

**Медицински университет- София**  
**Медицински факултет**

Катедра по клинична лаборатория и клинична  
имунология

**Доц. д-р Доброслав Станимиров Кюркчиев**

Началник Лаборатория по Клинична имунология  
УМБАЛ „Св. Иван Рилски”

Периферна имунна супресия осъществявана от  
мезенхимни стволови клетки

# **Дисертация**

За присъждане на научна степен “Доктор на медицинските науки”

Шифър на специалността “Имунология”: 01.06.23

София 2015 г.

# Съдържание

<b>Списък на използваните съкращения</b>	стр. 3
<b>Въведение</b>	стр. 6
<b>Глава I</b>	
Мезенхимни стволови клетки	стр. 12
<b>Глава II</b>	
МСК и цитокиновата им секреция	стр. 62
<b>Глава III</b>	
Въздействие на МСК върху Т, В и НК клетки	стр. 90
<b>Глава IV</b>	
Въздействие на МСК върху Т регулаторните лимфоцити (Tregs)	стр. 142
<b>Глава V</b>	
Въздействие на МСК върху моноцитните дендритни клетки	стр. 187
<b>Глава VI</b>	
МСК, прогестерон и въздействието им върху имунните клетки в женския репродуктивния тракт	стр. 232
<b>Глава VII</b>	
МСК изолирани и култивирани от GBM? Имунорегулаторно действие	стр. 267
<b>Заклучение</b>	стр. 312
<b>Литература</b>	стр. 315
<b>Приноси</b>	стр. 359
<b>Публикации по темата</b>	стр. 360

# Списък на използваните съкращения

## Използвани съкращения на български език

АМФ – аденозин монофосфат  
АПК- антиген- представящи клетки  
АРК- адвентиционални ретикулярни клетки  
АТ-МСК- мастно тъканни мезенхимни стволови клетки  
ГБМ – глиобластома мултиформе  
ДК- дендритни клетки  
Д-МСК- децидуални мезенхимни стволови клетки  
ДСК- децидуални стромални клетки  
КМ-МСК- костно мозъчни мезенхимни стволови клетки  
МСК - мезенхимни стволови клетки  
НСК – неврални стволови клетки  
Пг - прогестерон  
ПКМК- периферни кръвни мононуклеарни клетки  
ПХА- фитохемаглутинин  
РСК- ракови стволови клетки  
СЛЕ- системен лупус еритематодес  
ТАМ- тумор асоциирани макрофаги  
ТКР- Т клетъчен рецептор  
ФТС- фетален телешки серум  
ХСК- хемопоеични стволови клетки

## Използвани съкращения на английски език

APRIL – a proliferation inducing ligand  
BDNF – brain derived neurotrophic factor  
bFGF – basic fibroblast growth factor  
BLys – B lymphocyte stimulator  
BMP – bone morphogenic protein  
CFU-F – фибробласт- колонио-формираща единица  
СНАК – CC chemokine activated killers  
CNS – консервативни не кодиращи секвенции  
ConA – конканавалин А  
COX - циклооксигеназа  
CTLA-4 – cytotoxic T- lymphocyte associated protein 4  
DAMPs – damage associated molecular patterns  
DMEM – Dulbecco's minimum essential medium  
ЕАЕ – експериментален автоимуен енцефаломиелит  
EGF - epidermal growth factor  
EP2 – (E prostanoid 2)

GDF – growth and differentiation factor  
GFAP – glial fibrillary growth factor  
GITR – glucocorticoid – induces tumor necrosis factor receptor  
GM-CSF – granulocyte macrophage colony stimulating factor  
GPI – глюкозофосфатидил инозитол  
GVHD – graft versus host disease  
HAT – hromatin histone acetyl transferase  
HGF – hepatocyte growth factor  
HIF2 $\alpha$  – hypoxia induced factor  
HLA – human leukocyte antigen  
HMBG1 – high mobility group box protein 1  
HVEM – herpes virus entry mediator  
IBD – inflammatory bowel disease  
ICAM – intercellular adhesion molecule  
ICOS – inducible T cell co- stimulator ligand  
IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа  
ILT – immunoglobulin- like transcript  
iNOS – азотно оксидна синтетаза  
IPeX – X- свързана полиендокринопатия, вследствие на имунна дисрегулация  
ISCT – International society of cell therapy  
JAMs – junction adhesion molecules  
KIR – killer Ig-like receptor  
LAG – лимфоцит активационен ген  
LAK – lymphokine activated killer  
LFA-1 – lymphocyte function associated molecule  
LIF – leukemia inhibitory factor  
LPS – lipopolysaccarid (липополизахарид)  
MAC-1 – macrophage 1 antigen  
MAPCs - multipotent adult progenitor cells  
MAPK – mitogen activated protein kinases  
MCP – monocyte chemoattractant protein  
MCPiP – MCP- induced protein  
MDSC - миелоидно произхождащи супресорни клетки  
MFI – mean fluorescent intensity  
MHC – major histocompatibility complex  
MIAMI - marrow isolated adult mutinies inducible cells  
MIP-1 – macrophage inflammatory protein  
MLR – mixed lymphocyte culture  
MOG – миелин олигодендроцит  
NF $\kappa$ B – nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells  
NOD – non obese diabetes  
OPD – О-фениленамин  
HSP – heat shock protein  
OD – оптична плътност  
OVA - овалбумин

PAMPs – pathogen associated molecular patterns  
PAQR – прогестин и адипоQ рецептор  
PD-1- programmed death  
PD-1L - programmed death ligand  
PDGF-BB – platelet derived growth factor BB  
PECAM – platelet/endothelial cell adhesion molecule  
PGE2 – простагландин E2  
PGRMC1- прогестеронов рецепторен и мембранен компонент  
PI3K – фосфоинозитол-3-киназа  
PIBF – progesterone induced blocking factor  
PIGF – placental growth factor  
PMA – phorbol miristate acetate  
PRAR $\gamma$  – peroxisome proleferator activated receptor  
PVR – poliovirus receptor  
PWM – pokeweed mitogen  
RANTES – regulated on activated normal T-cell expressed and secreted  
SCID – severe combine immunodeficiency  
SDF1 – stromal derived factor  
STAT – сигнален трансдюсер и активатор на транскрипцията  
TIM – T cell immunoglobulin domain and mucin domain  
TIPs – tension induced inhibited protein  
TLR – toll- like receptor  
TSDR – T reg cell specific demethylated region  
VCAM – vascular cell adhesion protein  
VEGF – vascular endothelial growth factor  
VLA-4 – very late antigen

# Въведение

Интересът ми към мезенхимните стволови клетки (МСК) се създаде точно преди десет години, малко след като бях защитил докторската си дисертация си и бях частично запознат с някои механизми, които тогава се обсъждаха, а повечето от тях се дискутират и сега, относно патогенезата на автоимунните болести. Както е известно те обхващат приблизително 5 % от човешката популация и все още няма средство, което да доведе до окончателното излекуване на заболяване с автоимунна генеза. Четири- пет години преди нашата намеса в света на мезенхимните стволови клетки, бяха публикувани първите резултати за имunosупресивното им действие и бяха изказани първите надежди и очаквания за ново средство в терапията на автоимунните заболявания. За тези няколко години бяха натрупани голямо количество данни относно многостранното и нееднозначно влияние на МСК на множество нива и върху множество участници в имунния отговор. През 2008 година дойде и нашата първа, както и първа за страната международна публикация относно имунорегулаторното действие на МСК, като един от авторите ѝ Иван Бочев, защити и докторска дисертация на тази тема. От тогава аз и научната група с която работя, обхващаща специалисти от различни институции продължаваме да се занимаваме с темата. След 10 години работа и публикувани резултати, сметох че е нужно да обобщя, както нашите данни, така и знанията дотук в световната литература, относно имunosупресивното действие на МСК. Моите колеборатори дадоха съгласието си да го направя и от тяхно име, за което им благодаря и считам, че е чест за мен.

Разбира се, настоящият труд няма ни най-малко претенцията да обхване цялата тема, която е обект на множество интензивни проучвания, често с противоречиви резултати, което е нормално за една изгряваща и бързо развиваща се научна проблематика. Целта, която съм си поставил е да се акцентира на имunosупресивното действие на МСК върху основните имунокомпетентни клетки, в контекста на знанията дотук и нашите резултати. Поради това, голяма част от важни и изключително интересни аспекти на стволовите клетки няма да бъдат

коментирани, като: ембрионалните, хемопоеичните и индуцираните плурипотентни стволови клетки, регенеративните свойства на мезенхимните стволови клетки, както и доста други. От тази гледна точка работата би могла да изглежда прекалено центрирана, но обемът информация е огромен и считам, че по добрия подход е да се акцентира върху по стеснени параметри.

Терминът „имунорегулация“, както и „имуномодулация“ в имунологията често са синоними на „имуносупресия“. Много рядко стимулиращото въздействие се означава като „имуномодулация“ или „имунорегулация“. От тази гледна точка МСК безспорно са имунорегулаторни клетки. Това, разбира се далеч не означава, че те имат единствено и само супресивна роля, напротив, описани са много действия на МСК в обратна посока- стимулиране на имунния отговор и индукция на възпалителни прояви. Тези свойства на МСК не са обект на настоящия труд и ще бъдат споменавани само където това е необходимо, с оглед пълнотата на информацията относно действието на МСК в конкретната описвана ситуация.

Осъществяването на имуносупресия от МСК е вследствие предимно на тяхната цитокинова секреция, въпреки, че се коментира и ролята на директния междуклетъчен контакт. Докато за цитокините има данни за конкретни участници и описани механизми на действие, прекия контакт, особено при човешки МСК все още остава в сферата „подозира се“. Описани са малко на брой конкретни взаимодействащи молекули, докато множество експериментални данни категорично доказват, че секреторния механизъм е водещ в осигуряването на имунна супресия от МСК. Нещо повече, както много описани в литературата резултати, така и нашите потвърждават, че имунна супресия от МСК може да се извърши и без наличието на пряк междуклетъчен контакт. Тоест, почти всички данни сочат, че директните междуклетъчни взаимоотношения са спомагателен фактор при имунорегулаторните действия на МСК върху клетките на имунната система. Именно поради описаните причини, ролята на директния междуклетъчен контакт ще бъде обсъждана не толкова подробно и детайлно, както тази на секретираниите от МСК цитокини. Разделението на МСК на про- и анти-възпалителни възоснова на секретираниите цитокини не се приема от мнозинството

изследователи, въпреки опитите на някои автори да го формулират. Данните в научната литература убедително доказват, че ако има такова разделение, то е продукт на функционалното състояние на МСК и техните сложни и многопластови взаимоотношения с околната среда. От тази гледна точка, тук ще бъдат разгледани само едната страна от действието на МСК – осъществяване на имунна супресия, като тази страна е значително по-съществена за тях, ако могат да се правят подобни количествени сравнения.

Така, както МСК въздействат на клетките на имунната система, така се наблюдава и обратното взаимодействие – процес все още недостатъчно изучен и описан, който тепърва ще бъде обект на научен интерес. Този въпрос също няма да е цел на настоящия труд, както поради липса на достатъчно данни, така и поради факта, че разглеждания тук научен проблем сам по себе си е достатъчно сериозен и обемен. Казано с други думи в тази дисертация няма да става дума за „cross talk” между клетките на имунната система и МСК (освен където това е неизбежно), а ще разгледа едностранното имуносупресивно действие на МСК върху клетките на имунната система. Това действие може да се провежда директно върху тях, както и да бъде опосредствано от други имунорегулаторни клетки, предимно дендритни клетки и Т регулаторни клетки, като поради важната им роля на посредник, изброените клетки ще бъдат подробно разгледани сами по себе си.

Дисертацията е структурирана, като е разделена на седем глави. Глава I дава общи сведения за мезенхимните стволови клетки, като прави кратък исторически преглед на дефинирането им, описва условията, в които се развиват, маркерите, които експресират, способностите им за самообновление и диференциация. Втората глава е посветена на основните имунорегулаторни фактори, секретирани от МСК. В третата се описва инхибиращото действие на МСК върху основните лимфоцитни субпопулации – Т, В и НК клетки. Четвъртата и петата глава дискутират ефектът върху основните Т регулаторни лимфоцити (Tregs) и съответно дендритните клетки. Тъй като споменатите, сами по себе си имат супресивна функция, те са разгледани подробно, преди да стане дума за ефекта на МСК върху тях. Шеста и седма глава описват участието на МСК в подтискането на имунния

отговор при ситуации, където реално се наблюдава супресия- бременност и съответно злокачествен тумор. Главите са структурирани като в началото се очертава състоянието на проблема, а после се описват нашите резултати, преплетени с дискусия по темата. В някои от главите, където нашите резултати се движат успоредно с началните натрупвания на данни в литературата, информацията за влиянието на МСК върху конкретните клетки е преплетена със собствените резултати и анализ. Така, от определена гледна точка всяка от седемте глави има собствена структура, което приех като неизбежно последствие, с цел оптималната комбинация между информация и анализ в контекста на собствени резултати и литературни данни. Накрая на всяка глава се описват използваните лабораторни постановки и методи. В различните глави някои механизми на действие ще бъдат повтаряни, което считам за неизбежно, с оглед на необходимостта конкретни неща да бъдат казани в контекста на определения проблем. Също така, поради същата причина, често се споменават препратки към друга глава.

Един доста обсъждан въпрос в научните текстове на български език е използването на английски думи и съкращения. В настоящия труд съм се опитал да избягвам излишни английски думи при наличието на точни български такива. Едновременно с това никъде и съвсем целенасочено не съм си позволявал в името на езиковия пуризм, да не предам точното значение на термина. Така например думата “signaling” не е еднозначна със “сигнал”, поради което съм използвал първия термин. Английски термини съм използвал и там, където те са масови приети в имунологичната общност, навсякъде по света. Например изразът “cross talk” би могъл да се преведе като “двустранна връзка”, но поради широкото му използване в имунологията съм предпочел него.

Както казах, въпросната работа обобщава един колективен труд, поради което бих искал да изкажа своята благодарност на хората с които работих, работя, и вярвам, че ще продължа да работя. На първо място бих искал да благодаря на проф. Искра Алтънкова и проф. Станимир Кюркчиев, от които научих всичко в своя професионален път дотук. Наред с това, първата събуди у мен траен интерес към

регулацията на имунния отговор, а втория създаде ентузиазъм по отношение на мезенхимните стволови клетки при мен, както и при още много хора. От тях двамата научих и още нещо: че науката има смисъл сама по себе си, че не е необходимо тя да бъде практически насочена, защото фундаменталните неща без никаква практическа стойност днес, след години могат да изглеждат доста по-различно. Искам да изкажа също така благодарности на колабораторите ми: д-р Екатерина Иванова-Тодорова, Иван Бочев, доц. Милена Мурджева, доц. Румен Димитров, Снежана Кестенджиева, Елена Стоянова, Калина Белемезова, д-р Цветелина Великова, Калина Тумангелова-Юзеир и всички колеги в лабораторията по Клинична имунология на УМБАЛ “Св. Иван Рилски”.

Специални благодарности бих желал да изкажа и на колегите клинични специалисти, без които биха били невъзможни нашите изследвания: ортопеди: проф. д-р. Петър Тивчев, доц.д-р Пламен Кинов, д-р Димитър Букарев, акушер-гинеколози: доц. д-р. Атанас Щерев, д-р Таня Тимева, д-р Ангел Налбански, д-р Мария Юнакова, неврохирурзи: д-р Емануил Найденов.

В заключение, на някои от читателите, тази работа би могла да се стори твърде базисно имунологична, но аз не считам, че това е нейн недостатък, защото твърдо вярвам, че теоретичната основа е необходима като информация, която да освети всички аспекти на проблема и да бъде препятствие пред лековато и прибързано използване на МСК за терапия.

Първоначално планирах да има още една осма глава, която да описва наличните досега данни за резултати от клинични проучвания и приложение на мезенхимните стволови клетки с терапевтична цел. Тази глава остана ненаписана, защото считам, че тя трябва да бъде написана съвместно от имунолози и клинични специалисти, тогава, когато на базата на приложение на мезенхимните стволови клетки за терапия ще имаме резултати, които да съпоставим с получените по света.

Според уебстраницата [ClinicalTrials.gov](http://ClinicalTrials.gov) (един от официалните сайтове на Националния здравен институт на Съединените щати), повече от 418 клинични проучвания в момента изследват терапевтичните ефекти на мезенхимните стволови клетки, като голямата част от проучванията изучават имуномодулаторното

действие на МСК при автоимунни заболявания. Докато нашият екип, съвместно с клинични специалисти не стане част от тези световни процеси, считам, че нямам право да напиша глава VIII. Написването ѝ сега би било едно кухо обзорно обобщение на чужд опит без собствен принос, а аз вярвам, че ние заедно можем повече от това.

# I. Мезенхимни стволови клетки

## 1. Въведение

Като стволови клетки могат да се определят клетки с капацитет за самообновление и способност за диференциация в различни клетъчни линии. Способността им за самообновление се дължи на възможността на стволовите клетки да осъществяват симетрично митотично делене, в резултат на което се получават еднакви с майчината и помежду си клетки и по този начин се поддържа постоянен набор от недиференцирани стволови клетки. За сметка на това, процесът на диференциация е вследствие на асиметрично митотично делене, което води до наличие на една еднаква с майчината клетка и друга, която е различна. Последната навлиза в цикъл на диференциация, вследствие на който се активират нови гени и се проявяват нови черти на клетката. Диференциацията на стволовите клетки не е нито еднопосочен, нито необратим процес, откритието на което доведе до преоценка на множество догми в биологичната наука. Съобразно възможностите им за диференциация стволовите клетки се класифицират както следва:

- Тотипотентни: могат да се диференцират във всички възможни клетъчни линии, включително в герминативни клетки.
- Плурипотентни: те дават началото на мезодермални, ендодермални и ектодермални клетки.
- Мултипотентни: могат да се диференцират в клетки от линии, произхождащи от един зародишев слой (ектодерма, мезодерма или ендодерма)
- Прогениторни: могат да се диференцират в ограничен брой клетъчни линии
- “Предопределени” прогенитори: клетки с ограничена способност за диференциация – само в една клетъчна линия.

В зависимост от тъканта на изолирането си стволовите клетки се разделят на ембрионални и след-ембрионални. За разлика от ембрионалните стволови клетки, изолирани на 5-тия ден от оплождането, на стадий бластоцист, които поставят сериозни етични проблеми за изследването си (*Кюркчиев и Пачаманов 2007*), следембрионалните не поставят такива предизвикателства. Стволовите клетки

могат да бъдат разделени също така на хемопоеични - диференциращи се във всички клетъчни линии на кръвната тъкан, мезенхимни - диференциращи се във всички клетъчни линии, произхождащи от мезодермата (костна, хрущялна, мастна тъкан, ендотелни клетки, мускулни клетки) и неврални, способни да дават началото на неврони, олигодендрцити и астроглия.

Стволовите клетки могат да се диференцират в множество клетки в рамките на зародишевия пласт, от който произлизат, което определя тяхната пластичност, но могат и да се диференцират в клетки от различен зародишев пласт, качество известно като трансдиференциация. Чрез тези си свойства те поставят пред необходимост от генерална преоценка основни догми в биологичната наука. Една друга класификация, разделя стволовите клетки на ембрионални, фетални и с източник зрели тъкани, като последните от своя страна се делят на такива от енто, мезо и ектодермален произход (*Mimeault et al. 2006*). Предмет на настоящият труд ще бъдат произхождащите от мезодермата зрели мезенхимни стволови клетки.

## **2. Терминология и определения**

Понятието „мезенхимни стволови клетки” (МСК), въпреки своята широка популярност, далеч не се приема единодушно от всички изследователи. Терминът „мезенхим” се използва, за да се обозначи примитивната ембрионална съединителна тъкан (*Bianco et al. 2008*), или според друго определение „развиващата се хлабава съединителна тъкан на ембриона, която произхожда предимно от мезодермата и дава началото на множество съединително тъканни клетки на възрастния индивид” (*Roufosse et al. 2004*). Мезенхимът е структура, която е предхождана от епитела, както еволюционно, така и онтогенетично, като се създава от последния (*Perez-Pomares 2002*). Примитивният ембрионален мезенхим се появява след гаструлацията на базата на процес известен като „епител- към- мезенхим промяна,” като веднага след него примитивните мезенхимни клетки се реорганизируют по обратния път мезенхим -към- епител промяна и се формират секундарни епителни структури (*Hay 1990, 1995*). Продължаващата след това епител – към- мезенхим промяна води до формирането на множество органи (*Davies 1996*). Традиционната

представа е, че процесите на промяна на мезенхима в епител и обратно не протичат при възрастния организъм, но откритието на МСК и тяхната пластичност поставя въпросът дали това наистина е така (*Zipori et al. 2004*)

МСК липсват при фунги и растения, това са клетки появили се при метазоа, характеризиращи се с наличие на моторни протеини и протеолитични ензими, които им дават възможност да мигрират през ембрионалните структури, да взаимодействат и да получават сигнали от екстрацелуларния матрикс, и в следствие да се диференцират в мускули, кости, хрущял и други съединително тъканни елементи (*Phinney et al. 2007*). По отношение на произхода на МСК традиционната гледна точка е, че те произхождат от мезодермата (*Salem et al. 2009*), въпреки, че тази теза се оспорва от някои изследователи, които твърдят, че най - ранните клетки подобни на МСК произхождат от невроепитела на невралния гребен и в следствие мигрират в костния мозък по кръвен път (*Takashima et al. 2007, Nagoshi et al. 2008*). Въпреки безспорния факт, че мезенхимните тъкани съдържат, както линейно – специфични прекурсори, свързани с локалната регенерация, така и недиференцирани мултилинейни предшественици (*Roufosse et al. 2004*), МСК са открити и в множество тъкани, които не са от мезенхимен произход- мозък, слезка, чрен дроб, бъбрек, бял дроб, тимус, панкреас, кожа, яйчник (*da Silva et al. 2006, Blashki et al. 2006*). Разбира се, това може да се обясни с трафик на МСК по кръвен път, но както ще стане ясно по-нататък за този процес при МСК липсват убедителни данни. Първоначално описани в костния мозък (където МСК са 1 от 10000 ядрени клетки) (*Chamberlain et al. 2007*), МСК са намерени в множество други органи и тъкани, като представената таблица далеч не описва всички източници. **(Табл. 1)**

**Табл. 1.** Органи и тъкани, в които са установени и доказани МСК

<b>Орган/ тъкан</b>	<b>Съобщаващи автори</b>
костен мозък	<i>Friedenstein et al. 1976, Digirolamo et al. 1999, Pittenger et al. 1999, Murphy et al. 2002, Roufosse et al. 2004,</i>
мастна тъкан	<i>Gronthos et al. 2001, Zuk et al. 2002, De Ugarte et al. 2003, Dragoo et al. 2003, Wickman et al. 2003,</i>
периостеум	<i>Nakahara et al. 1990, Fukimoto et al. 2003</i>

трабекуларни кости	<i>Noth et al. 2002, Tuli et al. 2003</i>
синовия	<i>De Bari et al. 2001</i>
скелетни мускули	<i>Jankowski et al. 2002</i>
бял дроб	<i>Bianco et al. 2000, Noort et al. 2002, Salem et al. 2009</i>
панкреас	<i>Grisan et al. 2008</i>
амниотична течност	<i>Nadri and Soleimani 2007</i>
слезка	<i>Bianco et al. 2000, Chamberlain et al. 2007</i>
черен дроб	<i>Bianco et al. 2000, Chamberlain et al. 2007,</i>
тимус	<i>Chamberlain et al. 2007</i>
ставен хрущял	<i>Chamberlain et al. 2007</i>
сърдечен мускул	<i>Chamberlain et al. 2007</i>
мозък	<i>Bianco et al. 2000, Chamberlain et al. 2007</i>
зъбна пулпа	<i>Gronthos e al. 2004,</i>
кръв от пъпна връв	<i>Erices et al. 2000,</i>
децидуа	<i>Dimitrov et al. 2010</i>
стена на пъпна връв	<i>Wang et al. 2004, Karahuseyinoglu et al. 2006</i>
кожа	<i>Shih et al. 2005</i>
кърма	<i>Patki et al. 2010</i>

Следователно терминът „мезенхимни” се критикува от две посоки – оспорван произход от мезодермата и установената локализация в много не-мезенхимни структури, при сериозни основания за локален произход.

Още по сложна е ситуацията със термина „стволови”, основно изискване за което е потенциалът за мултилинейна диференциация, като различното доказване на този вид потенциал от различните изследователи води до терминологичен хаос (**Табл. 2**).

**Табл. 2** Различни наименования на МСК

<b>наименование</b>	<b>Съобщаващи автори</b>
Костно мозъчни (или съответно адипозни) стромални клетки	<i>Moreau et al. 1993, Cherry et al. 1994, Guerriero et al. 1997, Pittenger and Martin 2004</i>

Мултипотенти стромални клетки	<i>Phinney et al. 2007</i>
MAPCs (multipotent adult progenitor cells)	<i>Jiang et al. 2002, Reyes et al. 2001, 2002</i>
Стромални прекурсорни клетки	<i>Baksh et al. 2004</i>
Рециклиращи стволови клетки	<i>Prockop et al. 2001, 2003, Baksh et al. 2004</i>
Прекурсори от нехемопоеична тъкан	<i>Baksh et al. 2004</i>
CFU-F (colony forming unit fibroblast)	<i>Bianco et al. 2008, Baksh et al. 2004</i>
MIAMI (marrow isolated adult mutinies inducible cells)	<i>D'Ippolito et al. 2004</i>

Основната причина за множеството наименования е различната степен, в която отделните изследователи съумяват да докажат основните белези на „стволовост“ – способност за самообновление и мултилинейна диференциация. Така например името CFU-F е свързано с акцента на авторите върху способността на клетките за клонален растеж, или с други думи, капацитетът на една клетка да образува колонии от фибробластоподобни клетки. Други понятия като “MIAMI”, “костно мозъчни стромални клетки”, “адипозни стромални клетки”, „прекурсори от нехемопоеична тъкан” акцентуират върху тъканния произход, а някои термини като „мултипотенти стромални клетки” и ‘MIAMI’ се опитват едновременно да опишат мултипотентност и допълнителни характеристики. Все още трудно може да се каже съществуват ли реални разлики между клетките, характеризирани с различните понятия, но във всички случаи дори да има такива те едва ли са съществени, като общите характеристики – самообновление, пластичност и мултилинейна диференциация са налице. Поради тази причина, описаните термини се срещат все по рядко в научната литература. Може би изключение

правят клетките описвани предимно при гризачи, като MAPCs, които се характеризират с изключителна пластичност и способност на трансдиференциация надхвърлящи тези на МСК.

В опит да се систематизира терминологията, както и да се създадат минимални критерии за определяне на една клетка като МСК, през 2006 г. Комисията за мезенхимни и тъканни стволови клетки към Международното дружество за клетъчна терапия (ISCT) предлага понятието „мултипотентни мезенхимни стромални клетки” със станала вече популярна абривиатура – МСК (*Dominici et al. 2006*). Така или иначе, вече е късно. Терминът „мезенхимни стволови клетки”, предложен от *Caplan 1991*, се е наложил безвъзвратно, и както понякога се случва в науката, популярното наименование измества по-точното, но по-късно предложеното. В съгласие с огромната част от съвременните научни публикации, терминът „мезенхимни стволови клетки” ще бъде използван и в този труд.

От описаното дотук става ясно, че липсва категорично и единодушно прието определени за МСК. Като такива се определят:

- Клетки адхериращи към пласмасова повърхност с фибробласто подобна морфология, способност за самообновление и диференциация в мезенхимни линии (*Pittenger et al. 1999*)
- Нехемопоеични клетки с неограничена способност за самообновление и мултилинеен потенциал (*Deans et al. 2000*)
- Клетки с липса на тъканно специфична характеристика, които под действието на определени сигнали се диференцират в специфични клетки с фенотип, който може да бъде различен от тъканта, в която са прекурсорите (*Barry and Murphy 2003*)
- Прекурсорни клетки със способност за самообновление и диференциация в множество линии (*Roufosse et al. 2004*)
- Нехемопоеични стромални клетки, способни за диференциация и регенерация на мезенхимни тъкани със способност за самообновление при задържана способност за диференциация (*Chamberlain et al. 2007*)

- Адхерентни, фибробластоподобни клетки, диференциращи се в адипогенна, хондрогенна и остеогенна посока (*Dominici et al. 2006*, определение на ISCT)
- Постнатални прогенитори на повечето, ако не и на всички деривати на мезодермата (*Bianco et al. 2008*)

Всяко от определенията има своите достойнства, акцентуиращо върху различни аспекти от природата на МСК. Според съвременните разбирания при определяне на една клетка като МСК трябва да се имат предвид някои аспекти.

Общата изолирана популация би следвало да се назовава „ мезенхимни стромални клетки”. Терминът „мезенхимни стволови клетки” трябва да се използва при документиран капацитет за самообновление и диференциация и доказване на минимално необходимите фенотипни маркери. Когато се използва понятието, е необходимо да се уточни източникът, биологичния вид, диференцировъчния потенциал, както и дали става дума за култивирани клетки или за такива *in vivo*.

### 3. История

Още през 19 век съществува теоретична концепция за „стволова клетка” (въпреки, че не се назовава така), базирана на способността на някои тъкани да се самообновяват (кръв, кожа), въпреки краткия живот на съставлящите ги клетки (*Bianco et al. 2008*). Първ *Cohneim 1867* формулира идеята за наличието на не-хемопоеична стволова клетка в костния мозък, отговорна за заздравяване на рани и даваща начало на фибробластите (*Prockop 1997*). Модерната история на мезенхимните стволови клетки започва в края на 60-те години с трудовете на *Friedenstein*, който за първи път ги идентифицира в костен мозък на плъх (*Friedenstein et al. 1966*). По късно използвайки модел на морско свинче, същата група доказва, че клетки изолирани от костен мозък, водят до ектопично развитие на кост в подкапсулното бъбречно пространство.

*Friedenstein* и неговия екип установяват, че след 4 часа култивиране на костен мозък върху пластмаса се наблюдават адхерентни, вретеновидни издължени клетки, които по късно оформят хомогенен слой, като той е и първият, който въвежда понятието „фибробластна колонио формираща единица” (CFU-F), за да опише

клоногенния растеж на някои от наблюдаваните клетки ( *Friedenstein et al. 1968, 1970, 1974, 1976, 1987*).

През 1977 *Dexter et al.* описват ролята на МСК като клетки подпомагащи развитието на хемопоетичните клетки в костния мозък, а през 1999г *Caplan et al.* за първи път изолира и доказва диференциацията на МСК в клетъчни линии с мезодермален произход.

Данните на *Friedenstein u Caplan* са потвърдени от *Pittenger et al. 1999*, който установява произход на колонии с начало от една единствена клетка, като по този начин доказва, самообновлението, явяващо се основен критерий за за „стволовост”

#### **4. Видове МСК**

Мезенхимните стволови клетки биват различни видове по отношение на тъканите, в които се намират (**Табл.1**). Те се отбелязват като костно-мозъчни (КМ-МСК), адипозно-тъканни (АТ-МСК), децидуални (Д-МСК), изолирани от стена от пъпна връв и т.н. Един изключително важен въпрос засяга разликите между МСК изолирани от различни източници. Този въпрос трудно би могъл да има категоричен отговор, поради факта, че повечето изследвания относно характеристиките на различните видове МСК се правят при *in vitro* при условия, които във всички случаи променят природата на клетките. Въпреки това, сравнителните изследвания не показват съществени различия. Така например при сравняване на различни лабораторни протоколи за култивиране на КМ- МСК и АТ-МСК, не се установяват фенотипни и функционални разлики, касаещи повърхностните маркери и потенциала за диференциация (*Lodie et al. 2002*). Също така, *Dragoo et. 2003*, установяват еднакъв диференцировъчен потенциал, както при АТ-МСК, така и при КМ-МСК, а *De Ugarte et al. 2003* не откриват никакви разлики между АТ-МСК и КМ-МСК по отношение на растежната кинетика, остаряване на културата и капацитета за диференциация. В друго сравнително изследване между споменатите видове МСК, не се наблюдават разлики по отношение на експресията на повърхностни молекули (*Kolf et al. 2007*).

Съществуват и проучвания, които намират известни разлики между различните видове МСК (*Chamberlain et al. 2007*). В свое задълбочено изследване върху мезенхимни стволови клетки, изолирани от стена от пъпна връв *Karahuseyinoglu et al. 2006*, описват, че тези клетки показват същата способност за остеогенна и хондрогенна диференциация като КМ-МСК, но по-слаба способност за адипогенна диференциация.

Въпреки, че категорично становище на този етап все още не може да бъде формулирано, на този етап в литературата няма данни за принципни различия между мезенхимните стволови клетки, изолирани от различни източници. Доколкото такива са описани, те касаят по скоро количествени, а не качествени параметри. Нашите резултати базирани на използването на КМ-МСК, АТ-МСК, Д-МСК и стволови клетки, изолирани от стена на пъпна връв, също на установяват съществени разлики по отношение на диференциация, клоногенност и фенотипни маркери.

## **5. Локализация и трафик на МСК**

Относно местонахождението на МСК се счита, че те са локализиращи в специфични ниши. „Ниша” е понятие въведено за хемопоеичните стволови клетки (ХСК) в костния мозък, за да обозначи обкръжението поддържащо ХСК, тяхното оцеляване и развитие. В този случай нишата се формира от стромални прекурсорни клетки, като те, както и стромата осигуряват подкрепа за съзряването, оцеляването и диференциацията на ХСК, чрез преки междуклетъчни контакти и секреторни фактори (*Schofield et al. 1978, Tavassoli et al. 1982, Strobel et al. 1986, Koller et al. 2007*). В нишата участват и множество други клетки като адипоцити, макрофаги, ендотелни клетки, ретикуларни клетки, фибробласти и остеопрогениторни клетки. В тази система се намират и костно-мозъчните МСК, което повдига въпроса дали те делят обща ниша с ХСК или имат своя в рамките на общата в костния мозък. Преобладава мнението, че втория вариант е по- достоверен, тъй като е установено, че сигналите необходими за ХСК и МСК са доста различни (*Saraguser et al. 2000, Tuan et al. 2003*). Доказателство в тази посока е и, че както беше посочено, МСК се

намират в множество други структури различни от костния мозък. Следователно в различните тъкани поселявани от МСК съществуват сходни условия, които определят нишите на МСК. Концепцията за ниша на МСК включва всички елементи, заобикалящи МСК: клетките, които са в контакт, екстрацелуларния матрикс и секреторните молекули, като основната функция на тези елементи е поддържане на МСК в недиференцирано състояние (*Kolf et al. 2007*). МСК са локализирани в периваскуларните пространства, като „очертават“ съдовете на микроциркулацията от външната страна (*Shi et al. 2003, Blaski et al. 2006*). Тази локализация им дава възможност за достъп, до на практика всички тъкани, и следователно възможност за комуникация с множество клетъчни типове, като например дендритните клетки (*Tuli et al. 2003*). Външната страна на стената на кръвоносните съдове представлява „пристанище“ за МСК, като е описано, че периваскуларните клетки (мурални клетки, перицити) в множество органи като мускули, панкреас, мастна тъкан и плацента са способни на диференциация в миогенна, остеогенна и хондрогенна посока, експресират типичните маркери за МСК и на практика представляват мезенхимни стволови клетки (*Meirelles et al. 2006, Grisan et al. 2008*). Освен васкуларните перицити, други клетки, които по същество са МСК са т.нар. адвентициални ретикуларни клетки (АРК), представляващи специализирани перицити на венулите в костния мозък (*Bianco et al. 2001*). Клетки, покриващи критериите за МСК на ISCT са установени и в ставния хрущял, който е невакуларизирана структура. Това са т.нар. bone lining cells, които също се считат за МСК (*Barbero et al. 2003*). Следователно МСК имат не толкова категорично рестриктирани ниши, както хемopoетичните стволови клетки.

Важно условие в МСК нишата е наличие на релативна хипоксия. Доказано е, че при условия на 2% кислород МСК имат значително по-голям пролиферативен потенциал, в сравнение с 20%, като се удвояват CFU-F и се засилва експресията на Oct-4 – фактори ключови за процеса на самообновление (*Grayson et al. 2006*). Специално за Oct-4 се счита, че неговата индукция е под влияние на HIF2 $\alpha$  (hypoxia induced factor) (*Covello et al. 2006*). На този етап липсват сведения за конкретни

разтворими молекули и конкретни компоненти на междуклетъчния матрикс, които да обуславят условия за „стволовост” по отношение на МСК (*Koft et al. 2007*).

При определени обстоятелства, вследствие на получени сигнали МСК напускат своите ниши и осъществяват т.нар. homing към местата на тъканна увреда, мигрират и се засилват в увредените тъкани, осъществявайки регенеративни и имуносупресивни ефекти (*Salem et al. 2009*). Множество експерименти при гризачи, третирани с многократни инфузии на МСК недвусмислено показват, че МСК се локализируют в местата на увреда (*Gao et al. 2001, Pittenger and Martin 2004*). Най-често това се осъществява под действие на увредени клетки, които секретират сигнали свързани, както с homing на МСК, така и с тяхното диференциране. Като доказателство за това са експерименти, при които плъши МСК стартират процес на миогенеза в отговор на кондиционирани среди на увредени, но не и на интактни мускулни клетки (*Santa-Maria et al. 2004*). Съществуват данни, че интактни клетки също могат да индуцират МСК диференциация, като например остеобластите са в състояние да засилят остеогенезата на МСК в условия на пряк контакт с тях. Характерно е, че не винаги прекия контакт води до индукция на МСК диференциацията в посока към клетката, индуцирала контакта. Така например директния контакт между МСК и хондроцит, често индуцира остеогенеза, а не хондрогенеза (*Gerstenfeld et al. 2003*).

Процесът на homing се осъществява под влиянието на хемокинов градиент, като при възпаление и увреда се повишава хемокиновата концентрация, което е основния сигнал за МСК, отправящи се по посока високата концентрация (*Honczarenko et al. 2006, Salem et al. 2009*). Важни взаимоотношения регулиращи МСК миграцията са SDF1 (stromal derived factor) / CXCR4 (хемокинов рецептор, експресиран върху МСК), както и матриксните металопроотеинази (*Son et al. 2006*). Друго ключово взаимодействие е комуникацията между хемокина CCL21 и неговия рецептор CCR7. Също така МСК реагират на повишени концентрации на хемокините CXCL1, CXCL16, CCL3, CCL-19, както и на някои секреторни интегринови молекули като  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  интегрини и подокаликсин (*Salem et al. 2009*). На повърхността на МСК са описани множество хемокинови рецептори: CCR1, CCR2,

CCR3, CCR4, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CXCR4, CXCR5, CXCR6, което демонстрира важната роля на взаимоотношения хемокини/ рецептори в процеса на homing (*Chamberlain et al 2007*).

Следващият етап след придвижването определяно от хемокиновия градиент е трансендотелната миграция на МСК, процес твърде сходен с този на левкоцитите, с основна роля на Е и Р селектините на повърхността на ендотелните клетки и CD44 (селектинов рецептор) на повърхността на МСК. Тези взаимодействия водят до rolling (търкаляне) на МСК върху ендотелната повърхност. Описаните междуклетъчни комуникации не са еднопосочни, тъй като има данни, че освен ендотелните клетки, МСК също експресират Р- селектин (*Chamberlain et al 2007*). Връзката със селектини се последва от активация на интегринови рецептори, специално VLA-4 (very late antigen) на повърхността на МСК, който осъществява връзка с ICAM (intercellular adhesion molecule) 1 и VCAM (vascular cell adhesion molecule) на повърхността на ендотелните клетки. Установено е, че МСК експресират следните интегрини:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ , CD105, ICAM-1, ICAM-3, VCAM (*Chamberlain et al 2007*)

Вследствие на връзката чрез интегрини, следва процес на трансендотелна миграция осъществявана чрез кадхерини и JAMs (junction adhesion molecules) (*Salem et al. 2009*). Една разлика в трансендотелния трафик на левкоцитите е, че за МСК не е категорично установена експресията на PECAM (platelet/endothelial cell adhesion molecule), молекула основна за трансендотелната миграция на левкоцитите (*Chamberlain et al 2007*)

Някои данни показват, че процесът на homing се осъществява не само при увреда, но и при нормални условия. Установена малка фракция МСК, циркулираща в кръвта и попадаща в белите дробове и мускулите, като броят им нараства при тъканна хипоксия (*Francois et al. 2006, Salem et al. 2009*). Това дава основание да се счита, че фракция на МСК може да бъде намерена като циркулираща в периферната кръв- една концепция, която е приемана от някои изследователи, но отхвърляна от други.

