & Fibbe, W. E. (2006). Mesenchymal Stem Cells Inhibit Generation and Function of Both CD34<sup>+</sup>-Derived and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, *177*(4), 2080–2087. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.4.2080>
332. Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S. T., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P. G., Leelahavanichkul, K., Koller, B. H., Brown, J. M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R. A., & Mezey, É. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Medicine*, *15*(1), 42–49. <https://doi.org/10.1038/nm.1905>
333. Newman, R., Yoo, D., LeRoux, M., & Danilkovitch-Miagkova, A. (2009). Treatment of Inflammatory Diseases with Mesenchymal Stem Cells. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, *8*(2), 110–123. <https://doi.org/10.2174/187152809788462635>
334. Nguyen, N. T., Kimura, A., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., & Kishimoto, T. (2010). Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(46), 19961–19966. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014465107>
335. Nguyen, T. M., Arthur, A., Hayball, J. D., & Gronthos, S. (2013). EphB and Ephrin-B Interactions Mediate Human Mesenchymal Stem Cell Suppression of Activated T-Cells. *Stem Cells and Development*, *22*(20), 2751–2764. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0676>
336. Ni, H., Yang, S., Siaw-Debrah, F., Hu, J., Wu, K., He, Z., Yang, J., Pan, S., Lin, X., Ye, H., Xu, Z., Wang, F., Jin, K., Zhuge, Q., & Huang, L. (2019). Exosomes Derived From Bone Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Early Inflammatory Responses Following Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Neuroscience*, *13*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00014>

337. Nishikawa, S. I., Hashi, H., Honda, K., Fraser, S., & Yoshida, H. (2000). Inflammation, a prototype for organogenesis of the lymphopoietic/hematopoietic system. *Current Opinion in Immunology*, *12*(3), 342–345. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(00\)00097-2](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(00)00097-2)
338. Noguchi, Y., Maeda, A., Lo, P.-C., Takakura, C., Haneda, T., Kodama, T., Yoneyama, T., Toyama, C., Tazuke, Y., Okuyama, H., & Miyagawa, S. (2019). Human TIGIT on porcine aortic endothelial cells suppresses xenogeneic macrophage-mediated cytotoxicity. *Immunobiology*, *224*(5), 605–613. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.07.008>
339. Odorico, J. S., Kaufman, D. S., & Thomson, J. A. (2001). Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. *STEM CELLS*, *19*(3), 193–204. <https://doi.org/10.1634/stemcells.19-3-193>
340. Opitz, C. A., Litzenburger, U. M., Lutz, C., Lanz, T. V., Tritschler, I., Köppel, A., Tolosa, E., Hoberg, M., Anderl, J., Aicher, W. K., Weller, M., Wick, W., & Platten, M. (2009). Toll-Like Receptor Engagement Enhances the Immunosuppressive Properties of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells by Inducing Indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via Interferon- $\beta$  and Protein Kinase R: TLR-Mediated Immunosuppression by MSC. *STEM CELLS*, *27*(4), 909–919. <https://doi.org/10.1002/stem.7>
341. Orozco, L., Munar, A., Soler, R., Alberca, M., Soler, F., Huguet, M., Sentis, J., Sánchez, A., & García-Sancho, J. (2013). Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells: A Pilot Study. *Transplantation*, *95*(12), 1535–1541. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318291a2da>
342. Orozco, L., Munar, A., Soler, R., Alberca, M., Soler, F., Huguet, M., Sentis, J., Sánchez, A., & García-Sancho, J. (2014). Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells: Two-Year Follow-up Results. *Transplantation*, *97*(11), e66–e68. <https://doi.org/10.1097/TP.000000000000167>
343. Ortiz, L. A., DuTreil, M., Fattman, C., Pandey, A. C., Torres, G., Go, K., & Phinney, D. G. (2007). Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(26), 11002–11007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704421104>
344. Pai, S. I., Zandberg, D. P., & Strome, S. E. (2016). The role of antagonists of the PD-1:PD-L1/PD-L2 axis in head and neck cancer treatment. *Oral Oncology*, *61*, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.08.001>
345. Paladino, F. V., Peixoto-Cruz, J. S., Santacruz-Perez, C., & Goldberg, A. C. (2016). Comparison between isolation protocols highlights intrinsic variability of human umbilical cord mesenchymal cells. *Cell and Tissue Banking*, *17*(1), 123–136. <https://doi.org/10.1007/s10561-015-9525-6>
346. Park, C. W., Kim, K.-S., Bae, S., Son, H. K., Myung, P.-K., Hong, H. J., & Kim, H. (2009). Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *International Journal of Stem Cells*, *2*(1), 59–68. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2009.2.1.59>
347. Park, M.-J., Kwok, S.-K., Lee, S.-H., Kim, E.-K., Park, S.-H., & Cho, M.-L. (2015). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce expansion of interleukin-10-producing regulatory B cells and ameliorate autoimmunity in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Cell Transplantation*, *24*(11), 2367–2377. <https://doi.org/10.3727/096368914X685645>
348. Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., Linsley, P. S., Thompson, C. B., & Riley, J. L. (2005). CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(21), 9543–9553. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005>
349. Patel, S. A., Sherman, L., Munoz, J., & Rameshwar, P. (2008). Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *56*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00005-008-0001-x>
350. Pauken, K. E., & Wherry, E. J. (2014). TIGIT and CD226: Tipping the Balance between Costimulatory and Coinhibitory Molecules to Augment the Cancer Immunotherapy Toolkit. *Cancer Cell*, *26*(6), 785–787. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.016>
351. Peng, Y., Chen, B., Zhao, J., Peng, Z., Xu, W., & Yu, G. (2019). Effect of intravenous transplantation of hUCB-MSCs on M1/M2 subtype conversion in monocyte/macrophages of AMI mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *111*, 624–630. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.095>
352. Petrini, I., Pacini, S., Petrini, M., Fazzi, R., Trombi, L., & Galimberti, S. (2009). Mesenchymal cells inhibit expansion but not cytotoxicity exerted by gamma-delta T cells. *European Journal of Clinical Investigation*, *39*(9), 813–818. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02171.x>
353. Pevsner-Fischer, M., Morad, V., Cohen-Sfady, M., Rousoo-Noori, L., Zanin-Zhorov, A., Cohen, S., Cohen, I. R., & Zipori, D. (2007). Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*, *109*(4), 1422–1432. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-028704>
354. Pietilä, M., Lehtonen, S., Tuovinen, E., Lähteenmäki, K., Laitinen, S., Leskelä, H.-V., Nätyнки, A., Pesälä, J., Nordström, K., & Lehenkari, P. (2012). CD200 Positive Human Mesenchymal Stem Cells Suppress TNF-Alpha Secretion from CD200 Receptor Positive Macrophage-Like Cells. *PLoS ONE*, *7*(2), e31671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031671>
355. Poggi, A., Prevosto, C., Massaro, A.-M., Negrini, S., Urbani, S., Pierri, I., Saccardi, R., Gobbi, M., & Zocchi, M. R. (2005). Interaction between Human NK Cells and Bone Marrow Stromal Cells Induces NK Cell Triggering: Role of NKp30 and NKG2D Receptors. *The Journal of Immunology*, *175*(10), 6352–6360. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.10.6352>
356. Polchert, D., Sobinsky, J., Douglas, G., Kidd, M., Moadsiri, A., Reina, E., Genrich, K., Mehrotra, S., Setty, S., Smith, B., & Bartholomew, A. (2008). IFN- $\gamma$  activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *European Journal of Immunology*, *38*(6), 1745–1755. <https://doi.org/10.1002/eji.200738129>
357. Pontikoglou, C., Langonné, A., Ba, M. A., Varin, A., Rosset, P., Charbord, P., Sensébé, L., & Deschaseaux, F. (2016). CD200 expression in human cultured bone marrow mesenchymal stem cells is induced by pro-osteogenic

- and pro-inflammatory cues. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(4), 655–665. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12752>
358. Prasanna, S. J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S. R., & Vasandan, A. B. (2010). Pro-Inflammatory Cytokines, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells Differentially. *PLoS ONE*, 5(2), e9016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009016>
  359. Prigione, I., Benvenuto, F., Bocca, P., Battistini, L., Uccelli, A., & Pistoia, V. (2009). Reciprocal Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and  $\gamma\delta$  T Cells Or Invariant Natural Killer T Cells. *Stem Cells*, 27(3), 693–702. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0687>
  360. Putra, A., Ridwan, F. B., Putridewi, A. I., Kustiyah, A. R., Wirastuti, K., Sadyah, N. A. C., Rosdiana, I., & Munir, D. (2018). The Role of TNF- $\alpha$  induced MSCs on Suppressive Inflammation by Increasing TGF- $\beta$  and IL-10. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 6(10), 1779–1783. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.404>
  361. Qu-Petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., Mytinger, J., Cao, B., Gates, C., Wernig, A., & Huard, J. (2002). Identification of a novel population of muscle stem cells in mice. *Journal of Cell Biology*, 157(5), 851–864. <https://doi.org/10.1083/jcb.200108150>
  362. Rafei, M., Hsieh, J., Fortier, S., Li, M., Yuan, S., Birman, E., Forner, K., Boivin, M.-N., Doody, K., Tremblay, M., Annabi, B., & Galipeau, J. (2008). Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood*, 112(13), 4991–4998. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-166892>
  363. Raffaghello, L., Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F., Ottonello, L., & Pistoia, V. (2008). Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis: A Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche. *Stem Cells*, 26(1), 151–162. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0416>
  364. Ramasamy, R., Fazekasova, H., Lam, E. W.-F., Soeiro, I., Lombardi, G., & Dazzi, F. (2007). Mesenchymal Stem Cells Inhibit Dendritic Cell Differentiation and Function by Preventing Entry Into the Cell Cycle: *Transplantation*, 83(1), 71–76. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000244572.24780.54>
  365. Ramasamy, R., Tong, C. K., Seow, H. F., Vidyadaran, S., & Dazzi, F. (2008). The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cellular Immunology*, 251(2), 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.04.009>
  366. Rashedi, I., Gómez-Aristizábal, A., Wang, X.-H., Viswanathan, S., & Keating, A. (2017). TLR3 or TLR4 Activation Enhances Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Treg Induction via Notch Signaling: TLR Activation and Treg Induction by MSCs. *STEM CELLS*, 35(1), 265–275. <https://doi.org/10.1002/stem.2485>
  367. Rasmusson, I., Le Blanc, K., Sundberg, B., & Ringdén, O. (2007). Mesenchymal Stem Cells Stimulate Antibody Secretion in Human B Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 65(4), 336–343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01905.x>
  368. Rasmusson, I., Uhlén, M., Le Blanc, K., & Levitsky, V. (2007). Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(4), 887–893. <https://doi.org/10.1189/jlb.0307140>
  369. Regis, G., Conti, L., Boselli, D., & Novelli, F. (2006). IFN $\gamma$ R2 trafficking tunes IFN $\gamma$ -STAT1 signaling in T lymphocytes. *Trends in Immunology*, 27(2), 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.12.002>
  370. Ren, G., Su, J., Zhang, L., Zhao, X., Ling, W., L’huillie, A., Zhang, J., Lu, Y., Roberts, A. I., Ji, W., Zhang, H., Rabson, A. B., & Shi, Y. (2009). Species Variation in the Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression. *Stem Cells*, 27(8), 1954–1962. <https://doi.org/10.1002/stem.118>
  371. Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C., & Shi, Y. (2008). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*, 2(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.014>
  372. Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L’Huillier, A., Ling, W., Roberts, A. I., Le, A. D., Shi, S., Shao, C., & Shi, Y. (2010). Inflammatory Cytokine-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Mesenchymal Stem Cells Are Critical for Immunosuppression. *The Journal of Immunology*, 184(5), 2321–2328. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902023>
  373. Renner, P., Eggenhofer, E., Rosenauer, A., Popp, F. C., Steinmann, J. F., Slowik, P., Geissler, E. K., Piso, P., Schlitt, H. J., & Dahlke, M. H. (2009). Mesenchymal Stem Cells Require a Sufficient, Ongoing Immune Response to Exert Their Immunosuppressive Function. *Transplantation Proceedings*, 41(6), 2607–2611. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.06.119>
  374. Reubinoff, B., Pera, M., Fong, C.-Y., Trounson, A., & Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18(4):399-404 [see comment][erratum appears in *Nat Biotechnol* 2000 May;18(5):559]. *Nature Biotechnology*, 18, 399–404. <https://doi.org/10.1038/74447>
  375. Riekstina, U., Muceniece, R., Cakstina, I., Muiznieks, I., & Ancans, J. (2008). Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. *Cytotechnology*, 58(3), 153–162. <https://doi.org/10.1007/s10616-009-9183-2>
  376. Rizzo, R., Campioni, D., Stignani, M., Melchiorri, L., Bagnara, G. P., Bonsi, L., Alviano, F., Lanzoni, G., Moretti, S., Cuneo, A., Lanza, F., & Baricordi, O. R. (2008). A functional role for soluble HLA-G antigens in immune modulation mediated by mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 10(4), 364–375. <https://doi.org/10.1080/14653240802105299>
  377. Roddy, G. W., Oh, J. Y., Lee, R. H., Bartosh, T. J., Ylostalo, J., Coble, K., Rosa, R. H., & Prockop, D. J. (2011). Action at a Distance: Systemically Administered Adult Stem/Progenitor Cells (MSCs) Reduce Inflammatory Damage to the Cornea Without Engraftment and Primarily by Secretion of TNF- $\alpha$  Stimulated Gene/Protein 6. *STEM CELLS*, 29(10), 1572–1579. <https://doi.org/10.1002/stem.708>