Идеята за циркулацията на стволови клетки е на повече на 150 години (*Prockop et al. 1997*), но конкретно в случая с МСК тя е доста дискутабилна. Изнесена са множество данни в нейна подкрепа, като например резултати демонстриращи, че след инфузия на КМ-МСК, се наблюдава тяхното завръщане в костния мозък, както и локализацията им в множество мезенхимни тъкани (*Pereira et al. 1995, Prockop et al. 1997*). Също така *Fernandez et al. 1997* и *Zvaifler et al. 2000* докладват изолиране на МСК от периферна кръв, а *Kuznetsov et al. 2001* съобщава за изолиране на МСК от периферна кръв на мишка, заек, морско свинче и човек, докато *Huss et al. 2000* информират за изолирането на МСК от кръв на куче. В тази посока са и данните на *Wu et al. 2003*, изолирал МСК от аорта на плъх, *Eries et al. 2000* от човешка пъпна кръв и *Campagnoli et al. 2001* съответно от фетална кръв. Като индиректно доказателство за наличието на циркулиращи МСК е описаното наличие на МСК в присадени органи, като техния произход е от донорен, а не от реципиентен произход (*Quaini et al. 2002, Roufosse et al. 2004*).

Въпреки това твърде много са данните, които не откриват МСК: в периферната кръв (*Lazarus et al. 1997, Jones and McGonagle 2008*), нито в кръв от пъпна връв (*Wexler et al. 2003*). В подробно разгледани литературни данни, както и на базата на собствен опит върху 16 донора *Jones and McGonagle 2008* предполагат, че миграцията на МСК се осъществява по скоро през тъканите, отколкото по кръвен път, като при тъканно увреждане към зоната се предвижват локалните МСК от нишите си в периваскуларните пространства. Авторите не изключват и кръвния път на миграция на МСК, но само вследствие на мобилизация при тъканна увреда, а не при нормални условия.

Във всички случаи категоричен отговор на въпроса за нормално циркулиращи в периферната кръв МСК все още няма. Дори такива да съществуват, те представляват изключително малка фракция, все още категорично недоказана по отношение на основните характеристики на мезенхимните стволови клетки.

## **6. Изолиране и култивиране на МСК *in vitro***

Изолирането на КМ- МСК се извършва от аспират от костен мозък взет от *crista iliaca superior* (Digirolamo et al. 1999, Pittenger et al. 1999, Minguell et al. 2001), тибията или фемора (Murphy et al. 2002), както и от гръдния и лумбалния сегмент на гръбначния стълб (D'Ippolito et al. 1999). При изолиране на АТ-МСК, материалът, който се използва се получава при липосукция или при различни хирургични процедури (Kern et al. 2006), докато децидуалните МСК се изолират след прекъсване на бременността по желание (Dimitrov et al. 2010). Стандартната процедура е, след обработка на материала  $1 \times 10^4$  до  $0,5 \times 10^6 / \text{cm}^2$  клетки да бъдат разсяти за култивиране (Pittenger et al. 1999, Lodie et al. 2002, McBride et al. 2003, Chamberlain et al. 2007). От времето на Friedenstein, култивирането на мезенхимните стволови клетки не е претърпяло съществена промяна. От основно значение е да се отстранят плуващите клетки, чрез смяна на средата и интензивно ресуспендиране докато останат само адхериралите клетки (Chamberlain et al. 2007). Получените моноклеарни клетки се култивират в стандартни среди с 10% фетален телешки серум (ФТС), като след първоначален хетерогенен вид се формират адхерентни, издължени вретеновидни клетки. След първоначална лаг фаза около 2 до 4 ден клетките започват да се делят интензивно, като първоначално растат на гнезда (Friedenstein et al. 1976, Pittenger et al. 1999, Reyes et al. 2001, Minguell et al. 2001, Gregory et al. 2005, Kolf et al. 2007, Phinney et al. 2007). Важно е да се обърне внимание на факта, че не всички клетки в културата са истински стволови клетки, някои от тях са бипотентни или монопотентни, поради което множество автори предпочитат използването на понятието ”стромални клетки” (Harwitz et al. 2005, Dominici et al. 2006). Във всички случаи МСК са сравнително лесни за изолиране, притежават висок потенциал за експанзия и показват генетична стабилност и запазващи се качества след множество пасажи, като късните пасажи не показват хромозомни аномалии и имат запазена теломеразна активност (Halvorsen et al. 2000, Gronthos et al. 2001, 2003, Zuk et al. 2002, Jones et al. 2002, Lodie et al. 2002). Така например при изследванията си върху МСК, изолирани от стена от пъпна връв Karahuseyinoglu et al. 2006 използват клетки до 50-ти, 60-ти пасаж, култивирани в продължение на 10 месеца и установяват

запазен фенотип, липса на спонтанна диференциация и мултипотентни стволови характеристики.

Някои автори използват допълнителни компоненти към културалните среди, с цел да повишат интензивността на клетъчното делене, като bFGF (basic fibroblast growth factor) (*Martin et al. 1997*), под действието, на който се увеличава броя на клетките с удължени теломери и съответно интензивността на клетъчно делене. По отношение на култивирането на МСК при мишки, такова действие имат LIF (leukemia inhibiting factor), EGF (epidermal growth factor) и PDGF-BB (*platelet derived growth factor BB*) (*Bianchi et al. 2003*)

Наред с класическите методи за култивиране на МСК има опити за тяхното изолиране чрез магнитна сепарация и флоуцитометрия (*Majumdar et al. 2000, Quirici et al. 2002, Shi et al. 2003, Deschaseaux et al. 2002*), като на този етап тези подходи отстъпват, поради недоизяснените маркери на МСК *in vivo*.

Важно е да се отбележи, че МСК култивирани *in vitro* не са идентични с тези в организма, като по време на изолирането и култивирането могат да се наблюдават епигенетични промени, засягащи пластичността. Също така са описани донор-специфични вариации в генната експресия на МСК, както и промени в генната експресия при преминаването от разпръснато състояние в хомогенен слой (*Gregory et al. 2005, Phinney et al. 2007*)

Типът растеж на МСК след изолирането им като „адхерентни, фибробластоподобни”, е важна характеристика, която ги определя като такива и влиза в минималните критерии на ISCT (*Dominici et al. 2006*)

## **7. Клоногенност**

Способността на МСК да образуват клонове е израз на основното за стволовите клетки качество- самообновление (self-renewal). Тази способност е ключова характеристика, без която нито една клетка не може да се определи като „стволова”, поради което присъства в почти всички дефиниции на понятието. Самообновлението е процес на симетрично делене, при който се получават дъщерни клетки със същата характеристика като майчината и помежду си (*Roufosse*

*et al. 2004*), или казано по друг начин способност на клетката да създава идентични на себе си копия чрез митотично делене, за дълъг период от време. Едно друго определение дефинира процеса на самообновление, като способност да се образуват клетки идентични по фенотип и с потенциал да създадат клетъчна популация, поради задържан процес на диференциация (*Bianco et al. 2008*). Тоест самообновлението и диференциацията са два донякъде противоположни процеса, спирането на процеса на диференциация е необходимо условие за интензивно самообновление (експанзия), характеризиращо стволовите клетки. Още пионерите в областта на мезенхимните стволовите клетки, акцентуират върху способност за self-renewal, чрез понятието CFU-F, показващо произход на колония от една единствена клетка (*Friendenstein 1970, Pittenger et al. 1999*), като и до днес тази способност е „златен стандарт” за идентификация на МСК. Началото на МСК експанзията е свързано с CFU-F клетка, която се дели и дава началото на клонална клетъчна колония с хомогенен вид, който се запазва в продължение на много пасажи (*Pittenger and Martin 2004*). МСК могат да се копират повече от 1 милион пъти, запазвайки способността си за диференциация в няколко линии (*Pittenger et al. 1999, Muraglia et al. 2000, Sottile et al. 2002*), като дават повече от 40 популации в рамките на месеци (*Bianco et al. 2000 Karahuseyinoglu et al. 2006*). Тази способност може да бъде засилена под действието на някои фактори, като  $\beta$ FGF (*Bianchi et al. 2003*). Друго важно условие, определящо интензивността на процеса на самообновление при МСК е гъстотата на посяване на клетките, като е доказано че при гъстота 1,5 - 3 клетки на  $\text{cm}^2$ , експанзията на МСК е значително по-висока от тази на клетки засети в гъстота 12 клетки на  $\text{cm}^2$  (*Colter et al. 1997*) МСК притежават значителна, но вариабилна способност за самообновление (*Bianchi et al. 2003*), като процесът се контролира от множество фактори. Биологичните пътища и механизми запазващи недиференцираното състояние на МСК са свързани с действието на LIF (*Jiang et al. 2002*), FGF (*Tsutsumi et al. 2001*), и Wnt фамилията (*Boland et al. 2004*). Също така важно значение за контрола на процеса имат експресираниите от МСК транскрипционни фактори : Oct-4, Sox-2 и Rex-1 (*Izadpanah et al. 2006*)

Колоногенността на МСК е установена в най-пълна степен от изследванията на *Muraglia et al. 2000*, *Sarugaseri et al. 2009* и *Lee et al. 2010*, които доказват *in vitro* получаване на клонове от 1 клетка, като получената колония притежава способност за мултилинейна диференциация.

## 8. Фенотип

### 8.1. Имунотипизиране на клетъчни култури *in vitro*

На този етап не са доказани уникални маркери за мезенхимните стволиви клетки, които ги определят като такива. Първите изследвания целящи да установят експресия на специфични за МСК молекули *in vitro* доказват, че МСК не експресират CD45, CD34, CD14, а експресират SH2, SH3, SH4 (*Haynesworth et al. 1992*, *Gronthos et al. 1994*).

SH2, описано за първи път от *Haynesworth et al. 1992* е известно още като CD105, докато SH3 и SH4 разпознават различни епитопи на екто 5<sup>1</sup>- нуклеотидазата и са известни още като CD73 (*Barry et al. 2001*). Последвалите проучвания показват, че наред с описаните маркери, МСК експресират и Stro-1, както и  $\alpha$ -актин, наред с множество цитокинови рецептори (IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7 R, IFN $\gamma$ R, TNF $\alpha$ R, TGF $\beta$ R), интегрини: ( $\alpha$ 1, 2, 3, 4, 5,  $\beta$ 1, 3, ICAM-1 и 2, VCAM-1, LFA-3, ендоглин, CD44) (*Minguel et al. 2001*). Stro-1 антитялото, описано от *Simmons et al. 1994* и *Simmons and Torok 1999*, е насочено срещу костно-мозъчните стромални клетки и бележи почти хомогенна популация, способна на мултилинейна диференциация (*Gronthos et al. 2003*). Също така е доказано, че Stro-1 негативните клетки не са CFU-F, следователно маркерът корелира със способността за самообновление (*Simmons et al. 1994*). Поради тези причини първоначално Stro-1 дава надежди за наличие на установен специфичен маркер, бележещ МСК популацията. Някои негови недостатъци, обаче го правят трудно приложим за целта. Stro-1 липсва при мишки и губи експресията си при дълго култивиране, което го прави подходящ единствено за изолиране и фенотипизиране на ранни култури (*Gronthos et al. 2003*). Съществен недостатък на Stro-1, също така е липсата на експресията му в МСК, изолирани от различни от костния мозък структури

(Mafi et al. 2011). Други две молекули, SB-10 (CD166) (Bruder et al. 1997) и CD106 (VCAM-1) намерени върху повърхността на МСК, също не са рестриктирани само върху тях, като VCAM-1 се среща и върху ендотелните клетки, като е свързан с процесите на адхезия, хемотаксис и сигнална трансдукция (Carter et al. 2001). Интензивните изследвания в областта, водят до идентифициране на множество повърхностни, молекули, експресирани на повърхността на МСК, както и на такива, които по правило не се експресират (Табл. 3)

**Табл.3** Позитивна и негативна експресия на повърхностни маркери от МСК

Експресирани маркери	Липса на експресия	Автор
CD13, CD29, CD44, CD49a, b, c, e, f, CD51, CD54, CD58, CD71, CD73, CD90, CD102, CD105, CD106, CDw119, CD120a, b, CD123, CD124, CD126, CD127, CD140a, CD166, HLA-A,B,C	CD3, CD4, CD6, CD9, CD10, CD11a, CD14, CD15, CD18, Cd21, Cd25, Cd31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD50, CD62E, L, S, CD80, CD86, CD95, Cd117, CD133	<i>Pittenger and Martin 2004</i>
Stro-1, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106	CD11b, CD34, CD45, CD117,	<i>Kolf et al.2007</i>
CD105 (SH2), CD73 (SH3,4), CD44, CD90, CD71, Stro-1, CD106 (VCAM), CD29, ICAM-1	-CD45, CD34, CD14, CD11, CD80, CD86, CD40, CD31 (PECAM), CD18 (LFA-1), CD56	<i>Chamberlain et al. 2007</i>
<b>CD9</b> , CD10, CD13, CD29, CD44, Cd49 a,b, c, e, CD51, CD54, CD58, CD61, CD62 L, CD71, CD73, CD90, CD102, CD104, CD105, CD106, CD119, CD120 а и b, CD121, CD123, CD124, CD126, CD127, CD140a, CD166, CCR1, CCR4, CCR7, CCR10, CXCR5, VCAM, ICAM-1	CD45, CD34, CD14, CD11a, CD19, CD80, CD86, CD40, CD15, CD18, CD25, CD31, CD49d, CD50, CD62E, CD62P, CD117	<i>Salem et al. 2009</i>

Анализирайки 186 статии, касаещи експресията на маркери върху МСК, *Mafi et al. 2011*, докладват като най-често установени експресирани CD105, CD90, CD44, CD73, CD29, CD146, CD106, CD54, CD166, докато съответно най-често съобщаваната липса на експресия е за CD34, CD14, CD45, CD11b, CD49d, CD106, CD10, CD31.

Както може да се види, както от таблицата, така и от анализа на *Mafi et al. 2011*, маркерите са твърде много и данните за тях са доста противоречиви. Така например CD10 може да се срещне и като експесиран (*Salem et al. 2009*) и като липсващ на повърхността на МСК (*Pittenger and Martin 2004*) Също така от анализа на *Mafi* се вижда, че CD106 по подобен начин масово се описва и като експесиран и като неекспесиран от мезенхимните стволови клетки. В опит да се стесни обхвата на маркери, които да се използват за имунофенотипизиране на МСК, *Kolf et al. 2007* акцентуират върху изследването на CD90 (Thy-1), CD44, CD29 и CD73 (SH 3 и 4).

Според препоръките на ISCT за минимални критерии, характеризиращи една клетъчна популация като мезенхимна стволова е необходима експресия на CD105, CD73, CD90 в повече от 95% от клетките в културата и отрицателна експресия на CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79a или CD19, HLA-DR, които съответно да бъдат по малко от 2% в културата (*Dominici et al. 2006*).

## **8.2. *In vivo* маркери на МСК**

Подобна на ситуацията с маркерите, бележещи МСК в клетъчни култури е и тази с МСК маркерите *in vivo*, като в литературата съществуват малко съобщения засягащи този въпрос. *Jones and McGonagle 2008* съобщават за МСК клетки, характеризиращи се с *in vivo* фенотип CD45<sup>low</sup>/CD271+, като претендират, че CD271 е маркерът, който бележи МСК популацията *in vivo*. Изолираните клетки показват експресия на Stro-1, CD73, CD90, CD105 и CD44, което ги прави идентични по повърхностен фенотип с култивираните *in vitro* МСК. Единственият от изследваните маркери, който се разминава между изолираните CD45<sup>low</sup>/CD271+ и клетъчните култури е CD146, който при CD45<sup>low</sup>/CD271+ клетките варира от ниска до висока експресия. Друг маркер, който според авторите би могъл да се

ползва за *in vivo* изолиране и фенотипизиране на МСК е D7-FIB, като се установява, че изолираните чрез него клетки експресират CD10 и CD13, два маркера не толкова категорично свързани с типичните за култивираните МСК (*Jones and McGonagle 2008*). CD105 е повърхностна молекула, която също се дискутира в контекста на маркер, бележеш МСК популацията *in vivo*. Съществуват данни, че при използването му за изолиране на МСК, изолираните клетки показват CFU-F капацитет и три-линейна диференциация (*Aslan et al. 2006*). Подобни характеристики са описани и за CD146, като наред с CFU-F капацитета, клетките изолирани, чрез използването му, показват способност да формират костно вещество и да поддържат хомеостазата. Според авторите CD45-/CD146+ клетките, проявяват характеристики на адвентициални ретикуларни клетки (*Sacchetti et al. 2007*), които, както беше казано по горе реално представляват МСК. Въпреки множеството опити да се намери маркер, който категорично да идентифицира популацията на МСК, на този етап от научното познание такъв все още липсва.

## **9. Пластичност, диференциация и трансдиференциация**

### **9.1.Общи положения**

Централна догма в биологията е, че клетка в дадена тъкан може да се диференцира само в клетъчни линии производни на същата тъкан. Стволовите клетки, изолирани от възрастен индивид оборват това схващане, тъй са в състояние да прекосяват тази рестрикция и да се диференцират в клетки от други тъкани (*Lakshmiathy and Verfaillie 2005*). Това качество в миналото е свързано единствено с ембрионалното развитие, но днес е категорично доказано и за зрелия организъм (*Zipori 2004*). Друга централна догма е, че клетките при нормални условия се развиват от недиференцирано към диференцирано състояние. Откритието на стволовите клетки доведе до преоценка на това разбиране, тъй като вече е категорично установена при нормални условия, способността за дедиференциация, не само на стволовите клетки, но и на терминално диференцираните (*Baksh et al. 2004*).

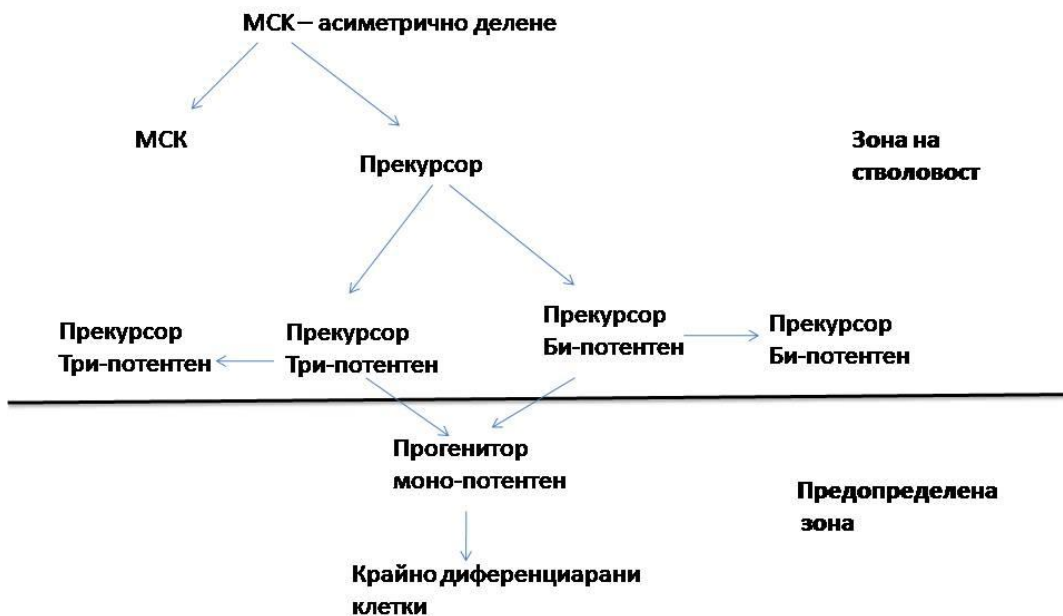
Именно тази способност за мултилинейна диференциация и дедиференциация определят свойството на МСК, известно като пластичност. Като трансдиференциация (линейно репрограмиране) се определя процес, който води до трансформация на една зряла клетка в друга, без преминаване през стадия на плурипотентни прогениторни клетки (*Graf et al. 2009*), или казано с други думи, превръщането на клетъчен тип от дадена тъкан в клетъчен тип в друга тъкан без преминаване през стадий на плурипотентни клетки (*nature.com 2013*). В случая със стволите клетки, като „пластичност” се определя способността им за дедиференциация, както и способността им да дават начало на множество видове клетъчни прогенитори в рамките на същия зародишев пласт, докато с термина „трансдиференциация” се бележи екстремната форма на пластичност, определяща възможността да се даде начало на клетки с произход от различен зародишев пласт, в сравнение с този, от който произхожда стволите клетка.

Както вече беше споменавано МСК са мултипотентни, като имат способност за диференциация в различни мезенхимни тъкани като кости, хрущял, мастна тъкан, сухожилия и мускули, като това определя тяхната пластичност, но МСК имат капацитет да се диференцират и в немезенхимни тъкани като епител и нервна тъкан, което ги прави способни за извършване на процеса трансдиференциация (*Zipori 2004, Roufosse et al. 2004*). Клетките, считани за вид мезенхимни стволите клетки, определяни като MAPCs и описани от *Jiang et al. 2002* при мишки, са класически пример за клетки с изявени характеристики на пластичност и трансдиференциация. Те могат да се диференцират не само в мезодермални деривати, но и в клетки с произход от висцералната невроектодерма и ендодерма. Екстремната пластичност на тези клетки обуславя тяхното нестабилно състояние, като те за кратко време преминават от една в друга позиция, определяща различен фенотип. Една MAPC инжектирана в ранен бластоцист може да се диференцира във всички соматични клетки (*Zipori 2004*). Въпросът, кое обуславя пластичността от страна на МСК намира своя отговор в установяване на факта, че тези клетки притежават множество генни фамилии, които са в подтиснато състояние, за

разлика от диференцираните клетки, където гените са по-малко, но силно експресирани (*Zipori 2004*).

Съществуват два теоретични модела, описващи пътищата на диференциация на МСК. Първият от тях се базира на идеята, че мезенхимните стволови клетки имат йерархично развитие, като при определени условия на средата, процесът на самообновление намалява за сметка на стартиране на определен път на диференциация. По този път МСК и техните производни минават през различни стадии докато достигнат терминалната си диференциация, което води до стоп на пролиферацията и синтез на тъканно специфични гени (*Roufosse et al. 2004*).

МСК са хетерогенна клетъчна популация с различен диференцировъчен капацитет, съдържаща три-потентни, би-потентни и моно-потентни клетки, както и прогенитори. При изолирането на МСК е установено, че около 1/3 от тях имат способност да се диференцират едновременно в остео-, хондо- и адипогенна посока, докато останалите 2/3 са с по рестриктирана способност за диференциация, в една или в две линии (*Pittenger et al. 1999*). *Baksh* предлага следната схема, описваща процеса на диференциация при МСК (**Фиг.1**)



**Фиг.1.** Модел на диференциация на МСК, предложен от *Baksh et al. 2004* (с модификации). Вследствие на асиметрично делене МСК дава прекурсорни клетки, но и еднакви на себе си, като процес продължава и при прогениторните клетки, които са три- и би-потентни, поради което се намират в „зоната на стволост”. Монопотентния прогенитор спира деленето си и се превръща в крайно диференцирана клетка, като тя и предшественика ѝ се намират в „предопределената зона”

Моделът свързан с йерархично линейно диференциране на МСК от един стадий на диференциация към друг се оспорва, поради данните доказващи, че МСК притежават пластичност и способност за трансдиференциация, като във втория случай дават начало на клетки, различни от тъканта към която принадлежат (*LaBarge et al. 2002, Zgao et al. 2002, Jiang et al. 2002*). Този процес се наблюдава *in vitro* и при по зрели, даже крайно диференцирани представители като остеоласти, адипоцити и хондроцити (*Song et al. 2004*). Тоест, процесът на трансдиференциация *in vitro*, съпроводен с интензивна клетъчна пролиферация води до това, че „предопределени” клетки губят своята линейна специфичност, като достигат до

примитивни стволови клетки. След индукция тези дедиференцирани клетки могат да се редиференцират в друга посока. Изследванията водят до извода, че наред с клетките в „зоната на стволовост”, „предопределените” клетки, както и диференцираните запазват капацитета си за мултипотентност и своята пластичност, които могат да бъдат придобити отново при съответните условия (*Baksh et al. 2004*)

## 9.2. Остеогенна диференциация

Пръв *Friedenstein et al. 1974* доказва, че МСК, изолирани от костен мозък „прехвърлят хемопоетичната среда” от тяхната тъкан в ектопични места (в бъбречната капсула), като наред с това формират костно вещество. Последвалите изследвания доказват, че МСК могат да се диференцират в кост (*Bruder et al. 1997*), хрущял (*Kadiyala et al. 1997*), сухожилие (*Young et al. 1998*), мускул (*Ferrari et al. 1998*), мастна тъкан (*Dennis et al. 1999*), строма поддържаща хемопоезата (*Prockop 1997*)

Способността на МСК да се диференцират в остеогенна посока е първото им доказано качество, свързано с образуване на зрели клетки от мезенхимен произход. МСК, вследствие на асиметрично делене преминават през стадии на остеопрекурсори, остеопрогенитори, преостеобласти, остеобласти докато се получат зрели остеоцити (*Song et al. 2004*). По пътя на тази диференциация са установени 914 гена, които засилват или съответно намаляват своята експресия. Важна част от в този процес заемат транскрипционните фактори *Cbfa1/ Runx2*, *Nsx2*, *Dlx5* и *OSX* (*Baksh et al. 2004*), като под тяхно действие се стига до експресия на гени, типични за костното вещество, кодиращи остеопоетин, колаген тип I, алкална фосфатаза, костен сиалопротеин и остеокалцин (*Harada et al. 2003*). Важна роля в процеса заемат и *BMP-2* и *BMP-6* (bone morphogenic proteins) (*Chen et al. 2004*), които индуцират ацетилирането на *Runx2*, който е ключовия ген ангажиран в остеогенезата. Липсата на ацетилиране на *Runx2* води до деградацията му от лигазите *Smurf1* и *Smurf2* (*Jeon et al. 2006*).

Друг фактор въввлечен в процеса на остеогенна диференциация е T-box гена *tbx5*, който взаимодейства с ко-регулатора TAZ и в резултат засилва своята активност, което от своя страна индуцира остеогенезата (*Murakami et al. 2005*).

Важна роля в процеса заемат и Wnt - фамилия секретирани гликопротеини, богати на цистеин, които регулират развитието и диференциацията на МСК. Класическият signaling провеждат под тяхно въздействие има като резултат повишена стабилност на цитоплазмения  $\beta$ -катенин, вследствие на инактивация на GSK-3 киназната активност. Наблюдава се транслокация на  $\beta$  – катенин в ядрото, което води до регулация на транскрипцията на гени, свързани с пролиферация и остеогенна диференциация. Установено е, че дефекти в ко-рецептора за Wnt, LRP5 водят до дефектно образуване на костно вещество (*Baksh et al. 2004*). Наред с ролята на Wnt в остеогенезата, класическият signaling, провеждан от тях е тясно и положително свързан и със способността на МСК за пролиферация, като се индуцира експресия на гени ангажирани в регулацията на клетъчни цикъл: Мус, циклин D1, Msx1 (*Willert et al. 2003*). Така например, под влияние на Wnt3, МСК засилват способността си за пролиферация и съответно отслабва способността им за апоптоза. Както класическият, така и некласическият signaling провеждан от МСК промотира остеогенезата (*Boland et al. 2004*). Важно е да се отбележи, че Wnt нямат единствено еднопосочно действие по отношението на диференциацията на МСК в остеогенна посока, като е известно, че докато в големи количества действието им е поддържащо процеса, то в малки ефектът е обратен (*Gaspar et al. 2004*)

*In vitro* са описани няколко вида фактори, под действието на които МСК се насочват към остеогенна диференциация, най-важните от които са комбинацията от:  $\beta$ -глицерол фосфат, дексаметазон и аскорбинова киселина. Култивирането на МСК в културална среда съдържаща тези фактори, както и ФТС в период от 2-3 седмици води до остеогенната им диференциация визуализирана чрез специфични оцветявания с Alizarin red и vonKossa, както и чрез наличие на алкално-фосфатазна активност и калциева депозиция (*Barry and Murphy 2003, Chamberlain et al. 2007*)

### **9.3. Хондрогенна диференциация**

Диференциацията на МСК в хондрогенна посока е свързана с действието на 52 гена (*Baksh et al. 2004*) и се осъществява под влияние на TGF $\beta$ , BMPs, GDF (growth and differentiation factor) и Wnt фамилията (*Massague et al. 2000, Chen et al. 2004, Hartmann et al. 2006*). Тези фактори действат чрез цитоплазмените Smad протеини и ядрените MAPK (mitogen activated protein kinases), като субстратът на MAPK е НАТ (nucleosome histone acetyl transferase) (*Abecassis et al. 2004*). Wnt фамилията също са ангажирани в процеса на хондрогенеза, като Wnt7a стимулира процеса по пътя на TGF $\beta$  и MAPK, но в увеличени количества има инхибиращо действие (*Tuli et al. 2003*), докато Wnt3a действа чрез BMP-2 стимулирайки хондрогенезата и също така в увеличени количества има обратното действие (*Fischer et al. 2002*).

При *in vitro* постановки необходимите условия за диференциацията на МСК в хондрогенна посока е наличието на среда даваща възможност за тримерен клетъчен растеж, липса на серум и наличие на фактор от TGF $\beta$  суперфамилията. Под въздействието на такава културална среда МСК променят морфологията си и експресират хрущяло-специфични матриксни компоненти като: глюкозаминогликани, агрекан, фибромодулин, хрущялен олигометричен матриксен протеин, декорин, колаген II и IX, бигликан (*Tuan et al. 2003, Baksh et al. 2004*). Доказването на хондрогенна диференциация се визуализира чрез специфично оцветяване с Toluidin Blue (*Chamberlain et al. 2007*)

#### **9.4. Адипогенна диференциация**

Действието на 957 гена (*Baksh et al. 2004*) е свързано с процеса на адипогенна диференциация на МСК, като основният регулатор на процеса е PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor) (*Barry and Murphy 2003*). Свързването му в цитоплазмата от дълговерижни мастни киселини и тиазолидинедион индуцира транслокация му в ядрото, където би могло да се осъществява връзка с TAZ и адипогенезата да бъде подтисната за сметка на остеогенезата (*Hong et al. 2005*). Алтернативно, връзката с TIPs (tension induced inhibited protein) промотира процеса на адипогенеза (*Jakkaraju et al. 2005*). Фактори, за които е известно, че подтискат адипогенната диференциация на МСК са IL-1 и TNF $\alpha$  (*Suzawa et al. 2003*).

При *in vitro* култивиране на МСК, адипогенната диференциация се постига чрез среди съдържащи дексаметазон, инсулин, изобутилметилксантин и индометацин и се визуализира чрез наличие на липидни капки и специфично оцветяване с Oil red O (*Chamberlain et al. 2007*)

Важно е да се отбележи, че съществуват множество гени, които са общи за различните пътища на диференциация на МСК. Така например има 253 гена общи за адипогенната и остеогенната диференциация, 3 са общи за остеогенната и хондрогенната, а 10 за адипогенната и хондрогенната. Описани са 8 гена, които са общи за трите пътя и които се приемат за основните контролиращи гени. Те са ангажирани също така и в други процеси като клетъчна адхезия, организация на цитоскелета и протеиновите нагъвания (*Baksh et al. 2004*)

### **9.5. Миогенна диференциация**

Индуцирането на миогенеза от МСК се осъществява основно под действието на активацията на Notch1 рецептора (*Dezawa et al. 2005*). Установено е също така, че прекия контакт между кардиомиоцити и МСК стимулира миогенната диференциация на последните, като основна роля имат взаимодействието на Notch 1 и неговия лиганд Jagged 1 (*Li et al. 2006*). *In vitro* миогенната диференциация на МСК изисква културални среди, съдържащи 5-азациитидин (*Taylor and Jones 1982*) или амфотерицин В, като се визуализират мултинуклеарни фибри (*Phinney et al. 1999*).

### **9.6. Тендогенна диференциация**

За основният фактор, ангажиран в диференциацията на МСК в сухожилия се счита GDF протеинът, под действието, на който е доказано формирането на сухожилие *in vivo* (*Wolfman et al. 1997*). Също така BMP-2 и взаимодействието му със Smad8 има доказана роля в тендогенната диференциация (*Hoffmann et al. 2006*).

### **9.7. Ендотелна диференциация**

МСК също така могат да се диференцират в ендотелни клетки и по този начин да участват в процеса на неоваскуларизация (*Davani et al. 2003, Gojo et al. 2003*)

### **9.8. Трансдиференциация**

Както беше пояснено по-горе процесът на трансдиференциация представлява диференциацията на МСК в клетки производни от друг зародишев пласт, в сравнение с този, от който произлизат МСК. Трансдиференциацията на МСК е описана относно формирането на клетки от невроектодермата, конкретно епителни и неврални клетки

### **9.8.1 Епителни клетки**

Трансдиференциацията на МСК в епителни клетки е описана като способност на МСК да „се превръщата“ в епителни ретинални пигментни клетки, кожни епителни клетки и тубуларни епителни клетки. При експозиция на блеомицин на мишки се установява заселване на МСК в белия дроб, където е доказано тяхното трансдиференциране в епителни пневмоцити тип I и тип II. Този процес на трансдиференциация се осъществява и при ко-култивиране на бронхиални епителни клетки обработени термично заедно МСК. При тази постановка се доказва, че някои МСК директно се трансдиференцират в епителни клетки, а други се сливат с епителния слой (*Phinney et al. 2007*).

### **9.8.2. Неврални клетки**

Докато процесът на трансдиференциация на МСК в епителни клетки не подлежи на съмнение, нещата при невралните клетки не стоят точно така. Доказано е, че МСК експресират, както гени, така и протеини, нормално експресирани от невралните ектодермални тъкани (*Kopen et al. 1999, Chopp et al. 2002, Chen et al. 2003*). Също така множество изследвания с МСК при мишки, плъхове и хора претендират, че МСК са способни на неврална трансдиференциация (*Deng et al. 2001, Kohyama et al. 2001, Sanchez-Ramos 2000, 2002, Woodbury et al. 2000, 2002*). Описани са и фактори, които я предизвикват: EGF, BDNF (brain derived neurotrophic factor), както и комбинацията изобутилметилксантин заедно с дибутирил цикличен АМФ (аденозин монофосфат), които водят до индукция на маркери на невронална диференциация – Nestin и GFAP (glial fibrillary acid protein) (*Sanchez-Ramos 2000, Kohyama et al. 2001*, докладват за подобно действие на съчетанието 5-азицитидин, BDNF и невротропин 3, докато *Woodbury et al. 2000, 2002*, установяват ролята на DMSO/ butylated hydroxyanisole, заедно с FGF и PDGF. Доказано е също така, че

МСК инжектирани в мозъка на новородени мишки мигрират през тъканта и придобиват морфологични и фенотипни характеристики на астроцити и неврони (Kopen et al. 1999).

Интензивните изследвания по отношение капацитета на МСК да се трансдиференцират в неврални клетки, водят до установяване на твърде голям брой агенти, които предизвикват неврно-подобна морфология на МСК и експресията на Nestin и GFAP. Освен описаните, такъв ефект имат и множество детергенти, високо рН, високо моларен NaCl (Lu et al. 2004), редуциращи агенти, субстанции, водещи до увеличен АМФ, антиоксиданти (Krabe et al. 2005, Phinney et al. 2005, Chen et al. 2006), култивирането върху различни повърхности (Qian et al. 2004). Огромното разнообразие на тези агенти, тяхното бързо действие и обратимостта на процеса повдигат въпроса доколко става дума за реална трансдиференциация. Още повече подобен ефект се наблюдава, не само при МСК, но и при фибробласти и кератиноцити. Установява се също така, че сета гени на МСК, за които се предполага неврална трансдиференциация е доста различен от този, както на нормалната неврална тъкан, така и на нетретираниите МСК (Phinney et al. 2007). На базата на това се счита, че по скоро се осъществява процес на агент индуцирана цитоскелетна реорганизация, свързана с нарушени биохимични свойства на микротубулите и микрофиламентната мрежа, отколкото за процес на реална трансдиференциация (Chou et al. 2000).

Нещо повече, експресията на Nestin и GFAP, въпреки че традиционно се свързва с невралната тъкан, далеч не е толкова рестриктирана. Недиференцираните клетки конститутивно експресират „неврално специфични протеини“ (Vigel et al. 2003, Wislet-Gendebien et al. 2003, Tondreau et al. 2004, Deng et al. 2006). Nestin се установява при мускулни (Sejersen et al. 1993) и ендотелни клетки по време на развитието им (Mokry et al. 1998). По подобен начин GFAP се експресира от хондроцити и фибробласти (Egerbache et al. 1995)

Специално за МСК е установено, че могат да експресират GFAP (Tondreau et al. 2004) след 5-ти пасаж на култивирането си. Доказването на факта, че МСК експресират Nestin, дава основание да се предположи, че съществува уникален клас

МСК, ангажиран с невралната трансдиференциация (*Lendahl et al. 1990, Ratajczak et al. 2006*), но фактите свързани с капацитета на твърде много агенти да индуцират експресия на Nestin от МСК, водят по скоро към отхвърляне на тази идея. По скоро се счита, че микрофиламентите формират динамична мрежа, която е способна да се променя в зависимост от влиянията на околната среда и стадия на диференциация (*Phinney et al. 2007*). Разбира се, единствено експресията на маркери не може да даде достатъчно информация относно способността на МСК да извършват трансдиференциация по посока неврални клетки. На базата на изследване на функционалните качества на получените в резултат на трансдиференциацията неврони, се установява слабата им мембранна деполяризация и непълноценна невротрансмисия (*Cho et al. 2005*). От казаното дотук, не следва да се отхвърля реалната възможност за пълноценна МСК трансдиференциация в неврална тъкан, още повече, че този процес е убедително доказан при MAPCs, изолирани от костен мозък при мишки (*Jiang et al. 2003*). Факт е, обаче че в тази сфера има още много въпроси, търсещи своя отговор, още повече, че в ЦНС съществува популацията на невралните стволови клетки, способни за диференциация в олигодендроцити, глиа и неврони. Връзките между невралните стволови клетки, формиралите се от тях при дадени ситуации ракови стволови клетки и МСК ще бъдат обект на обсъждане в глава VII.

За доказване на мезенхимни стволови клетки ISCT препоръчва извършване на диференциацията им в остеогенна, хондрогенна и адипогенна посока, визуализирани чрез специфични оцветявания (*Dominici et al. 2006*)

## **10. Други свойства на МСК**

Наред с изброените дотук, мезенхимните стволови клетки притежават и други, не по малко важни свойства, които, тъй като не са обект на настоящия труд ще бъдат само набелязани.

### **10.1. Тъканна регенерация**

Тъканната регенерация е основно свойство на МСК, поради тяхната способност за трафик и диференциране под влияние на факторите на микросредата в увредената

тъкан. Под тяхно въздействие се осъществяват процеси на функционално възстановяване (*Verfaillie et al. 2002*), което дава надежди за ефективното им използване за целите на регенеративната медицина. По нови данни дават основание да се счита, че ролята на МСК в тъканната регенерация е свързана, не толкова с прякото физическо участие на МСК чрез диференциране и заместване на увредени клетки, колкото с индиректното им действие, осъществявано чрез секрецията на фактори, които засилват регенерацията на увредените клетки, стимулирайки пролиферацията и диференциацията на прогениторите. Важно значение в този аспект имат също така антивъзпалителните и имunosупресорни свойства на МСК (*Phinney et al. 2007*)

## **10.2.Поддържане на хемопоезата**

Първоначалните изследвания върху МСК са фокусирани именно върху тяхната способност да поддържат хемопоезата, чрез сигнали индуциращи диференциация и пролиферация на хемопоетичните стволови клетки и техните прогенитори, като тези сигнали се осъществяват, както чрез преки междуклетъчни контакти, така и чрез секреторни цитокини и хемокини (*Moreau et al. 1993, Cherry et al. 1994, Guerriero et al. 1997*). Ясно от само себе си е, че тази функция касае МСК населяващи костния мозък, които оформят своеобразно „скеле”, осигуряващо дълготрайна хемопоетична активност (*Zipori et al. 2004, Baksh et al. 2004*).