378. Rodríguez, M., Domingo, E., Municio, C., Alvarez, Y., Hugo, E., Fernández, N., & Sánchez Crespo, M. (2014). Polarization of the Innate Immune Response by Prostaglandin E<sub>2</sub>: A Puzzle of Receptors and Signals. *Molecular Pharmacology*, 85(1), 187–197. <https://doi.org/10.1124/mol.113.089573>
379. Romieu-Mourez, R., François, M., Boivin, M.-N., Bouchentouf, M., Spaner, D. E., & Galipeau, J. (2009). Cytokine Modulation of TLR Expression and Activation in Mesenchymal Stromal Cells Leads to a Proinflammatory Phenotype. *The Journal of Immunology*, 182(12), 7963–7973. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803864>
380. Rosado, M. M., Bernardo, M. E., Scarsella, M., Conforti, A., Giorda, E., Biagini, S., Cascioli, S., Rossi, F., Guzzo, I., Vivarelli, M., Dello Strologo, L., Emma, F., Locatelli, F., & Carsetti, R. (2015). Inhibition of B-Cell Proliferation and Antibody Production by Mesenchymal Stromal Cells Is Mediated by T Cells. *Stem Cells and Development*, 24(1), 93–103. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0155>
381. Røslund, G. V., Svendsen, A., Torsvik, A., Sobala, E., McCormack, E., Immervoll, H., Mysliwicz, J., Tonn, J.-C., Goldbrunner, R., Lønning, P. E., Bjerkvig, R., & Schichor, C. (2009). Long-term Cultures of Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Frequently Undergo Spontaneous Malignant Transformation. *Cancer Research*, 69(13), 5331–5339. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4630>
382. Rüster, B., Göttig, S., Ludwig, R. J., Bistrrian, R., Müller, S., Seifried, E., Gille, J., & Henschler, R. (2006). Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*, 108(12), 3938–3944. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-025098>
383. Ryan, J. M., Barry, F., Murphy, J. M., & Mahon, B. P. (2007). Interferon- $\gamma$  does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 149(2), 353–363. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03422.x>
384. Rygiel, T. P., Mertens, A. E., Strumane, K., van der Kammen, R., & Collard, J. G. (2008). The Rac activator Tiam1 prevents keratinocyte apoptosis by controlling ROS-mediated ERK phosphorylation. *Journal of Cell Science*, 121(8), 1183–1192. <https://doi.org/10.1242/jcs.017194>
385. Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P. G., Riminucci, M., & Bianco, P. (2007). Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell*, 131(2), 324–336. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.025>
386. Sadeghi, L., Kamali-Sarvestani, E., Azarpira, N., Shariati, M., & Karimi, M. H. (2014). Immunomodulatory Effects of Mice Mesenchymal Stem Cells on Maturation and Activation of Dendritic Cells. *Iranian Journal of Immunology*, 11(3), 177–188.
387. Saeidi, M., Masoud, A., Shakiba, Y., Hadjati, J., Bonab, M. M., Nicknam, M. H., Latifpour, M., & Nikbin, B. (2013). Immunomodulatory Effects of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells on Differentiation, Maturation and Endocytosis of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 37–49.
388. Saha, B., Jyothi Prasanna, S., Chandrasekar, B., & Nandi, D. (2010). Gene modulation and immunoregulatory roles of Interferon- $\gamma$ . *Cytokine*, 50(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.11.021>
389. Sala, E., Genua, M., Petti, L., Anselmo, A., Arena, V., Cibella, J., Zanotti, L., D'Alessio, S., Scaldaferrri, F., Luca, G., Arato, I., Calafiore, R., Sgambato, A., Rutella, S., Locati, M., Danese, S., & Vetrano, S. (2015). Mesenchymal Stem Cells Reduce Colitis in Mice via Release of TSG6, Independently of Their Localization to the Intestine. *Gastroenterology*, 149(1), 163–176.e20. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.03.013>
390. Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 170–181. <https://doi.org/10.1038/nri2711>
391. Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., & Ozawa, K. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*, 109(1), 228–234. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002246>
392. Savan, R., Ravichandran, S., Collins, J. R., Sakai, M., & Young, H. A. (2009). Structural conservation of interferon gamma among vertebrates. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(2), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.02.006>
393. Savitsky, D., Tamura, T., Yanai, H., & Taniguchi, T. (2010). Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(4), 489–510. <https://doi.org/10.1007/s00262-009-0804-6>
394. Schena, F., Gambini, C., Gregorio, A., Mosconi, M., Reverberi, D., Gattorno, M., Casazza, S., Uccelli, A., Moretta, L., Martini, A., & Traggiai, E. (2010). Interferon- $\gamma$ -dependent inhibition of B cell activation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 62(9), 2776–2786. <https://doi.org/10.1002/art.27560>
395. Schoenborn, J. R., & Wilson, C. B. (2007). Regulation of Interferon- $\gamma$  During Innate and Adaptive Immune Responses. In *Advances in Immunology* (Vol. 96, pp. 41–101). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(07\)96002-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(07)96002-2)
396. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon- $\gamma$ : An overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2), 163–189. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
397. Schurgers, E., Kelchtermans, H., Mitera, T., Geboes, L., & Matthys, P. (2010). Discrepancy between the in vitro and in vivo effects of murine mesenchymal stem cells on T cell proliferation and collagen-induced arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 12(1), R31. <https://doi.org/10.1186/ar2939>
398. Sreaton, G. R., Mongkolsapaya, J., Xu, X.-N., Cowper, A. E., McMichael, A. J., & Bell, J. I. (1997). TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Current Biology*, 7(9), 693–696. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00297-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00297-1)

399. Sekiya, I., Larson, B. L., Vuoristo, J. T., Reger, R. L., & Prockop, D. J. (2005). Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell and Tissue Research*, *320*(2), 269–276. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1075-3>
400. Selleri, S., Bifsha, P., Civini, S., Pacelli, C., Dieng, M. M., Lemieux, W., Jin, P., Bazin, R., Patey, N., Marincola, F. M., Moldovan, F., Zaouter, C., Trudeau, L.-E., Benabdhalia, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2016). Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by metabolic reprogramming. *Oncotarget*, *7*(21), 30193–30210. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8623>
401. Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tiberghien, P., Rouas-Freiss, N., Carosella, E. D., & Deschaseaux, F. (2008). Human Leukocyte Antigen-G5 Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells Is Required to Suppress T Lymphocyte and Natural Killer Function and to Induce CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FOXP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *Stem Cells*, *26*(1), 212–222. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0554>
402. Sharma, M. D., Hou, D.-Y., Liu, Y., Koni, P. A., Metz, R., Chandler, P., Mellor, A. L., He, Y., & Munn, D. H. (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3<sup>+</sup> Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood*, *113*(24), 6102–6111. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195354>
403. Sharma, S., Yang, S.-C., Zhu, L., Reckamp, K., Gardner, B., Baratelli, F., Huang, M., Batra, R. K., & Dubinett, S. M. (2005). Tumor Cyclooxygenase-2/Prostaglandin E<sub>2</sub>-Dependent Promotion of FOXP3 Expression and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T Regulatory Cell Activities in Lung Cancer. *Cancer Research*, *65*(12), 5211–5220. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0141>
404. Sheng, H., Wang, Y., Jin, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, L., Shen, B., Yin, S., Liu, W., Cui, L., & Li, N. (2008). A critical role of IFN $\gamma$  in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Research*, *18*(8), 846–857. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.80>
405. Sheppard, K.-A., Fitz, L. J., Lee, J. M., Benander, C., George, J. A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J. M., Carter, L. L., Wood, C. R., & Chaudhary, D. (2004). PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 $\zeta$  signalosome and downstream signaling to PKC $\theta$ . *FEBS Letters*, *574*(1–3), 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.083>
406. Shi, S., & Gronthos, S. (2003). Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. *Journal of Bone and Mineral Research*, *18*(4), 696–704. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.4.696>
407. Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., Xu, C., Chen, X., Huang, Y., Zhu, Z., Huang, X., Han, X., Xie, N., & Ren, G. (2010). Mesenchymal stem cells: A new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Research*, *20*(5), 510–518. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.44>
408. Shi, Y., Su, J., Roberts, A. I., Shou, P., Rabson, A. B., & Ren, G. (2012). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends in Immunology*, *33*(3), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.11.004>
409. Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(3), 787–795. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>
410. Siegel, G., Kluba, T., Hermanutz-Klein, U., Bieback, K., Northoff, H., & Schäfer, R. (2013). Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Medicine*, *11*(1), 146. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-146>
411. Sioud, (2011). Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins. *International Journal of Oncology*, *38*(2). <https://doi.org/10.3892/ijo.2010.869>
412. Sioud, M., Mobergslie, A., Boudabous, A., & Fløisand, Y. (2010). Evidence for the Involvement of Galectin-3 in Mesenchymal Stem Cell Suppression of Allogeneic T-Cell Proliferation. *Scandinavian Journal of Immunology*, *71*(4), 267–274. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02378.x>
413. Sivanathan, K. N., Gronthos, S., Rojas-Canales, D., Thierry, B., & Coates, P. T. (2014). Interferon-Gamma Modification of Mesenchymal Stem Cells: Implications of Autologous and Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Therapy in Allogeneic Transplantation. *Stem Cell Reviews and Reports*, *10*(3), 351–375. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9495-2>
414. Song, X., Xie, S., Lu, K., & Wang, C. (2015). Mesenchymal Stem Cells Alleviate Experimental Asthma by Inducing Polarization of Alveolar Macrophages. *Inflammation*, *38*(2), 485–492. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9954-6>
415. Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N., & Papamichail, M. (2006). Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells. *Stem Cells*, *24*(1), 74–85. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0359>
416. Spaggiari, G. M., Abdelrazik, H., Becchetti, F., & Moretta, L. (2009). MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: Central role of MSC-derived prostaglandin E<sub>2</sub>. *Blood*, *113*(26), 6576–6583. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-203943>
417. Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Blood*, *111*(3), 1327–1333. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-074997>
418. Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2006). Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: Evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, *107*(4), 1484–1490. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2775>
419. Sreeramkumar, V., Fresno, M., & Cuesta, N. (2012). Prostaglandin E<sub>2</sub> and T cells: Friends or foes? *Immunology & Cell Biology*, *90*(6), 579–586. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.75>
420. Stagg, J., Pommey, S., Eliopoulos, N., & Galipeau, J. (2006). Interferon- $\gamma$ -stimulated marrow stromal cells: A new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*, *107*(6), 2570–2577. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2793>