## **10.1.Имуногенност**

МСК експресират множество повърхностни молекули, които дават основание да се предполага взаимодействие с Т клетките : МНС- I, CD90, VCAM, ICAM, LFA-1 (lymphocyte function associated molecule), интегрини ( $\alpha$ 1,2,3,5,6,  $\beta$ 1,2,3) и много други молекули (*Pittenger et al. 2000, Najumdar et al. 1998, 2003*). Въпреки, че контактът между клетките на имунната система и МСК безспорно съществува, този контакт не води до имунно отхвърляне на алогенните МСК. Една от причините за това, но вероятно не единствената е, че МСК не експресират В7 комплекса (CD80/CD86), CD40 и молекулите от МНС II комплекса. За разлика от МНС II, които могат да се експресират под действието на IFN $\gamma$ , този процес на се осъществява по отношение на В7 (*Melntosh et al. 2000, Tse et al. 2003*). Теоретично

би могло да се предполага, че при стартиране на диференциацията си МСК би следвало да експресират МНС II и да бъдат мишена на имунно отхвърляне. Опитите на *LeBlanc et al. 2003*, доказват, че МСК диференцирани *in vitro* също не проявяват антигенни свойства. Като цяло, множество проучвания, както *in vitro*, така и на животински модели, недвусмислено показват, че МСК не са имуногенни. Причините за това, освен изброените, са много и те ще бъдат разгледани при дискутирането на комуникацията между МСК и клетките на имунната система.

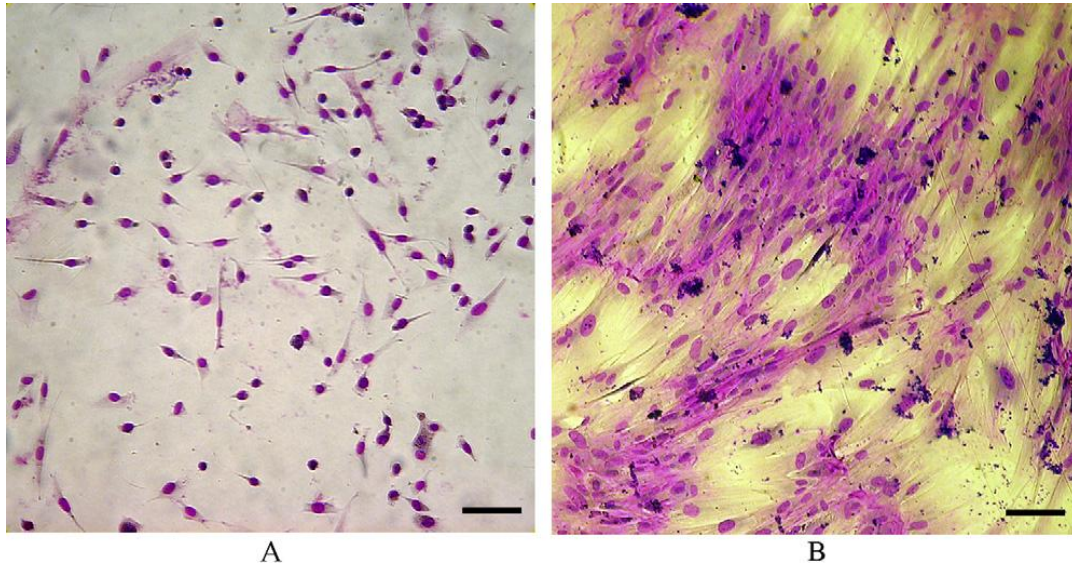
## **11. Собствени резултати**

В нашите изследвания са използвани мезенхимни стволови клетки изолирани от 4 източника: костен мозък, мастна тъкан, децидуа и стена на пъпна връв. За всеки вид от описаните клетки е доказана специфичната морфология и растеж, експресия на маркери, клоногенност и мултилинейна диференциация. И за четирите вида мезенхимни стволови клетки резултатите са публикувани, съответно: костен мозък и мастна тъкан (*Bochev et al. 2008*), стена от пъпна връв (*Kestendjieva et al. 2008*) и децидуа (*Dimitrov et al. 2010*). Характеристиката на МСК изолирани от мастна тъкан и костен мозък е подробно описана и в дисертационния труд на Иван Бочев. Поради споменатите причини, както и за да се избегне монотонно повторение на едни и същи резултати, получени с различни видове клетки, избрах да се спра на децидуалните мезенхимни стволови клетки (Д-МСК), чието изолиране, фенотипизация, клоногенност и диференциация да се опише подробно. Изборът върху тях пада, поради факта, че нашият екип е първият който подробно описва и доказва тези клетки.

### **11.1. Морфология**

Приблизително една седмица след изолирането си Д-МСК образуваха колонии, като морфологично клетките се характеризираха с издължена, вретеновидна форма с централно разположено кръгло ядро, тоест обичайната фибробласто-подобна морфология на мезенхимни стволови клетки (**Фиг. 2А**). Клетките демонстрираха висок пролиферативен капацитет и приблизително към 12-тия ден формираха

хомогенен адхерентен, клетъчен слой (**Фиг. 2В**). При серия от пасажи Д-МСК запазиха своята морфология и пролиферативна способност, като не се установиха белези на остаряване на културата в течение на 6 месеца, в хода на 12-14 пасажа.

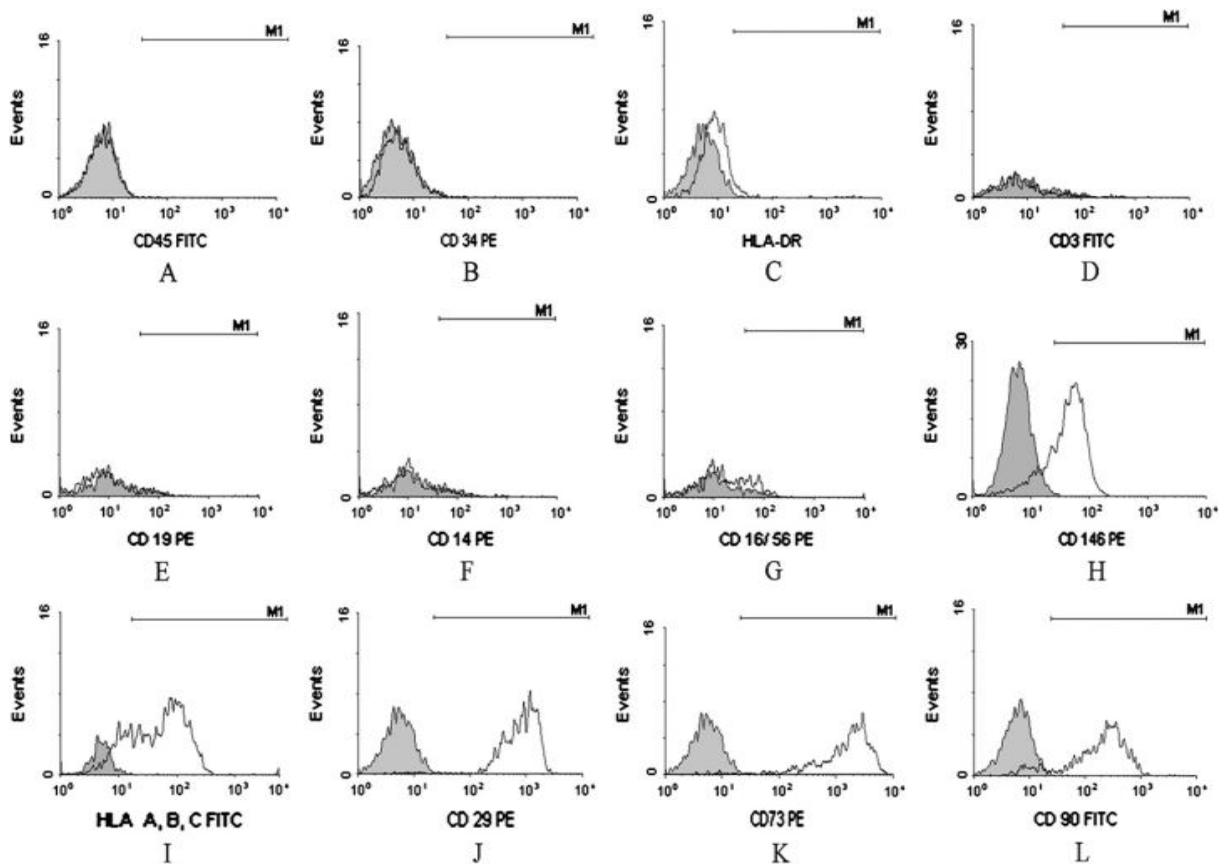


**Фиг. 2** Светлинно микроскопски морфологичен изглед на *in vitro* култивирани Д-МСК. Издължена вретеновидна фибробластоподобна форма на индивидуалните клетки (А), които вследствие на интензивната си пролиферация преминават в адхерентен, хомогенен монослой (*Dimitrov et al. Fertility and Sterility 2010*)

Наблюдаваната морфология, дълготрайните пасажи и интензивния пролиферативен капацитет са класически характеристики на мезенхимните стволкови клетки

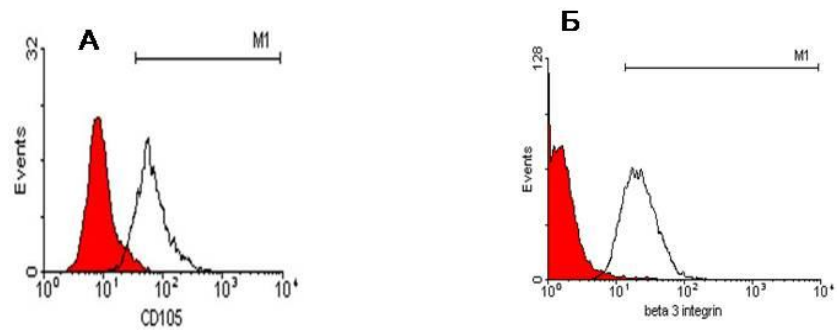
### 11.2 Имунофенотип

Д-МСК бяха изследвани за основните фенотипни маркери, които трябва, и съответно не трябва да експресират, като беше установено, че клетките са негативни по хемопоеичните и левкоцитните маркери (CD45, CD34, CD19, CD14, CD16/56, CD3), докато типичните за МСК маркери CD73, CD90 и CD29 се експресират върху почти 100% от Д-МСК (**Фиг. 3**)



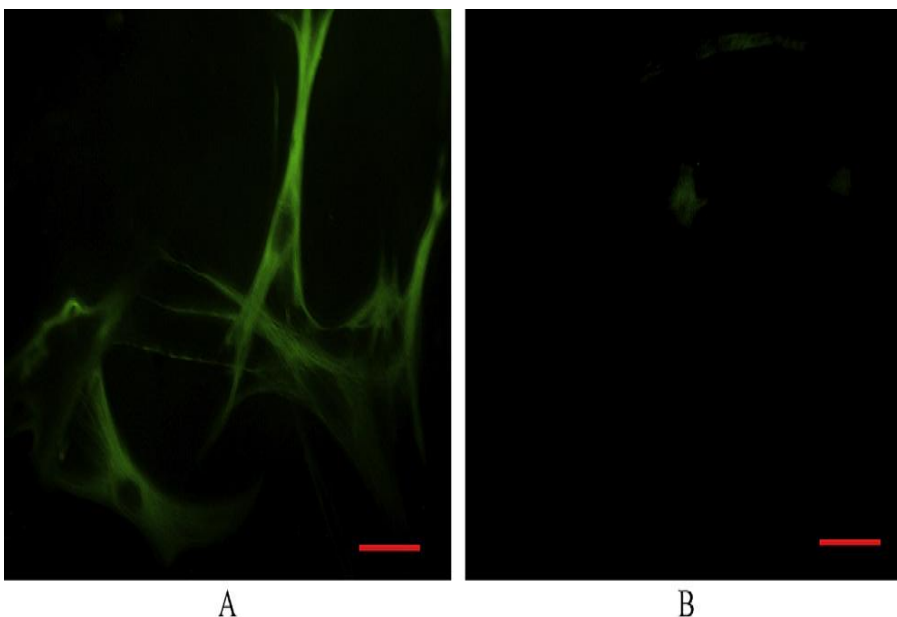
**Фиг.3** Експресия на повърхностни маркери от Д-МСК. Клетките са негативни по CD45(A), CD34(B), CD3(D), CD19(E), CD14(F), CD16/56(G), HLA-DR положителна експресия се установява при 1.6 до 6.3% от клетките при различните експерименти (C). Д-МСК демонстрират почти 100% положителна експресия на CD29(J), CD73(K) и CD90(L). Експресията на CD146 беше установено в средно 82,3% от клетките, докато тази на МНС клас I (A,B,C) беше отчетена на 75% (I) (*Dimitrov et al. Fertility and Sterility 2010*).

Една от повърхностните молекули, ключови за имунофенотипизацията на МСК и влизаща в имунотипизационната част от критериите на ISCT не беше изследвана при Д-МСК (по технически причини), но за сметка на това показва убедителна експресия при всички други проби от другите три вида МСК (**Фиг.4 А**). По същия начин всички други видове, изследвани МСК показаха и специфична експресия на  $\beta 3$  интегрин (**Фиг.4 Б**)



**Фиг. 4** Експресия на CD105 (А) и  $\beta 3$  интегрин (Б) от мезенхимни стволви клетки, изолирани от стена от пъпна връв (*Д.Кюркчиев и сътр.*)

Фактът, че изолираните и култивирани Д-МСК са от мезенхимен произход беше доказан и чрез установяването на интрацелуларната им експресия на виментин (Фиг.5)



A

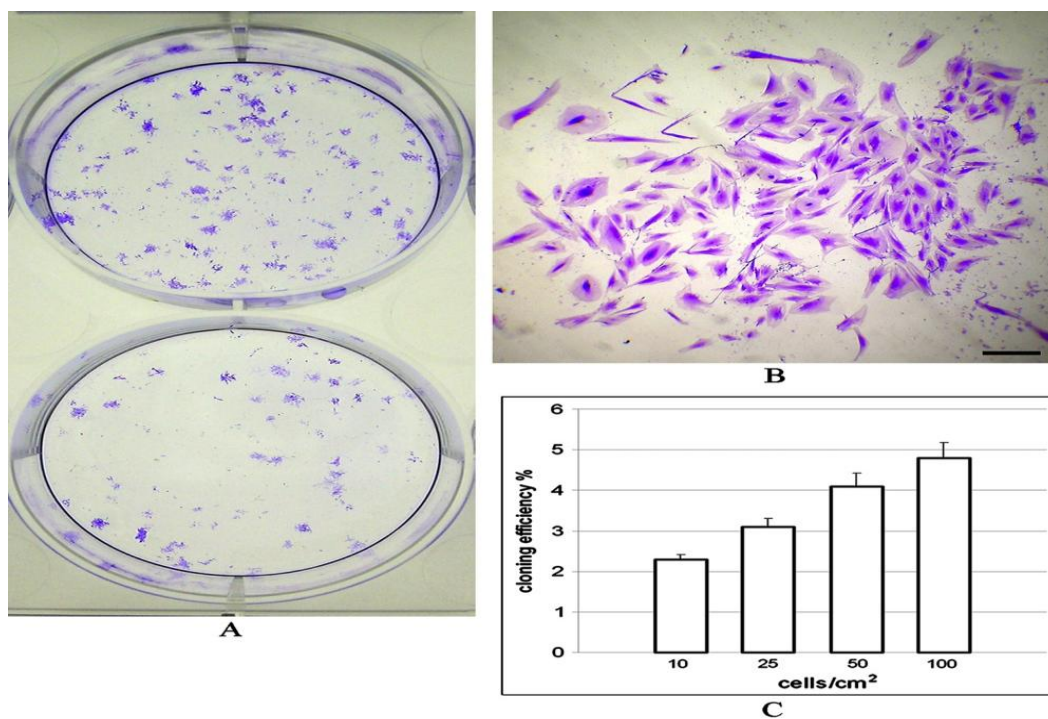
B

**Фиг. 5** Индиректна имунофлуоресценция, доказваща интрацитоплазмена експресия на виментин от Д-МСК(А). Негативна контрола (В) (*Dimitrov et al. Fertility and Sterility 2010*).

Анализът на експресираните маркери показва, че клетките проявяват имунофенотип, типичен за мезенхимни стволови клетки, като резултатите ни показаха, че описаната експресия се запазва за целия период на култивирането на клетките (до 6-тия месец).

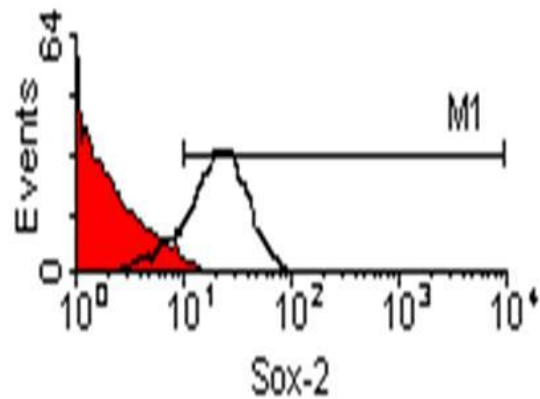
### 11.3 Клоногенност

Както беше многократно споменавано, още от експериментите на *Friedenstein*, установяването на клоногенност е изключително важно за идентифицирането на стволови клетки. Установяване на CFU-F е *conditio sine qua non* за доказване на способността на МСК за самообновление. С цел да изследване способността на Д-МСК за самообновление клетки на 4-ти пасаж бяха трипсинизирани и посяти в концентрация, съответно 10, 25, 50 и 100 клетки на  $\text{cm}^2$ , като на 15-тия ден бяха преброени отделните колонии, след оцветяването с Crystal violet (**Фиг. 6А, В**). При 10 клетки на  $\text{cm}^2$  колонии формираха 2.3%, 3.06% формираха колонии при засяване 25 клетки на  $\text{cm}^2$ , 4.1% при 50 клетки на  $\text{cm}^2$  и 4.8% при 100 клетки на  $\text{cm}^2$  (**Фиг.6 С**). Доказването на клоногенност, чрез използване на класическия CFU-F тест, още веднъж доказва „стволовата” природа на Д-МСК.



**Фиг. 6** Колонио-формиращи единици тест (CFU-F) за Д-МСК. Установяват се отделни колонии с проиход от 1 клетка, оцветени с Crystal violet. Горна ямка 100 клетки на  $\text{cm}^2$ , долна ямка 50 клетки на  $\text{cm}^2$  (A). Единична колония (B). Количествени данни за клоногенна ефикасност при различна клетъчна плътност на засяване. Данните са средни от 8 експеримента (C) (*Dimitrov et al. Fertility and Sterility 2010*)

Както беше споменато способността за самообновление се регулира от няколко транскрипционни фактора, един от които е Sox-2. С цел да допълним изследването на Д-МСК за потенциал за самообновление, ние изследвахме и доказахме интрацелуларната експресия на Sox-2 (Фиг.7)



**Фиг. 7.** Д-МСК експресират интрацелуларен Sox-2 – един от транскрипционните фактори базисен за способността им за самообновление (*Д. Кюркчиев и сътр.*)

## 11.4 Диференциация

Основно изискване за доказване на мезенхимни стволови клетки е способността им за мултилинейна диференциация, която в случая с Д-МСК тя беше доказана в посока остеогенна, адипогенна и диференциация в ендотелно-подобни клетки.

### 11.4.1 Остеогенна диференциация

Култивирането на клетките в остеоиндуктивни среди води до това, че след около 18 дни се стига до промяна в тяхната морфология, като клетките стават широки и плоски, като показват значително засилена алкално фосфатазна активност (**Фиг.8 С**). Екстрацелуларният матрикс на диференциращите се Д-МСК, показва

минерална депозиция, която свидетелства за метаболитни промени и се доказва, чрез оцветяване по von Kossa (**Фиг.8 В**)

#### ***11.4.2 Адипогенна диференциация***

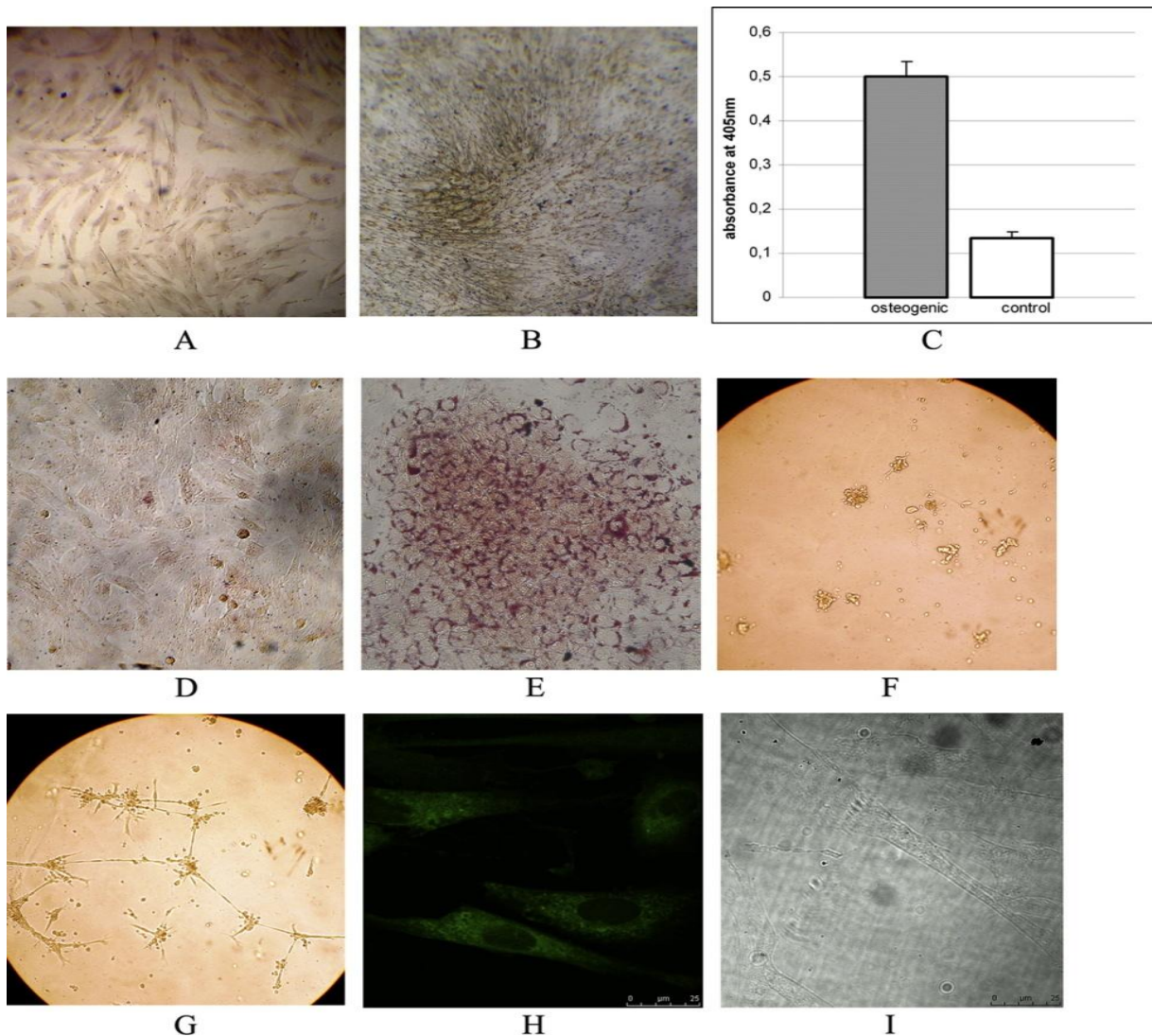
При култивирането на Д-МСК в адипо-индуцираща среда, след 18 дни се установи наличието на вакуоли с липидно съдържание, които показаха специфично оцветяване с Oil red O (**Фиг. 8 Е**), свидетелство за адипогенна диференциация.

#### ***11.4.3 Ендотелна диференциация***

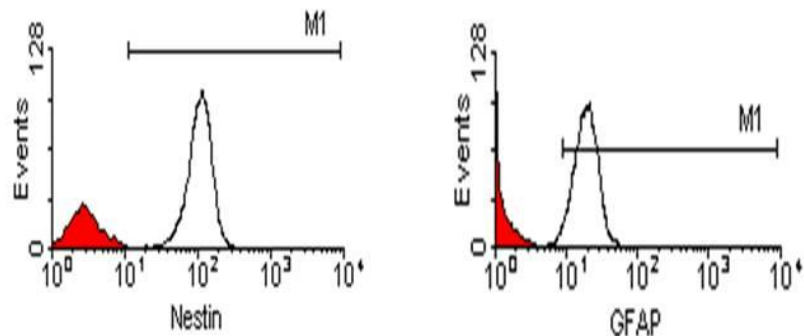
Култивирането в специализирана среда на Д-МСК доведе до установяване на първоначално разпръснати клетки, които след 12 часа започнаха да оформят малки и нарядко разположени клъстърни свързани едни с други. След 24 часа култивиране клъстърите станаха по-големи, с тънки връзки помежду си и оформиха полигонални структури. Два дни по-късно връзките между клъстърите станаха все по-тънки и наподобяваха капиляроподобни тръбички (**Фиг.8 G**). След третиране с колагенеза, клетките бяха оставени да залепнат на стъкалца, покрити с желатин, като изследването им показва експресия на фактор на фон Вилебранд (**Фиг.8 H**).

#### ***11.4.4. „Трансдиференциация” в неврална тъкан***

Както беше коментирани по-горе, въпросът дали мезенхимните стволови клетки са способни на трансдиференциация все още няма своя категоричен отговор. На фона на множеството съобщения, за голям брой фактори, под действието на които МСК експресират маркери типични за неврална тъкан, нашите резултати също така показаха, че при култивиране в среди, съдържащи EGF и bFGF, МСК, изолирани от мастна тъкан и стена на пъпна връв демонстрират интрацелуларна експресия на Nestin и GFAP, като тази експресия се наблюдава в близо 100% от клетките (**Фиг. 9**) Както стана дума по горе, доста е вероятно този феномен да не е свързан с реална трансдиференциация, а по скоро с цитоскелетно реорганизиране.



**Фиг.8.** Мултилинейна диференциация на Д-МСК. Установява се специфичното оцветяване за остеогенна диференциация von Kossa (А- контрола, В- остеогенно диференцираща се клетка), както и повишена алкално-фосфатазна активност (С). Доказва се диференциация в адипогенна посока чрез специфично оцветяване с Oil red O (D- контрола, E- адипогенно диференцираща се клетка). Диференциация в посока ендотелни клетки се установи чрез образ на формирани структури с вид на тръбички (F- контролни клетки, G- клетки, диференциращи се в ендотелна посока), както и чрез специфичната експресия на фактор на фон Вилебранд (H).



**Фиг.9** AT-MCK при култивиране в среди с EGF и  $\beta$ FGF експресират интрацелуларно Nestin и GFAP (Д. Кюркчиев и сътр.)

В заключение беше доказано, че клетки изолирани от човешка децидуа представляват мезенхимни стволови чрез тяхната морфология и растеж, фенотипни маркери, способност за самообновление (установена чрез капацитет за клоногенност) и мултилинейна диференциация. По същият начин бяха третирани и доказани мезенхимни стволови клетки, изолирани от костен, мозък, мастна тъка, и стена от пъпна връв. Подходът, който използвахме напълно покрива, а в някои случаи и надхвърля минималните изисквания за доказване на МСК, препоръчани от ISCT. На базата на това, ние започнахме изследването на имунорегулиращата им способност.

## **12. Материали и методи**

### **12.1 Материали**

Пробите от мастна тъкан (7 на брой) и тези от костен мозък (7 на брой) бяха изолирани след рутинни хирургични процедури в Клиниката по ортопедия и травматология, УМБАЛ „Царица Йоанна- ИСУЛ” София, в съгласие с изискванията на местната Етичната комисия, след подписано информирано съгласие на пациентите. Всяка проба беше съхранявана в стерилен фосфат буфериран разтвор (PBS, рН 7.4) и в рамките на максимум 2 часа беше доставена в лабораторията.

Осем проби от човешка децидуа бяха използвани от здрави жени на възраст между 26 – 32 години след прекъсване на бременността по желание между 8 и 10 гестационна седмица. Всички пациентки подписаха информирано съгласие, съгласно изискванията на Етичната комисия към САГБАЛ „Д-р Щерев”, София. Всяка проба беше съхранявана в PBS рН 7.4 и в рамките на максимум 2 часа беше доставена в лабораторията.

По отношение на изолирането на клетки от пъпна връв бяха използвани десет проби, след нормални раждания, като пъпните върви бяха предоставени за изолиране на мезенхимни стволови клетки, в тъканна банка „Булген”. Всяка пациентка подписа информирано съгласие за използването на материал за научни цели, в съгласие с договора подписан с тъканна банка „Булген”

В различните експерименти за изследване на имуномодулация, осъществявана от МСК бяха изследвани 39 клетъчни култури от периферни кръвни мононуклеарни клетки, получени от здрави доброволци.

### **12.2.Изолиране и култивиране на мезенхимни стволови клетки**

#### ***12.2.1. Адипозна тъкан***

Пробите от мастна тъкан бяха промити 3 пъти с по 50 ml среда Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (PAA, Austria) с цел отстраняване на кръвта, и фракционирани механично на малки парчета с големина около 1–2 mm<sup>3</sup>. Получената тъканна суспензия беше хомогенизирана с 0,075% колагеназа тип IA (Sigma-Aldrich, USA) в продължение на 60 минути на 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажност на въздуха, на

шейкър. В последствие към колагеназата беше добавена 20 ml DMEM, съдържаща 10% ФТС (РАА Austria). Едноклетъчна суспензия, беше получена след филтруване на тъканния хомогенат през стерилен клетъчен филтър с размери на порите 70  $\mu\text{m}$ . Филтратът беше центрофугиран на 200g за 10 минути. Клетъчната утайка беше промита чрез ресуспендиране в 30 ml PBS, pH=7,4 с последващо центрофугиране на 200g за 10 минути. Клетъчната фракция беше ресуспендирана в среда DMEM в присъствие на 10% ФТС. Клетките бяха посяти в шест-ямкови полистиренови плаки (Orange Scientific, Belgium), в концентрация  $1 \times 10^5$  кл./ $\text{cm}^2$  и култивирани при стандартни условия (37° C, 5 % CO<sub>2</sub> и 95% влажност на въздуха). 24 часа по-късно бяха отстранявани неадхериралите клетки, след което свежа културална среда беше добавяна на всеки 4 дни (3 ml/ямка). На 15-20 тия ден от началното посяване, достигналите над 90% конfluентност прилепнали фибробластоподобни клетки бяха трипсинизирани (Trypsin 0,05%/EDTA 2 – 4 мин.; 37°С) и препосявани в 25  $\text{cm}^2$  PVC флаσκοвете (Orange Scientific, Belgium) в концентрация  $2,5 \times 10^3$  кл./ $\text{cm}^2$ . Клетъчната култура беше поддържана в продължение на 4 - 8 последователни пасажа, като клетки от различните пасажи бяха замразявани в течен азот.

### ***12.2.2. Костен мозък***

След центрофугиране (200g, 10 мин.), от костно-мозъчната проба бяха отстранявани последователно серумна и еритроцитна фракция, като за целта еритроцитите бяха лизирани с помощта на АСК буфер ( pH=7,2–7,4, 0,15 M NH<sub>4</sub>Cl; 0,1 mM EDTA; 0,01 M NaHCO<sub>3</sub>), в продължение на 8 мин. при стайна температура в съотношение клетъчна утайка : лизиращ буфер 2:1. След етапа на еритроцитно лизиране, пробата беше центрофугирана за 10 мин. на 200g. Утаената фракция от ядрени костномозъчни клетки беше промивана двукратно със стерилен PBS и ресуспендирана в DMEM в присъствие на 10% ФТС. Клетките се посяха в шест-ямкови плаки (Orange Scientific, Belgium). След 24 часа от първичната култура бяха отстранявани неприлепналите костномозъчни клетки и беше добавяна свежа хранителна среда (3 ml/ямка). Средата за култивиране беше сменяна на всеки 4 дни. На 15-20 -тия ден от изолирането култивираните фибробластоподобни клетки достигаха над 90% конfluентност и бяха трипсинизирани (2–4 min; 37°С).

Препосяти бяха в 25 cm<sup>2</sup> PVC флаσκοвете (Orange Scientific, Belgium) в концентрация 2,5 x 10<sup>3</sup> кл./cm<sup>2</sup>. Клетъчната култура бе поддържана в продължение на 4 - 8 пасажа.

### ***12.2.3. Децидуа***

Всяка проба беше промита трикратно със среда DMEM (PAA, Austria), съдържаща 100 IU/ml пеницилин и 100µg/ml стрептомицин, след което децидуалната тъкан беше внимателно отделена от трофобласта и нарязана на парченца приблизително 1-2 mm<sup>3</sup>. След допълнително промиване с PBS, тъканта беше инкубирана за 1 час на 37<sup>0</sup>C в 0,25% колагенеза тип IA (GIBCO BRL, USA) на шейкър. След това беше добавена среда DMEM с 10% ФТС (PAA, Austria). Клетъчната суспензия беше прекарана през 70µm сито, с цел да се отстранят жлезисти и епителни клетки. След центрофугиране за 10 минути на 200g, клетките в утайката бяха ресуспендирани в DMEM с 10% ФТС, 100 IU/ml пеницилин, 100µg/ml стрептомицин и 2mM L-glutamine и посяти в 6 ямкови плаки (Orange Scientific, Belgium). След 24 часа инкубация на 37<sup>0</sup>, 5% CO<sub>2</sub>, плуващите клетки бяха отстранени. На 15- 20- тия ден от началното посяване, достигналите над 90% конfluентност прилепнали фибробластоподобни клетки бяха трипсинизирани и препосявани в 25 cm<sup>2</sup> PVC флаσκοвете (Orange Scientific, Belgium) в концентрация 2,5 x 10<sup>3</sup> кл./cm<sup>2</sup>. Клетъчната култура беше поддържана в продължение на 4 - 8 последователни пасажа, като клетки от различните пасажи бяха замразявани в течен азот.

### ***12.2.4. Стена от пънна връв***

Всяка проба беше промита трикратно със среда DMEM (PAA, Austria), съдържаща 100 IU/ml пеницилин и 100µg/ml стрептомицин, след което тъканта беше нарязана на парченца приблизително 1-2 mm<sup>3</sup>. След допълнително промиване с PBS, тъканта беше инкубирана за 1 час на 37<sup>0</sup>C в 0,25% колагенеза тип IA (GIBCO BRL, USA) на шейкър. След това беше добавена среда DMEM с 10% ФТС (PAA, Austria). Клетъчната суспензия беше прекарана през 70µm сито. След центрофугиране за 10 минути на 200g, клетките в утайката бяха ресуспендирани в DMEM с 10% ФТС, 100 IU/ml пеницилин, 100µg/ml стрептомицин и 2mM L-glutamine и посяти в 6 ямкови плаки (Orange Scientific, Belgium). След 24 часа инкубация на 37<sup>0</sup>, 5% CO<sub>2</sub>, плуващите клетки бяха отстранени. На 15-20 -тия ден от началното посяване,

достигналите над 90% конfluентност прилепнали фибробластоподобни клетки бяха трипсинизирани и препосявани в 25 cm<sup>2</sup> PVC фласкове (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) в концентрация 2,5 x 10<sup>3</sup> кл./cm<sup>2</sup>. Клетъчната култура беше поддържана в продължение на 4 - 8 последователни пасажа, като клетки от различните пасажи бяха замразявани в течен азот.

### **12.3. Клетъчно култивиране**

Първичните клетъчни култури, бяха култивирани в хранителна среда DMEM-low glucose, 100 IU/ml пеницилин и 100µg/ml стрептомицин, + 10% ФТС в 25 cm<sup>2</sup> PVC фласкове (Orange Scientific, Belgium), както и в 6-, 24- или 96-ямкови стерилни плаки (Orange Scientific, Belgium), в зависимост от целта на конкретното изследване. Инкубациите бяха извършвани в CO<sub>2</sub>-инкубатор Heareus (Germany) при температура 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажност на въздуха. Всички манипулации с клетки бяха осъществявани в стерилен ламинарен бокс Heareus (Germany) с клас на чистота 100, а растежът на клетките беше проследяван под инвертен микроскоп (Wilovert, Germany). Културалната среда беше сменяна на 4 дни, а при достигане на критична плътност (80% - 90%) клетките бяха препосявани след трипсинизиране за 2-4 минути (0.05% trypsin/EDTA, PAA, Austria). Морфологията на клетките беше изследвана след стандартни оцветявания по Гимза и хематоксилин-еозин.

### **12.4. Индиректна имунофлуоресценция**

Култивираните мезенхимни стволови клетки (пасаж 3, над 80% конfluентност) бяха трипсинизирани, преброени и ресуспендирани в културална клетъчна среда DMEM + 10 % FCS и посяти върху стерилни стъклени ламелки (7,7 cm<sup>2</sup>; Hirshman, Germany) в концентрация 0,4 x 10<sup>4</sup> кл./cm<sup>2</sup>. 72 часа по-късно прилепналите и достигнали оптимална плътност (50% – 60%) фибробластоподобни клетки бяха фиксирани с 4%-ен разтвор на параформалдехид (pH=7,5) за 10 мин. и пермеабилizирани с 0,1%-ен 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 12 часа при 4° C във водна камера с: анти-виментин моноклонално антитяло в разреждане 1/100 в PBS (DAKO, Denmark) и анти-фон Вилебранд фактор поликлонален заешки серум в разреждане 1/500 в PBS (Sigma-Aldrich). В контролните препарати първото

антитяло се заменя от PBS. Трикратно промитите с PBS ламелки бяха третириани за 60 мин. на тъмно на стайна температура със съответните анти-мише-FITC (SAPU, Lanarkshire, Scotland); и анти-заешко FITC (Sigma-Aldrich, USA) антитела, разредени 1/100 в 0,01%-ен разтвор на Evans blue (Merck, Germany). Последва измиване 3 пъти с PBS и включване на клетките в Mowiol (Hoechst, Frankfurt, Germany). Флуоресцентната реакцията беше наблюдавана на епи-флуоресцентен микроскоп Leitz (Germany) и микрофотографирана посредством фотоапарат Leitz (Germany) или с цифрова фотокамера Nikon Coolpix L 3, 5 Mpix.

### **12.5.Флоуцитометричен анализ**

МСК (пасаж 2 и 3, над 80% конfluентност бяха трипсинизирани, преброени (хемоцитометър Bürker), промити двукратно и ресуспендирани в PBS. За изследване на повърхностна експресия на маркери бяха подготвени проби, съдържащи  $1 \times 10^5$  клетки всяка, които в последствие бяха инкубирани за 30 мин. със следните анти-човешки антитела: анти-CD73 PE, CD90 FITC, CD29 PE, CD3 FITC, CD45 FITC/CD34 PE, CD19 PE, CD14 PE, HLA-DR PE, CD16/CD56 PE, CD105 PerCP-Cy.5-5, CD146 PE, HLA-I (A,B,C) FITC (Becton Dickinson, Pharmingen USA), HB-242 (American type cell collection). Като автофлуоресцентна контрола бяха използвани клетки, немаркирани с антитела. Второ антитяло anti-mouse FITC IgG (eBioscience, USA) беше добавено при анализа за  $\beta 3$  интегрин, с последваща 30 минутна инкубация и промиване. След промиване два пъти с миещ разтвор (CellWash solution, Becton Dickinson, USA) клетките бяха фиксирани в 0.5 ml CellFIX solution (Becton Dickinson, USA), както се препоръчва от производителя.

Интрацелуларната експресия на Nestin, Sox-2 и GFAP беше анализирана след пермеабилзация на клетките с Cytotfix/Citoperm Fixation/ Permeabilization Kit (BD, USA), като бяха спазени инструкциите на производителя. За белязване на клетките бяха използвани специфични моноклонални антитела: anti-Nestin PE (eBioscience, USA), anti-Sox-2 PerCP (eBioscience, USA), anti-GFAP Alexa Fluor488 (eBioscience, USA) Клетките бяха фиксирани със CellFix разтвор (BD, USA). Специфичното флуоресцентно оцветяване беше анализирано на флоуцитометър FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) с отчитане на 10 000 събития, а резултатите бяха

обработени с помощта на софтуерния продукт Cell Quest (Becton Dickinson, USA) и WinMDI 2.2.