421. Strauch, V., Saul, D., Berisha, M., Mackensen, A., Mougiakakos, D., & Jitschin, R. (2020). N-glycosylation controls inflammatory licensing-triggered PD-L1 upregulation in human mesenchymal stromal cells: N-GLYCOSYLATION CONTROLS PD-L1 IN MSC s. *STEM CELLS*, 38(8), 986–993. <https://doi.org/10.1002/stem.3190>
422. Strojny, C., Boyle, M., Bartholomew, A., Sundivakkam, P., & Alapati, S. (2015). Interferon Gamma-treated Dental Pulp Stem Cells Promote Human Mesenchymal Stem Cell Migration In Vitro. *Journal of Endodontics*, 41(8), 1259–1264. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.02.018>
423. Su, J., Chen, X., Huang, Y., Li, W., Li, J., Cao, K., Cao, G., Zhang, L., Li, F., Roberts, A. I., Kang, H., Yu, P., Ren, G., Ji, W., Wang, Y., & Shi, Y. (2014). Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. *Cell Death & Differentiation*, 21(3), 388–396. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.149>
424. Su, W.-R., Zhang, Q.-Z., Shi, S.-H., Nguyen, A. L., & Le, A. D. (2011). Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stromal Cells Attenuate Contact Hypersensitivity via Prostaglandin E2-Dependent Mechanisms. *STEM CELLS*, 29(11), 1849–1860. <https://doi.org/10.1002/stem.738>
425. Summan, M., Warren, G. L., Mercer, R. R., Chapman, R., Hulderman, T., Van Rooijen, N., & Simeonova, P. P. (2006). Macrophages and skeletal muscle regeneration: A clodronate-containing liposome depletion study. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290(6), R1488–R1495. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00465.2005>
426. Sun, L., Wang, Q., Chen, B., Zhao, Y., Shen, B., Wang, X., Zhu, M., Li, Z., Zhao, X., Xu, C., Chen, Z., Wang, M., Xu, W., & Zhu, W. (2018). Human Gastric Cancer Mesenchymal Stem Cell-Derived IL15 Contributes to Tumor Cell Epithelial-Mesenchymal Transition via Upregulation Tregs Ratio and PD-1 Expression in CD4<sup>+</sup> T Cell. *Stem Cells and Development*, 27(17), 1203–1214. <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0043>
427. Szegezdi, E., O'Reilly, A., Davy, Y., Vawda, R., Taylor, D. L., Murphy, M., Samali, A., & Mehmet, H. (2009). Stem cells are resistant to TRAIL receptor-mediated apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(11–12), 4409–4414. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00522.x>
428. Tabera, S., Perez-Simon, J. A., Diez-Campelo, M., Sanchez-Abarca, L. I., Blanco, B., Benito, A., Ocio, E., Sanchez-Guijo, F. M., Canizo, C., & Miguel, J. F. S. (2007). Effect of Mesenchymal Stem Cells on the Viability, Proliferation and Differentiation of B Lymphocytes. *Blood*, 110(11), 3880–3880. <https://doi.org/10.1182/blood.V110.11.3880.3880>
429. Takizawa, N., Okubo, N., Kamo, M., Chosa, N., Mikami, T., Suzuki, K., Yokota, S., Ibi, M., Ohtsuka, M., Taira, M., Yaegashi, T., Ishisaki, A., & Kyakumoto, S. (2017). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells propagate immunosuppressive/anti-inflammatory macrophages in cell-to-cell contact-independent and -dependent manners under hypoxic culture. *Experimental Cell Research*, 358(2), 411–420. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.07.014>
430. Tal, M. C., Sasai, M., Lee, H. K., Yordy, B., Shadel, G. S., & Iwasaki, A. (2009). Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8), 2770–2775. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807694106>
431. Tang, B., Li, X., Liu, Y., Chen, X., Li, X., Chu, Y., Zhu, H., Liu, W., Xu, F., Zhou, F., & Zhang, Y. (2018). The Therapeutic Effect of ICAM-1-Overexpressing Mesenchymal Stem Cells on Acute Graft-Versus-Host Disease. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(6), 2624–2635. <https://doi.org/10.1159/000489689>
432. Tang, K. C., Trzaska, K. A., Smirnov, S. V., Kotenko, S. V., Schwander, S. K., Ellner, J. J., & Rameshwar, P. (2008). Down-Regulation of MHC II in Mesenchymal Stem Cells at High IFN- $\gamma$  Can Be Partly Explained by Cytoplasmic Retention of CIITA. *The Journal of Immunology*, 180(3), 1826–1833. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1826>
433. Tataru, R., Ozaki, K., Kikuchi, Y., Hatanaka, K., Oh, I., Meguro, A., Matsu, H., Sato, K., & Ozawa, K. (2011). Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation. *Cytotherapy*, 13(6), 686–694. <https://doi.org/10.3109/14653249.2010.542456>
434. Tatebayashi, K., Takagi, T., Fujita, M., Doe, N., Nakagomi, T., Matsuyama, T., & Yoshimura, S. (2019). Adipose-derived stem cell therapy inhibits the deterioration of cerebral infarction by altering macrophage kinetics. *Brain Research*, 1712, 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.01.037>
435. Taylor-Robinson, A. W., Liew, F. Y., Severn, A., Xu, D., McSorley, S. J., Garside, P., Padron, J., & Phillips, R. S. (1994). Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *European Journal of Immunology*, 24(4), 980–984. <https://doi.org/10.1002/eji.1830240430>
436. Thiemann, S., Man, J. H., Chang, M. H., Lee, B., & Baum, L. G. (2015). Galectin-1 Regulates Tissue Exit of Specific Dendritic Cell Populations. *Journal of Biological Chemistry*, 290(37), 22662–22677. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.644799>
437. Thomas, H., Jäger, M., Mauel, K., Brandau, S., Lask, S., & Flohé, S. B. (2014). Interaction with Mesenchymal Stem Cells Provokes Natural Killer Cells for Enhanced IL-12/IL-18-Induced Interferon-Gamma Secretion. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/143463>
438. Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J. L., Barnabé-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biology*, 3(9), 778–784. <https://doi.org/10.1038/ncb0901-778>
439. Tomchuck, S. L., Zvezdaryk, K. J., Coffelt, S. B., Waterman, R. S., Danka, E. S., & Scandurro, A. B. (2008). Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive Their Migration and Immunomodulating Responses. *Stem Cells*, 26(1), 99–107. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0563>
440. Toscano, M. A., Bianco, G. A., Ilarregui, J. M., Croci, D. O., Correale, J., Hernandez, J. D., Zwirner, N. W., Poirier, F., Riley, E. M., Baum, L. G., & Rabinovich, G. A. (2007). Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nature Immunology*, 8(8), 825–834. <https://doi.org/10.1038/ni1482>

441. Trounson, A., & McDonald, C. (2015). Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell*, 17(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.007>
442. Tsuchiya, H., Kitoh, H., Sugiura, F., & Ishiguro, N. (2003). Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(2), 338–343. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)03026-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)03026-7)
443. Tu, Z., Li, Q., Bu, H., & Lin, F. (2010). Mesenchymal Stem Cells Inhibit Complement Activation by Secreting Factor H. *Stem Cells and Development*, 19(11), 1803–1809. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0418>
444. Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), 726–736. <https://doi.org/10.1038/nri2395>
445. Ungerer, C., Quade-Lyssy, P., Radeke, H. H., Henschler, R., Königs, C., Köhl, U., Seifried, E., & Schüttrumpf, J. (2014). Galectin-9 Is a Suppressor of T and B Cells and Predicts the Immune Modulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cell Preparations. *Stem Cells and Development*, 23(7), 755–766. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0335>
446. van Amerongen, M. J., Harmsen, M. C., van Rooijen, N., Petersen, A. H., & van Luyn, M. J. A. (2007). Macrophage Depletion Impairs Wound Healing and Increases Left Ventricular Remodeling after Myocardial Injury in Mice. *The American Journal of Pathology*, 170(3), 818–829. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060547>
447. van Hoeven, V., Munneke, J. M., Cornelissen, A. S., Omar, S. Z., Spruit, M. J., Kleijer, M., Bernink, J. H., Blom, B., Voermans, C., & Hazenberg, M. D. (2018). Mesenchymal Stromal Cells Stimulate the Proliferation and IL-22 Production of Group 3 Innate Lymphoid Cells. *The Journal of Immunology*, 201(4), 1165–1173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700901>
448. Vasandan, A. B., Jahnavi, S., Shashank, C., Prasad, P., Kumar, A., & Prasanna, S. J. (2016). Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE2-dependent mechanism. *Scientific Reports*, 6(1), 38308. <https://doi.org/10.1038/srep38308>
449. Vieira-Potter, V. J. (2014). Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues: Adipose tissue macrophage modulation. *Cellular Microbiology*, 16(10), 1484–1492. <https://doi.org/10.1111/cmi.12336>
450. Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Dieffenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N. J., Mebius, R. E., Powrie, F., & Spits, H. (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*, 174(5), 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>
451. Walczak, H. (1997). TRAIL-R2: A novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *The EMBO Journal*, 16(17), 5386–5397. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5386>
452. Walter, M. R. (2014). The Molecular Basis of IL-10 Function: From Receptor Structure to the Onset of Signaling. In S. Fillatreau & A. O'Garra (Eds.), *Interleukin-10 in Health and Disease* (Vol. 380, pp. 191–212). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5_9)
453. Wang, B., Wu, S., Wang, T., Ma, Z., & Liu, K. (2017). Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells-Mediated Protection Against Organ Dysfunction in Disseminated Intravascular Coagulation Is Associated With Peripheral Immune Responses. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(10), 3184–3192. <https://doi.org/10.1002/jcb.25964>
454. Wang, H., Zheng, R., Chen, Q., Shao, J., Yu, J., & Hu, S. (2017). Mesenchymal stem cells microvesicles stabilize endothelial barrier function partly mediated by hepatocyte growth factor (HGF). *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0662-7>
455. Wang, J., Zhu, Z., Huang, Y., Wang, P., Luo, Y., Gao, Y., & Du, Z. (2014). The subtype CD200-positive, chorionic mesenchymal stem cells from the placenta promote regeneration of human hepatocytes. *Biotechnology Letters*, 36(6), 1335–1341. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1468-7>
456. Wang, L., Zhao, Y., Liu, Y., Akiyama, K., Chen, C., Qu, C., Jin, Y., & Shi, S. (2013). IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  Synergistically Induce Mesenchymal Stem Cell Impairment and Tumorigenesis via NF $\kappa$ B Signaling. *STEM CELLS*, 31(7), 1383–1395. <https://doi.org/10.1002/stem.1388>
457. Wang, M., Zhang, G., Wang, Y., Liu, T., Zhang, Y., An, Y., & Li, Y. (2015). Crosstalk of mesenchymal stem cells and macrophages promotes cardiac muscle repair. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 58, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.11.003>
458. Wang, Q., Sun, B., Wang, D., Ji, Y., Kong, Q., Wang, G., Wang, J., Zhao, W., Jin, L., & Li, H. (2008). Murine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Cause Mature Dendritic Cells to Promote T-Cell Tolerance: BMSC Induce Tolerance through DCs. *Scandinavian Journal of Immunology*, 68(6), 607–615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02180.x>
459. Wang, Y., Chen, X., Cao, W., & Shi, Y. (2014). Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: Pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology*, 15(11), 1009–1016. <https://doi.org/10.1038/ni.3002>
460. Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L., & Betancourt, A. M. (2010). A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *PLoS ONE*, 5(4), e10088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010088>
461. Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A. C., & Reynolds, B. A. (1996). Multipotent CNS Stem Cells Are Present in the Adult Mammalian Spinal Cord and Ventricular Neuroaxis. *The Journal of Neuroscience*, 16(23), 7599–7609. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-23-07599.1996>
462. Wexler, S. A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B., & Hows, J. M. (2003). Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not: *Adult Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*. *British Journal of Haematology*, 121(2), 368–374. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04284.x>
463. Wheelock, E. F. (1965). Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin. *Science*, 149(3681), 310–311. <https://doi.org/10.1126/science.149.3681.310>
464. Wolfe, A. R., Trenton, N. J., Debeb, B. G., Larson, R., Ruffell, B., Chu, K., Hittelman, W., Diehl, M., Reuben, J. M., Ueno, N. T., & Woodward, W. A. (2016). Mesenchymal stem cells and macrophages interact through IL-6 to

- promote inflammatory breast cancer in pre-clinical models. *Oncotarget*, 7(50), 82482–82492. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12694>
465. Wu, W., Lan, Q., Lu, H., Xu, J., Zhu, A., Fang, W., Ge, F., & Hui, G. (2014). Human Amnion Mesenchymal Cells Negative Co-stimulatory Molecules PD-L1 Expression and Its Capacity of Modulating Microglial Activation of CNS. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 69(1), 35–45. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9763-9>
  466. Wynn, R. F., Hart, C. A., Corradi-Perini, C., O'Neill, L., Evans, C. A., Wraith, J. E., Fairbairn, L. J., & Bellantuono, I. (2004). A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*, 104(9), 2643–2645. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0526>
  467. Xia, Q., Zhu, S., Wu, Y., Wang, J., Cai, Y., Chen, P., Li, J., Heng, B. C., Ouyang, H. W., & Lu, P. (2015). Intra-Articular Transplantation of Atsttrin-Transduced Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Osteoarthritis Development: Atsttrin Modified MSCs for Osteoarthritis Therapy. *STEM CELLS Translational Medicine*, 4(5), 523–531. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0200>
  468. Xu, C., Yu, P., Han, X., Du, L., Gan, J., Wang, Y., & Shi, Y. (2014). TGF- $\beta$  Promotes Immune Responses in the Presence of Mesenchymal Stem Cells. *The Journal of Immunology*, 192(1), 103–109. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302164>
  469. Xu, G., Zhang, Y., Zhang, L., Roberts, A. I., & Shi, Y. (2009). C/EBP $\beta$  Mediates Synergistic Upregulation of Gene Expression by Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: C/EBP $\beta$ -Dependent Synergism Between IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  in MSCs. *STEM CELLS*, 27(4), 942–948. <https://doi.org/10.1002/stem.22>
  470. Xu, H., Oriss, T. B., Fei, M., Henry, A. C., Melgert, B. N., Chen, L., Mellor, A. L., Munn, D. H., Irvin, C. G., Ray, P., & Ray, A. (2008). Indoleamine 2,3-dioxygenase in lung dendritic cells promotes Th2 responses and allergic inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(18), 6690–6695. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708809105>
  471. Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Navarro-Alvarez, N., Nahmias, Y., Goldwasser, Y., Kitagawa, Y., Tilles, A. W., Tompkins, R. G., Parekkadan, B., & Yarmush, M. L. (2010). Reactive Bone Marrow Stromal Cells Attenuate Systemic Inflammation via sTNFR1. *Molecular Therapy*, 18(10), 1857–1864. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.155>
  472. Yamout, B., Hourani, R., Salti, H., Barada, W., El-Hajj, T., Al-Kutoubi, A., Herlopian, A., Baz, E. K., Mahfouz, R., Khalil-Hamdan, R., Kreidieh, N. M. A., El-Sabban, M., & Bazarbachi, A. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: A pilot study. *Journal of Neuroimmunology*, 227(1–2), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.07.013>
  473. Yan, Z., Zhuansun, Y., Chen, R., Li, J., & Ran, P. (2014). Immunomodulation of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells and its possible mechanism. *Experimental Cell Research*, 324(1), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.03.013>
  474. Yan, Z., Zhuansun, Y., Liu, G., Chen, R., Li, J., & Ran, P. (2014). Mesenchymal stem cells suppress T cells by inducing apoptosis and through PD-1/B7-H1 interactions. *Immunology Letters*, 162(1), 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.09.013>
  475. Yañez, R., Oviedo, A., Aldea, M., Bueren, J. A., & Lamana, M. L. (2010). Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Experimental Cell Research*, 316(19), 3109–3123. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.08.008>
  476. Yang, M., Liu, P., Wang, K., Glorieux, C., Hu, Y., Wen, S., Jiang, W., & Huang, P. (2017). Chemotherapy induces tumor immune evasion by upregulation of programmed cell death ligand 1 expression in bone marrow stromal cells. *Molecular Oncology*, 11(4), 358–372. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12032>
  477. Yang, N., Baban, B., Isales, C. M., & Shi, X.-M. (2015). Crosstalk between bone marrow-derived mesenchymal stem cells and regulatory T cells through a glucocorticoid-induced leucine zipper/developmental endothelial locus-1-dependent mechanism. *The FASEB Journal*, 29(9), 3954–3963. <https://doi.org/10.1096/fj.15-273664>
  478. Yen, B. L., Yen, M.-L., Hsu, P.-J., Liu, K.-J., Wang, C.-J., Bai, C.-H., & Sytwu, H.-K. (2013). Multipotent Human Mesenchymal Stromal Cells Mediate Expansion of Myeloid-Derived Suppressor Cells via Hepatocyte Growth Factor/c-Met and STAT3. *Stem Cell Reports*, 1(2), 139–151. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.06.006>
  479. YlÖstalo, J. H., Bartosh, T. J., Coble, K., & Prockop, D. J. (2012). Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells Cultured as Spheroids are Self-activated to Produce Prostaglandin E2 that Directs Stimulated Macrophages into an Anti-inflammatory Phenotype: HMSC Spheroids Promote M2 Macrophage Phenotype. *STEM CELLS*, 30(10), 2283–2296. <https://doi.org/10.1002/stem.1191>
  480. Yoshimura, A., & Muto, G. (2010). TGF- $\beta$  Function in Immune Suppression. In R. Ahmed & T. Honjo (Eds.), *Negative Co-Receptors and Ligands* (Vol. 350, pp. 127–147). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/82\\_2010\\_87](https://doi.org/10.1007/82_2010_87)
  481. Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E. H., & Lenardo, M. J. (2004). Regulation of an ATG7—Beclin 1 Program of Autophagic Cell Death by Caspase-8. *Science*, 304(5676), 1500–1502. <https://doi.org/10.1126/science.1096645>
  482. Yu, P. F., Huang, Y., Han, Y. Y., Lin, L. Y., Sun, W. H., Rabson, A. B., Wang, Y., & Shi, Y. F. (2017). TNF $\alpha$ -activated mesenchymal stromal cells promote breast cancer metastasis by recruiting CXCR2+ neutrophils. *Oncogene*, 36(4), 482–490. <https://doi.org/10.1038/ncr.2016.217>
  483. Yu, X., Harden, K., C Gonzalez, L., Francesco, M., Chiang, E., Irving, B., Tom, I., Ivelja, S., Refino, C. J., Clark, H., Eaton, D., & Grogan, J. L. (2009). The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature Immunology*, 10(1), 48–57. <https://doi.org/10.1038/ni.1674>