### **12.6. Изследване за клоногенен клетъчен растеж**

МСК (пасаж 2, над 80% конfluентност) бяха трипсинизирани, преброени и ресуспендирани в културална клетъчна среда DMEM + 10% ФТС. Впоследствие те бяха посяти в гъстота 10, 25, 50 и 100 клетки/cm<sup>2</sup> в шестямкови плаки (10 cm<sup>2</sup>; Orange Scientific, Belgium), третирани или нетретирани предварително с фибронектин (5 µg/ml). Култивирането протече в продължение на 14 дни при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажност на въздуха. Хранителната средата (DMEM + 10% ФТС) беше сменяна на всеки 4 дни. Ежедневно беше извършвано микроскопско наблюдение, за да се проследи произхода на всеки клон от единична клетка. Две седмици след началото на експеримента клетките бяха промити еднократно с PBS, след което бяха фиксирани и пермеабелизирани със 70%-ен воден разтвор на етанол за 10 мин. Накрая бяха оцветени с 0,5%-ен разтвор на Crystal violet (Merck, Germany) в метанол в продължение на 8 мин. при стайна температура. Наличието и броят на клетъчните колонии бяха установени с помощта на инвертен светлинен микроскоп (Wilovert, Germany) при увеличение 5x. За колония беше приета всяка група от 20 и повече клетки. Клоногенната ефективност (ЕК) беше изчислена по следната формула:

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

### **12.7. Остеогенна диференциация**

За индуциране на остеогенна диференциация, достигналите над 80% конfluентност костно-мозъчни и адипозни клетки на четвърти пасаж бяха препосаяти в 24-ямкови плаки (Orange Scientific, Belgium) в концентрация  $1 \times 10^4$  клетки/cm<sup>2</sup> и култивирани в клетъчна среда DMEM в присъствие на 10% ФТС и следните специфични диференциращи фактори: 100 nM дексаметазон (Sigma-Aldrich, USA), 0,2 mM аскорбинова киселина-2-фосфат (Sigma-Aldrich, USA), 10 mM β-глицеролфосфат (Sigma-Aldrich, USA). Свежа остеогенна културална среда беше добавяна на всеки 4 дни в продължение на 3 седмици (21 дни). Паралелно, контролни клетки бяха

култивирани единствено в DMEM + 10% ФТС. В края на стимулационния период, степента на остеогенна диференциация беше определена с прилагане на колориметричен метод за количествено отчитане на алкално-фосфатазна активност и чрез специфично хистологично оцветяване за доказване отлагането на  $\text{Ca}^{2+}$  в екстрацелуларния матрикс

### ***12.7.1 Доказване на алкално-фосфатазна активност***

Третираните с остеогенни фактори клетки, 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% Triton X-100 (Merck, Germany). PVC плаката беше замразена на  $-70^\circ\text{C}$  (10 мин.) и веднага след това размразена. В ямките с вече лизирани клетки бяха прибавени по 150  $\mu\text{l}$  от разтвора на алкално-фосфатазния субстрат 4-нитрофенилфосфат (3,5 mM в алкално-фосфатазен буфер) и получената цветна реакция беше отчетена спектрофотометрично на микро-ELISA reader (Dynatech AG, USA) при дължина на вълната 405 nm.

### ***12.7.2. Оцветяване по von Kossa***

Остеогенно диференцираните клетки бяха промити еднократно с дестилирана вода, след което бяха третирани с 1%-ен разтвор на сребърен нитрат ( $\text{AgNO}_3$ ; Sigma-Aldrich, USA) при облъчване с ултравиолетова светлина ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ; 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 5%-ен разтвор на натриев тиосулфат ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; Sigma-Aldrich, USA) за 10 мин., а в последствие и с дестилирана вода. Наличието на  $\text{Ca}^{2+}$  минерални отлагания с характерно черно оцветяване беше детектирано на инвертен светлинен микроскоп (Wilvert, Germany), а светлинно микроскопските снимки бяха направени с цифрова фотокамера Coolpix L3, 5 Mpix.

### **12.8. Адипогенна диференциация**

Клетъчни култури от МСК (пасажи 3 и 4), достигнали над 80% конfluентност, бяха трипсинизирани, препосяти в 6-ямкови плаки (Orange Scientific, Belgium) в концентрация  $1 \times 10^4$  клетки/ $\text{cm}^2$  и култивирани в специфична индуцираща адипогенна среда, съдържаща: DMEM + 10 % ФТС,  $1 \mu\text{M}$  дексаметазан (Sigma-Aldrich, USA),  $10 \mu\text{g/ml}$  телешки инсулин (Sigma-Aldrich, USA),  $0.5 \text{ mM}$  3-изобутил-1-метил-ксантин (Sigma-Aldrich, USA) и  $200 \mu\text{M}$  индометацин (Sigma-Aldrich, USA). Три дни след инициране на диференциационния процес, индуциращата адипогенна среда беше заменена с поддържаща среда, съставена от: DMEM + 10 % ФТС,  $1 \mu\text{M}$  дексаметазон,  $10 \mu\text{g/ml}$  телешки инсулин. В тази среда клетките бяха отглеждани отново за период от 3 дни. След три поредни цикъла на последователна замяна на индуцираща с поддържаща адипогенна среда (на 18-тия 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- + 10% ФТС без наличие на диференциращи фактори. За специфично оцветяване клетките бяха промити с PBS, след което бяха фиксирани с 10%-ен неутрален формалинов разтвор (Merck, Germany) в продължение на 30 мин. при стайна температура. Фиксираните клетки бяха промити еднократно с дестилирана вода и оцветени с прясно приготвен 0,6%-ен разтвор на Oil red O (3 части 1%-ен 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 (Wilovert, Germany) и заснето с цифрова фотокамера Coolpix L 3, 5 Mpix.

### **12.9. Диференциация в ендотелни клетки**

Този вид диференциация беше изследван, чрез култивиране на клетки в 6-ямкови плаки покрити с Matrigel (BD, USA). МСК бяха трипсинизирани, промити с PBS и

ресуспендирани в среда съдържаща DMEM, антибиотици, 20% ФТС, 50ng/ml VEGF (Invitrogen, USA) и 10 ng/ ml bFGF (Abcam, GB).

#### **12.10. „Трансдиференциация” в неврална тъкан**

МСК бяха култивирани в среди, съдържащи DMEM, 10% ФТС, антибиотици, 20 ng/ml bFGF(Abcam, GB) и 20 ng/ml EGF (Abcam, GB).

## II. МСК и цитокиновата им секреция

### 1. Въведение

Контактът между МСК и имунокомпетентните клетки не е еднопосочен, като са описани разнообразни взаимни влияния. За целите на настоящия труд, обаче ще бъдат разгледани само влиянията, които МСК оказват по отношение на имунните клетки. МСК влияят върху регулацията на имунния отговор в предимно супресивна насока, като са описани множество фактори ангажирани в това действие. Най-общо те могат да бъдат разделени на фактори действащи чрез пряк междуклетъчен контакт между МСК и клетките мишени и секреторни фактори. Смята се, че двата вида фактори действат съвместно, като влиянието на секреторните фактори, може да се изследва отделно и независимо, използвайки супернатанти на МСК. По този начин отдиференцирането на секреторните компоненти е много по-лесно и по информативно, от това на прекия контакт.

Макар ролята на последния да се обсъжда като важен компонент от комплексното влияние на МСК в процеса на имунна регулация, конкретиката по въпроса не е много. Няколко вида повърхностни молекули се спрегат като участници в този процес: ICAM-1, простагландин E2 (PGE2) и program death 1 молекулата и нейния лиганд (PD-1/ PD-1L), както и HLA-G (като последния е предмет на обсъждане в глава VI)

ICAM -1 е мембранен гликопротеин експресиран на повърхността на ендотелни клетки, лимфоцити, моноцити и МСК, който свързва основно интегриновите рецептори LFA-1 и MAC-1 (macrophage 1 antigen). ICAM-1 е ангажиран в левкоцитната миграция през съдовата стена, както и в междуклетъчното свързване, като експресията на повърхността на МСК се засилва вследствие на въздействието на проинфламаторни цитокини (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ ) (*Gronthos et al. 2001, Ren et al. 2010*). Имуносупресивните функции на МСК, реализирани чрез ICAM-1 се описват при експериментален модел, където моноклонално антитяло, блокиращо рецептора на мембранния ICAM-1, както и дефицитът на ICAM-1 водят до намалена супресивна функция на МСК върху Т клетъчната пролиферация (*Ren et*

*al. 2010*). Счита, че основната роля на ICAM-1 е повлияването на адхезията между МСК и имунните клетки, както и способността на Т клетките за пролиферация (*Хи et al. 2014*).

PGE2 има мембранна и секреторна форма, като мембранната му форма има идентична имunosупресивна функция като секреторната, поради, което ще бъде описана по-долу.

Може би май-категорично установена роля по отношение на имunosупресивното действие на МСК, осъществявано чрез междуклетъчния контакт има експресирания на повърхността на МСК PD-1L, който взаимодейства със своя рецептор PD-1, разположен на повърхността на Т, В и NK клетките, за което ще стане дума в следващата глава. Като цяло, твърде много проучвания, използващи кондиционирани среди от МСК и ко-култивирани чрез transwell система (клетките са разделени с преграда, която възпрепятства прекия им контакт, но позволява проникването на секреторни фактори), доказват че междуклетъчния контакт не е приоритетен за имunosупресивната функция на МСК, за сметка на секреторните фактори, отделяни от тях.

Секреторните фактори, най-общо определяни като „цитокини” са твърде разнопосочни по своето действие и реално трудно биха могли да бъдат класифицирани. Опитите, които се правят, цитокините да бъдат разделяни като „имunosупресивни” и „ имуностимулиращи”, както и като „проимфламаторни” и „антиинфламаторни” по- скоро очертават някакви общи тенденции, отколкото да описват реалното състояние на нещата. Въпреки това, тази терминология е необходима и удобна, за да може да се опишат основни действия и ефекти осъществявани от цитокините по отношение на модуляцията на имунния отговор, поради което ще бъде използвана в тази работа. 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 върху таргетната клетка (**Фиг 10.**)



**Фиг 10.** Директно и индиректно цитокиново действие

МСК секретират цитокини с предимно имunosупресивен ефект, като в литературата съществуват някои разлики по отношение на установените секреторни фактори. В настоящата работа ще се обърне внимание върху тези, които са недвусмислено доказани, както от литературните данни, така и от личния опит на автора (**Табл 4.**)

**Табл 4.** Цитокини секретирани от мезенхимни стволови клетки и таргетни клетки на цитокиновото действие

Цитокини секретирани от МСК	Таргетни клетки
IL-10	Mph, Neu, DCs, Th1, Tregs, Tr1, tumor cells
IL-6	Neu, Mo, DCs, B, Th2, Tregs, Th17, CD8+FoxP3+
TGF $\beta$	Mph, NK, DCs, B, T, Tregs
Chemokines - CCL-2/MCP-1 - CCL-5/RANTES	Neu, Mo, NK, Eo, Baso, DCs, Ly Mph, EC, PL, Th2, Th17 Neu, Mo, DCs, Th1, Tregs, CD8+FoxP3+
IDO	Mo, DCs, B, T, Tregs
VEGF	DCs, EC, Th1, Th17, Tregs
ICAM	T, MSCs
PGE2	Mph, Mo, NK, DCs, T, Tr1

**Легенда :** Mph- макрофаги, Neu- неутрофили, DCs- дендритни клетки, Th- Т хелпери, Tregs – Т регулаторни, Tr1- Т регулаторни 1, Мо- моноцити, NK- „естествени убийци” Ео- еозинофили, Baso- базофили, Ly- лимфоцити, EC- ендотелни клетки, PL- плазматични клетки (*Kyurkchiev et al. WJSC. 2014*)

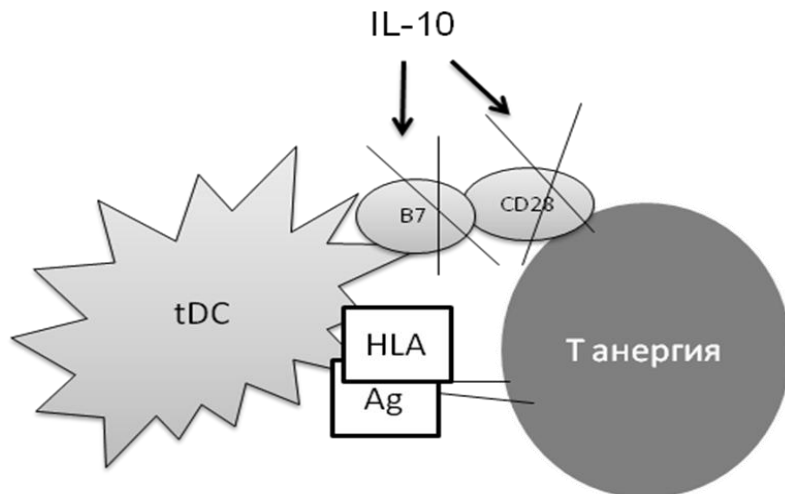
Като цяло се смята, че различните видове мезенхимни стволови клетки не показват качествени разлики по отношение на цитокиновата си секреция, като повечето автори или не намират разлики, или намират само количествени такива по отношение на цитокините секретирани предимно от АТ-МСК и КМ- МСК (*Park et al., 2009, Kyurkchiev et. al. 2013, Elman et al. 2014*) Подобни са резултатите получени при сравнение между МСК получение от ембриони, фетуси и възрастни индивиди (*Chan et al. 2012*)

Важно е да се отбележи, че МСК могат да секретират цитокини „спонтанно” или под индукция на други цитокини, като най-важните от тях се явяват IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  (*Newman et al. 2009, Dazzi et al. 2011, Bernardo et al. 2013*). Донякъде парадоксално основните стимули за секреция на антиинфламаторни цитокини от страна на МСК са проинфламаторни цитокини, но както по-горе беше казано, това разделение между цитокините е доста относително. МСК макар и с типична секреция на имunosупресивни цитокини, могат да имат и проинфламаторен цитокинов ефект, като ролята на микрообкръжението често модулира типа

действие. От микрообкръжението за основен момент се смята ангажирането на определени Toll-like рецептори, експресирани от МСК, което в най-голяма степен определя про- или антиинфламаторните им функции (*Shi et al. 2010, DelaRosa et al. 2012, Ma et al. 2014*)

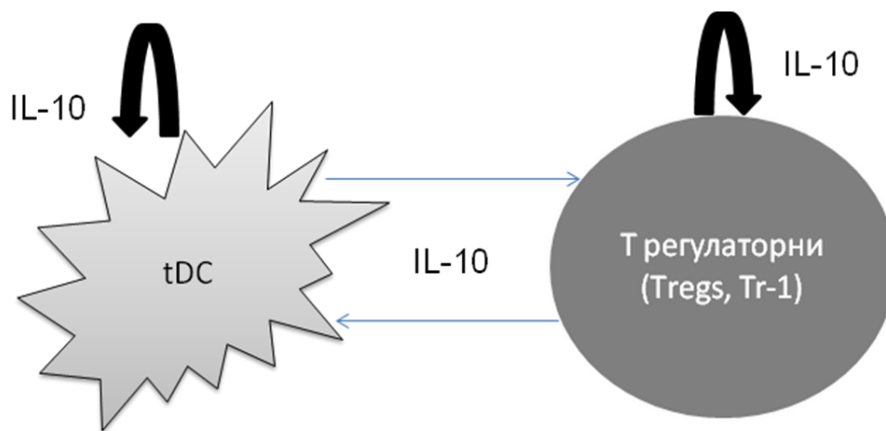
## **1. Интерлевкин 10 (IL-10)**

IL-10 е плейотропен цитокин, за първи път описан през 1980г. и характеризиращ се с антиинфламаторно действие, което обуславя способността му да индуцира имуен толеранс (*Mocellin et al. 2005, Bouffi et al. 2010, Ng et al. 2013*). Установено е, че IL-10 подтиска функцията на макрофаги и неутрофили (*Xing et al. 1998, Mocellin et al. 2005, Ng et al. 2013*), подтиска Th1 имунния отговор (*Opal et al. 2000, Mocellin et al. 2005, Yang et al. 2006, O'Garra et al. 2007, Heo et al. 2010*), повлиява синтеза на NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (*Sultani et al. 2012*) и води до експресия на антиинфламаторни молекули като протеазните инхибитори (*Salgado et al. 2010*) и IL-1 и TNFα антагонисти (*Tilg et al. 1994*). Основният ефект на IL-10 в индукцията на имуен толеранс е свързан с действието му върху антиген-представящите клетки и в частност върху дендритните клетки (ДК). IL-10 подтиска секрецията им на проинфламаторни цитокини като TNFα, IL-1, IL-12, IL-8, както и експресията им на ключовия за имунния отговор B7 (CD80/86) ко-стимулаторен комплекс (*Opal et al. 2000, Yang et al. 2006, Sultani et al. 2012*) Успоредно на това, IL-10 е описан да подтиска и експресията на CD28 (партньорът на B7) на повърхността на Т лимфоцитите. По този начин се осъществява може би най-важния имуносупресивен ефект осъществяван от IL-10 – индукция на толерогенни ДК с ниска експресия на B7 и едновременно подтискане на CD28 експесиран на повърхността на Т клетките **(Фиг 11.)** Тази двустранна супресия на т.нар. „втори сигнал”, който е безусловно необходим за активацията на Т лимфоцитите индуцира анергия в тях (*Mocellin et al. 2005, Yang et al. 2006, Ivanova-Todorova et al. 2005, Ivanova-Todorova et al. 2012, Ng et al. 2013*)



**Фиг 11.** IL-10 индуцира анергия в Т клетките като подтиска експресията, както на B7 от дендритните клетки, обуславяйки толерогенния им фенотип, така и CD28 на повърхността на Т лимфоцитите.

Друг механизъм на имуен толеранс осъществяван от IL-10 е индукцията на основните регулаторни популации Т лимфоцити: Tregs и Tr1 (*Yang et al.2006*). IL-10 се явява един от цитокините ангажиран в генерирането на Tregs (*Heo et al. 2010*), които от своя страна са способни да го секретират, като секрецията му е описана както при „естествените“ FoxP3+ (nTregs) клетки, така и при „индицираните“ FoxP3+ (iTregs) клетки (*Mocellin et al. 2005, Heo et al. 2010, Claudhry et al. 2011*). Една особеност на IL-10, която се среща и при други цитокини е, че клетките, които го продуцират могат да бъдат, както източник, така и обект на действието му. Тази особеност е характерна основно за дендритните и Т регулаторните клетки. Като пример може да послужи фактът, че толерогенните ДК секретират IL-10, който индуцира регулаторен Т клетъчен фенотип (Tregs и/или Tr1). Регулаторните клетки от своя страна секретират IL-10, който обуславя толерогенен тип ДК (*Yang et al.2006, Mocellin et al. 2005, Ng et al.2013*). От друга страна, всяка от изброените клетки, секретирайки IL-10 влияе сама на себе си по автокринен път (**Фиг 12.**)



**Фиг 12.** Толерогенните ДК и Т регулаторните субпопулации засилват имуносупресивните си свойства чрез секреция на IL-10

Ефектът на IL-10 се медира чрез свързването му със специфичен рецептор (IL-10R) и последващо взаимодействие между JAK1 и STAT-3 (*Heo et al. 2010, Sultani et al. 2012*), механизъм сходен с този и на други цитокини.

Наред с толерогенните ДК и Т регулаторните субпопулации, са описани и много други имунокомпетентни клетки, секретирани IL-10 като В лимфоцити, НК клетки, неутрофили и макрофаги. По отношение на Т лимфоцитите ролята на Th2 клетките, секретирани IL-10 е добре известна (*Salgado et al. 1994, Claudhry et al. 2011*), но нови данни сочат, че този цитокин донякъде парадоксално се секретира и от Th1 и Th17 клетките. Счита се, че тези „двойно-секретирани“ клетки (IL-10 заедно с IFN $\gamma$  или съответно IL-17) използват IL-10, за да подтиснат собствената си проинфламаторна активност, едновременно директно и чрез посредничеството на толерогенни антиген-представящи клетки (*O'Garra et al. 2007, Ng et al. 2013*).

Въпреки, че IL-10 се смята за класически цитокин, който индуцира имуноен толеранс, съществуват данни, че подобно на повечето цитокини той е в състояние да действа не само еднопосочно. IL-10 е установен в туморното обкръжение и е описано анти-туморното му действие, свързано с подтискането на туморната ангиогенеза и засилване на секрецията на азотен оксид (NO). Той също така води и до намалена експресия на HLA молекули на повърхността на туморните клетки,

което улеснява анти-туморното действие на NK клетките. (*Xing et al. 1998, Mocellin et al. 2005*). Други описани „проинфламаторни” свойства на IL-10 се свързват с про-апоптозното му действие и в частност със способността му да засилва апоптозата на Tregs, както и със способността му да стимулира поглъщането на антигени от антиген представящи клетки (АПК) (*Mocellin et al. 2005*).

IL-10 е един от цитокините, широко дискутирани по отношение на имуномодулаторните свойства на МСК. Въпреки това в научната литература не съществува единно мнение дали той се секретира от тях и резултатите са доста противоречиви. Литературният преглед показва, че близо половината автори откриват IL-10 в супернатанти на МСК (*Ben-Ami et al. 2011, Blaber et al. 2012, Engela et al. 2012, Gebler et al. 2012, Bernardo et al. 2013, Ma et al. 2014*), а другата половина – не (*Kilroy et al. 2007, Park et al. 2009, Newman et al. 2009, Djouad et al. 2009, Salgado et al. 2010, Ivanova-Todorova et al. 2012, Perrini et al. 2013, Solovyeva et al. 2013*).

## **2. Интерлевкин 6 (IL-6)**

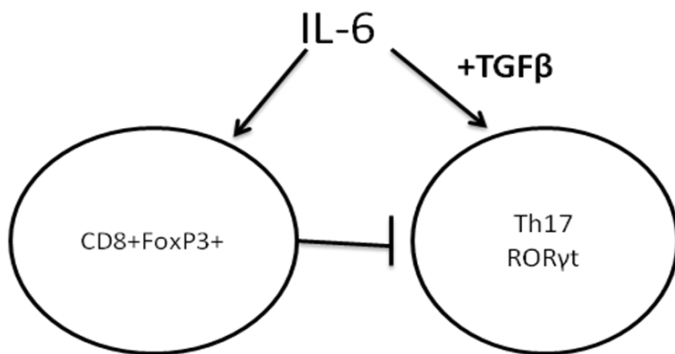
IL-6 е идентифициран през 1986 г. като фактор стимулиращ В лимфоцитите (*Kishimoto et al. 2010*) и днес са известни редица негови други свойства, определящи го като плейотропен цитокин с ключова роля в регулацията на имунния отговор, хематопоезата, възпалението, клетъчното оцеляване и пролиферация, апоптозата и онкогенезата (*Kishimoto et al. 2010, Yun et al. 2012*). Действието на IL-6 се определя от свързването му на повърхността на таргетните клетки с мембранный IL-6- рецептор (mIL-6R), както и с протеин, известен като gp130, като впоследствие gp130 взаимодейства с JAK-STAT системата (*Kishimoto et al. 2010*). Твърде малко клетъчни популации експресират mIL-6R, докато почти всички експресират gp130. Това дава възможност на клетките, експресиращи само gp130 да свързват комплекси съставени от IL-6 и неговия разтворим рецептор (sIL-6R), процес известен като transsignaling. Именно този процес прави множество видове клетки, които не експресират mIL-6R обекти на действието на описания цитокин (*Scheller et al. 2011, Galbers et al. 2012*). Някои автори смятат, че ефекта на

IL-6 медиран чрез transsignaling (IL-6/sIL-6R) е свързан с про-инфламаторна функция на цитокина, а „класическия” път чрез мембранныя рецептор (IL-6/mIL-6R) обуславя анти-инфламаторните свойства на IL-6 (Scheller et al. 2011). Това предположение е доста логично имайки в предвид двойствената природа на IL-6 изразяваща се в про- и анти-инфламаторни характеристики (Opal et al. 2000, Blaber et al. 2012). При цялата относителност на разделението на цитокините на про- и анти-инфламаторни, традиционно IL-6 се представя като класически про-инфламаторен цитокин, като съществуват множество основания за това. Той заедно с IL-1 и TNF $\alpha$  индуцира секреция на протеините на острата фаза, води до привличане на неутрофили, експресия на адхезивни молекули и превключване от неутрофилно към макрофагиално индуцирано възпаление (Xing et al. 1998, Opal et al. 2000, Scheller et al. 2011). IL-6 стимулира T клетъчната пролиферация (Xing et al. 1998, Newman et al. 2009) и заедно с IL-4 участва в генерирането на Th2 имунен отговор (Scheller et al. 2011), като също така има значителна роля в хуморалния имунитет, стимулирайки B клетъчната диференциация и секрецията на антитела (Kimura et al. 2010). Нови данни сочат, че IL-6 заедно с TGF $\beta$  е ангажиран в регулирането на баланса между про-инфламаторния Th17 имунен отговор и имunosупресивния имунен отговор, осъществяван от Tregs. Заедно IL-6 и TGF $\beta$  индуцират експресията на ROR $\gamma$ t (RORC), който е основния транскрипционен фактор, дефиниращ Th17 клетъчната субпопулация (Kimura et al. 2010, Scheller et al. 2011).

Успоредно с несъмнената про-инфламаторна функция, която IL-6 осъществява, много данни сочат редица негови действия в анти-инфламаторна посока. Описано е, че IL-6 подтиска секрецията на множество про-инфламаторни цитокини като IL-1, TNF $\alpha$ , GM-CSF и IFN $\gamma$ , а индуцира секреция на кортикостероиди, IL-10, IL-1 рецепторен антагонист и разтворимия рецептор за TNF $\alpha$  (Tilg et al. 1994, Xing et al. 1998, Opal et al. 2000, Steensberg et al. 2003). Локалното и системното анти-инфламаторно действие на IL-6 се доказва при мишки дефицитни по гена за IL-6, които имат повишена продукция на TNF $\alpha$ , GM-CSF (granulocyte/monocyte colony stimulating factor) и MIP-2 (macrophage inflammatory protein) (Xing et al. 1998).

Нещо повече, нови резултати разкриват, че IL-6 се явява ключов фактор във формирането и функционирането на една сравнително скоро описана лимфоцитна субпопулация, характеризираща се с експресия на CD8+FoxP<sup>+</sup> и свързана със супресията на Th17 имунния отговор (*Nakagawa et al.2010*).

Натрупаните данни сочат, че IL-6 проявява двупосочен ефект в регулацията на Th17 имунния отговор. От една страна, заедно с TGFβ индуцира формирането на Th17 клетките, а от друга води до образуването на CD8+FoxP3<sup>+</sup>, които подтискат Th17 (**Фиг 13.**)



**Фиг 13.** Двупосочен ефект на IL-6 върху Th17 имунния отговор (*Kyurkchiev et al. WJSC, 2013*)

За разлика от IL-10 в научната литература цари консенсус относно секрецията на IL-6 от МСК и всички изследвания потвърждават неговото наличие (*Kilroy et al. 2007, Salgado et al. 2010, Ivanova- Todorova et al. 2012, Blaber et al. 2012, Gebler et al. 2012, Perrini et al. 2013*) Тази секреция е установена и при миши и при човешки МСК (*Bernardo et al. 2013, Ma et al. 2014*) и се наблюдава, както при индукция на МСК с TNFα, IL-1β и IFNγ, така и при спонтанната им секреция (*Park et al. 2009, Ivanova- Todorova et al. 2009, Kimura et al. 2010, Dazzi et al. 2011, Chan et al. 2012, Bernardo et al. 2013*). При тестиране на МСК за 120 цитокини на ниво РНК и на белтъчно ниво е установена най-висока степен на експресия/секреция на IL-6, на базата, на което, както и на базата на описаните му имунорегулаторни свойства се правят изводи за ключовата му роля в имуномодулацията, осъществявана от МСК

(*Park et al. 2009*). Вследствие секрецията на IL-6 от МСК се установява подтисната неутрофилна апоптоза (*Newman et al. 2009, Bouffi et al. 2010, Ben-Ami et al. 2011*) – един ефект, който трудно би могъл да се вмести в рамката про/антивъзпалителен ефект, и който би могъл да бъде много важен от гледна точка на връзката между дефектите в процеса на апоптоза и автоимунните реакции.

На този етап все още не е съвсем сигурна връзката между IL-6 и генерирането на Tregs (CD4+FoxP3+). МСК безспорно секретират фактори, които увеличават броя на Tregs, което се доказва в множество публикации (*Ivanova-Todorova et al. 2012, Bernardo et al. 2013, Kyurkchiev et al. 2013*), но няма сигурни доказателства, че точно IL-6 е ангажиран в този процес. Въпреки това, факта, че IL-6 води до образуването на CD8+FoxP3+ клетки, го прави твърде вероятен кандидат свързан с образуването и функцията на класическите Tregs.

МСК освен източник на IL-6 могат да бъдат също така и обект на неговото действие, като под действието на IL-6, чрез механизма на transsignaling, МСК могат да проявяват туморогенни свойства (*Cui et al. 2014*). Този факт повдига множество въпроси за взаимоотношенията между МСК и туморното обкръжение, което често е богато на IL-6.

### **2.1. Взаимодействие между IL-6 и IL-10**

IL-6 стимулира секрецията на IL-10 от множество видове клетки, като този ефект е несъмнено доказан, за разлика от обратното взаимодействие (*Steensberg et al. 2003*). Влиянието на секретирания от МСК IL-6 върху секрецията на IL-10 от моноцитите и дендритните клетки е от особено значение в процеса на имунорегулация. Съществуват данни, че секретиралите IL-6 МСК директно, или чрез предизвиканата автокринна секреция на IL-10 подтискат диференциацията на моноцитите в дендритни клетки (*Ivanova-Todorova et al., 2009, Ben-Ami et al. 2011*). Също така двата цитокина подтискат антиген-представящата функция на дендритните клетки, като по този начин се формира популация от незрели толерогенни дендритни клетки, секретирани IL-10 (*Jiang et al. 2005, Djouad et al. 2007, Newman et al. 2009, Ivanova-Todorova et al. 2009, Ghannam et al. 2010, Kyurkchiev et al. 2013*). Предизвиканата секреция на IL-10 от своя страна води до

формиране на регулаторни Т клетки, също секретират IL-10 и засилват толерогенен фенотип на ДК (*Djouad et al. 2009, Bernardo et al. 2013*). По този начин IL-6 стимулира секрецията на IL-10 и стартира системата на взаимно влияние между толерогенните дендритни клетки и Т регулаторните субпопулации, показана на **Фиг.12**.

Важно е да се отбележи, че IL-6 и IL-10 не са единствените цитокини, участващи в подобен вид взаимодействия, както ще бъде споменато по нататък.

### **3. Трансформиращ растежен фактор бета (TGFβ)**

TGFβ е плейотропен цитокин, който регулира базисни клетъчни функции като: пролиферация, диференциация, миграция, адхезия и апоптоза. Наред с това TGFβ има ключова роля в процесите на карциногенеза, ангиогенеза, зарастване на рани и имуноен отговор (*Li et al. 2006*). При бозайниците са описани три форми на TGFβ (TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3), които са контролирани от специфични гени (*Govinden et al. 2003*). Наред с множеството си други действия TGFβ е един от цитокините най-силно ангажиран в процеса на имunosупресия, като повлиява левкоцитната пролиферация, диференциация, активация и оцеляване (*Wahl et al. 2004, Yoshimura et al. 2011*). Описани са много механизми на действието на TGFβ, които заедно с IL-10 го правят централен цитокин в индукцията на имуноен толеранс. Едно от действията му в тази насока е подтискане на Т клетъчната пролиферация, процес, който се осъществява на няколко нива. Единият път, по който TGFβ реализира този процес е чрез блокиране на продукцията на IL-2, който е централен за пролиферацията на Т клетките, като това най-вероятно се осъществява, чрез нарушаване на процеса на транскрипция на гена за IL-2 поради подтискането на промоторната му активност (*Brabletz et al. 1993*). Съществуват данни, че за инхибицията на IL-2 важна роля играе и транскрипционния фактор Smad3 (*McKarns et al. 2004*). Установено е, че добавянето на екзогенен IL-2 частично възстановява антипролиферативния ефект, предизвикан от TGFβ, което свидетелства, че TGFβ въздейства върху IL-2 и на ниво продукция, както и на ниво интрацелуларен signaling (*Ruegermer et al. 1990*).

TGF $\beta$  подтиска Т клетъчната пролиферация и чрез влиянието си върху фактори, контролиращи клетъчния цикъл, като под негово влияние е описана увеличена експресия на циклин – зависимите киназни инхибитори p15, p21 и p27, както и намалена експресия на С-мус, циклин D2 и циклин E (*Hannon et al. 1994, Polyak et al. 1994, Datto et al. 1995, Nelson et al. 2003*).

Наред с подтискащото си действие върху клетъчната пролиферация TGF $\beta$  супресира и диференциацията на Т лимфоцитите, като Т цитотоксичните клетки не осъществяват функциите си, а Т хелперите не се диференцират в посока Th1 и Th2. По отношение на Th1 един от възможните механизми на TGF $\beta$  индуцирана нарушена диференциация е подтисната експресия на  $\beta$ 2 веригата на рецептора на IL-12, което води до блокаж в signaling осъществяван от IL-12 - цитокин безусловно необходим за Th1 диференциацията (*Gorham et al. 1998*). Друго изследване акцентуира върху ролята на TGF $\beta$  като инхибитор на T-bet, който е важен транскрипционен фактор, активиращ Th1 диференциацията (*Gorelik et al. 2002*). Супресията на Th1 се осъществява и по индиректен път чрез инхибиция на IFN $\gamma$  секрецията от NK клетките, осъществявано от TGF $\beta$  (*Laouar et al. 2005*).

По отношение на подтискането на Th2 диференцията от TGF $\beta$  за основна се счита ролята на инхибирането на транскрипционния фактор GATA-3, който ключов за формирането на Th2 фенотип (*Zheng et al. 1997*). По отношение на този ефект централно значение има Sox-4, който от една страна директно свързва GATA-3 и го подтиска, а от друга свързва промотора на IL-5 и по този начин предотвратява GATA-3 медираната индукция на генна експресия (*Kuwahara et al. 2012*).

TGF $\beta$  е ангажиран и в подтискането на цитотоксичната функция на CD8+Т клетки, чрез инхибирането на основни ефекторни молекули като перфорин (*Smyth et al. 1991*), FAS лиганд (*Genestier et al. 1999*), IFN $\gamma$  (*Bonig et al. 1999, Ahmadzadeh et al. 2005*).

Заедно с IL-6, TGF $\beta$  е свързан и с генерирането на Tregs, чрез индукцията на транскрипционния фактор FoxP3, определящ Treg субпопулацията (*Chen et al. 2003, Zheng et al. 2007, Davidson et al. 2007*), като за този процес за ключова се

смята ролята на транскрипционните фактори Smad2 и Smad3 (*Jana et al. 2009, Lu et al. 2010, Martinez et al. 2010, Takimoto et al. 2010*).

Почти всички проучвания установяват продукция и секрецията на TGF $\beta$  от МСК. Установено е, че КМ-МСК, както и МСК, изолирани от зъбна пулпа, подтискат митогенната пролиферация на ПКМК, Т хелпери и Т цитотоксични лимфоцити, като този ефект е обратим при прибавянето на моноклонално антитяло срещу TGF $\beta$ 1 (*DiNicola et al 2002, Tomic et al. 2011*). Друго проучване описва, че активираните от моноцити МСК, секретират TGF $\beta$ , който води до подтиснат Т клетъчен имуен отговор (*Groh et al. 2005*). КМ-МСК, чрез секрецията си на TGF $\beta$  и PGE2 са способни да подтискат пролиферацията на NK и секрецията им на IFN $\gamma$  (*Sotiropoulou et al. 2006*).

Съществуват данни, че МСК секретират TGF $\beta$  отново заедно с PGE2 индуцират формирането на класическите Tregs (CD4+CD25+FoxP+), които подтискат пролиферативния отговор в смесена лимфоцитна култура (*English et al. 2009*). TGF $\beta$  секретирани от МСК, също така е способен, увеличавайки броя на Tregs да предпазва клетки от карцином на гърдата от имунно унищожение (*Patel et al. 2010*)

#### **4. Хемокини**

Хемокините са фамилия протеини със сходна структура и молекулна маса между 7.5-12.5 kDa с основна хемоатрактивна функция. Тяхната физиологична роля е свързана с процесите на регулация на възпалението, клетъчната диференциация, ангиогенезата и миграцията на имунни клетки (*Olson et al. 2002, Borish et al. 2003*). Под влияние на различни проинфламаторни стимули, хемокините се продуцират и секретират от множество клетъчни типове, което дава възможност за привличане и активация на неутрофили, моноцити, лимфоцити (*Borish et al. 2003*). Установено е, че култивирани МСК секретират конститутивно множество различни представители на хемокиновото семейство като CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL20 (MIP-3a), CCL26 (eotaxin-3), CXCL1 (GRO $\alpha$ ), CXCL2 (GRO $\beta$ ), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC), CXCL12 (SDF-1) и CX3CL1 (fractalkine) Твърде вероятно е типът и комбинацията от експресирани от МСК хемокини да варира съобразно специфичните условия

на средата и контакта с околните клетки, особено ако те са имунокомпетентни. Към прицелните клетки, привлечани от посочената група хемоатрактанти спадат неутрофили, моноцити, еозинофили, базофили, Т и В лимфоцити, дендритни клетки, NK клетки, хематопоетични и ендотелни прогенитори (*Meirelles et al. 2009*). Секретирани от МСК хемокини имат преди всичко хемоатрактивна роля, за която изглежда, че няма директно отношение към имунорегулацията. Въпреки това, хемокните биха могли да се разглеждат като съществен елемент при осъществяване на имуномодулаторната активност на МСК *in vivo*, тъй като се предполага, че опосредстват взаимодействието им с имунокомпетентни клетки. Привличайки имунни клетки в близост до продуциращите ги МСК, хемокините осигуряват, както директния междуклетъчен контакт, така и възможността за паракринно имунорегулаторно въздействие на други ефекторни молекули, също секретирани от МСК. Така например, се установява, че експресирани от МСК хемокини CXCL9, CXCL10 и CXCL11 предизвикват мигриране на Т-клетки в близост до МСК, където попадат под локалното потискащо въздействие на стволовите клетки (*Ren et al. 2007*)

Въпреки че хемокините, секретирани от МСК имат предимно хемотактично действие, редица данни сочат към директната роля на някои от тях в процеса на имуномодулация, като особено значение в това направление имат CCL2 и CCL5.

#### **4.1. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (CCL-2/MCP-1)**

CCL2 е ключов хемокин регулиращ миграцията и инфилтрирането в тъканите на клетките на моноцито-макрофажната система. Секретира се не само от моноцити, но и от множество други клетки, включително ендотелни клетки, микроглия, NK клетки и др. CCL2 се свързва с множество патологични състояния и заболявания, при които се наблюдава акумулиране на активирани моноцити включително атеросклероза, бронхиална астма, възпалителни заболявания на червата и др. (*Deshmane et al. 2009*). Има множество данни, че CCL2 влияе върху Т-клетъчния имунен отговор, като предизвиква превключване от Th0 към Th2 с преимуществена секреция на IL-4 (*Karpus et al 1997, Gu et al. 2000*). Доказателства за роля в имунната регулация на CCL2 са и способността му да индуцира секреция на

МСРІР-1 (MCP-1 induced protein-1), който действа като RNase и стимулира иРНК деградацията на някои цитокини като ІL-6 и ІL-1 (Xu et al. 2012). МСРІР-1 действа и като негативен регулатор на ССL2 и потиска макрофагеалната активация (Liang et al. 2008). Установено е също, че ССL2, ССL5, както и някои други хемокини индуцират пролиферация и активация на специфични CD56+ цитолитични клетки определяни като СНАК (CC chemokine-activated killer) подобни на ІL-2-активираните (LAK) клетки (Maghazachi et al. 1996).

По-нови изследвания установяват, че ССL2 е и един от факторите свързани с МСК предизвикания имунен толеранс. Секрецията на този хемокин от МСК води до засилена Fas-L зависима апоптоза на Т лимфоцитите. Апоптотичните Т клетки стимулират високи нива на секреция на TGF $\beta$  от макрофагите, цитокин свързан с формирането на CD4+ FoxP3+ регулаторните клетки (Akiyama et al. 2006). Други автори, обратно, коментират анти-апоптотичен ефект на ССL2, като описват потискане на каспаза 3 на клетъчна линия от ембрионални кардиомиобласти, при добавяне на среда от МСК (Boomsma et al. 2012). Доказана е и способността на ССL2 да медуира автокринно миграцията на МСК и да ги насочва към местата на възпаление, исхемична увреда, травма или развиващ се малигнен процес, където да осъществят своя имуномодулиращ ефект (Boomsma et al. 2012). Съществуват данни, според които инхибиращият ефект на МСК върху имуноглобулиновата продукция на плазматичните клетки е резултат от ефекторното действие на секретирания от МСК хемокин ССL2 и ССL7. Установено е, че този ефект се дължи на инхибиране на фосфорилирането на STAT3, водещо от своя страна до активиране на транскрипционния фактор PAX5 и потискане на имуноглобулиновата синтеза. Като доказателство за това служи факта, че неутрализирането на ССL2 води до отстраняване на супресивния ефект на МСК върху плазматичните клетки (Rafei et al. 2008). Описано е също така вероятно участие на ССL2 в предизвиканото от МСК *in vivo* потискане на проинфламаторните CD4+ Th17 клетки, при което се наблюдава облекчаване на клиничните симптоми на експерименталния автоимунен енцефаломиелит (ЕАЕ). Установено е, че кондиционирана среда от МСК има инхибиращ ефект върху

активацията на CD4 T-клетки, получени от мишки с EAE, посредством CCL2-зависима супресия на фосфорилирането на STAT3. В допълнение, ключовата роля на продуцирания от МСК CCL2 е потвърдена от наблюдението, че при инжектиране на МСК, изолирани от CCL2 knockout мишки в мишки с EAE, отсъства терапевтичен ефект (*Rafei et al. 2009*).

#### **4.2.Regulated on activated normal T-cell expressed and secreted (CCL5/RANTES)**

Първоначално е открит като продукт секретирани от активирани T лимфоцити (*Schall et al. 1988*), който медира хемотаксисната активност на редица клетъчни типове включително моноцити, лимфоцити, дендритни клетки. Участва в левкоцитната миграция, ангиогенезата (*Balkwill et al. 1998, Rossi et al. 2000*) и в процеси свързани със зарастване на рани (*Martins-Green et al. 2013*). Той е мощен левкоцитен и неутрофилен активатор с ефект подобен на този наблюдаван при митогенни стимули (*Schall et al. 1991*). Освен функциите му като хемокин, CCL5 участва и в антивирусния имунен отговор като блокира HIV вирусната репликация *in vitro* (*Hadida et al. 1999, Appray et al. 2001*). Той има способност да подтиска T-клетъчния отговор и вероятно функционира като блокиращ фактор (супресор на алоантиген специфични T-клетки), като индуцира T-клетъчна апоптоза, чрез модулиране на Bcl-2 протеиновите нива, а също така по каспаза независим механизъм (*Ramhorst et al. 2004*). Има данни, че предизвиква и блокиране на развитието на моноцити и Th1клетки (*Weber et al. 2001*). Секретирани от NKT клетки, CCL5 специфично води до образуване на CD8+FoxP3+ клетки (*Faunce et al. 2002*). Подобно на CCL2, и CCL5 автокринно стимулира способността за миграция на МСК до местата на увреда, като има данни, че различни тумори стимулират *de novo* секреция на CCL5 от МСК с цел, използвайки имуносупресивните му функции да подпомагат метастазирането, инвазивността и подвижността си (*Karnoub et al. 2007, Zischek et al. 2009*).

Получените данни от различни автори показват, че действието на хемокините не може да се тълкува еднопосочно. Най-вероятно секретирани от МСК, те не само осъществяват привличане на различни типове имунни клетки с цел супресия, но и действат автокринно водейки до миграция на стволовите клетки до местата на

увреда и в следствие, в зависимост от средата, подпомагат осъществяването на конкретните им имуномодулиращи свойства.

## **5. Индоламин- 2,3- диоксигензара (IDO)**

IDO е триптофан катаболизиращ ензим, който има антибактериален и имуносупресивен ефект. Експресията му е описана по време на бременност, при някои тумори и при МСК от различен произход : децидуални (*Liu et al. 2014*), МСК от аминиточна течност (*Luo et al. 2014*), МСК от умбиликална стена (*Guo et al. 2011*), АТ-МСК (*DelaRosa et al. 2009*). Обикновено в „неактивирано” състояние МСК секретират ниски нива на IDO, но под влияние на IFN $\gamma$  (*Liang et al. 2013*), глюкокортикостероиди (*Ankrum et al. 2014*), DAMPs (damage associated molecular patterns) (*Lotfi et al. 2011*), продукцията и секрецията му чувствително се увеличава. Тези стимули се генерират при двупосочен контакт между МСК и други клетки (*Lin et al. 2012, Luo et al. 2014*). По отношение на имуносупресивното си действие IDO експресията от МСК води до арест на В клетъчния растеж и индуцира апоптоза в В клетките (*Maby-El Hajjami et al. 2009*), както и подтиска Т клетъчната пролиферация поради бързо дегриране на триптофана. Т клетъчният ефект е обратим при добавяне на IDO инхибитора 1-метил- DL триптофан (*Yang et al. 2009*). Наред с директните си ефекти IDO секретирани от МСК супресира имунния отговор и по индиректни механизми. Чрез МСК и IDO секрецията им, се медира диференциацията на моноцитите в IL-10 - секретирани M2 тип макрофаги, които имат имунорегулаторно действие (*François et al. 2012*). Наред с това IDO предизвиква и формирането на някои регулаторни Т клетъчни субпопулации, като IL-10+IFN $\gamma$ +CD4+ Tr1 – подобни клетки, както и засилена секреция на IL-10 от класическите Tregs (*Hsu et al. 2013, Engela et al. 2013*). Не на последно място IDO е един от цитокините, който заедно с други, секретирани от МСК подтиска съзряването и функцията на ДК, като засилва секрецията им на IL-10, механизми осъществявани чрез активацията на JAK1 и STAT 3 сигналния път (*Liu et al. 2013*).

## **6. Васкуларен ендотелен разстежен фактор (VEGF)**

Представлява система от 6 протеина (VEGF-A, B, C, D, E и PlGF), взаимодействащи с два рецептора (VEGF-R1 и VEGF-R2), разположение върху ендотелните клетки и някои имунни клетки. Основна функция на VEGF е да служи като митоген за ендотелните клетки, което го прави ключов в процеса на ангиогенеза (Kim et al. 2009). Наред с това е ангажиран в туморогенезата, възпалението и регулацията на имунния отговор. По отношение на последното VEGF е класически представител на двойствената и нееднозначна цитокинова природа. От една страна има изяви про-инфламаторни свойства като привличане на инфламаторни клетки, експресия на адхезивни молекули и поляризиране на Т хелперите по посока Th1 и Th17 (Kim et al. 2009), но от друга при тумори е описана изявената му имуносупресивна функция. VEGF-A регулира транскрипцията на NFκB, което води до подтискане на матurationта, трафика и способността за антигенно представяне, осъществявана от дендритните клетки (Gabrilovich et al. 1996, Oyama et al. 1998, Dikov et al. 2005). При пациенти със злокачествени заболявания е описана увеличена плазмена концентрация на VEGF, която корелира с наличието на незрели ДК и незрели миелоидни клетки в периферната кръв (Almand et al. 2000, Osada et al. 2008). VEGF също така влияе на дендритните клетки като води до секрецията им на IDO (Marti et al. 2014). Един от протеините в системата на VEGF- PlGF (placental growth factor) също променя дендритно клетъчната функция, подтискайки диференциацията на ДК, както и способността за индуциране на Th1 имуноен отговор (Dikov et al. 2005, Lin et al. 2007).

Друг имуносупресивен ефект осъществяван от VEGF-A е подтискането на далачни Т клетки (Gabrilovich et al. 1998).

МСК секретират VEGF, но натрупаните данни сочат, че това не се случва спонтанно, а по скоро при условия, индуциращи тази секреция, като дълъг период на култивиране (Kagiwada et al. 2008), и безсерумни условия, като във втория случай се установяват концентрации в супернатантите около 4.1 ng (Tögel et al. 2007). При условия на хипоксия и под влияние на TNFα МСК секретират VEGF чрез активиране на STAT3 и p38 MAPK механизмите (Wang et al. 2007). Други

автори описват като необходимо условие за VEGF секрецията активирането на TLR-2 и NOD-1 рецепторите (*Sioud et al. 2010*).

## **7. Секреторна интрацелуларна адхезивна молекула (sICAM)**

Ролята на мембрания ICAM по отношение на имunosупресивното действие на МСК беше разгледана по-горе. Отделно от него съществува и секреторна форма на ICAM (sICAM), която се получава вследствие на „изронване“ от клетъчната мембрана в резултат на протеолитично разграждане (*Budnik et al. 1996, Champagne et al. 1998*) или вследствие кодиране на специфичен РНК транскрипт (*Wakatsuki, et al. 1995*). Съществуват малко данни относно секрецията на sICAM от МСК, които претендират, че различните видове МСК са различно способни на секрецията му. Така например се установява, че децидуални МСК и МСК от стена на пъпна връв секретират големи количества sICAM, докато такава секреция липсва при КМ-МСК (*Hwang et al. 2009, Kim et al. 2012*). Едно донякъде спекулативно обяснение на това е, че sICAM е силно ангажиран с ангиогенезата и секрецията му от децидуални МСК и МСК от стена на пъпна връв е необходима за процесът на интензивна ангиогенеза по време на плацентацията. Основната паракринна функция на sICAM се счита за еквивалентна на тази на мембранната форма – подтискане на връзките между левкоцитите и МСК и съответно трафика на имунните клетки (*Rieckmann et al. 1995*).

## **8. Простагландин E2 (PGE2)**

Простагландините са продукти на синтез на циклооксигеназата (COX) от арахидоновата киселина. COX1 е експресирана непрекъснато при почти всички тъкани, докато COX2 се индуцира предимно при инфламаторни условия под влиянието на LPS (lipopolysaccharide), IL-1, TNF $\alpha$  (*Crofford et al. 1997*). Именно COX2 е ангажиран в метаболизма на PGE2, който действа на клетките по автокринен и паракринен начин (*Brock et al. 1999*). PGE2 е тясно свързан с имунорегулаторните функции на МСК, които го секретират спонтанно (*Aggarwal et al. 2005, Spaggiari et al. 2008, 2009*), като при възпалителни условия свързани с

наличието на  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  и  $IL-1\beta$  секрецията на PGE2 чувствително се засилва (Aggarwal et al. 2005, Nemeth et al. 2009, Chen et al. 2010). Множество проучвания показват, че директния контакт на МСК с ПКМК, моноцити и НК клетки засилват секрецията на PGE2 чрез действието на споменатите цитокини (Aggarwal et al. 2005, Spaggiari et al. 2009, Chen et al. 2010).

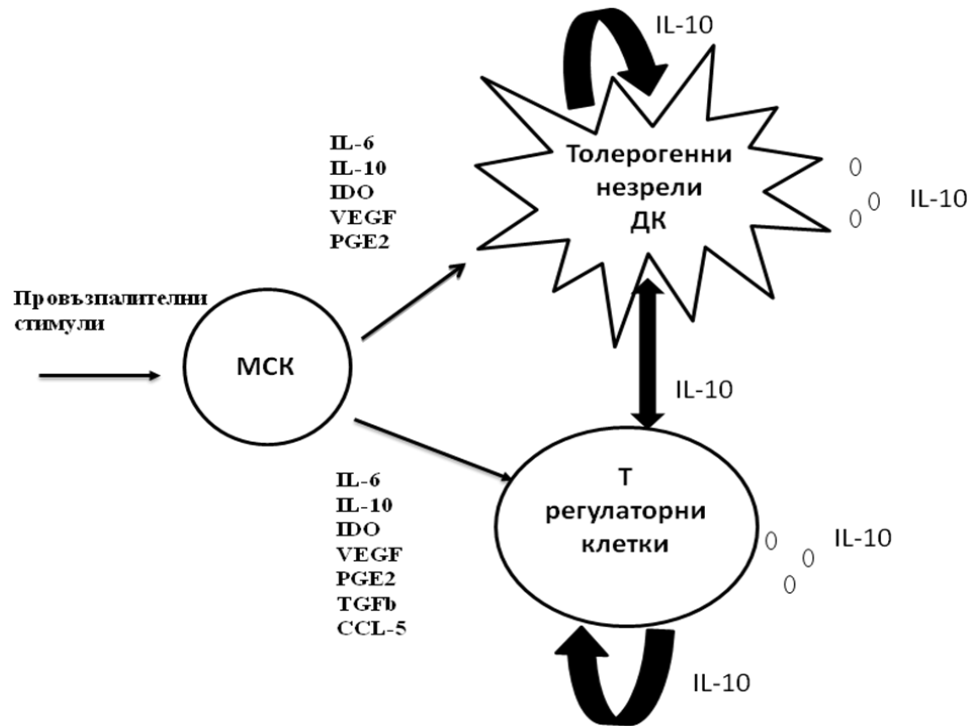
Най-често активиран чрез сигнали от възпалителното обкръжение PGE2, секретирани от МСК, действа на активационния статус, диференциацията и функцията на имунните клетки, проявявайки антиинфламаторен ефект чрез подтискане секрецията на  $TNF\alpha$  и  $IL-6$ , както и чрез промяна на васкуларния пермеабилитет (Nemeth et al. 2009). Описани са множество клетки обект на действието му: НК, моноцити, макрофаги (Spaggiari et al. 2009, Nemeth et al. 2009, Van Elssen et al. 2011), като съществуват данни, че PGE2 подтиска активираните ПКМК на ниво пролиферация и секреция на  $IFN\gamma$  (Aggarwal et al. 2005, Beyth et al. 2005, Chen et al. 2010). Двойствен ефект на PGE2 е описан по отношение на Т клетките, като едновременно се стимулира секрецията им на  $IL-4$  (Aggarwal et al. 2005) и се индуцират регулаторни Т клетки, секретирани  $IL-10$  (Zheng et al. 2008, Hsu et al. 2013). Основният ефект върху Т клетките обаче PGE2 осъществява чрез влиянието си върху дендритните клетки. Действието му върху тях се свързва с намалена ефективност на моноцитите да се диференцират в незрели ДК, което се описва с намалена експресия на  $CD1a$  и намалена експресия на костимулаторните  $CD80$  и  $CD86$ , формиращи  $B7$  комплекса, както и на МНС II молекули (Beyth et al. 2005, Spaggiari et al. 2009). Успоредно на това намалява секрецията на  $IL-12$  от ДК, докато се увеличава тази на  $IL-10$  (Aggarwal et al. 2005, Beyth et al. 2005, Nemeth et al. 2009, Spaggiari et al. 2009, Van Elssen et al. 2011). Подобно на други цитокини PGE2 води до незрял, толерогенен тип дендритни клетки, повлиява по скоро на диференциацията отколкото на съзряването им (Spaggiari et al. 2009), и този процес индиректно засяга ефекторните клетки на имунната система. Сред тях особено засегнати са Т клетките, но и НК клетките, като променената хемокинова секреция на ДК и най-вече намалената им секреция на  $IL-12$  (ключов за НК функцията)

водят до ниска активност на NK клетките, намалената им IFN $\gamma$  секреция и влошени цитотоксични функции (*Van Elssen et al. 2011*).

## 9. Изводи

Мезенхимните стволови клетки отделят редица секреторни фактори, които подтискат имунния отговор. Това се осъществява чрез влияние както върху съдовия ендотел, трафика и ангиогенезата, така и чрез влияние върху имунните клетки. Някои от цитокините действат директно върху ефекторните имунокомпетентни клетки (IL-10, TGF $\beta$ , CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, IDO, VEGF, PGE2), а други повлияват имунния отговор чрез индиректно действие опосредствано предимно от ДК и Т регулаторните популации (IL-6, IL-10, IDO, VEGF, PGE2, TGF $\beta$ , CCL5/RANTES). Повечето цитокини оказват и директен и индиректен ефект в процеса на имунна супресия.

Индиректният ефект обаче поставя МСК в централна роля като предимно негативен регулатор на инфламаторните процеси (**Фиг. 14**). Бидейки изключително чувствителни на провъзпалителни стимули от обкръжението си МСК свързват факторите на вродения и придобит имунен отговор.



**Фиг 14.** МСК осъществяват имунорегулаторните си функция основно чрез влиянието си върху ДК и различните Т регулаторни субпопулации. При провъзпалителни стимули МСК секретират редица цитокини, под влияние на които се формира незрял толерогенен фенотип ДК и Т регулаторни популации, като и двата вида клетки секретират IL-10. Тази секреция води до взаимно засилване на имунорегулаторните средства по паракринен и автокринен механизъм (D. Kyurkchiev et al. WJSC, 2014)

Описаните цитокини в настоящата глава не са, нито единствените, нито безспорно установени от всички автори работили по темата. Някои проучвания установяват едни цитокини, а други съответно алтернативни. Наред с гореописаните се съобщава и за наличие на NO, GM-CSF, G-CSF, IL-7, IL-12, IL-11, TNFα и др. (Majumdar et al. 1998, 2000) Коментираните тук цитокини са тези, които най-често се споменават в научната литература.

## 10. Собствени резултати

### 10.1. IL-10

Нашите резултати не показаха наличие на IL-10 при никоя от изследваните супернатанти на МСК, нито при ELISA тестовете (въпреки, че бяха използвани

китове на 3 различни фирми), нито при тестовете извършени чрез Proteome profiler kit. За IL-10 секреция бяха негативни 7 супернатанти на МСК изолирани от костен мозък, 7 на МСК изолирани от мастна тъкан и 10 от стена на пълна връв, като с негативен резултат се характеризираха всички изследвани проби. Тези резултати ни причисляват към групата автори, които не установяват секреция на IL-10 от МСК. Едно възможно обяснение за силно противоречивите резултати относно IL-10 в литературата е, че МСК могат да го секретират при определени условия, като наличие на провъзпалително обкръжение и присъствие на цитокини като IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-1, които активират определени Toll-like рецептори на МСК. Въпреки, че няма категорично установено мнение относно способността на МСК да секретират IL-10, безспорен е фактът, че те водят до секрецията му от други клетки. Доказано е, че фактори секретирани от МСК водят до секрецията на IL-10 от периферни кръвни мононуклеарни клетки (ПКМК) (Kyurkchiev et al. 2013), толерогенни макрофаги (Eggenhofer et al. 2014) и толерогенни ДК (Ivanova-Todorova et al. 2009, 2012, Bassi et al. 2011). Нашият екип има доста резултати, свързани с влиянието на МСК върху секрецията на IL-10 от имунокомпетентни клетки, като тези резултати ще бъдат описани и коментирани в глави IV и V.

## **10.2. IL-6**

За IL-6 секреция бяха положителни всички изследвани 7 супернатанти на МСК изолирани от мастна тъкан, 7 изолирани от костен мозък и 10 от стена на пълна връв. Изследвания бяха извършени и чрез proteome profiler kit и чрез ELISA, като резултатите не показаха качествени разлики. Количественото определяне на IL-6 в супернатантите на МСК показва средна стойност 116,05 pg/ml при ELISA тестовете. Относно proteome profiler kit изследването, дадените мерни единици се изчисляват като pixel density, като средната стойност за IL-6 беше установена на 217 pixel density. Различните мерни единици правят несъпоставимо количественото измерване на концентрациите на IL-6, изследван с различните методи.

## **10.3. TGF $\beta$**

Нашите резултати не показаха наличие на TGF $\beta$  при никоя от изследваните супернатанти на МСК, при извършените ELISA тестове, негативни бяха 7

супернатанти на МСК, изолирани от мастна тъкан, 7 на МСК изолирани от костен мозък и 10 от стена на пълна връв. С негативен резултат се характеризираха всички изследвани проби. TGF $\beta$  е цитокин, чието присъствие в супернатантите на МСК масово се коментира при почти всички изследвания, поради което нямаме обяснение за липсата му при нашите резултати. Факт, обаче е, и че други изследватели не го откриват (*Kilroy et al. 2007, Salgado et al. 2010, Ghannam et al. 2010, Blaber et al. 2012, Perrini et al. 2013*). Едно обяснение би било, че наличието на TGF $\beta$  в супернатанти на МСК твърде много зависи от условията, в които се намират, като основно значение вероятно има активационния им статус и пасажа на култивиране.

#### **10.4. Хемокини**

При изследваните супернатанти на МСК, установихме наличието на следните хемокини: IL-8, CXCL1/Gro $\alpha$ , CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, Serpin E1, MIF и CXCL12/SDF-1.

Чрез proteome profiler kit бяха изследвани 7 супернатанти на МСК, изолирани от мастна тъкан, 7 на МСК изолирани от костен мозък и 10 от стена на пълна връв, като за споменатите цитокни всички проби показаха положителни резултати.

#### **10.5. sICAM**

Ние не установихме наличие на sICAM при никоя от изследваните супернатанти на МСК, при извършените ELISA тестове, негативни бяха 7 супернатанти на МСК, изолирани от мастна тъкан, 7 на МСК изолирани от костен мозък и 10 от стена на пълна връв. Докато този резултат е логичен за КМ-МСК и АТ-МСК, той е в противоречие с резултатите за МСК от стена на пълна връв, описани в литературата, които откриват такава секреция.

#### **10.6. IDO, PGE2, VEGF**

Нашият научен екип няма собствени данни относно секрецията на IDO, PGE2 и VEGF от мезенхимни стволови клетки.

Изследванията ни върху супернатанти получени от КМ-МСК, АТ-МСК и стволови клетки от стена на пълна връв установяват безспорна секреция на множество хемокини част от които, наред с основните си функции имат и роля в

имунната регулация: CCL5/RANTES и CCL2/ MCP-1. Наред с това установяваме и такива, за които тази функция не е описана като CXCL1/Gro $\alpha$ , IL-8, MIF, Serpin E1 и CXCL12/SDF-1. Най-общо казано установените хемокини са силно ангажирани в привличането предимно на Т лимфоцити, което безспорно се явява включва стъпка в осъществяването на регулацията на имунния отговор.

От класическите имунорегулаторни цитокини нашите изследвания установяват категорично единствено секрецията на IL-6. Изследвания за секреция на IDO, PGE2 и VEGF не са провеждани. Предварителните ни очаквания бяха да се установи секреция и на IL-10 и TGF $\beta$ , и докато по отношение на секрецията на IL-10 от МСК мненията в литературата са доста полярни, по отношение на TGF $\beta$  преобладаващата концепция е, че той се секретира от МСК.

Основна причина за множеството разлики по отношение на резултатите за секретираните цитокини в супернатанти от МСК е факта, че тази секреция често е индуцирана от различни стимули, а не е спонтанна. От тази гледана точка важно е да се имат в предвид културалните условия. Дали експерименталната постановка е свързана с условия на ко-култивиране на МСК с други клетки или те се култивират самостоятелно, дали се гледат в безсерумни среди или в среди с фетален серум, на кой пасаж е културата, всичко това не е без значение, защото условията определят евентуалния стимул върху МСК, който пък определя цитокиновата им секреция. В нашите изследвания цитокините са тествани при клетки, които са максимално нестимулирани, което вероятно обяснява липсата на някои цитокини, описани от други автори. Подобно на повечето изследователи по темата, ние не установяваме резки количествени разлики по отношение на секрецията на МСК, изолирани от различни източници.

## **11. Използвани материали и методи**

За тестване на цитокини и хемокини са използвани супернатанти на АТ-МСК (7 културелни линии), КМ-МСК (7 културелни линии) и МСК от стена на пъпна връв (10 културелни линии). При всички тестове, клетките бяха на първи пасаж, оформили монослой на дъното на флашка и средата не е сменяна 48 часа. Средите

са замразени на -80 градуса и размразени непосредствено преди ползване, като не се допускат повторни замразявания и размразявания.

Използвани са два вида тестове за установяване на цитокинова секреция от страна на МСК

### **11.1.ELISA тестовете**

Тестовете бяха извършени с фабрични китове като се съобразихме с изискванията на производителя. Всяка проба беше изследвана в 3 повторения като се прие средната аритметична стойност между тях. Всеки цитокин беше изследван съответно със следните тестове:

IL-2: Human Instant ELISA, Bender MedSystems, Austria

IFN $\gamma$ : Human Instant ELISA, Bender MedSystems, Austria,

IFN $\gamma$ : Gen-Probe Diaclone, SAS, France

IL-10: Human Instant ELISA, Bender MedSystems, Austria

IL-10: Gen-Probe Diaclone, SAS, France

IL-10: Quantakine Human IL-10 ELISA, R&D Systems, USA

TGF $\beta$ : Human Instant ELISA, Bender MedSystems, Austria

IL-4: Human ELISA, Arcus Biological, Italy

IL-12: Gen-Probe Diaclone, SAS, France

IL-12: Quantakine Human IL-10 ELISA, R&D Systems, USA

IL-6, TNF $\alpha$ , IL-18, IL-23, IL-75A, sPCAM, sICAM, IL-8: Gen-Probe Diaclone, SAS, France.

Резултатите бяха отчетени на ELISA ридер STAT-FAX 2100, при дължина на вълната 450nm бяха представени в pg/ml.

### **11.2.Proteome profiler kit**

За анализ на цитокините, съдържащи се в супернатантите на МСК беше използван Human Cytokine array panel A array kit (R&D Systems, USA), способен да установи 36 цитокини, хемокини и разстежни фактори, конкретно:

C5a, CD40L, G-CSF, GMCSF, GRO $\alpha$ , I-309, sICAM-1, IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-16, IL-17, IL-17E, IL-23, IL-27, IL-

32 $\alpha$ , IP-10, I-TAC, MCP-1, MIF, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , Serpin E1, RANTES, SDF-1, TNF $\alpha$ , TREM-1

Експерименталната постановка, беше проведена съобразно с инструкциите на производител. Нитроцелулозни мембрани, всяка съдържаща 36 различни анти-цитокинови антитела, импрегнирани в повторения, се инкубират с всяка супернатанта поотделно и се добавят биотинилирани разпознаващи антитела. Визуализирането на експериментите се осъществява, чрез добавянето на белязани с пероксидаза стрептавидин свързани антитела и хемилуминисценция (ECL-технология), спазвайки инструкциите на производителя (Amersham Biosciences, Amersham, UK).

### **11.3. Software**

В последствие хемилуминисцентните фотоплаки бяха сканирани и подложени на денситометричен анализ, чрез използването на софтуерна програма - ImageJ software (NIH, Bethesda, Maryland, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) като резултатите бяха представени като pixel density.

## **III. Въздействие на МСК върху Т, В и НК клетки**

Настоящата глава си поставя за цел да опише на базата на литературни данни и собствен опит въздействието на МСК върху Т и В лимфоцитите, както и върху НК клетките. При цялата относителност на това твърдение, може да се каже, че споменатите клетъчни популации, осъществяват предимно междинните и крайните етапи на имунния отговор, а не са свързани с неговото инициране, поради което сметнах за целесъобразно да започна именно с въздействието на МСК върху Т, В и НК клетките, а после да разгледам МСК въздействието върху клетъчни популации, които ги контролират.

Докато по отношение на действието на МСК върху Т и В лимфоцитите нашия научен екип има собствени резултати, то по отношение на НК клетките не сме провеждали изследвания, поради което влиянието върху тях ще бъде описано за пълнота на изложението само на базата на литературни данни.

### **1. Имуносупресивен ефект на МСК върху Т лимфоцити**

Имуносупресивните механизми на МСК са описани най-рано и до известна степен най-подробно по отношение на Т лимфоцитите. От началото на хилядолетието до настоящия момент са натрупани множество данни, които недвусмислено доказват, че МСК подтискат активацията и пролиферацията на Т клетките, като този процес засяга както CD4+, така и CD8+ популациите (*Rasmusson et al. 2007, Duffy 2011*). Наред с това, под въздействието на МСК, Т хелперните лимфоцити променят своя фенотип и цитокинова секреция.

#### **1.1. "Активирани" МСК**

Според множество автори основно изискване за имуносупресивните ефекти на МСК е необходимостта те да бъдат „активирани“, като тази необходимост сякаш се явява най - важна за ефекта предимно върху Т лимфоцитите, а не толкова върху други имунокомпетентни клетки. Концепцията за „активацията“ на МСК, която ги

прави имunosупресивни, е свързана с идеята за cross talk между МСК и Т лимфоцитите (бъдеща мишена на инхибиция). Счита се, че взаимната обмяна на фактори води като резултат до придобиване на имunosупресивен фенотип на МСК, който иначе не съществува или е изразен в по- слаба степен. Множество изнесени данни разкриват, че няколко вида фактори, някои от които отделяни от имунокомпетентни клетки водят до придобиване или засилване на имunosупресивна активност от страна на МСК (*Haddad and Saldanha-Araujo 2014*). На първо място това е IFN $\gamma$  (*Ryan et al. 2007*). Под негово въздействие МСК засилват способността си да подтискат Т клетъчната пролиферация (*Tobin et al. 2012, van Rhijn et al. 2013, Auletta et al. 2014*), като за основен се смята ефектът на IFN $\gamma$  върху способността на МСК да синтезират и секретират IDO – един от най-важните имunosупресивни фактори, действащи върху Т лимфоцитите (*Delarosa et al. 2009, Krampner et al. 2009, Menta et al. 2014*). Подобно действие на IFN $\gamma$  е описано и по отношение на HGF (hepatocyte growth factor) и TGF $\beta$  (*Ryan et al. 2007*). Наред с това под влияние на IFN $\gamma$  се увеличава експресията на programmed death ligand 1 и 2 (PD-L1 и PD-L2) на повърхността на МСК, молекули, които, както ще стане дума по-надолу са основен фактор в контакт-индуцираната имунна супресия, осъществявана от МСК по отношение на Т клетките (*Chinnadurai et al., 2014*). Въздействието на IFN $\gamma$  върху МСК има още едно важно значение, тъй като води до възможност на МСК да оцелеят във възпалителна среда, и по конкретно да се предпазят от цитотоксичното действие на NK клетките срещу тях (*Spaggiari et al. 2006*), процес, който също ще бъде разгледан по късно. Важно е да се отбелжи, че сигналните пътища, чрез които IFN $\gamma$  въздейства върху МСК са все още абсолютно неизвестни.

Друг цитокин, ангажиран в „праймирането” на МСК по посока имunosупресивно действие е TNF $\alpha$ , който в редица случаи действа синергично с IFN $\gamma$ , като двата цитокина водят до увеличена секреция на HGF и PGE2 (*English et al. 2007*).

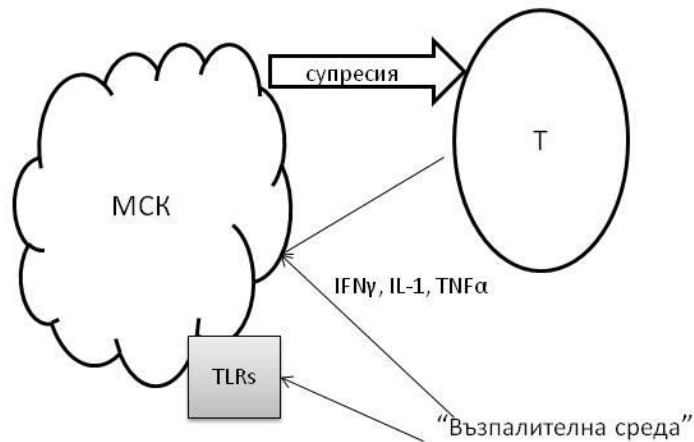
По подобен начин IL-1 $\alpha$  заедно с IFN $\gamma$  засилват способността на МСК да действат в посока инхибиция на Т клетъчната активация и пролиферация (*Larocca et al. 2013*). В тази връзка е описан и ефект на IL-1 $\beta$ , секретирани от моноцитите, върху МСК,

които от своя страна увеличават секрецията си на TGF $\beta$ , водещ до засилен потенциал за Т клетъчна супресия (*Groh et al. 2005*).

Наред с изброените цитокини друг важен фактор, водещ до „активирането” на МСК е въздействието върху техните toll-like рецептори (TLRs). Данните в това отношение са доста разнопосочни. Например активацията на TLR-2 според *Sioud et al. 2011* води до повишена супресивност на МСК спрямо Т клетките, осъществявана чрез секрецията на галектин 1 и 3. Въздействието върху същия рецептор според *Lei et al. 2011* има като следствие намалена способност на МСК да подтискат Т лимфоцитите както и да генерират Tregs. Въпреки разнопосочните данни, в последните години се прави опит за разделянето на МСК на МСК1 и МСК2, в зависимост от стимулацията на техните TLRs. Докато за МСК1 се счита, че секретират проинфламаторни цитокини, МСК2 секретират цитокини, обуславящи процес на имунна супресия (*Waterman et al. 2010*). Като пример се сочи стимулацията на TLR-4 на повърхността на МСК, която дава като резултат секреция на про-инфламаторните IL-6, IL-8 и TGF $\beta$  (МСК 1), докато активацията на TLR-3 води до секреция на анти-инфламаторните IL-4, IDO и PGE2 (МСК2) (*Waterman et al. 2010*).

Въпреки опитите да се въведе класификация, сепарирането МСК1/ МСК2 не среща масова подкрепа в научната общност, като основна причина за това е разделението „про- и анти- инфламаторни” цитокини. Както вече беше дискутирано, много трудно, дори невъзможно е повечето цитокини да бъдат вкарани в тази скала.

Независимо от това, основната идея за „активираните” МСК е, че те функционират във „възпалителна среда”, обуславяна от наличието на IFN $\gamma$ , IL-1, TNF $\alpha$  и активирани TLRs, формират или засилват своя имуносупресивен потенциал (*Glennie et al. 2004, Channan et al. 2010*) (**Фиг. 15**).



**Фиг.15** „Cross talk” между Т лимфоцитите и МСК. „Възпалителната среда” и повлияните от нея Т лимфоцити секретират „провъзпалителни цитокини”, както и фактори активиращи toll-like рецепторите на МСК. В резултат МСК придобиват/усилват своите имуносупресивни свойства и подтискат Т лимфоцитната активация, пролиферация и секреция на „провъзпалителни цитокини”.

Дали „възпалителната среда” е безусловно необходима за придобиване на имунорегулаторни средства от МСК е въпрос, който все още няма своя окончателен отговор, тъй като твърде много данни сочат, че дори без „активирането” си, МСК действат в супресивна посока върху Т лимфоцитите.

### **1.2. МСК действат имуносупресивно върху Т лимфоцитите**

Способността на МСК да подтискат пролиферацията на Т клетките е доказана както на няколко експериментални животински модела, така и при множество *in vitro* постановки

### ***1.2.1. Експериментални in vivo модели***

Основните проучвания направени за имуносупресията върху Т клетките залагат на изследването на ролята на МСК при реакции на отхвърляне на трансплантата, както и за ролята им при graft versus host disease (GVHD). При експериментални мишки инжектирането на алогенни АТ-МСК води до оцеляване на кожна присадка повече от 7 дни, като се установяват подтисната Т лимфоцитна пролиферация и ниски нива на IL-2 и IFN $\gamma$  в присадката (*Chanam et al. 2010*). При друг модел, имунизирани павиани с КМ-МСК на HLA неидентични индивиди, с последвала кожна присадка, показват забавеното ѝ отхвърляне, като според авторите ефектът на единична инжекция с КМ-МСК е сравним с този на флударабин (медикамент индуциращ Т клетъчна апоптоза) и циклоспорин, съчетан с анти-CD80 моноклонално антитяло. Описва се 14 дневно оцеляване на кожната присадка като направената биопсия разкрива инфилтрирането ѝ по-скоро с неутрофили, отколкото с Т клетки (*Bartholomew et al. 2002*). При изследване на влиянието на АТ-МСК върху присадка на цял крайник (заден крак на плъх), в експерименталната постановка АТ-МСК и присадения крайник са от един индивид, докато реципиента е HLA неидентичен. Описва се намалена пролиферация на Т клетките и удължен живот на присадката, като хистологично се установява моноклеарна инфилтрация в кожата и мускулите на присадения крайник. Тази инфилтрация е значително с по ниска интензивност при АТ-МСК третираните, животни в сравнение с контролната група (*Jeong et al. 2014*).

При експериментално предизвикана GVHD чрез трансфер на човешки ПКМК в SCID (severe combined immune deficiency) мишки се доказва, че добавянето на човешки КМ-МСК ефективно подтиска проявите на GVHD (*Tobin et al. 2002*). Друг модел доказва, че при предизвикана GVHD в радиационно третирани мишки, трансферът на човешки КМ-МСК значително редуцират проявите на реакцията, като се установява, че МСК се насочват към местата на увреда чрез своя CCR7 рецептор следвайки хемокинов градиент. Така, те се локализируют първоначално в белия дроб, а по-късно в гастроинтестиналния тракт. МСК се установяват и в бялата пулпа на слезката, където се счита, че оказват своето супресивно действие

върху Т лимфоцитите (*Auletta et al. 2014*). Подобно действие се описва и за миши МСК, които контролират потенциално фаталната GVHD при SCID мишки (*Yanez et al. 2006*)

При сравнение на имunosупресивното действие *in vivo* се установява, че КМ-МСК и АТ-МСК имат сходно действие и подтискат Т пролиферацията по доза-зависим начин (*van Rhijn et al. 2013*).

### **1.2.2 *In vitro* експерименти**

Този вид изследвания използват MLC (mixed lymphocyte culture), както и митогенно и актигенно въздействие върху Т лимфоцитите, с цел да ги активират и да изследват имunosупресивното въздействие на МСК върху тях. Множеството проучвания недвусмислено доказват, че се наблюдава супресия както на CD4+, така и на CD8 + Т лимфоцитите (*Krampera et al. 2005*)

Едни от най-ранните изследвания в този аспект разкриват убедително, че човешки КМ-МСК в достатъчен брой подтискат Т клетките в MLC, както и при Т стимулацията с ПХА (фитохемаглутинин), ConA (concanavaline A) и протеин А. Тези резултати се постигат и с автоложни и с алогенни МСК, което доказва, че действието им е HLA-независимо. Авторите твърдят, че в малки количества МСК могат да имат и обратния ефект – стимулация на Т лимфоцитите, като този ефект също не е зависим от HLA (*Le Blanc et al. 2003*). Действието на МСК, изразяващо се в подтискане на пролиферацията на Т клетки се описва и при Т клетъчното активиране чрез алогенни дендритни клетки, като повечето проучвания твърдят, че независимо от стимулиращия фактор за Т лимфоцитите, ефектът е един и същ и той се реализира, както от КМ-МСК, така и от АТ-МСК (*Di Nicola et al. 2002, Bartholomew et al. 2002, Yanez et al. 2006*). Независимо от това отделни изследвания претендират, че ефектът на МСК зависи от стимула върху Т лимфоцитите. Така например *Rasmusson et al. 2005* в своите изследвания установяват, че под влияние на МСК, в условия на MLC, IL-2 и неговия рецептор се увеличават, докато при ФХА активацията, същите фактори намаляват. Подобно, в условия на MLC, МСК водят до увеличена секреция на IL-10 от Т лимфоцитите, процес, който авторите не установяват при стимулация на Т клетките с ФХА. Независимо от различните

цитокинови промени, процесът на супресия на Т клетъчната активация се установява винаги. Въз основа на това се прави извода, че различните стимули за Т клетъчната активация се свързват с различни механизми на подтискане от страна на МСК. При изследване на способността на МСК да инхибират РМА (phorbol miristate acetate) активираните Т клетки (характерно за РМА е, че този вид активация "заобикаля" клетъчните рецептори и калций обусловения signaling, като влиянието му се свързва с директна активация на протеин киназа С), инхибиторния ефект на МСК също присъства (*Rasmusson et al. 2005*)

Един друг важен въпрос засяга способността на МСК да подтискат антиген-специфичния отговор, осъществяван от Т лимфоцитите. При изследването на имунен отговор срещу антигенни пептиди кодирани от НУ комплекса, се установява, че приложението на МСК води до липса на Т клетъчно делене след 72 часа (*Glennie et al. 2004*). Доказва се, че МСК подтискат НУ специфичния имунен отговор, като процесът засяга, както наивния, така и паметовия имунен отговор. Разбира се, процесът на инхибиция, осъществявана от МСК е неспецифичен и не се ограничава само до НУ активираните клонове Т клетки (*Krampera et al. 2003*). Подобни резултати се получават и при антиген-специфична активация с ОВА (ovalbumine), който води до експанзия на специфични клонове Т лимфоцити, като супресията се осъществява, както от сингенни, така и от алогенни миши МСК (*Goodwin 2011*). При изследване на експериментален автоимунен енцефаломиелит (ЕАЕ), състояние с характерна предимно Т клетъчна имунна патогенеза, предизвикано в мишки при третиране с миелин олигодендроцит гликопротеин (МОГ35-55) се доказва, че приложението на МСК преди индуцирането на заболяването води до смекчени прояви на ЕАЕ. Същият резултат се получава при МСК приложението в пика на заболяването, но не и при стабилизирането му. МОГ специфичните клонове Т клетки са с подтисната пролиферация, процесът на демиелинизация и възпалителния инфилтрат са значително редуцирани. И при тази постановка авторите установяват, че супресията не е специфична за МОГ активираните клонове. Установява се също локализация на МСК в лимфоидните органи и субарахноидалното пространство на гръбначния мозък (*Zappia et al. 2005*).