484. Yuan, Z., Li, Q., Luo, S., Liu, Z., Luo, D., Zhang, B., Zhang, D., Rao, P., & Xiao, J. (2016). PPAR $\gamma$  and Wnt Signaling in Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, *11*(3), 216–225.
485. Yun, S. P., Lee, S.-J., Jung, Y. H., & Han, H. J. (2014). Galectin-1 stimulates motility of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells by downregulation of smad2/3-dependent collagen 3/5 and upregulation of NF- $\kappa$ B-dependent fibronectin/laminin 5 expression. *Cell Death & Disease*, *5*(2), e1049–e1049. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.3>
486. Zaidi, M. R., Davis, S., Noonan, F. P., Graff-Cherry, C., Hawley, T. S., Walker, R. L., Feigenbaum, L., Fuchs, E., Lyakh, L., Young, H. A., Hornyak, T. J., Arnheiter, H., Trinchieri, G., Meltzer, P. S., De Fabo, E. C., & Merlino, G. (2011). Interferon- $\gamma$  links ultraviolet radiation to melanomagenesis in mice. *Nature*, *469*(7331), 548–553. <https://doi.org/10.1038/nature09666>
487. Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., Mancardi, G., & Uccelli, A. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, *106*(5), 1755–1761. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1496>
488. Zhang, B., Liu, R., Shi, D., Liu, X., Chen, Y., Dou, X., Zhu, X., Lu, C., Liang, W., Liao, L., Zenke, M., & Zhao, R. C. H. (2009). Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2–dependent regulatory dendritic cell population. *Blood*, *113*(1), 46–57. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-154138>
489. Zhang, C., Zhu, Y., Wang, J., Hou, L., Li, W., & An, H. (2019). CXCR4-Overexpressing Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Enhance Protection against Radiation-Induced Lung Injury. *Stem Cells International*, *2019*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/2457082>
490. Zhang, L., & Wang, C.-C. (2014). Inflammatory response of macrophages in infection. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, *13*(2), 138–152. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(14\)60024-2](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(14)60024-2)
491. Zhang, W., Ge, W., Li, C., You, S., Liao, L., Han, Q., Deng, W., & Zhao, R. C. H. (2004). Effects of Mesenchymal Stem Cells on Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Stem Cells and Development*, *13*(3), 263–271. <https://doi.org/10.1089/154732804323099190>
492. Zhang, Z., Han, Y., Song, J., Luo, R., Jin, X., Mu, D., Su, S., Ji, X., Ren, Y.-F., & Liu, H. (2015). Interferon- $\gamma$  regulates the function of mesenchymal stem cells from oral lichen planus via indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, *44*(1), 15–27. <https://doi.org/10.1111/jop.12224>
493. Zhang, Z., Huang, S., Wu, S., Qi, J., Li, W., Liu, S., Cong, Y., Chen, H., Lu, L., Shi, S., Wang, D., Chen, W., & Sun, L. (2019). Clearance of apoptotic cells by mesenchymal stem cells contributes to immunosuppression via PGE<sub>2</sub>. *EBioMedicine*, *45*, 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.016>
494. Zhao, K., Lou, R., Huang, F., Peng, Y., Jiang, Z., Huang, K., Wu, X., Zhang, Y., Fan, Z., Zhou, H., Liu, C., Xiao, Y., Sun, J., Li, Y., Xiang, P., & Liu, Q. (2015). Immunomodulation Effects of Mesenchymal Stromal Cells on Acute Graft-versus-Host Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *21*(1), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.09.030>
495. Zhao, W., Wang, Y., Wang, D., Sun, B., Wang, G., Wang, J., Kong, Q., Wang, Q., Peng, H., Jin, L., & Li, H. (2008). TGF- $\beta$  expression by allogeneic bone marrow stromal cells ameliorates diabetes in NOD mice through modulating the distribution of CD4<sup>+</sup> T cell subsets. *Cellular Immunology*, *253*(1–2), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.06.009>
496. Zheng, Y., Deng, Y., Lai, W., Zheng, S., Bian, H., Liu, Z., Huang, Z., Sun, C., Li, H., Luo, H., Ma, L., Chen, H., & Xiong, B. (2018). Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on the polarization of macrophages. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8457>
497. Zhou, K., Guo, S., Tong, S., Sun, Q., Li, F., Zhang, X., Qiao, Y., & Liang, G. (2018). Immunosuppression of Human Adipose-Derived Stem Cells on T Cell Subsets via the Reduction of NF- $\kappa$ B Activation Mediated by PD-L1/PD-1 and Gal-9/TIM-3 Pathways. *Stem Cells and Development*, *27*(17), 1191–1202. <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0033>
498. Zhou, L., Chu, C., Teng, F., Bessman, N. J., Goc, J., Santosa, E. K., Putzel, G. G., Kabata, H., Kelsen, J. R., Baldassano, R. N., Shah, M. A., Sockolow, R. E., Vivier, E., Eberl, G., Smith, K. A., & Sonnenberg, G. F. (2019). Innate lymphoid cells support regulatory T cells in the intestine through interleukin-2. *Nature*, *568*(7752), 405–409. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1082-x>
499. Zhou, X.-M., Li, W.-Q., Wu, Y.-H., Han, L., Cao, X.-G., Yang, X.-M., Wang, H.-F., Zhao, W.-S., Zhai, W.-J., Qi, Y.-M., & Gao, Y.-F. (2018). Intrinsic Expression of Immune Checkpoint Molecule TIGIT Could Help Tumor Growth in vivo by Suppressing the Function of NK and CD8<sup>+</sup> T Cells. *Frontiers in Immunology*, *9*, 2821. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02821>
500. Zhu, J., Wen, H., Ju, X., Bi, R., Zuo, W., & Wu, X. (2017). Clinical Significance of Programmed Death Ligand-1 and Intra-Tumoral CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes in Ovarian Carcinosarcoma. *PLOS ONE*, *12*(1), e0170879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170879>
501. Zhu, X., He, B., Zhou, X., & Ren, J. (2013). Effects of transplanted bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in animal models of acute hepatitis. *Cell and Tissue Research*, *351*(3), 477–486. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1524-3>
502. Zhu, Y., Feng, X., Abbott, J., Fang, X., Hao, Q., Monsel, A., Qu, J., Matthay, M. A., & Lee, J. W. (2014). Human Mesenchymal Stem Cell Microvesicles for Treatment of *Escherichia coli* Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Mice: MSC MV Attenuates ALI in Part Through KGF. *STEM CELLS*, *32*(1), 116–125. <https://doi.org/10.1002/stem.1504>
503. Zhuo, Y., Zhang, Y.-F., Wu, H.-J., Qin, L., Wang, Y.-P., Liu, A.-M., & Wang, X.-H. (2017). Interaction between Galectin-9/TIM-3 pathway and follicular helper CD4<sup>+</sup> T cells contributes to viral persistence in chronic hepatitis C. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *94*, 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.134>