Като цяло резултатите за действието на МСК върху Т лимфоцитите, получени както *in vivo* така и *in vitro*, несъмнено доказват, че МСК подтискат Т клетъчната пролиферация. Процесът се осъществява по антиген-независим път, той не е свързан с HLA системата, реализира се от авто, ало и ксеногенни МСК и вероятно не е зависим от фактора, който води до Т клетъчната активация. Супресия върху Т лимфоцитите извършват, както КМ-МСК, така и АТ-МСК (*Duffy 2011, Haddad and Saldanha - Araujo 2012*).

### **1.3. Фактори от страна на МСК осъществяващи имунна супресия върху Т клетки**

Въпреки, че по въпроса за супресията на Т клетките, провеждана от МСК, в научната литература цари рядко срещан консенсус, то по отношение на факторите, които предизвикват ефекта, нещата далеч не стоят така. Най-общо тези фактори могат да бъдат разделени на пряк контакт, секреторни фактори и комбинация между двете. Авторите, които считат за единствен фактор прекия междуклетъчен контакт, осъществяван от МСК върху Т клетката, са по скоро изключение. Повечето от тях емпирично достигат до този извод, като установяват чрез transwell система липса на МСК супресия (*Krampera et al. 2003, Beyth et al. 2005*). Други допускат приоритетната роля на прекия контакт, чрез липса на CD40 сигнал към Т клетките, поради факта, че CD40 не се експресира от МСК (*Larocca et al. 2013*). МСК експресират на повърхността си редица интегрини като  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ , както и ICAM-1, VCAM-1, CD72 и LFA-3 (CD58) (*Haddad and Saldanha - Araujo 2012*). Теоретично те биха могли да се свържат с кореспондентните им молекули на повърхността на Т клетките, като някои данни съобщават, че в първите 4 часа от ко-култивирането на МСК и Т се осъществява междуклетъчна връзка, която продължава приблизително около 60 часа (*Suva et al. 2008*). Това само по себе си не дава достатъчно основания да се счита, че прекия контакт е основен в имносупресията, осъществявана от МСК върху Т лимфоцитите. Още повече при изследване на възможността за връзка между LFA-3 с LFA-2 на повърхността на Т клетките, неутрализацията на LFA-3 не променя инхибиращия ефект на МСК (*Rasmusson et al. 2005*). Някои автори описват, че блокирането на CXCR3 на

повърхността на МСК не му дава възможност за връзка с кореспондиращите Т клетъчни CXCL9, CXCL10 и CXCL11, което води до намалена способност за супресия (Ren et al. 2008). Като цяло се счита, че ICAM-1, VCAM и PD-L1 са повърхностни молекули, свързани с контактния път на инхибиция, но този процес е по характерен за мишки, а не за хора (Najar et al. 2010). Доколкото контактна молекула се сприяга при хората тя е предимно PD-1 и нейната връзка с PD-L1 и 2 експресирани на повърхността на МСК (Augello et al. 2005, Chinnadurai et al. 2014). Описват се и имносупресивни функции на някои повърхностни молекули, които са типични за МСК. Така например, установено е, че Stro-1 положителните КМ-МСК имат по силен супресивен ефект върху Т лимфоцитите, както и че липсата на CD90 води до отслабен инхибиращ ефект. Двойноположителните CD39/CD73 МСК също се свързват с мощен имуноподтискащ ефект върху Т клетъчните субпопулации, като индуцират секрция на имносупресивния аденозин (Haddad and Saldanha - Araujo 2012). Данните покрелящи тезата за контактен път на инхибиция върху Т лимфоцитите са доста разнопосочни, като една страна прекия контакт не може да се изключи като фактор обуславящ имунната супресия, но от друга липсват точно установени междумолекулни взаимоотношения, които да определят този процес.

По широко възприета е тезата, че контактния път е само един от компонентите, който действа наред със секреторния фактор (Glennie et al. 2004, Zappia et al. 2005, Peng et al. 2012, Menta et al. 2014), като поддръжниците на „двустепенния процес“ считат, че прекия контакт е първоначално необходимо условие за секрецията на имунорегулаторни фактори (Selmani et al. 2008).

Повечето изследователи считат секреторния път за основен в процеса на осъществяване на имунната супресия върху Т лимфоцитите (Aggarwal and Pittenger 2004, Yanez et al. 2006, Delarosa et al. 2009, Auletta et al. 2014) като основно доказателство за това са експериментите провеждани чрез transwell система, където се осъществява инхибиция на Т лимфоцитите без наличие на междуклетъчен контакт (Di Nicola et al. 2002, Rasmusson et al. 2005), както и чрез тестирането на супернатанти от МСК по отношение на супресивното им действие върху Т

клетките (*Rasmusson et al. 2005, Groh et al. 2005, Jeong et al. 2014*). Доказателство за ролята на секреторния път са и изнесените данни, че КМ-МСК, третирани с EDCI (агент, блокиращ цитокиновата секреция, но запазващ повърхностните молекули) не осъществяват подтискащото си действие върху Т лимфоцитите при миши модел (*Jeong et al. 2014*).

От факторите секретирани от МСК са дискутирани повече от 30, които могат да имат отношение на супресията върху Т лимфоцитите, сред които IDO, PGE2, TGF $\beta$ , CCL2, HGF, IL-10 галектини 1 и 3, HLA-G5 (*Haddad and Saldanha - Araujo 2012*). По отношение на HGF, IL-10 и TGF $\beta$ , съобщаваните данни са твърде разнопосочни. Така например в някои изследвания HGF (*Delarosa et al. 2009, Peng et al. 2012, Auletta et al. 2014, Jeong et al. 2014*), IL-10 (*Delarosa et al. 2009, Auletta et al. 2014, Jeong et al. 2014, Menta et al. 2014*) и TGF $\beta$  (*Auletta et al. 2014, Jeong et al. 2014*) се споменават като възможни теоретични участници в супресията на Т клетките, в други категорично се счита, че основна роля имат TGF $\beta$  и HGF (*Di Nicola et al. 2002, Groh et al. 2005*), докато в трети не се установява супресия на Т лимфоцитите с участие на IL-10 (*Groh et al. 2005*) и TGF $\beta$  (*Rasmusson et al. 2005, Krampera et al. 2005*). Единични съобщения има също така за възможна инхибираща роля на хемокина CCL2 (MCP-1), секретирани от МСК (*Duffy 2011*). МСК секретирания CCL2 има роля в предизвикана в Т клетките апоптоза (*Akiyama et al. 2006*), както и в предизвиканото от МСК *in vivo* потискане на про-инфламаторните CD4<sup>+</sup> Th17 клетки, при което се наблюдава облекчаване на клиничните симптоми на ЕАЕ. Установено е, че кондиционираната среда от МСК има инхибиращ ефект върху активацията на CD4<sup>+</sup> Т-клетки, получени от мишки с ЕАЕ, посредством CCL2-зависима супресия на фосфорилирането на STAT3. В допълнение, ролята на продуцирания от МСК CCL2 е потвърдена от наблюдението, че при инжектиране на МСК, изолирани от CCL2 knockout мишки в мишки с ЕАЕ, отсъства терапевтичен ефект (*Rafei et al. 2009*).

Счита се, че значение за Т клетъчната инхибиция, може да има и последвалата прекия контакт секреция на аденозин от МСК, който подтиска Т клетъчната пролиферация (*Haddad and Saldanha - Araujo 2012*)

Галектин 1 и галектин 3 са мембранно свързани протеини, които могат и да бъдат секретирани, като е установено че МСК са едни от клетките, които ги секретират. Блокирането им чрез моноклонални антитела води до подтисната способност на МСК да инхибират пролиферацията на Т лимфоцитите. Счита, се че секретцията на тези галектини се осъществява при наличие на фактори, които въздействат върху TLR-2 на повърхността на МСК (*Sioud et al. 2011*).

Най-много натрупани и най-убедителни данни за супресивно действие върху Т клетките има за 3 фактора, секретирани от МСК: HLA-G5, PGE2 и IDO.

HLA-G5 е секреторна форма на неklasическия HLA-G антиген, описан за първи път по отношение на експресията си върху трофобласта. Неговата роля е подробно разгледана в глава VI. По отношение на супресивното му действие върху Т клетките, се дискутира, че то не е самостоятелно, а зависимо от други фактори като IDO (*Menta et al. 2014*), пряк контакт и IL-10 (*Selmani et al. 2008*). HLA-G5 подтиска Т клетъчната пролиферация като се свързва с рецептора си ILT-2 на повърхността на Т лимфоцитите, като е описано, че HLA-G5 неутрализирането води до частично възстановяване на подтиснатия Т клетъчен пролиферативен капацитет (*Selmani et al. 2008*)

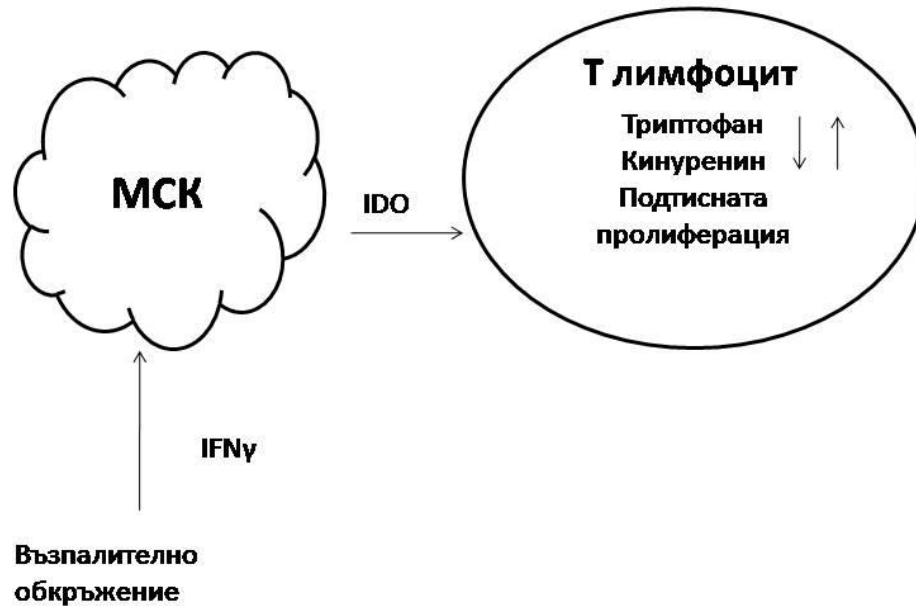
PGE2 се счита за един от основните фактори въввлечен в имунната супресия осъществявана от МСК върху Т лимфоцитите (*Krampera et al. 2005, Peng et al. 2012*), въпреки че данните относно ролята му също са противоречиви. При кокултивиране между МСК и Т лимфоцити, в супернатантата се установява увеличено ниво на PGE2 (*Menta et al. 2014*), като инхибирането на PGE2 чрез индометацин и EP2 (E prostanoid 2) антагонист води до частично възстановяване на пролиферативните възможности на подтиснатите Т лимфоцити. Същият ефект се установява *in vivo*, при индуцирана GVHD на миши модел, чрез блокиране на циклоксигеназата (*Delarosa et al. 2009, Aggarwal and Pittenger 2004, Auletta et al. 2014*). Обратно, добавянето на EP2 агонист засилва имуносупресивния ефект на МСК върху Т клетките (*Auletta et al. 2014*). Някои данни сочат, че ефектът на индометацин се осъществява при активирани Т лимфоцити в условия на MLC и кокултивирани МСК, но не се осъществява при ПХА активирани Т клетки, ко-

култивирани с МСК (*Rasmusson et al. 2005*), а други директно отричат ефекта на индометацин за възстановяване на подтисната чрез PGE2 Т клетъчна активация (*Menta et al. 2014*)

IDO се явява може би най-убедителния кандидат за осъществяването на инхибиция на Т клетъчната пролиферация от страна на мезенхимните стволови клетки. Освен, че най-често се споменава по отношение на тази си роля (*Glennie et al. 2004, Krampera et al. 2005, Peng et al. 2012, van Rhijn et al. 2013, Auletta et al. 2014, Mentha et al. 2014*), IDO е един от малкото фактори, секретирани от МСК, за който е описан патогенетичен механизъм (*Glennie et al. 2004, Krampera et al. 2005, Mentha et al. 2014*). Една характерна особеност е, че IDO се счита за фактор в МСК обусловената Т клетъчна супресия, при хора, но не и при мишки, където неговата функция се изпълнява от индуцирана азотно оксидната синтетаза (INOS) (*Auletta et al. 2014*).

IDO е цитоплазмен ензим с основна функция да участва в метаболизма на триптофан по кинурениновия път, като под негово действие се образува кинуренин за сметка на триптофан. Повечето клетки, както и МСК не експресират IDO в състояние на покой, но при „активацията” си, най-вече под действието на IFN $\gamma$ , започват да го секретират, което повлиява клетките в съседство. По отношение на Т лимфоцитите един от ефектите на IDO се свързва с подтискане на пролиферацията им, чрез блокиране на транслацията на много транскрибирани фактори (*Krampera et al. 2005, Mentha et al. 2014*). Според някои данни, блокирането на IDO почти напълно лишава МСК от техния инхибиращ ефект върху Т клетъчната пролиферация (*Menta et al. 2014*). При извършени експерименти с добавяне на различни дози триптофан, авторите установяват блокиране на имunosупресивното действие на АТ-МСК, въпреки наличието на кинуренин. Добавянето на допълнително кинуренин възстановява инхибиращото действие на МСК, но това се случва само при част от донорите на АТ-МСК, което дава основание да се предположи, че чувствителността към кинуренин е донор-специфична (*Menta et al. 2014*). Както беше споменато IFN $\gamma$ , водещ до „активирано състояние” на МСК е от ключово значение за действието на IDO върху триптофан,

като се счита, че секрецията на IFN $\gamma$  се формира вследствие на възпалително обкръжение (Krampera et al. 2005) (Фиг. 16)



**Фиг. 16** Патогенетичен механизъм на имунна супресия, осъществявана от МСК върху Т клетки, чрез секреция на IDO. Под действието на възпалителна среда се секретира IFN $\gamma$ , който „активира” МСК и ги прави способни да експресират IDO. IDO от своя страна метаболизира триптофан, превръщайки го в кинуренин. Липсата на триптофан и акумулирането на кинуренин води до супресия на Т клетъчната пролиферация.

Наред с прякото директно подтискане на Т клетъчната пролиферация от МСК, са описани и индиректни механизми, които се базират на наличието на „клетки посредници”, осъществяващи имунната супресия на Т лимфоцитите. Както е логично да се предположи, тази функция е описана за моноцитите и дендритните клетки. Относно моноцитите има съобщения за тяхна роля в „активирането на МСК” чрез секрецията им на IL-1 $\beta$ , който от своя страна стимулира секрецията на

TGF $\beta$  от МСК, като по този начин се осъществява супресията на Т клетките (*Groh et al. 2005*).

*Peng et al. 2012* доказват, че дендритни клетки, предварително ко-култивирани с МСК придобиват толерогенен фенотип и при добавянето им към Т лимфоцити, осъществяват ефективна супресия на пролиферацията на последните. Взаимоотношенията между МСК и дендритните клетки са подробно разгледани в глава V.

#### **1.4. Процеси в Т лимфоцитите под влияние на МСК**

Подтиснатата пролиферация на Т лимфоцитите би могла да е израз на три основни имунологични процеса: апоптоза, анергия или супресия.

Апоптозата и предизвиканата от нея делеция на Т клетъчни клонове категорично се отрича като процес, предизвикан от МСК върху Т лимфоцитите (*Krampera et al. 2003, Glennie et al. 2004, Tobin et al. 2012.*), като доказателствата за това са свързани със способността на Т лимфоцитите да възстановяват пролиферативния си потенциали при премахване на МСК или някои от факторите от страна на МСК водещи до Т клетъчна супресия. С други думи подтискането на Т лимфоцитите от МСК е обратим процес, което прави невъзможно реализацията му да се извърши чрез механизмите на апоптоза. Така например е доказано, че Т клетките не са апоптотични вследствие на влиянието на МСК и отстраняването на последните води до нормални пролиферативни Т клетъчни отговори (*Di Nicola et al. 2002*). Инхибирането на PGE2 и неговите рецептори с индометацин и EP2 рецепторен антагонист, както и блокирането на циклооксигеназта води до възстановен Т пролиферативен капацитет (*Auletta et al. 2014*). Подобен ефект се описва и при неутрализирането на HLA-G5 (*Selmani et al. 2008*) и IDO (*Menta et al. 2014*). Също така, изхождайки от идеята за „клетките посредници” в инхибицията на Т лимфоцитите, добавянето на LPS, водещ до съзряването на дендритните клетки и съответния „имуногенен” фенотип, което има като следствие възстановяване на пролиферативните Т клетъчни способности (*Beyth et al. 2005*)

Според някои данни добавянето на IL-2 води до възстановяване на пролиферацията на Т клетките (*Zappia et al. 2005*), но други отричат този ефект, като твърдят, че

добавянето на IL-2, IL-4, IL-7 и IL-15 не възстановява способностите на Т клетките да пролиферират (*Krampera et al. 2005*). Съществуват, макар и единични съобщения подкрепящи възможността МСК, наред с други механизми да могат да индуцират и апоптоза в Т клетките, като, както беше споменато се коментира ролята на CCL2 в този процес (*Akiyama et al. 2006, Menta et al. 2014*).

Ролята на процеса на анергия по отношение на супресирана клетъчна пролиферация е по-вероятен механизъм за действието на МСК (*Krampera et al. 2003*), въпреки, че значението на този процес се отрича от някои автори (*Tobin et al. 2012*). Механизмът на анергия се свързва с първоначален пряк контакт, с последвала секреция на IDO, който блокира влизането на Т клетките във фаза S, като ги “арестува” във фаза Go/G1. Преходът от G1 в S се контролира от инхибиторни протеини като p27<sup>Kip1</sup>, като тяхното подтискане води до индукция на циклини и ДНК синтез. Под въздействието на променения триптофанов метаболизъм, причинен от действието на IDO се увеличава p27<sup>Kip1</sup> и се подтиска експресията на циклин D, вследствие на което Т лимфоцитите остават във фаза G1. Седемдесет и два часа след добавянето на МСК, авторите не установяват Т клетъчно делене (*Glennie et al. 2005*)

Супресията (в тесен смисъл на термина) е третият механизъм, който широко се коментира като механизъм свързан с подтискането на Т клетъчната пролиферация (*Rasmusson et al. 2005, Tobin et al. 2012*), като основна роля в процеса играе генерирането на Tregs под влияние на МСК.

Въпреки, че някои автори отричат значението на формиралите се Tregs под влияние на МСК за супресията на Т клетките (*Krampera et al. 2003, Glennie et al. 2005*), или пък изцяло отричат формирането на Tregs под влияние на МСК (*Krampera et al. 2005, Zappia et al. 2005, Auletta et al. 2014*), като цяло в научната литература съществува консенсус, че МСК водят до генерирането на Tregs. Множество *in vitro* експерименти доказват, че МСК индуцират формирането на Tregs (*Aggarwal and Pittenger 2004, Groh et al. 2005, Saldanha - Araujo 2011, Peng et al. 2012, Menta et al. 2014*), като се установява, че МСК увеличават както броя, така и активността им (*Griffin et al. 2008, English et al. 2010*). Доказано е също така, че

Tregs се индуцират при ко-култивиране между Т хелпери и алогенни МСК, като след сепарирането си индуцираните Tregs демонстрират имunosупресивни качества върху Т клетките в условия на MLC (*English et al. 2009*). При Т лимфоцити, изолирани от пациенти с ревматоиден артрит се установява, че добавянето на МСК индуцира формирането на FoxP3 положителни Tregs, секретирани IL-10, като след изолирането на тези формирани се Tregs се доказва тяхното супресивно действие върху пролиферацията и секрецията на IFN $\gamma$  от колаген стимулирани Т лимфоцити (*Wang et al. 2009*).

Индукцията на Tregs от МСК се доказва и на животински модели, където под влияние на МСК в кожна присадка се установява инфилтрация с Tregs (*Larocca et al. 2013*), или при трансплантация на крайник, където в кожата и мускулатурата се доказва инфилтрирането със същия вид клетки, под влияние на МСК (*Jeong et al. 2014*). При други *in vivo* модели алотрансплантацията на сърце (*Casigagli et al. 2008*), черен дроб (*Wang et al. 2009*) и бъбрек (*Ge et al. 2010*) в комбинация с приложение на МСК води до индукция на Tregs.

Съществуват няколко описани механизма, чрез които МСК влияят върху Tregs, свързани, както с пряк контакт, така и чрез секреторни фактори. Сред компонентите, осъществяващи пряк контакт от съществено значение за генерирането на Tregs са рецепторните взаимоотношения Notch/Jagged и Delta-like 1,3,4, които водят до диференцирането Т лимфоцитите в Tregs (*Haddad and Saldanha – Araujo 2012*)

По отношение на секреторните фактори HLA-G5 се явява от ключово значение, след сложна верига от взаимоотношения. Първоначално продуцираната хемоксигеназа-1 от МСК води до формиране на регулаторните Tr1, секретирани IL-10, които от своя страна чрез IL-10 водят до HLA-G експресия на МСК, който се ангажира във формиране на Tregs (*Selmani et al. 2008, Mougiakakos et al. 2011*). Дискутира се също така ролята на PGE2, IL-6, TGF $\beta$  и LIF, които се секретират от МСК (*Haddad and Saldanha – Araujo 2012*). Формирането на Tregs под действието на МСК се свързва и с „клетки посредници“, като е описано, че МСК водят до трансформация на моноцитите в M2 макрофаги, които секретират CCL18 и IL-10 –

фактори водещи до диференциацията на Т лимфоцитите в Tregs. Най-типичните и значителни клетки посредници са толерогенните ДК, които чрез IL-10 също участват във формирането на Tregs (*Haddad and Saldanha – Araujo 2012*).

Един основен механизъм, осъществяван от МСК, чрез който се осъществява формирането на Tregs е чрез изместване на баланса Th17/Tregs в посока на втория тип клетки, като този механизъм ще бъде коментиран малко по долу.

МСК са способни не само да генерират Tregs, но и да засилват супресивния потенциал на вече наличните Tregs, като водят до повишена експресията на PD-1 върху повърхността на последните. Този процес също се свързва с въздействието на HLA-G5 (*Selmani et al. 2008*).

Наред с описаните ефекти МСК представляват „хомеостатична ниша“ за Tregs, като са в състояние да ги привличат и да регулират действието им (*Di Iannia et al. 2008*). Взаимоотношенията между МСК и Tregs, както и самите Tregs са подробно разгледани в глава IV.

Под влиянието на МСК могат да се формират и множество други клетки с имunosупресивни свойства върху Т лимфоцитите. Така например контактът между МСК и CD8+Т клетките би могъл да доведе до формиране на CD8+Т лимфоцити с имunosупресивни свойства (*Glennie et al. 2005*), а може би най-важния ефект по отношение на подтискане на имунния отговор е формирането на дендритни клетки с толерогенен фенотип, които са предмет на подробно обсъждане в глава V.

Супресията, осъществявана от МСК върху Т клетките не винаги е в съзвучие с подтисната експресия на молекули известни като активационни маркери. Така например, въпреки че повечето автори описват понижена експресия на CD69 и CD25 на повърхността на Т клетките под влияние на МСК (*Le Blanc et al. 2003, Zappia et al. 2005, Groh et al. 2005*), някои не установяват промяна на този вид молекули (*Glennie et al. 2005*). Обяснението на този на пръв поглед парадоксален феномен се крие във факта, че CD69 и CD25 имат многопосочни биологични функции, които далеч надхвърлят значението им на „активационни маркер“. Както е известно CD25 е рецептор за IL-2, като в някои публикации се описва неговото увеличение заедно с кореспондиращи му цитокин под влияние на

МСК в условия на MLC. Точно обратния ефект се наблюдава при ФХА активацията на Т лимфоцити и последвалото добавяне на МСК. При тези обстоятелства CD25 понижава експресията си, а IL-2 съответно намалява нивото си (*Rasmusson et al. 2005*). По същия начин при животински модел свързан с кожна присадка и добавени МСК, в дрениращите лимфни възли се установява увеличени нива на IL-2, за разлика от самата присадка, където IL-2 е с понижена секреция (*Larocca et al. 2013*). Следователно IL-2 и съответно неговия рецептор имат нееднозначна динамика при взаимоотношеията МСК/ Тлимфоцити, което до голяма степен обяснява различните резултати, описващи експресията на CD25.

По отношение на CD69, неговото значение при експресията му върху Т лимфоцити е двойствено. От една страна, това е молекула, експресирана вследствие на класическия NFκB signaling и се появява временно при Т клетъчна активация. От друга страна обаче, експресията на CD69 по неklasически NFκB signaling води до трайна експресия на CD69 на повърхността на Т лимфоцити, които проявяват имуносупресивни свойства. В своето изследване *Seldanha – Araujo et al. 2011* проследяват динамиката на CD69 експресията чрез моделиране на класическия signaling използвайки BAY11-7082 и „неklasически” такъв, използвайки RELB в условия на взаимодействие между МСК и Т лимфоцити. Резултатите им показват, че под въздействие на МСК се блокира класическия път на CD69 експресия и се активира неklasическия, вследствие на което се формират Т клетки с дълготрайна експресия на CD69 и имунорегулаторни свойства. Описват се 3 инхибитора на класическия signaling, които се експресират от МСК: IRAK3, A20 и E3 убиквитин лигаза βTrCP, като последния активира неklasическите механизми (*Seldanha – Araujo et al. 2011*).

Тоест ко-култивирането с МСК води до подтискане на ранната експресия на CD69 по класическия NFκB signaling, която корелира с провъзпалителни цитокини и е белег на активация на Т лимфоцитите, но промотира неklasическите механизми, водещи до създаване на имунорегулаторни клетки. В своята статия авторите претендират, че тези клетки са Tregs, като така описват още един механизъм за генерирането им, под влияние на МСК. Фенотипизирането им обаче е възоснова на

повърхностната експресия на CD69, CD25 и TNFR2, което не общоприетата фенотипизация на този вид клетки (CD4+, CD25+/-, FoxP3+, CD127<sup>-low</sup>). Във всички случаи обаче, Т лимфоцитите които се генерират, се характеризират се със „задържана” експресия на CD69 и притежават имуносупресивни свойства.

### **1.5.Влияние на МСК върху различните лимфоцитни субпопулации**

Промяната на цитокиновата секреция под влияние на МСК е не само белег на Т клетъчната супресия, но и обуславя допълнителни междуклетъчни взаимоотношения в хода на променения имунен отговор.

#### **1.5.1.Промяна на Th1 под влияние на МСК**

Въздействието на МСК е най-категорично и недвусмислено доказано при Th1 субпопулацията на Т хелперните лимфоцити. Всички изнесени дани са единодушни по въпроса, че МСК водят до подтисната секреция на основните Th1 определящи цитокини- TNF $\alpha$  (Zappia et al. 2005, Yanez et al. 2006, Delarosa et al. 2009, Tobin et al. 2012, Auletta et al. 2014) и IFN $\gamma$  (Glennie et al. 2005, Zappia et al. 2005, Delarosa et al. 2009, Sioud et al. 2011, Larocca et al. 2013, van Rhijn et al. 2013, Auletta et al. 2014). При флоуцитометрични изследване на различните Th1 субпопулации се установява, че TNF $\alpha$  е с подтисната експресия при всички от тях (наивни, central memory, effector memory и ефектори), като намаляват, както броя клетки секретирани TNF $\alpha$ , така и количеството му на повърхността на клетките, установено чрез отчитане на MFI (mean fluorescent intensity). По отношение на IFN $\gamma$ , подтисната му експресия се установява най-вече при effector memory Th1 лимфоцитите (Laranjeira et al. 2015)

Инхибираната секреция на IFN $\gamma$  от Th1 клетките, под влияние на МСК е описана и в животински модели, като при експериментален автоимунен колит, приложението на ксеногенни, алогенни и автоложни МСК води до инхибиране активността на заболяването, подтисната секреция на IFN $\gamma$  от Th1 лимфоцитите и формиране на Tregs. (Gonzalez et al. 2009). Същият ефект се наблюдава и при стрептозотоцин индуциран диабет при плъхове и при NOD (non-obese diabetic) мишки (Boutaza et al. 2009). При биопсия на кожна присадка, която е отхвърлена след алогенна

трансплантация (доста по късно при приложение на МСК) се описват намален брой Th1 субпопулации с ниска експресия на IFN $\gamma$  и IL-2 (Larocca et al. 2013)

Влиянието на МСК върху Th1 лимфоцитите се осъществява, както пряко, така и под действието на други имунорегулаторни клетки с ролята на посредници, сред които най-важни се явяват толерогенните дендритни клетки и Tregs (Duffy 2011)

### **1.5.2 Промяна на Th2 под влияние на МСК**

По отношение въздействието на МСК върху Th2 цитокиновата секреция данните са по-малко и по противоречиви. Някои автори съобщават за увеличен брой Th2 клетки и съответно увеличена секреция на IL-4 при *in vitro* експерименти (Aggarwal and Pittenger 2004, Groh et al. 2005, Peng et al 2012), както и на животински модели. При ко-култивиране между КМ-МСК и изолирани Т хелпери се установява увеличение на субпопулацията на Th2 със съответното увеличение на IL-5 при взаимодействието на Т хелперите с алогенни ПКМК (Batten et al. 2006)

При *in vivo* модели е описан ефект на алогенни МСК при NOD мишки, който води към превключване в посока Th2 имуен отговор (Fiorina et al. 2009), както и възстановяване след парализа на крайник при мишки с ЕАЕ, като процесът е съпроводен с индукция на Th2 клетки секретирани IL-4 и IL-5 (Bai et al. 2009).

От друга страна Goodwin et al. 2011 описват миши модел с OVA- индуциран еквивалент на човешка асма, където бронхиалното възпаление се съпътства от експанзия на Th2 цитокини. При третиране със сингенни и алогенни МСК, предварителните очаквания са за влошаване на процеса, вследствие на засилен Th2 имуен отговор. Авторите получават точно обратните резултати, като докладват за намалена бронхиална реактивност и диференциация на Т хелперите по посока на Th1. Тези резултати са получени при два вида мишки, единият от които (BALB/c) е генетично предопределен да отговаря с Th2 имуен отговор при индукция на възпаление (Goodwin et al. 2011). В подкрепа на тези данни са и резултатите на Kavanagh et al. 2011, които отново на OVA- индуцирано бронхиално възпаление, описват намален брой еозинофили, намалени IgE нива и намалена секреция на IL-4 и IL-13. В тази насока са и резултати получени при третиране с МСК на пациенти с хронична форма на GVHD (едно Th2 медирано състояние), където се установява

подобрене на клиничната картина, съпроводени от намален брой Th2 секретирани лимфоцити (*Zhou et al. 2010*).

Макар и на пръв поглед описаните резултати да са противоречиви, те дават основание да се счита, че при Th1 обусловени заболявания МСК водят до увеличен брой Th2 клетки, докато при Th2 медираните заболявания този имунен отговор е подтиснат за сметка на Th1 (*Duffy 2011*).

### **1.5.3.Промяна на Th17 под влияние на МСК**

Th17 лимфоцитите са описани сравнително наскоро, като способни да секретират IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, CCL20 и CCR6 и да осъществяват имунен отговор срещу патогени на мукозните повърхности. Тяхната роля е доказана в някои автоимунни заболявания като ревматоиден артрит, мултипла склероза, IBD и псориазис. Основен фактор, който ги дефинира е ретиноидния орфан рецептор - RORC, с миши еквивалент ROR $\gamma$ t, а основните цитокини водещи до тяхната диференциация са TGF $\beta$  и IL-6. Процесите на диференциация на Th17 и Tregs, показват голяма сходност, въпреки различното действие на двете субпопулации T клетки (*Channan et al. 2010*), като тези прилики ще бъдат по-подробно разгледани в глава IV.

Под влияние на МСК се установява подтискане на Th17 лимфоцитите наред с цитокините, които секретират: IL-17A, IL-17F, IL-21 (*Yanez et al. 2006, Channan et al. 2010, Ghannam et al. 2010, Darlington et al. 2010, Carrion et al. 2011, Larocca et al. 2013, Laranjeira et al. 2015*). Доказано е, че при наличие на инфламаторна среда МСК експресират на повърхността си CD54, който е лиганд за CD11a/CD18 на повърхността на Th17 клетките. Тази връзка, заедно с връзката CCR6/ CCL20 води до въздействие на МСК върху Th17 не само в посока супресия, но и в посока трансформация към Treg (*Channan et al. 2010*). Последният процес се осъществява чрез триметилиране на хистон H3K $\text{me}_3$  в промотора на FoxP3 генния локус със съответното подтискане на процеса в кореспондентния RORC ген за Th17, като успоредно се индуцира секреция на IL-10 и върху повърхността на „бившите” Th17 се експресира CD39, бележещ имунорегулаторната субпопулация (*Channan et al. 2010, Haddad and Saldanha – Araujo 2012*). При изолиране на така променените

клетки се установява тяхната способност да супресират CD4+ Т лимфоцитите (Ghannam et al. 2010). Счита се, че основна роля за трансформацията на Th17 в Tregs има IL-6 индуцирания PGE2, който увеличава секрецията на аденозин (Selmani et al. 2008, Duffy 2011, Haddad and Saldanha – Araujo 2012).

При изследване на наивни Т клетки, изолирани от кръв от пъпна връв, които са поставени в Th17 индуциращи условия се установява, че МСК подтискат секрецията на IL-17, като същия ефект, съпроводен с индукция на FoxP3 се установява и при диференцирани Th17 клетки (Channan et al. 2010)

Описаните процеси са доказани и *in vivo*, като се установява, че МСК подтискат развитието на ЕАЕ и този процес се съпровожда от супресия на IL-17 продукцията в ЦНС (Wang et al. 2008). Инхибицията на Th17 и превключването на Tregs е доказано при животински модели на диабет тип I (Zhao et al. 2008), колаген-индуциран артрит (Bouffi et al. 2010), експериментално предизвикана миастения гравис (Kong et al. 2009).

Следва да се обърне внимание, че влиянието на МСК върху деликатния баланс Th17/Tregs може да бъде и по посока индукция на Th17, основна причина, за което е МСК секрецията на IL-6 – цитокин, който заедно с TGFβ е от ключово значение за Th17 формирането (Bouffi et al. 2010).

#### **1.5.4.Промяна на Т цитотоксичните (Тс) лимфоцити под влияние на МСК**

Въпреки, че мезенхимните стволови клетки експресират HLA-I молекули на повърхността си, те са резистентни на цитотоксичното действие на CD8+Т лимфоцитите, като супресията, осъществявана от МСК засяга както хелперните клетки, така и цитотоксичната Т популация (Rasmusson et al. 2007). Множество данни доказват този ефект (Di Nicola et al. 2004, Krampera et al. 2005, Delarosa et al. 2009), като той е описан както за наивните, така и за паметовите Тс лимфоцити (Rasmusson et al. 2005). Нещо повече, според някои данни, инхибицията на TNFα, IFNγ и IL-2, осъществявана от МСК е по-добре изразена при Тс клетки, в сравнение с Т хелперните популации (Laranjeira et al. 2015). Действието на МСК се свързва с подтискане на формирането на цитотоксични Т лимфоцити в условия на MLC, което предотвратява лизирането на таргетните клетки. Една особеност на този

процес е, че МСК са ефективни само при добавянето им по време на стимулационната фаза, добавянето им по време на еферентната фаза не води до описания ефект (*Rasmusson et al. 2003*). Съществуват данни, които доказват, че под влияние на МСК се генерират CD8+FoxP3+, понякога наричани (макар и без достатъчни основания на този етап) „CD8+Tregs”. Изолирането на тези клетки и ко-култивирането им с CD4+Т лимфоцити води до подтисната CD4+Т пролиферация, като при стимулация с алоантигени, така и при ФХА активация (*Casiraghi et al. 2008*).

Действието на МСК върху Т лимфоцитите, разбира се, се отразява индиректно и върху клетки, които са Т зависими, като В лимфоцитите и НК клетките. В следващите страници ще бъде разгледано имуносупресивното действие на МСК върху тях, независимо от Т клетките.

## **2. Имуносупресивен ефект на МСК върху НК клетки**

Литературните данни за имуносупресивния ефект, осъществяван от МСК върху НК клетките са доста оскъдни. Това, което е категорично установено, обаче е, че тук в много голяма степен става въпрос за двустранни и двупосочни взаимоотношения, с други думи процесът на cross talk е особено акцентиран.

От една страна безспорно установен факт е, че НК клетките, за разлика от CD8+ Т лимфоцитите са способни да действат цитотоксично срещу МСК. При изолиране на пресни НК клетки и ко-култивирането им с алогенни МСК не се установява лизиране на последните (*Le Blanc 2003*). За разлика от това активирани с IL-2 НК клетки са в състояние да унищожат, както алогенни, така и автоложни мезенхимни стволови клетки, с други думи за действието на НК срещу МСК е необходима „възпалителна среда” (*Spaggiari et al. 2006, Sotiropoulou et al. 2006*).

Установени са и активиращите цитотоксичното действие на НК рецептори, както и техните лиганди на повърхността на МСК, като НК рецепторите са съответно NKG2D с МСК лиганд U2BP3, DNAM-1 с МСК лиганди Nectin-2 и PVR (poliovirus receptor) и NKp30 чиито лиганд на повърхността на МСК все още е неизвестен (*Spaggiari et al. 2006*). Според изследователите по темата, ниското ниво на

експресия на HLA-I молекули от МСК е основния стимул за цитотоксичното действие на NK клетките, като лизирането на МСК се инхибира при наличието на IFN $\gamma$ , който засилва тази експресия (*Spaggiary et al. 2006, Thomas et al. 2014*). Силно смущаващ е фактът, че лизирането, осъществявано от NK се случва и срещу автоложни МСК, като в опит да се даде обяснение на този процес се акцентира върху възможните разлики между МСК, култивирани *in vitro* и тези, които са в организма. Според авторите унищожението на МСК в организма не се осъществява, поради тяхното разположение в специфичните им ниши, по висока експресия на HLA-I молекули, липса на NK лиганди или липса на достатъчно висок активационен праг на самите NK клетки (*Spaggiary et al. 2006*).

От друга страна МСК действат върху NK в имуносупресивна посока, като подтискат NK клетъчната пролиферация (*Krampera et al. 2005*). По детайлни проучвания установяват, че МСК са способни да инхибират индуцираната чрез IL-2 и IL-15 начална пролиферация при NK клетки, но имат слабо влияние върху вече активираните и пролифериращи NK клетки. Характерно е, че инхибицията не се изразява в индукция на апоптоза или некроза (*Spaggiary et al. 2006, Sotiropoulou et al. 2006*).

Най-ранните данни и класическата представа относно супресивното действие на МСК върху NK клетките описват, подтискане на NK клетъчната секреция на IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  (*Aggarwal and Pittenger 2004, Sotiropoulou et al. 2006, Spaggiary et al. 2008*). По нови резултати, обаче оспорват тази концепция, като доказват, че под влияние на МСК, стимулираните чрез IL-12 и IL-18 NK клетки, засилват секрецията си на IFN $\gamma$ , като процесът е доза-зависим. Авторите твърдят, че МСК се намесва в сигналния път IL-12R/STAT-4 и активирайки го, засилват секрецията и интрацелуларното натрупване на IFN $\gamma$ , като този ефект се доказва и при клетъчна линия NK92 и при изолирани NK клетки. (*Thomas et al. 2014*). Авторите обясняват различията в резултатите си с общоприетата гледна точка с две групи фактори. От една страна те обръщат внимание на факта, че предишните изследвания използват IL-2 и IL-15 за активация NK клетките, докато те използват IL-12 и IL-18. Другата група фактори, обясняващи противоречивите резултати са свързани с времето

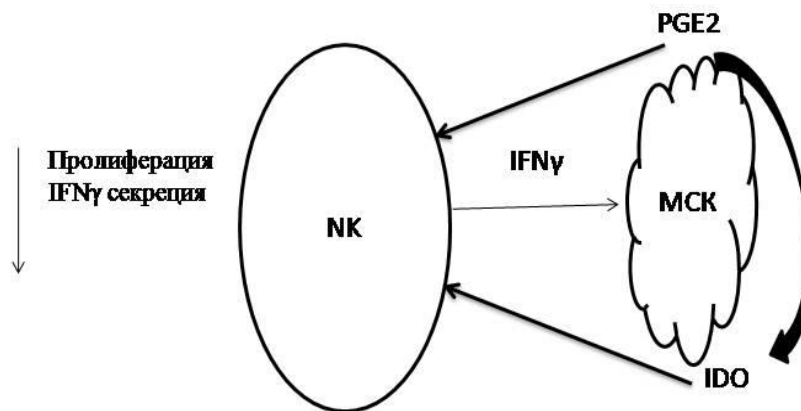
изминало от ко-култивирането, когато се измерва IFN $\gamma$ . Според *Thomas et al. 2014* в първите часове след ко-култивирането секрецията на IFN $\gamma$  драстично се увеличава, а 24 часа след това, обратно – намалява, за да се увеличи отново след 7- мия ден на ко-култивиране. Имайки в предвид известната роля за IFN $\gamma$  в процеса на „активация” на МСК е логично едно първоначално стимулиране, което да повлияе на МСК, които от своя страна да инхибират НК клетките, включително и тяхната секреция на IFN $\gamma$  (Фиг.17).

Под влияние на МСК се установяват и някои фенотипни промени в НК клетките, изрзващи се в намалената им експресия на основния им определящ ги маркер CD56 (*Sotiropoulou et al. 2006*).

Един от най-важните ефекти от гледна точка на имуномодулацията е действието на МСК върху НК клетъчната цитотоксичност. Под влияние на МСК, НК клетките демонстрират по-слаб цитотоксичен потенциал и намаляват експресията на някои от рецепторите, обуславящи цитотоксичност, като 2B4, NKp44, NKp30 и NKG2D (*Sotiropoulou et al. 2006, Spaggiari et al. 2008*). Както беше споменато последните два са свързани с цитотоксично действие срещу самите мезенхимни стволови клетки. По отношение на подтисната цитотоксичност, предизвикана от МСК *Spaggiari et al. 2008* докладват, че тя се установява, както спрямо клетъчна линия от невробластом SKNBЕ, която е HLA-I<sup>+</sup>, така и спрямо клетъчна линия HTLA-230, от същия произход, която е HLA-I<sup>-</sup>. За разлика от това *Sotiropoulou et al. 2006* докладват за изненадващия резултат, че МСК не повлияват НК клетъчната цитотоксичност срещу HLA-I<sup>-</sup> линията K562, но силно я редуцират срещу три други клетъчни линии, които са HLA-I<sup>+</sup> (SK-BR-3, MCF-7 и FM3). Тези резултати са донякъде нелогични, тъй като именно намалената експресия на HLA-I е основния сигнал (не единствения), стимулиращ НК клетъчните активиращи рецептори.

Както при всички взаимоотношения на МСК с имунокомпетентни клетки, така и тук се поставя въпроса за ролята на прекия междуклетъчен контакт и на факторите секретирани от МСК в процеса на имунна супресия. Сред секреторните фактори за, които се счита, че са най-тясно ангажирани в обуславяната от МСК имунна

супресия по отношение на NK клетките са PGE2 и IDO. Действието им е синергично, което се доказва от експерименти, при които блокирането на PGE2 с NS-398 води само до частично възстановяване на подтиснатия NK пролиферативен капацитет, докато при блокиране и на IDO с 1-M-Trp, този капацитет се възстановява напълно. Според авторите синтезът на IDO, който се явява ключов за супресията, се индуцира по два начина: директно чрез въздействието на IFN $\gamma$  (както беше разисквано синтезът на IDO е IFN $\gamma$ - зависим) и индиректно в резултат на секретирания от МСК PGE2, който влияе по автокринен път за секреция на IDO (Spaggiari et al. 2008). (Фиг.17)



**Фиг.17** Cross talk между NK клетката и МСК. Под влияние на IFN $\gamma$ , отделян, както от „възпалителната среда”, така и от NK клетките, МСК се „активира” и секретира PGE2 и IDO, като последния се образува вследствие, както на действието на IFN $\gamma$ , така и под автокринното влияние на PGE2. Двата фактора действащи синергично супресират пролиферацията, цитотоксичността и способността на NK клетката да секретира IFN $\gamma$

При експерименти базирани на NK активацията с IL-15 се установява, че секреторните фактори, обуславящи подтиснатата секреция на IFN $\gamma$  действат, дори само при използване на кондиционирани среди от МСК, докато за инхибиране на NK клетъчната пролиферация кондиционирани среди нямат този ефект. Необходимо е да се използва среда получена след като МСК и NK клетките са били в условия на ко-култивиране (*Sotiropoulou et al. 2006*).

При детайлни проучвания върху ефекта на МСК върху NK клетъчната, цитотоксичност се установява, че секреторния механизъм не е единствен ангажиран в процеса. Този процес не се осъществява при използване на transwell ситема, за разлика от супресията на NK клетъчната пролиферация и цитокинова секреция. Прекият контакт между МСК и NK е условие, което е безусловно необходимо за намалената експресия на NK клетъчни активиращи рецептори и за подтиснатата NK клетъчна цитотоксичност, като все още не са известни комуникаращите си молекули (*Sotiropoulou et al. 2006*).

### **3. Имуномодулаторен ефект на МСК върху В лимфоцити**

Едва ли има други имунокомпетентни клетки като В лимфоцитите, действието върху които от страна на МСК да води до толкова противоречиви резултати, като противоречията обхващат, както *in vivo*, така и *in vitro* експерименталните данни.

#### **3.1. Данни от въздействие на МСК върху В лимфоцити *in vivo***

Най- много докладвани резултати има за СЛЕ модели, където различните авторски групи докладват диаметрално противоположни ефекти. В едната посока са данните докладващи, че приложението на човешки КМ-МСК и АТ-МСК води до намалени нива на серумен креатинин и намалена депозиция на С3 комплементна фракция (*Zhou et al. 2008*), повишена преживяемост, оптимизиране на хистологичните и серологични абнормности, намален титър на анти-двДНК антители, увеличена фракция на Tregs и IL-10 секреция (*Choi et al. 2012*). В тази посока са данните базирани на приложението на миши КМ-МСК или тяхна кондиционирана среда,

които разкриват подтискане на антиген специфичния Т зависим и Т независим имунен отговор (Asari et al. 2009), инхибиране на процеса на гломерулна пролиферация, лимфоцитна инфилтрация и натрупване на имунни комплекси (Schena et al. 2010). Също така е описано приложението на миши КМ-МСК при присаждане на сърце при мишки, води до подтискане на антителата атакуващи присадката, както и циркулиращите такива (Ge et al. 2009).

От друга страна, има данни, че приложението на миши КМ-МСК на лупусни модели не само, че няма ефект върху оцеляването, протеинурията и анти-дв.ДНК антителата (Schena et al. 2010), но и води до увеличена продукция на автоантитела, засилена протеинурия и влошаване на клиничната картина (Youd et al. 2010).

*In vivo* изследванията са доста противоречиви и относно друг ефект на МСК върху В клетките – индукцията на анти-МСК антитела. Въпреки, че базисната постановка гласи, че МСК са неимуногенните поради липсващата си експресия на HLA-II и ниското си ниво на експресия на HLA-I и ко-стимулаторни молекули, съществуват данни, че при някои обстоятелства срещу тях могат да се развият антитела (Nauta et al. 2006). При изследвания на плъши модели (Schu et al. 2011) и на модели на павиани (Begg et al. 2006) някои изследователи установяват антитела срещу алогенни МСК, но не и срещу автоложни такива. Обратно на това, при прилагане на МСК заедно с хемопоеични стволови клетки при 12 пациента, при нито един не се установяват анти-МСК антитела (Sundin et al. 2008). Също така при бъбречна трансплантация на плъх, прилагането на МСК не води до антитела срещу тях (Franquesa et al. 2012a).

Получените разлики, установени по отношение на действието на МСК върху В клетките *in vivo* се обясняват с източника на МСК (алогенни или автоложни), броя на инжектираните клетки, мястото на администрация и успоредно използваната имunosупресия (Franquesa et al. 2012b)

### **3.2. Данни от въздействие на МСК върху В лимфоцити *in vitro***

Докладваните научни резултати по отношение на влиянието на МСК върху В лимфоцитите, както при хора, така и при мишки *in vitro* са не по-малко конфликтни помежду си от тези на *in vivo* експериментите.

Едни от най-ранните комплексни резултати докладвани по отношение действието на МСК върху В клетките са на *Corcione et al. 2006*. В своите изследвания, авторите тестват ефекта на човешки КМ-МСК върху изолирани от периферна кръв В лимфоцити, стимулирани с анти-имуноглобулинови антитела, антитела срещу CD40, CpG и коктейл цитокини с въздействие върху В клетките (IL-2, IL-4). Резултатите разкриват подтисната В клетъчна пролиферация, осъществявана чрез В клетъчен арест във фаза G0/G1 без да се установява В клетъчна апоптоза. Установява се също така инхибиране на В клетъчната диференциация в плазматични клетки и подтисната секреция на IgG, IgM и IgA. Под влияние на МСК не се установява промяна на В клетъчните повърхностни молекули, свързани с антигенното представяне: HLA-DR, CD80/86, CD40, нито в цитокиновата секреция, осъществявана от В клетките (*Corcione et al. 2006*). Тези данни потвърждават получените по-рано от *Glennie et al. 2005*, за ролята на МСК в подтискането на В клетъчната пролиферация при клетъчна култура от миши спленоцити с деплетирани Т клетки. В тази насока са и изследвания, които доказват, че човешки МСК подтискат IgG, IgA и IgM продукцията, индуцирана в условия на смесена лимфоцитна култура (*Comoli et al. 2008*) или от изолирани CD19-CD138+ плазматични клетки (*Rafei et al. 2005*), както и че миши МСК инхибират пролиферацията и диференциацията на В клетките, изолирани от слезка (*Augello et al. 2005, Asari et al. 2009, Schena et al. 2010*).

От друга страна съществуват и друга група научни съобщения, които докладват, че ко-култивирането на МСК и В лимфоцитите, води до повишена пролиферация на В лимфоцитите, повишена преживяемост и функция на плазматичните клетки, като и увеличена имуноглобулинова синтеза, както при мишки (*Youd et al. 2010, Ji et al. 2012*), така и при хора (*Traggiai et al. 2008*) и при клетъчни линии (*Samoylovich et al. 2013*).

Използвайки човешки клетки *Rasmusson et al. 2007* и *Tabera et al. 2008*, изказват предположението, че ефектът на МСК върху В лимфоцитите не едностранен, а зависи от различни условия, като и двете научни групи акцентуират върху стимула на пролиферация на В клетките.

Именно разликите в използваните пролиферативни стимули в различните експериментални постановки се явяват едно логично обяснение за противоречивите резултати. За активацията на В клетките са необходими три вида сигнали: през BCR (В клетъчен рецептор), чрез CD40 и цитокинова или TLR активация (CpG, двРНК, LPS). За този процес при паметовите В лимфоцити не е задължителна BCR активацията и процесът може да се извърши по пътя на CD40 или чрез цитокини и TLR лиганди (*Franquesa et al. 2012b*). Някои научни групи използват и трите възможни сигнала (*Corcione et al. 2006, Comoli et al. 2008, Tabera et al. 2008, Tragiai et al. 2008, Schena et al. 2010*), докато други по ограничен тип активационно действие като LPS (*Rasmuson et al. 2007, Asari et al. 2009*), OVA (*Rafei et al. 2008, Youd et al. 2010*), PWM (pokeweed mitogen) (*Augello et al. 2005*).

Някои изследователи (*Schena et al. 2010*) считат, че за имunosупресивния ефект на МСК върху В клетките е от ключово значение „активирането” на МСК– процес разгледан в частта за МСК действието върху Т клетките. В зависимост от природата на „активацията” МСК фактор, ефектът може да е различен. Така например CpG активираните МСК чрез своя TLR-9 водят до засилена секреция на IL-6, който е фактор подкрепящ В клетъчната пролиферация (*Franquesa et al. 2012b*) (наред с многото си други нееднозначни действия)

За разлика от активираните В клетки, за които мненията по отношение на МСК ефекта се различават, то по отношение на В лимфоцитите, които са в състояние на покой преобладава концепцията, че МСК по-скоро водят до тяхната пролиферация и повишена преживяемост (*Tragai et al. 2008*), като се счита, че МСК действат синергично с IL-2, TLR стимулите и Т клетъчната „помощ”.

Наред със стимулите за В клетъчната стимулация и „активационното” състояние на МСК, съществува още една група фактори, която би могла да даде обяснение за докладваните противоречиви резултати по отношение на МСК ефекта върху В лимфоцитите и това са клетъчния източник и изолацията на клетките. Някои автори залагат на „по физиологични” модели, използвайки ПКМК или изолирани моноклеарни клетки от слезка, както и обогатени В клетъчни култури с различна степен на деплеция на Т лимфоцити (*Rasmuson et al. 2007, Comoli et al. 2008*)

Общото в тези модели е, че в клетъчната култура, върху която въздействат МСК съдържа известно количество Т лимфоцити. Така например в работите на *Comoli et al. 2008* (използващ като модел периферни кръвни мононуклеарни клетки с частично деплетирани Тхелпери) се описва, че под въздействието на МСК, В клетките, активираните от ирадиирани алогенни ПКМК, потискат имуноглобулиновата си синтеза. Този ефект, обаче изчезва при добавянето на анти-CD40 антители, което води до извода, че ефектът се осъществява под действието на МСК върху остатъчните Т хелперни клетки, които от своя страна въздействат на В лимфоцитите. Други изследователски групи използват „чисти“ В клетъчни култури, чрез магнитна сепарация на CD19+ клетки (*Corcione et al. 2006, Tragiati et al. 2008*) или CD43 деплетирани, с цел изолиране на наивна В клетъчна популация (*Asari et al. 2009, Schena et al. 2010*).

Като цяло може да се направи изводът, че МСК оказват двойствен ефект върху В лимфоцитите, като в модели съдържащи Т лимфоцити трудно може да се заобиколи значението на Т обусловената В лимфоцитина имуносупресия. В „чистите“ В клетъчни модели МСК ефективно потискат или увеличават В клетъчната пролиферация, което се определя основно от типа стимул за активацията на В лимфоцитите (*Franquesa et al. 2012b*). По отношение на ефекта на МСК върху плазматичните клетки някои автори установяват потиснатото им образуване и инхибиция на имуноглобулиновата продукция (*Tabera et al. 2008, Comoli et al. 2008, Asari et al. 2009*), докато други обратно, описват засилена диференциация на В клетките в плазматични клетки и засилена секреция на антитела (*Tragiati et al. 2008, Youd et al. 2010*). Съществуват данни, според които инхибиращият ефект на МСК върху имуноглобулиновата продукция на плазматичните клетки е резултат от действието на секретирани от МСК хемокини CCL2 и CCL7. Установено е, че този ефект се дължи на инхибиране на фосфорилирането на STAT3, водещо от своя страна до активиране на транскрипционния фактор PAX5 и потискане на имуноглобулиновата синтеза. Като доказателство за това служи факта, че неутрализирането на CCL2 води до

отстраняване на супресивния ефект на МСК върху плазматичните клетки (*Rafei et al. 2008*)

### **3.3.Роля на секреторните фактори и прекия междуклетъчен контакт**

Независимо какъв точно е ефектът и от какво зависи той, безспорен факт остава, че МСК модулират действието на В лимфоцитите, така че логично възниква въпросът за факторите от страна на МСК, които водят до това влияние.

Първите данни по отношение на този въпрос, сочат ролята на секреторни медиатори. В своите разработни, цитирани по горе *Corcione et al. 2006*, използват transwell система, чрез която доказват, че супресиранията пролиферация и имуноглобулинова секреция се дължат на отделяни от МСК секреторни фактори, като авторите предполагат роля на TGF $\beta$ , HGF, IDO и PGE2. Установено е, че кондиционираната среда на МСК, не води до ефект, а той се постига само при ко-култивиране между В клетките и МСК, което води до извода за наличие на cross talk между двата вида клетки, вследствие на който се подтискат В лимфоцитите (*Corcione et al. 2006*)

В подкрепа на тези данни са и резултати на *Asari et al. 2008*, които отново използвайки transwell система доказват при миши клетки подтиснатата В клетъчна пролиферация и секреция на IgM под действието на МСК. Нещо повече, тази авторска група доказва, че под влияние на разтворими фактори, секретирани от МСК, в В лимфоцитите се установява подтиснатата експресия на иРНК за Blimp-1 (*Asari et al. 2008*) – фактор, който е ключов за терминалната диференциация на В клетките в плазматични клетки, чрез способността си да подтиска PAX5 и Bcl-6 (*Dent et al. 1997, Shapiro-Shelef et al. 2005*). Под действието на активационни сигнали като LPS, действащ върху TLR-4, се експресират факторите NF $\kappa$ B и AP-1, които от своя страна водят до Blimp-1 експресията (*Vasanwala et al. 2002*). Според *Asari et al.*, МСК секретират фактори и се намесват в този път супресирайки Blimp-1 експресията, вследствие на което се подтиска В лимфоцитната диференциация в плазматични клетки. Наред с описаните ефекти изследвани в transwell система, авторите докладват (за разлика от *Corcione et al. 2006*), че под действието на кондиционирана среда от МСК се подтиска терминалната диференциация на В

клетките, както и антиген-специфичната секреция на IgM и IgG *in vivo*. В опит да установят секреторния/те фактор отделят от МСК и ангажиран в описаните процеси, *Asari et al. 2008* използват моноклонални антитела срещу CCL2 и TGF $\beta$ , както и блокиращия IDO

1-метил-D-триптофан, като установяват, че ефектът осъществяван от МСК не се променя. Авторите (както множество други, включително и ние) не установяват наличие на IL-10 в културалните среди от МСК. Следователно данните на *Asari et al. 2008* сочат към изключване на IL-10, CCL2, TGF $\beta$  и IDO като секреторни фактори, отделяни от МСК и отговорни за имunosупресивния ефект върху В лимфоцитите.

Ролята на секреторните фактори е разгледана и в данните изнесени от *Ji et al. 2012*, които докладват, че под влияние на МСК, изолирани от пъпна връв се засилват пролиферацията на В лимфоцитите и продукцията им на имуноглобулини, като авторите описват чувствително увеличаване на PGE2 и IL-6 при ко-култивиране между МСК и В клетки. Добавянето на моноклонални антитела срещу IL-6 не променя ефекта на МСК. За разлика от това добавянето на индометацин води до частично потискане на В клетъчната пролиферация и продукцията на имуноглобулини. Въпреки това, авторите не са склонни категорично да подкрепят ролята на МСК секретирания PGE2, като единствен фактор, модулиращ ефекта върху В клетките, като считат, че той действа в комбинация с други такива (*Ji et al. 2012*).

Наред с влиянието на секреторните, фактори съществува и гледна точка, подкрепяща ролята на прекия междуклетъчен контакт за осъществяването на имуномодулаторното действие на МСК върху В лимфоцитите (*Augello et al. 2005*, *Traggai et al. 2008*, *Schena et al. 2010*). В своите изследвания *Shena et al. 2010*, установяват че при мишки, активираните чрез BCR и TLR В клетки, потискат своята пролиферация и диференциация, под въздействието на МСК, като процесът е зависим от наличието на екзогенен IFN $\gamma$ . Авторите установяват, че ефектът е независим от IDO и предполагат контактен път на инхибиция, обусловен от взаимодействията PD-1/PD-L1. Предишни резултати разкриват, че това

взаимодействие води до подтискане на В клетъчния signaling (*Okazaki et al. 2001*), като *Scheda et al. 2010* твърдят, че експресията на PD-L1 върху МСК се увеличава под въздействието на IFN $\gamma$ . В потвърждение на своята хипотеза авторите докладват, че добавянето на моноконални антитела срещу PD-1 и PD-L1, имат като следствие частично възстановяване на пролиферативния капацитет на В лимфоцитите (*Scheda et al. 2010*). Друга авторска група също допуска, че ролята на прекия междуклетъчен контакт, осъществен по пътя на PD-1/PD-L1 взаимодействията е в основата на инхибицията на В клетъчната пролиферация, извършвана от МСК (*Augello et al. 2005*)

#### **3.4.Влияние на МСК върху В клетъчния хемотаксис**

Трафикът на В клетките между вторичните органи на имунната система (слезка и лимфни възли) и периферията е от ключово значение за осъществяване на тяхната биологична роля. Миграцията на В клетките и позиционирането им във вторичните имунни органи се регулира от експресираните лимфоидни хемокини CXCL12, CXCL13, CCL19 и CCL21 вследствие на взаимодействието им със специфичните им рецептори CXCR4 (за CXCL12), CXCR5 (за CXCL13) и CCR7 (за CCL19 и CCL21). CXCR4 е клетъчен рецептор с роля в В клетъчната адхезия към високия ендотел на венулите в лимфните възли. Той също така определя локализацията на клетките в посока герминативните центрове и миграцията на плазмобластите към костния мозък. CXCR5 има важно значение за насочването на антиген-активираните В лимфоцити към герминативните центрове, а CCR7 медира адхезията към високо-ендотелните венули, действайки заедно с CXCR4, но също така основна негова функция е трафика на паметовите В лимфоцити към Т клетъчните зони в лимфоидния фоликул (*Zou et al. 1998, Nie et al. 2004*)

МСК се намесват в тези процеси, като под тяхно действие се подтиска В клетъчната експресия на CXCR4, CXCR5 и CCR7, както и хемотаксиса им определян от съответните им лиганди CXCL12, CXCL13, CCL19 и CCL21 (*Corcione et al. 2006*). МСК секретират някои хемокини, влияещи на миграцията и хемотаксиса на В клетките, като SDF1(CXCL12), MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5)

и IL-8 (*Kyurkchiev et al. 2013, Barrio et al. 2014*), но точните механизми, свързани с това действие все още са неизвестни.

#### **4. Собствени резултати и дискусия**

В нашите изследвания ние използвахме мезенхимни стволови клетки изолирани от два източника – костен мозък и мастна тъкан, като проследихме в сравнителен аспект техния ефект върху цитокиновата секреция на Т лимфоцитите, имуноглобулиновата секреция на В клетките и активацията на двата вида лимфоцити.

##### **4.1.Промяна в Т клетъчната цитокинова секреция под въздействието на МСК**

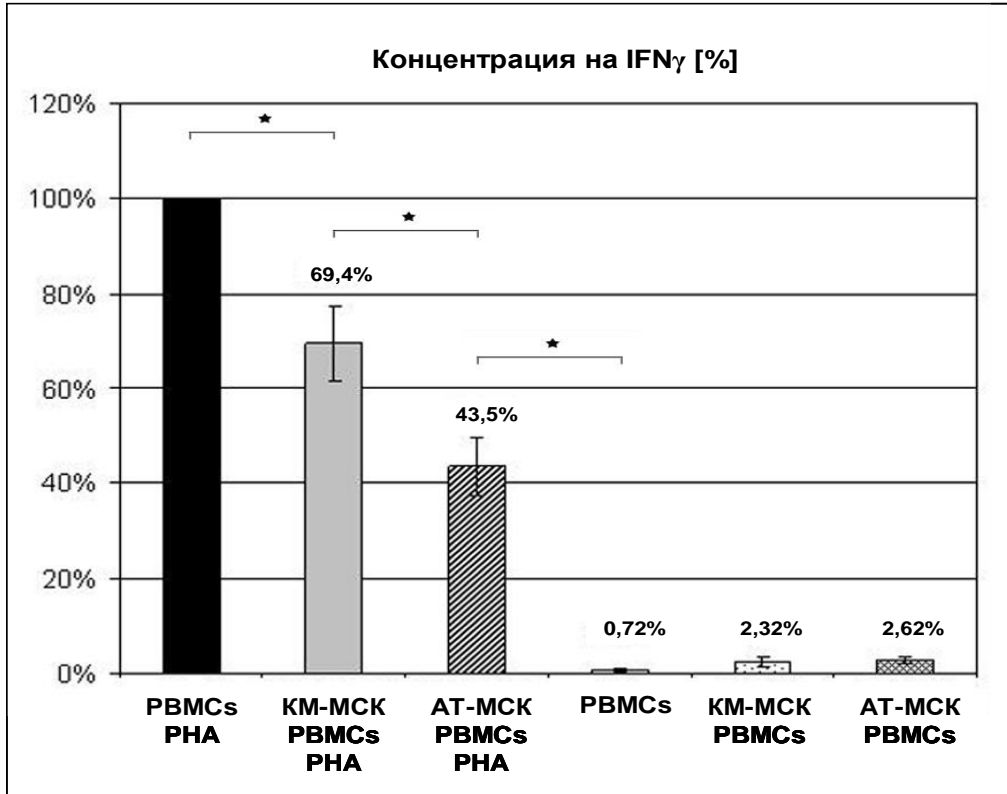
Първата ни цел беше да установим дали въздействието на КМ-МСК и АТ-МСК води до промяна в цитокиновата секреция на Т хелперните лимфоцити, като за целта определихме за изследване двата базови цитокина- IFN $\gamma$  и IL-4, дефиниращи съответно Th1 и Th2 субпопулацията. С цел да стимулираме Т лимфоцитите към секрецията на цитокини, ние използвахме фитохемаглутинин (ФХА), който е растителен лектин изолиран от *Phaseolus vulgaris*, и за който е известно, че е класически митоген, водещ до селективна неспецифична активация и пролиферация на Т лимфоцитите (*Potter and Moore 1975*).

Един проблем, с който се сблъскахме отначало беше, дали да използваме изолирани Т хелперни лимфоцити или да фокусираме нашите изследвания върху Т клетките в контекста на периферните кръвни мононуклеарни клетки. Първият метод безспорно е „по-изчистен”, докато втория е „по-физиологичен”, тъй като в организма Т лимфоцитите са в пряка комуникация с други клетки, а не се развиват като изолирана популация. Въпросът се саморазреша, тъй като при изолираната популация Т хелпери, ние не успяхме да установим секреция нито на IFN $\gamma$ , нито на IL-4 под активиращото действие на ФХА, независимо дали Т клетките бяха активирани самостоятелно, или ко-култивирани с МСК (данните не са показани). Прегледът в литературата показва, че още в средата на 70-те години е установено, че пречистена култура от Т лимфоцити не отговаря на ПХА активиращото действие, за разлика от „смесена популация” (*Potter and Moore 1975*), като авторите твърдят,

че контактът с моноцитите е ключов за ПХА активацията на Т клетките. Тези данни се потвърждават и по-късно от изследванията на *Seuppens et al. 1988*. Следователно се наложи използването на „по-физиологичния” подход базиран на активиране на Т лимфоцитите в условия на ПКМК.

При използване на ПКМК под действието на ПХА се установи секреция, както на IFN $\gamma$ , така и на IL-4. В отделните опити, отчетената максимална концентрация за IFN $\gamma$  в културална среда от третирани с ФХА ПКМК варираше в границите от 715 pg/ml до 873 pg/ml, при съответни базови стойности в контролните култури ПКМК без съдържание на стимулиращ агент, непревишаващи 6,8 pg/ml. В хода на изследванията за IL-4, в различните експерименти бяха определени нива на този цитокин в рамките между 265 pg/ml и 268 pg/ml при ФХА-стимулирани ПКМК, срещу максимално измерени 12,6 pg/ml при неактивирани ПКМК.

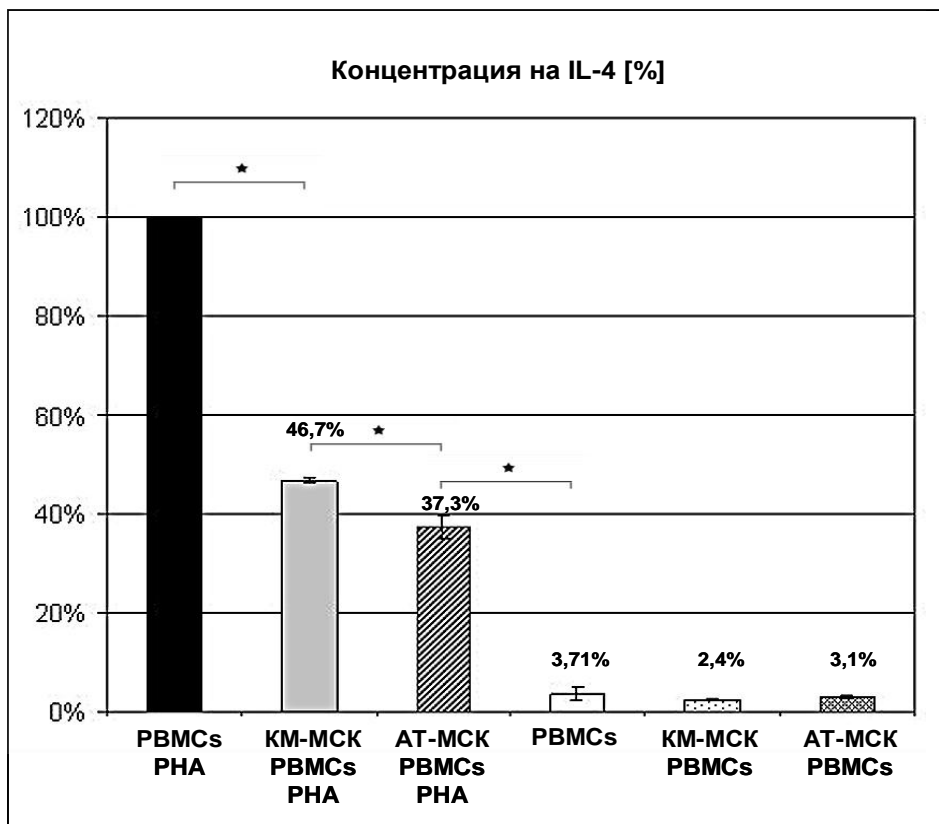
При ко-култивирането с МСК, както от костен мозък, така и от мастна тъкан секрецията, както на IFN $\gamma$  (**Фиг.18**), така и на IL-4 (**Фиг.19**), значително намаляваше, като разликите бяха статистически сигнификантни (*Bochev et al. 2009*). Както може да се види на двете фигури ефектът на АТ-МСК е статистически значимо по отчетлив, в сравнение с този на КМ-МСК, като това се наблюдава, както за IFN $\gamma$  (**Фиг.18**), така и за IL-4 (**Фиг.19**).



**Фиг. 18** Секреция на IFN $\gamma$  при ПКМК, активирани с ФХА и ко-култивирани с КМ-МСК и АТ-МСК. След ко-култивиране на митоген-активирани ПКМК с КМ-МСК концентрацията на IFN- $\gamma$  намалява до 69,4% а с АТ-МСК – до 43,5% от установената при контролните ПКМК+ФХА. Показани са осреднени стойности  $\pm$  SD от три независими експеримента (\* $P < 0.05$ ). Както може да се забележи нестимулираните с ФХА клетки не секретират IFN $\gamma$  (Bochev et al. 2009 Comp. Rend. Bulg. Acad. Sci.) Фигурата е използвана с позволение на автора

**Легенда:** PBMCs-периферни кръвни мононуклеарни клетки, PHA-фитохемаглутинин

Следователно може да се направи изводът, че МСК изолирани от два различни източника намаляват секрецията на основните цитокни определящи Th1 и Th2 субпопулациите. Въпреки, че за нашите изследвания бяха използвани ПКМК, а не изолирана CD4+ Т лимфоцитна култура, в голяма степен на сигурност можем да твърдим, че източникът на цитокините са именно Т лимфоцитите, поради факта, че подобрения митоген активира именно тях.



**Фиг. 19** Секреция на IL-4 при ПКМК, инкубирани с ФХА и ко-култивирани с КМ-МСК и АТ-МСК. След ко-култивиране на митоген-активирани ПКМК с КМ-МСК концентрацията на IL-4 намалява до 46,7% а с АТ-МСК – до 37,3 % от установената при контролните ПКМК+ФХА. Показани са осреднени стойности  $\pm$  SD от три независими експеримента (\* $P < 0.05$ ). Както може да се забележи нестимулираните с ФХА клетки не секретират IL-4. (Bochev et al. 2009 Comp. Rend. Bulg. Acad. Sci). Фигурата е използвана с позволение на автора

**Легенда:** PBMCs-периферни кръвни мононуклеарни клетки, PHA-фитохемаглутинин

Получените резултати относно подтиснатата секреция на IFN $\gamma$  от Th1 лимфоцитите под въздействието на МСК, са в съгласие с тези, получени от всички изследователи по темата (Glennie et al. 2005, Zappia et al. 2005, Delarosa et al. 2009, Boumaza et al. 2009, Gonzales et al. 2009, Sioud et al. 2011, Larocca et al. 2013, van Rhijn et al. 2013, Auletta et al. 2014, Laranjeira et al. 2015).

За разлика от това, по отношение на въздействието на МСК върху Th2 в литературата има алтернативни мнения. Нашите резултати подкрепят тези на Zhou

*et al. 2010, Goodwin et al. 2011, Kavanagh et al. 2011*, които също установяват инхибиция на Th2 имунния отговор под действието на МСК, за разлика от *Groh et al. 2005, Batten et al. 2006, Bai et al. 2009, Fiorina et al. 2009, Peng et al. 2012*, които описват увеличена експресия на IL-4 и експанзия на Th2 индуцирания имунен отговор.

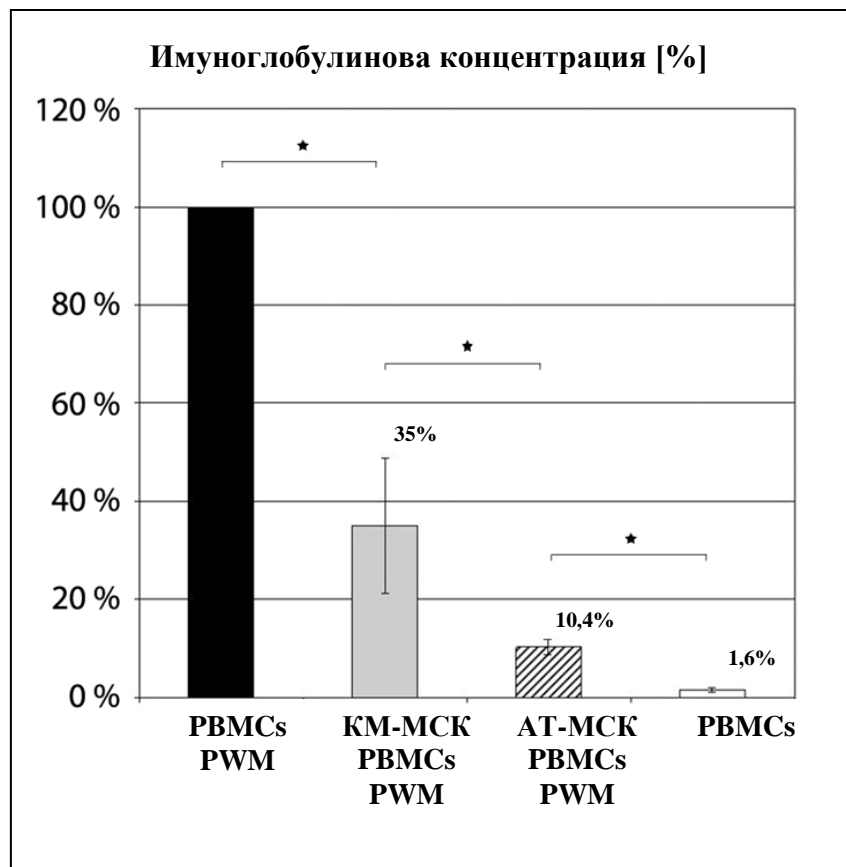
#### **4.2.Промяна в В клетъчната секреция на имуноглобулини под въздействието на МСК**

Имуноглобулиновата секреция е основния ефекторен елемент на В лимфоцитите, еквивалентен на секрецията на различните цитокини от Т хелперните субпопулации. Поради тази причина с цел да определим евентуалното имуномодулиращо действие върху В клетките ние изследвахме промените в секрецията на имуноглобулини под действието на МСК. За да стимулираме тази секреция, ние активирахме В лимфоцитите с растителен митоген, изолиран от *Phytolacca americana*, известен като pokeweed mitogen (PWM). Трябва да се отбележи, че за разлика от селективното действие на ПХА върху Т лимфоцитите, PWM, макар и доста по-ефективен върху В клетките, също така има способност да активира и Т лимфоцитите (*Mellstedt 1975*). Експерименталната постановка, която използвахме отново се базираше на ПКМК, като резултатите, които получихме демонстрират, че под влияние на МСК, изолирани както от костен мозък, така и от мастна тъкан, В лимфоцити намаляват секрецията си на имуноглобулини (*Bochev et al. 2008*) (**Фиг.20**). И тук, както при Т клетките ефектът на АТ-МСК е сигнификантно по изразен, в сравнение с този на КМ-МСК.

Получените резултати са първи в научната литература относно АТ-МСК и са в съгласие с тези описани от *Rafei et al. 2005, Corcione et al. 2006, Comoli et al. 2008*. За разлика от това *Traglai 2008, Youd et al. 2010, Ji et al. 2012*, описват обратното действие на МСК върху В клетките, а именно засилване на имуноглобулиновата синтеза.

Както беше дискутирано по-горе, в научната литература се счита, че две групи фактори определят ефекта на МСК върху В лимфоцитите. От една страна това са условията на култивиране, а от друга- активирания В клетъчен агент. По

отношение на условията на култивиране в нашата постановка, залагаща на ПКМК, В клетките са в контакт с Т лимфоцити. Имайки в предвид получените резултати за въздействието на МСК върху Т клетките, но може да се изключи възможността, получения ефект на подтисната имуноглобулинова секреция да е Т клетъчно зависим. Цитираните по-горе изследвания на *Comoli et al. 2008*, доказват, че блокирането на CD40 възстановява имуноглобулиновата продукция на В клетките, която е била подтисната от МСК. Това дава основание да се счита, че при ко-култивирането МСК/ПКМК (както в нашия случай), Т клетъчния фактор не може да бъде изключен като определящ по отношение на инхибираната имуноглобулинова секреция. Нещо повече, резултатите ни относно Т лимфоцитите показват подтиснат Th2 имунен отговор, което е още едно доказателство за възможната роля на Т опосредствена инхибиция на имуноглобулиновата продукция.



**Фиг. 20** МСК-индуцирана супресия на В-клетъчната имуноглобулинова продукция.

Отразени са нивата на имуноглобулинова концентрация в културална среда от ко-култури KM-МСК или АТ-МСК заедно с PWM-стимулирани ПКМК, както и от самостоятелна контролна култура ПКМК. След ко-култивиране на митоген-активирани ПКМК с KM-МСК концентрацията на IL-4 намалява до 35% а с АТ-МСК – до 10,4% от установената при контролните ПКМК+ФХА. Резултатите са представени като процентна стойност от максималното количество антитела (100%), установено в среда от култура на ПМ-третираните ПКМК. Показани са осреднени стойности  $\pm$  SD от три независими експеримента (\* $P < 0.05$ ) (Bochev et al. 2008 Cell Biol. Intern.)