## ИЗВОДИ

1. Под влияние на IFN $\gamma$  се наблюдава промяна в морфологията на МСК изолирани от пъпна връв.
2. Под влияние на IFN $\gamma$  се наблюдава засилена клоногенна ефективност на МСК изолирани от пъпна връв, както и скъсяване на времето им за популационно удвояване.
3. Под влияние на IFN $\gamma$  МСК изолирани от пъпна връв губят своята способност за остеогенна и адипогенна диференциация.
4. Под влияние на IFN $\gamma$  се наблюдава по-интензивен процес на апоптоза.
5. Под влияние на IFN $\gamma$  се наблюдава засилена експресия на PD-L1 и HLA-I и намалена секреция на IL-10, което дава основание да приемем, че IFN $\gamma$  повлиява способностите на МСК по посока имуномодулация.
6. По отношение на влиянието на IFN $\gamma$  върху Т лимфоцитите установяваме намалена експресия на PD-1.
7. Под влияние на третирани с IFN $\gamma$  МСК изолирани от пъпна връв и ко-култивирани с периферни кръвни мононуклеарни клетки се установява намалена секреция на IL-10.

# ПРИНОСИ

## I. Приноси с оригинален характер

1. За първи път в научната литература е описана промяна в клоногенната ефективност на WJ-МСК по влияние на IFN $\gamma$ .
2. За първи път в научната литература е описана промяна в популационното удвояване на WJ-МСК по влияние на IFN $\gamma$ .
3. За първи път в научната литература е описано въздействието на IFN $\gamma$  върху WJ-МСК по отношение на тяхната способност да променят PD-1 експресията на повърхността на Т клетките.

## II. Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдено е описаната повишена експресия на PD-L1 от WJ-МСК под влияние на IFN $\gamma$ .
2. Потвърдено е описаната повишена експресия на HLA-I от WJ-МСК под влияние на IFN $\gamma$ .
3. Потвърдено е, че в резултат на ко-култивиране на МСК с РВМС се наблюдава промяна на IL-10 секрецията.

## III. Приноси с дискутабилен характер

1. В съответствие с нашите резултати се дискутират противоречивите данни за влиянието на IFN $\gamma$  върху морфологията на МСК.
2. В съответствие с нашите резултати се дискутират противоречивите данни за влиянието на IFN $\gamma$  върху апоптозата на МСК.
3. В съответствие с нашите резултати се дискутират противоречивите данни за влиянието на IFN $\gamma$  върху остеогенната и адипогенната диференциация на МСК.
4. В съответствие с нашите резултати се дискутират противоречивите данни за влиянието на IFN $\gamma$  върху цитокиновата секреция на МСК.

## ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ

### 1. Публикации във връзка с дисертационния труд

**К. Belemezova, D. Kyurkchiev;** Interferon-gamma effect on mesenchymal stem cells. Bulgarian Journal of Clinical Immunology 13 (1):43-52. 2020.

**К. Belemezova, I. Dimova, D. Kyurkchiev;** Effect of intereferon-gamma on chromosomal stability of human umbilical cord mesenchymal stem cells. Bulgarian Journal of Clinical Immunology 13 (2). 2020.

**Belemezova K, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev S, Kyurkchiev D.** A study of the transformation of umbilical cord mesenchymal stem cells by interferon-gamma. Iran J Basic Med Sci, 2021; 24(9): 1203-1210.

*(IF<sub>2021</sub> – 2.699)*

### 2. Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд

**К. Белемезова, Н. Магунска, Т. Тимева, Д. Кюркчиев, Е. Тодорова-Иванова, С. Кюркчиев.** Изолиране и характеризиране на мезенхимни стволови клетки от менструална кръв при синдром на Ашерман. Плевенски дни на репродуктивната медицина 2017; 28 – 30 Април, 2017, Плевен

*(Спечелена първа награда за най-добър постер)*

**К. Belemezova, D. Kyurkchiev, E. Todorova-Ivanova, T. Timeva, I. Bochev, S. Kyurkchiev.** Mesenchymal stem-like cells isolated from human menstrual blood. 4th Black Sea International Immunology School (BSIIS); 20 - 22 October 2017, Starosel

*(Спечелена първа награда)*

**К. Belemezova, Ivan Bochev, Ekaterina Todorova-Ivanova, Stanimir Kyurkchiev, Dobroslav Kyurkchiev.** Interferon- $\gamma$  Effect on Mesenchymal Stem Cells; Immunological

days in Pleven 2019; “Autoimmunity in 2019: The good and the bad news”; 10-11 April 2019 – Pleven, Bulgaria.

**K. Belezova**, I. Bochev, E. Ivanova-Todorova, S. Kyurkchiev, D. Kyurkchiev. Interferon–gamma affects the properties of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Autoimmunity* 2021, 28 May – 1 June 2021.

### **3. Участия в научни проекти по темата на дисертационния труд**

Отчетен научноизследователски проект, свързан с темата на дисертационния труд за конкурс „Млад изследовател-2020“ към Медицински Университет – София на тема: *Влияние на IFN-γ върху свойствата на мезенхимни стволови клетки изолирани от тъкан от пъпна връв.*

Договор No: Д-82/24.06.2020 г.