**Легенда:** PBMCs-периферни кръвни мононуклеарни клетки, PWM- pokeweed mitogen

От друга страна факт е, че МСК инхибират имуноглобулиновата продукция и пряко, при липса на Т клетки в системата, както се доказва от работите на Corcione

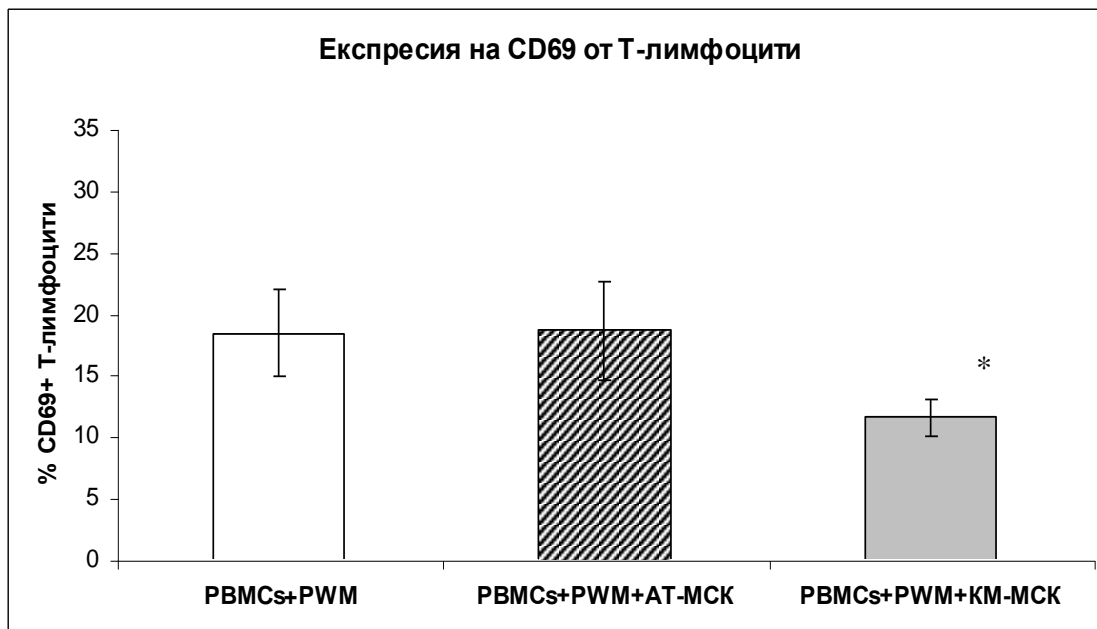
*et al. 2006, Rafei et al. 2008, Asari et al. 2009*, така че директния ефект, неопосредстван от Т клетки също не може да бъде изключен.

По отношение на активирания агент, в нашата постановка не се стимулира нито BCR, нито CD40, а се използва свойството на лектиновия митоген PWM да предизвиква напречно свързване на повърхностните гликопротеини на Т и В лимфоцитите (*Стайс 1997*). Само една авторска група използва PWM за В клетъчна активация и ко-култивиране с МСК, като изследователите установяват подтисната В клетъчна пролиферация, при постановка с изолирани В клетки, без наличие на Т лимфоцити (*Auggelo et al. 2005*). Следователно тези резултати са още едно доказателство, че при PWM активирания В клетки е възможно и Т независимо инхибиране на В клетъчната функция от страна на МСК. Във всички случаи ние не можем да отговорим категорично дали супресията осъществявана от МСК върху В лимфоцитите, установена от нас е директно въздействие, въздействие опосредствано от подтиснатия Th2 имунен отговор или комбинация между двете групи фактори.

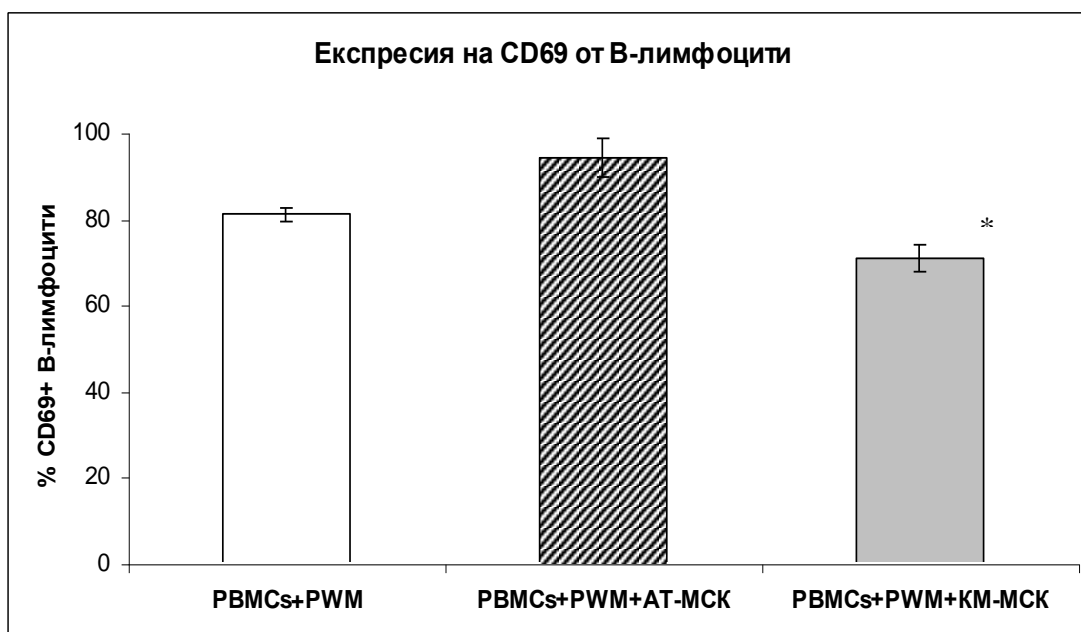
#### **4.3.Промяна в Т и В клетъчните активационни маркери под въздействието на МСК**

Получените резултати, разкриващи, че под влияние на КМ-МСК и АТ-МСК се подтиска Т хелперната цитокинова секреция и имуноглобулиновата секреция от страна на В лимфоцитите, ни насочи към изследване на лимфоцитната активация под влияние на МСК. За целта отново използвахме PWM, поради споменатата му способност да активира, както В, така и Т клетките, като изследвахме повърхностната експресия на активационния маркер CD69 върху двата вида лимфоцити, в условия на ко-култивиране с КМ-МСК и АТ-МСК. Резултатите показаха, че в следствие ко-култивиране на ПКМК и КМ-МСК, експресията на CD69 се понижава, както при Т лимфоцитите (**Фиг. 21**) така и при В клетките (**Фиг. 22**) като намалението е статистически достоверно ( $p < 0,05$ ). Обратно в присъствие на АТ-МСК липсва промяна на CD69 експресията, както върху Т, така и върху В лимфоцитите. Резултатите бяха доста изненадващи, тъй като очаквахме и двата вида стволови клетки да доведат до подтисната експресия на CD69, която да

е израз на подтиснатата активация на Т и В лимфоцитите. Логично би било инхибицията на цитокиновата продукция, при Т клетките и подтисната имуноглобулинова секреция от страна на В клетките да бъдат придружени от супресия на клетъчната активация и при двата вида лимфоцити. Още по изненадващ беше фактът, че КМ-МСК, оправдаха очакванията ни, но не и АТ-МСК. Получените досега резултати показаха, че именно АТ-МСК имат статистически достоверно по силен ефект върху инхибицията на Т клетъчната цитокинова секреция (Фиг.18 и 19) и върху В клетъчната имуноглобулинова секреция (Фиг.20). Изводът, който се налага е, че докато при КМ-МСК супресията върху основните лимфоцитни свойства се придружава от супресия в активацията им, то при АТ-МСК тези процеси се разминават. Или казано с други думи КМ-МСК и АТ-МСК подтискат Т и В клетъчните функции по различен начин.



**Фигура 21.** Имуномодулиращ ефект на АТ-МСК и КМ-МСК върху експресията на CD69 при Т-лимфоцити. 18,4% от Т-клетките, третирани само с PWM позитивират CD69, като в присъствие на КМ-МСК активираниите Т-лимфоцити намаляват до средно 11,6% ( $P < 0,05$ ). За разлика от костно-мозъчните, адипозните мезенхимни стволови клетки не оказват влияние върху експресията на CD69 като нивата от 18,6% на позитивните по този маркер клетки са сравними с контролните. Отразени са осреднени стойности  $\pm$  SD от три независими експеримента ( $*P < 0.05$ ).



**Фигура 22.** Имунomodулиращ ефект на АТ-МСК и КМ-МСК върху експресията на CD69 при В-лимфоцити. 81% от Т-клетките, третирани само с PWM позитивират CD69, като в присъствие на КМ-МСК активираните Т-лимфоцити намаляват до средно 70,76% (\* $P < 0,05$ ). За разлика от костно-мозъчните, адипозните мезенхимни стволови клетки не оказват статистически сигнификантно влияние върху експресията на CD69. Отразени са осреднени стойности  $\pm$  SD от три независими експеримента (\* $P < 0,05$ ).

Като цяло в научната литература липсват доказателства за принципни качествени разлики между АТ-МСК и КМ-МСК по отношение на имунорегулаторното им действие. Намерената от нас разлика по отношение на CD69 експресията, също едва ли е достатъчна, за да се направят подобни изводи, но тя дава основание за някои спекулации.

Както беше дискутирано по-горе съществува двойственост в експресията на CD69, като от една страна експресията ѝ е свързана с лимфоцитна активация, а от друга Т клетките, които трайно експресират CD69 имат имунорегулаторни свойства и обуславят толеранс (*Saldanha- Araujo et al. 2011*). Твърди се, че под действието на МСК се осъществява именно втория тип процес, чрез задействане на неklasическия NF $\kappa$ B signaling (*Saldanha- Araujo et al. 2011*). Нашите изследвания не

биха могли да отговорят доколко експресията на CD69, която се запазва върху Т и В лимфоцитите под въздействието на АТ-МСК е трайна и обуславя имунорегулаторен фенотип, тъй като не сме изследвали тази експресия във времето, нито свойствата на клетките по отношение на имуносупресивност. Във всички случаи обаче е възможно „задържаната” експресия на CD69 под действието на АТ-МСК да е израз именно на това. Следователно, (въпреки че тази спекулация е на ръба на научно приемливото), е възможно КМ-МСК да водят до подтисната Т клетъчна активация при Т и В лимфоцитите, докато АТ-МСК е възможно да задържат експресията на CD69, осигурявайки имунорегулаторен фенотип лимфоцити. Ролята на CD69 като молекула, осъществяваща имуносупресивно действие е детайлно разгледана в ревю на *Sancho et al. 2005*). На базата на известното за CD69, авторите акцентират върху няколко факта:

- CD69 дефицитните мишки с колаген-индуцирана артрит, развиват изострена форма на заболяването.
- При пациенти с ревматоиден артрит се установяват серумни автоантитела, насочени срещу CD69, които корелират с тежестта на заболяването.
- In vitro свързването на CD69 води до синтез на TGFβ – основен имуносупресивен цитокин
- Клетки, които проявяват имунорегулаторна функция и са в състояние на анергия са с фенотип CD4+CD69+ (*Sancho et al. 2005*). Все още спорен е въпроса доколко това са истински Tregs, но добре известен факт е, че секретирания вследствие на активацията на CD69, TGFβ индуцира FoxP3 експресия.

Тези факти дават основание CD69 да бъде анализиран многопластово, не само като активационен маркер, но и като молекула с участие в процесите на супресия на имунния отговор. Именно в този аспект „задържаната” експресия на CD69 на повърхността на Т и В клетките под влиянието на АТ-МСК може да бъде още един израз на инхибиторното действие на МСК.

#### **4.4. Фактори от страна на МСК въздействащи върху Т и В лимфоцитите**

Нашите изследвания не биха могли да отговорят на въпроса кои са факторите, ангажирани в имунната супресия на Т и В клетките, осъществявана от МСК. В

нашата експериментална постановка МСК и съответните лимфоцити са ко-култивирани, така че ролята на прекия контакт не може да бъде negliжирана. Както беше вече коментирано, основния кандидат за МСК обусловена имунна супресия по механизма на преки междуклетъчни контакти е PD1/PD-L1 рецепторното взаимодействие, още повече, че един от авторите (*Auggelo et al. 2005*) доказващ значението му, използва в опитната си постановка именно стимулация на В клетките с PWM, както подходихме и ние.

По отношение на разтворимите секреторни фактори отделяни от МСК, нашите изследвания не установиха наличие на два други коментирани фактора- IL-10 и TGF $\beta$ , които са разнопосочно описани и в литературата. Друга група разтворими фактори като IDO, PGE2 и HGF не са тествани от нас, така че не можем да коментираме на базата на личен опит евентуалното им въздействие върху Т и В лимфоцитите. От факторите, коментирани, като отделяни от МСК и супресивни спрямо Т и В клетките, ние установяваме наличие на CCL2 и HLA-G , като данни за действието им са описани глави II и съответно VI.

Един важен въпрос, на който също нямаме отговор е дали в нашата експериментална постановка МСК са в „активирано” състояние, тъй като от това състояние до голяма степен се определя действието на много от факторите обуславящи имунна супресия (напр. IDO). Използваните от нас клетки, не са предварително активирани, но ко-култивирането им с Т лимфоцити би могло да ги активира по механизма на cross talk. Теоретично би било напълно възможно секретирания IFN $\gamma$  под действието на митогени върху Т лимфоцитите да доведе до „активирането”, на МСК, вследствие, на което те да супресират Т клетките, включително и секрецията им на IFN $\gamma$ .

В заключение, както натрупания досега чужд опит, така и нашите резултати демонстрират, че под въздействие на МСК Т, В и НК клетките се повлияват, като при Т лимфоцитите и НК клетките, това повлияване е категорично в посока имунна супресия, докато при В лимфоците данните са разнопосочни и процесът очевидно зависи от няколко групи фактори. Важно е да се има в предвид, че описаните в настоящата глава клетки, са до голяма степен ефекторни (при цялата

относителност на понятието). Т, В и NK се контролират от множество други имунокомпетентни клетки, въздействието на МСК върху които ще е обект на следващите две глави.

## **5. Използвани материали и методи**

### **5.1. Пациенти**

Проби от аспират от човешки костен мозък и мастна тъкан бяха изолирани от едни и същи пациенти на възраст между 37 и 81 години, общо 7 на брой, след ортопедични манипулации, като пробите бяха взети в съответствие на правилата на Етичната комисия към Клиника по Ортопедия и травматология на Университетска болница „Царица Йоанна - ИСУЛ. Периферни кръвни мононуклеарни клетки бяха изолирани от левкоцитен концентрат от здрави донори, предоставен ни от Националния център по хематология и трансфузиология, София.

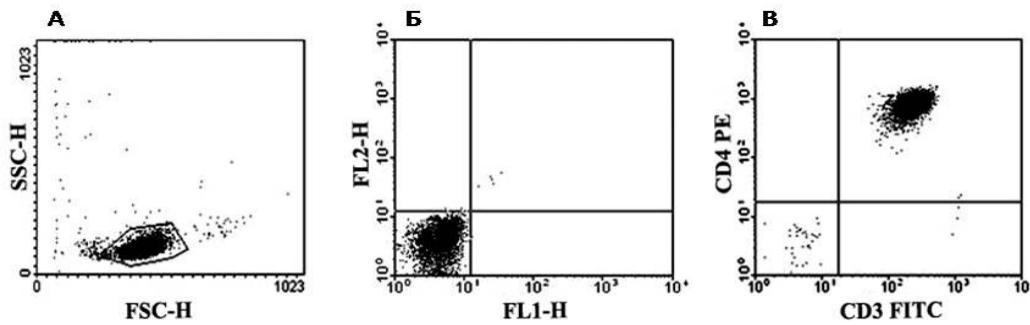
### **5.2. Мезенхимни стволови клетки**

Мезенхимните стволови клетки от мастна тъкан и костен мозък бяха изолирани, култивирани и фенотипизирани използвайки стриктно описаните в глава I лабораторни протоколи.

### **5.3. Изолитане на CD4+Т лимфоцити**

Периферни кръвни мононуклеарни клетки (ПКМК) бяха изолирани от цяла кръв чрез градиентно центрофугиране (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare). Изолитаните впоследствие ПКМК бяха използвани за селектиране на CD4+Тлимфоцити, като беше използван метод за магнитна сепарация чрез MACS kits (Miltenyi Biotec, Bergisch- Gladbach, Germany). Първоначално CD14+ моноцитите (които също носят CD4) бяха отстранени от ПКМК чрез магнитна колона след като ПКМК бяха инкубирани с anti- CD14 антитела. Така моноцитите (CD14+) бяха задържани в магнитната колона, а беше използвана изтеклата фракция. Тя също беше прекарана през втора магнитна колона, след като клетките бяха инкубирани с anti-CD4 антитела, като беше използвана фракцията задържана в колоната. По този начин от периферните кръвни мононуклеарни клетки бяха селектирани само CD4+ Т

лимфоцитите, като чистотата на фракцията беше доказана чрез флоуцитометрия на базата на почти 100% експресия на CD3+/CD4+ маркери (Фиг.23)



**Фиг 23.** Флоуцитометрично определяне степента на чистота на CD4<sup>+</sup> Т-клетки, изолирани чрез система MACS. Панел А – маркиран е участък, обхващащ лимфоцитната фракция на магнитно сепарираните клетки, отдиференцирана по физични параметри; панел Б – отрицателна контрола; панел В – 98,2 % от пречистените клетки са двойнопозитивни за Т-клетъчните маркери CD3 и CD4

#### 5.4.Изолиране на ПКМК

Пробите от левкоцитен концентрат с обем 50 ml бяха центрофугирани за 10 мин. на 250g, след което беше отстранявана надутайката от остатъчна кръвна плазма. Утаената клетъчна фракция беше ресуспендирана в DMEM до краен обем 60 ml и надслоявана върху общо 20 ml Ficoll-Нураque (Pharmacia-LKB, Sweden) в две отделни стерилни центрофужни епруветки (Orange Scientific, Belgium), като всяка от тях съдържаше 30 ml разредени кръвни клетки и 10 ml Ficoll-Нураque. Следваше центрофугиране за 30 минути на 300g. Броят на изолираните ПКМК беше определян с камера на Bürker. За *in vitro* култивирането им беше използвана

хранителна среда DMEM + 10% фетален телешки серум, в присъствие или не на 2,5 µg/ml PWM (Sigma-Aldrich, USA) или 10µg/ml ПХА .

### **5.5.Клетъчно ко-култивиране**

Изолирани от костен мозък и мастна тъкан МСК на четвърти пасаж от култивирането им бяха трипсинизирани, преброени и посяти в гъстота  $1 \times 10^4$  кл./ямка в среда DMEM + 10% ФТС в 96-ямкова плака (Orange Scientific, Belgium) в обем 200 µl/ямка. След 24 часова инкубация при 37°C; 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажност, културалната среда беше отстранена и при експериментите с Т клетки, към прилепналите МСК бяха добавени по 200 µl/ямка свежа DMEM + 10% ФТС, съдържаща:

а)  $1 \times 10^5$  пречистени алогенни CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцити + 10 µg/ml ФХА (Sigma-Aldrich, USA).

б)  $2 \times 10^5$  алогенни ПКМК + 10 µg/ml ФХА.

За контроли бяха използвани следните опитни постановки:

а)  $1 \times 10^5$  пречистени CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцити в 200 µl DMEM +10% ФТС + 10 µg/ml ФХА (самостоятелна култура без МСК)

б)  $2 \times 10^5$  ПКМК в 200 µl DMEM + 10% ФТС + 10 µg/ml ФХА (самостоятелна култура без МСК)

в)  $1 \times 10^5$  пречистени CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцити в 200 µl DMEM + 10% ФТС (самостоятелна култура без МСК и митогени)

г)  $2 \times 10^5$  ПКМК в 200 µl DMEM + 10% ФТС (самостоятелна култура без МСК и митогени)

д) МСК в 200 µl DMEM + 10% ФТС + 10 µg/ml ФХА (самостоятелна култура без ПКМК/CD4<sup>+</sup> Т-кл.)

е) МСК в 200 µl DMEM + 10% ФТС (самостоятелна култура без ПКМК/CD4<sup>+</sup> Т-кл. и митогени)

Всяка от описаните по-горе опитни култури (смесени или самостоятелни) беше представена в 5 повторения в рамките на един експеримент. Плаката беше инкубирана за 48 часа при стандартни условия, след което културалната среда от

експерименталните ямки беше събрана, центрофугирана (250g; 10 мин.) и изследвана за съдържание на IFN- $\gamma$  и IL-4.

За изследване имуномодулиращите свойства на КМ-МСК и АТ-МСК по отношение на В-клетъчната имуноглобулинова секреция беше приложена следната експериментална постановка:

ПКМК в концентрация  $1,0 \times 10^6$  кл./ml бяха посяти в среда DMEM + 10% ФТС в 96-ямкова плака (Orange Scientific, Belgium) в обем 200  $\mu$ l/ямка, самостоятелно или в ко-култура с алогенни адипозни или костно-козъчни мезенхимни стволови клетки ( $2,0 \times 10^4$  кл./ямка; пасаж 3; съотношение ПКМК:МСК = 10:1), с или без стимулация с Pokeweed mitogen (2,5  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich, USA). Анализирани и обобщени бяха данните, получени от 3 независими експеримента, осъществени с клетки от различни донори, като при всеки от тях изследваните проби бяха дублирани в шест повторения. След 7 дни инкубация при 37°C; 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажност на въздуха, културалната среда от експерименталните ямки беше събрана, центрофугирана (250g; 10 мин.) и подложена на количествен sandwich-ELISA анализ за наличие на човешки имуноглобулини.

#### **5.6.ELISA методи за установяване концентрацията на IFN $\gamma$ и IL-4**

Цитокиновата секреция беше изследвана, чрез използване на търговски китове: IL-4 Human ELISA, Arcus Biological, Italy и IFN $\gamma$  Human Instant ELISA, Bender MedSystems, Austria, Gen-Probe Diaclone, SAS, France, като бяха спазени изискванията на фирмата производител.

#### **5.7.Тест за имуноглобулиново определяне**

Микро-титърна плака (Costar, USA) беше натоварена с 1  $\mu$ g/ml Protein A (Sigma-Aldrich, USA), разтворен в 0,05 М карбонатен буфер и беше инкубирана за 12 часа при температура 4°C. След промиване 3 пъти по 5 мин. с PBS, свободните свързващи места на плаката бяха блокирани с по 200  $\mu$ l/ямка 2%-ен разтвор на телешки серумен албумин (BSA; Sigma-Aldrich, USA) в PBS за 1 час на 37°C. Плаката беше измита 3 пъти по 5 мин. с PBS, след което всяка от тестираните проби (културална среда от смесените клетъчни култури и контролните ямки) беше нанесена в 4 повторения по 50  $\mu$ l на ямка. Имуноглобулиновата концентрация в пробите беше определена по

предварително построена стандартна крива на база спектрофотометричните показания за стойностите на абсорбцията на серия от контролни проби с познато имуноглобулиново съдържание. За целта бяха използвани човешки интравенозни имуноглобулини (IvIg), проби от които бяха нанесени в две серии падащи двукратни разреждания (в DMEM + 10% ФТС) с начална концентрация 20 µg/ml и крайна 1 ng/ml в същата микро-титърна плака, по 50 µl в ямка.

Плаката беше инкубира за 2 часа на 37°C, след което беше измита трикратно за по 5 мин. с TPBS. Неангажираните молекули на Protein A бяха блокирани с по 200 µl/ямка 2%-ен нормален заешки серум в PBS за един час при 37°C. В последствие трикратно промитата с TPBS плака беше третирана за един час на стайна температура с комбиниран разтвор на конюгирани с пероксидаза антитела (Sigma-Aldrich, USA), реагиращи срещу κ и λ веригите на човешки имуноглобулини, в разреждане съответно 1/5000 и 1/10000 в блокиращ буфер. След измиване 3 пъти по 5 мин. с TPBS, ензимната реакция беше проявена с цитратен буфер (pH=5,0), съдържащ 4 mM хромогенен субстрат OPD (О-фениленамин; Sigma-Aldrich, USA) и 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Реакцията беше спряна след 10 мин. чрез прибавяне на 50 µl/ямка 10%-ен воден разтвор на H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, а оптичната плътност (OD) беше отчетена спектрофотометрично на micro-ELISA reader (Dynamech AG, USA) при дължина на вълната 492 nm.

### **5.8.Изследване влиянието на мезенхимни стволови клетки върху активирането на лимфоцити**

КМ-МСК и АТ-МСК (пасаж 3) бяха трипсинизирани, преброени, посяти в гъстота  $2,5 \times 10^5$  клетки/cm<sup>2</sup> в 6-ямкови плаки (10 cm<sup>2</sup>; Orange Scientific, Belgium) и култивирани на 37°C; 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажност на въздуха. 24 часа по-късно към мезенхимните стволови клетки във всяка ямка бяха добавени по  $2 \times 10^6$  ПКМК, ресуспендирани в DMEM+ 10% FCS с или без присъствието на PWM 2,5 µg/ml; (Sigma-Aldrich, USA), в общ обем 2 ml/ямка. Контролните култури бяха съставени само от  $2 \times 10^6$  ПКМК в 2 ml DMEM + 10% FCS с или без съдържание на 2,5 µg/ml PWM. Плаката беше инкубирана за период от 24 часа, след което мононуклеарните клетки от експерименталните контролни и смесени култури, дублирани в по три

повторения, бяха събрани чрез внимателно ресуспендиране и подложени на флоуцитометричен анализ.

Субпопулации CD19<sup>+</sup> (В-лимфоцити); CD3<sup>+</sup> (Т-лимфоцити) клетки, присъстващи в ПКМК фракцията, събрана от смесените и контролните опитни култури, бяха изследвани за експресия на повърхностния ранен активационен маркер CD69 чрез поточна цитометрия (FACS Calibur, Becton Dickinson, USA). Използвани бяха следните анти-човешки антитела: -CD19-FITC; -CD3-FITC и -CD69-PE (Becton Dickinson, USA). Бяха отчетени и анализирани по 10 000 клетки на проба, като се използва софтуеърен продукт CellQuest.

### **5.9.Статистически методи**

Количествените показатели са представени като средна стойност  $\pm$  стандартно отклонение ( $\pm$  SD). За сравнение на средните стойности по групи беше приложен t-тестът на Student и непараметричният анализ на Mann-Whitney U test. Статистическа сигнификантност беше приета при  $P \leq 0,05$ .

# IV. Въздействие на МСК върху Т регулаторните лимфоцити (Tregs)

## 1. Въведение

Регулацията на имунния отговор е изключително важен биологичен процес, който предотвратява възникването и развитието на автоимунни заболявания. Известно е, че той е сложен и многопластов, осъществяващ се в първичните (тимус и костен мозък) и вторични лимфоидни органи (лимфни възли, слезка, мукозна имунна система), както и в периферията (кръв, съединителна тъкан, мезенхимни органи). В процеса на модулиране на имунния отговор вземат участие множество имунокомпетентни клетки, отговорни за поддържането на периферния имуно толеранс. От 70-те години, когато за първи път се формулира концепцията за „Т супресори“ (*Gershon et al. 1972*), са натрупани множество данни, които разкриват, че механизмите на периферна имунна супресия, далеч не се осъществяват от един специализиран вид клетки.

Към днешна дата, непълният списък на супресорите включва (*Jiang and Chess 2004, Guerin et al. 2009*) **Табл. 5:**

**Табл. 5** Основни субпопулации клетки с имуносупресивно действие

Клетъчни популации с имунорегулаторни действие	Кратка характеристика
Tr-1	Т регулаторни клетки тип 1, секретират IL-10 ( <i>Groux et al. 1997</i> )
Th3	Т хелпери 3, секретират TGF $\beta$ ( <i>Weiner et al. 2001</i> )
CD4+FoxP3+	Класическите Т регулаторни клетки известни още като T regs ( <i>Sakaguchi et al. 1995</i> )

CD8+FoxP3+	Дискутабилно имуносупресивно действие ( <i>Nakagawa et al. 2009, Mayer et al. 2011</i> )
CD4-CD8-	Липсва сигнал чрез CD4 или CD8 ( <i>Voelkl et al. 2011</i> )
CD8+CD28-	Индукцират анергия, поради липсата на костимулация CD28/ B7 ( <i>Jiang and Chess 2004</i> )
CD8+HLA-E+	С цитотоксично действие срещу CD4, експресиращи антигени в контекста на HLA-E ( <i>Jiang and Chess 2004</i> )
В клетки с висока експресия на сиалофорин 3	( <i>Kaminski et al. 2012</i> )
B10 клетки	В лимфоцити секретирани IL-10 ( <i>Kaminski et al. 2012</i> )
NKT клетки	Секретират IL-10 и TGFβ ( <i>Jiang and Chess 2004</i> )
MDSC	Миелоидни супресорни клетки, хетерогенна популация ( <i>Elkabets et al. 2010</i> )
Дендритни клетки	Толерогенен фенотип (разгледани са подробно в глава V)

Нови изследвания недвусмислено доказват, че в процеса на регулация на имунния отговор са ангажирани не само клетки от лимфоцитен произход, но и множество други, чието значение по отношение на имуномодулацията е не по-маловажно.

Клетките участващи в регулирането на имунния отговор са в сложна и често противоречива комуникация помежду си, което води до постигане на комплексен баланс в процесите на активация и супресия. Нарушаването на този баланс е база на една от модерните концепции за възникването на автоимунните заболявания. От тази гледна точка е важно да бъдат разгледани отношенията между МСК и имунорегулаторните клетки, тъй като често основния механизъм на имунна

супресия, осъществяван от МСК е въздействие върху тях. С други думи наред с директното си действие върху ефекторните клетки, осъществяващи имунния отговор, МСК могат да действат и индиректно чрез „посредник”, като именно този посредник се явяват имуносупресивните клетки (*Kyurkchiev et al. 2013*). Разглеждането на сложните и многопластови взаимоотношения между МСК и всички клетки с установена имуномодулаторна функция е задача, която е трудно осъществима, поради което в тази и следващата глава ще бъдат разгледани основните, а според повечето изследователи и най-важните имунорегулаторни клетки: Tregs и дендритните клетки, още повече нашия екип има данни именно по отношение на действието на МСК върху тях.

## 2. T regs

### 2.1.Имуносупресия *in vitro* и *in vivo*

Първоначално супресорните Т лимфоцити са описани в CD8+ популацията (*Cantor et al. 1976, Reinherz et al. 1980*), като и досега често CD8+Т клетките се наричат „Т супресори”. Липсата на маркер, който да идентифицира поулацията с имунорегулаторни действие води до дълга пауза в изучаването на Т супресорите.

„Възкресението” на бившите „супресори”, вече под името „имунорегулаторни клетки” стартира през 80-те години, когато се установява, че тези клетки са разположени по-скоро в пула на CD4+ Т лимфоцитите, от което, разбира се не следва, че не съществуват CD8+ Т супресорни клетки. Макар и донякъде условно биха могли да се разграничат два етапа в изследването на CD4+Т регулаторните клетки, като първият е от началото на 90-те години до началото на 21-век, когато за основен имунорегулаторен тип се приемат клетките идентифицирани по положителната експресия на маркерите CD4 и CD25. Вторият етап започва в първите години на 21-век с откриване на ролята на интрацелуларния транскрипционен маркер FoxP3, който по-ефикасно характеризира имунорегулаторната CD4+Т популация. Следва да се отбележи, че тези етапи в никакъв случай не могат да бъдат позиционирани по остта „минал - по нисш ” и „модерен – по висш”. Много от най-модерните и вече доказани концепции по

отношение на биологията на Т регулаторните клетки са теоретично и донякъде практически обусловани през 90-те, поради което в тази работа етапите ще се преплитат и няма да бъдат напълно исторически разграничавани.

Както беше казано, въпреки традиционната представа, че супресорните клетки принадлежат към пула на CD8+Т лимфоцитите, става ясно, че CD4+ лимфоцитите също могат да осъществяват супресорни функции (*Sakaguchi et al. 1985, 1995, Shevach et al. 2000*). В началото на 80-те години се описва, че ко-култивирането на поликлонални активирани CD4+Т лимфоцити с автоложни resting CD4+Т клетки подтиска способността на resting Т клетките да индуцират В клетъчна диференциация и продукция на антитела (*Thomas 1982*). По късно базисните разработки на *Sakaguchi* и колеги върху орган - специфични автоимунни заболявания при тимектомирани мишки, категорични доказват супресорната функция на част от CD4+ Т лимфоцитите. Неонаталната тимектомия води до редуциран брой, както на CD4+, така и на CD8+ лимфоцити, като се доказва, че трансферът на CD4+, но не и на CD8+ лимфоцити води до подтискане на развитието на автоимунното заболяване. (*Sakaguchi et al. 1985*). Тези открития до голяма степен водят до преформулиране на наименованията на лимфоцитните субпопулации. Десет години по късно в средата на 90-те екипът на *Sakaguchi* доказва, че медираната от CD4+Т лимфоцити супресия се дължи на малък субклас Т хелпери, характеризиращ се с CD4+CD25+ експресия, като именно тази субпопулация е наречена Tregs (*Sakaguchi 2000, Shevach 2001*). Последвалите експерименти доказват, че мишки дефицитни по отношение на Т клетки (неонатално тимектомирани) развиват автоимунни заболявания при сингенен трансфер на Т клетки, които са „изчистени” от CD4+CD25+ лимфоцити, като е описано развитието на диабет тип 1, тиреодит и автоимунен гастрит (*Apostolou et al. 2002, de Lafaille et al. 2002*). Така става ясно, че сред Т хелперите има субпопулация, която конститутивно експресира рецептора за  $\alpha$  веригата на IL-2 – CD25 и която медира имунна супресия при автоимунни болести на миши модели (*Holm et al. 2004*). Скоро след това, множество изследователски групи докладват, че CD4+CD25+ Т лимфоцити еквивалентни на тези при мишките съществуват и

при хора, като са установени в тимус (*Stephens et al. 2001*), периферна кръв (*Diekman et al. 2001, Baecher- Allen et al. 2001*), лимфоидни органи (*Taams et al. 2001*) и умбиликална венозна кръв (*Ng et al. 2001*). Заслужава да се отбележат и изследванията на *Thornton and Shevach 1998*, които култивират CD4+CD25+ клетки в намаляващ брой заедно с респондери Т клетки, които са поликлонално стимулирани, като доказват доза зависимо ролята на Tregs в обуславянето на имунна супресия

## **2.2.Проллиферативен потенциал**

Натрупването на информация за Tregs популацията показва, че те са в анергично състояние и не пролиферират при самостоятелно култивиране, като в техния пул липсва некроза и апоптоза. Това състояние би могло да бъде израз на стаус на клетки, които са многократно стимулирани с антиген и са достигнали краен етап на диференциация. В подкрепа на тази теза е силно ограничаване им потенциал за растеж, фенотипът им на активирани клетки, дълготрайното им присъствие, ниската експресия на Bcl-2 и наличната експресия на CD95 (*Akbar et al. 2003*). Въпреки, че Tregs не са чувствителни към апоптоза, предзвикана от клетъчна активация („activation induced cell death”), те проявяват способност за апоптоза при липса на цитокини (*Taams et al. 2001*). Алтеративна теория се явява идеята, че CD4+CD25+ представляват отделна линия CD4+Т лимфоцити, като аргумент за това е установяването им в кръв от пъпна връв (*Baecher- Allen et al. 2004*).

Tregs притежават ограничен потенциал за пролиферация в сравнение с подобно активирани не-регулаторни Т клетки, като се установява, че те пролиферират от 10 до 40 пъти по слабо (*Baecher- Allen et al. 2001*)

Въпреки лимитираният пролиферативен потенциал на Tregs, обаче е изяснено, че пролиферацията им може да се индуцира при добавяне на високи дози цитокини, от които най-важни се явяват IL-2, IL-4 и IL-15 (*Stephens et al. 2001, Taams et al. 2001, Diekmann et al. 2001, Ng et al. 2001, Jonuleit et al. 2001*). Друг начин за стимулиране на пролиферацията на Tregs е по пътя на CD28 рецептора чрез моноклонално антитяло, което води до ендогенна продукция на IL-2 и последващата пролиферация на CD4+CD25+. Тези факти показват, че антиген-

представящите клетки могат да стимулират пролиферацията на CD4+CD25+ чрез B7/CD28/ (или CTLA-4) взаимодействие (Levings et al. 2001). Студии върху миши модели разкриват, че най-добрата комбинация способна да преодолее анергичното състояние на Tregs, дължащо се на арест в клетъчния цикъл (Jonuleit et al. 2001) е добавянето на IL-2 с едновременно стимулиране на Т клетъчния рецептор (ТКР) с анти- CD3 моноклонално антитяло (Thornton et al. 1998). При ко-култивиране активираните CD4+CD25+, водят до подтискане на пролиферацията, както на CD4+, така и на CD8+ Т лимфоцити при съотношение 1:1 (Stephens et al. 2001, Taams et al. 2001, Diekmann et al. 2001, Levings et al. 2001, Baecher-Allen et al. 2001), като се установява супресия на клонално ниво (Ng et al. 2001). От това следва изводът, че не всички CD4+CD25+ клетки проявяват свойства на Tregs, а най-важното условие за това е те да бъдат активирани чрез своя ТКР (Thornton et al. 1998, Diekmann et al. 2001). Важен факт е, че активираните по този начин CD4+CD25+ клетки остават супресивни и след периода си на пролиферация, като са способни да подтискат CD4+CD25- лимфоцити (Ng et al. 2001, Levings et al. 2001). Интерес представлява въпросът дали Tregs се активират от собствени или чужди антигени. Експерименти, проведени от Taams and al. 2002 изследват ко-култивирането на CD4+CD25+ и CD4+CD25-, стимулирани с автоложни ПКМК и различни антигени като HSP (heat shock proteins), тетанос токсин, протеини на кравето мляко и др. Във всички случаи под въздействието на активацията CD4+CD25+ подтискат пролиферацията на CD4+CD25-, откъдето следва изводът, че Tregs могат да се активират и да действат имуносупресивно, както под въздействие на свои, така и под въздействие на чужди антигени.

### **2.3.Фенотип**

При изследване на молекулите експресирани от CD4+CD25+ Т лимфоцитите се установява наличие на повърхностни CD25, HLA-DR, CD45RO, CD122 (рецептор за  $\gamma$  веригата на IL-2), както и интрацелуларна експресия на CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4), един фенотип в голяма степен близък до този на паметовите Т хелпери. Една разлика обаче се явява фактът, че Tregs за разлика от паметовите Т клетки експресира непрекъснато CTLA-4 и CD25 (Holms et al. 2004).

При сравнение между активирани Tregs и активирани CD4+CD25- клетки основната разлика се явява постоянно експресираните високи нива на повърхностна CTLA-4 при Tregs, в сравнение с активираните CD4+CD25-. Експресията на последните по отношение на интрацелуларна CTLA-4, и повърхностни HLA-DR, CD122 и CD25 се явява в значително по-голямо количество в сравнение с Tregs, но това явление е временно (*Diekmann et al. 2001*). Донякъде парадоксален се явява фактът, че клетки определени като “CD4+CD25-“ експресират по-голямо количество CD25 от тези които са CD4+CD25+, но в случая дифенирането като “CD4+CD25-“, важи за състоянието преди активацията, тъй като CD25 се явява активационен маркер, появил се в хода на процеса.

По принцип около 30 % от CD4+ Т клетките имат първична и непрекъсната ниска експресия на CD25, като сред тях около 2% показват висока експресия на маркера (*Baecher- Allan et al. 2004*). Това поставя въпроса дали всички, или само някои от CD25+ Т хелперите принадлежат към Tregs. При сравнение между CD4+CD25<sup>high</sup> и CD4+CD25<sup>low</sup> по отношение експресия на други маркери, се установява, че CD4+CD25<sup>high</sup> е хомогенна субпопулация, 95% от която експресира CD45RO, CD62L, CD122, HLA-DR и CD71. За разлика от това CD4+CD25<sup>low</sup> представляват доста хетерогенна популация от клетки, от които 80% експресират CD45RO, 80 %-CD62L и 28%- CD122 (*Baecher- Allan et al. 2001,2004, Cao et al. 2003*).

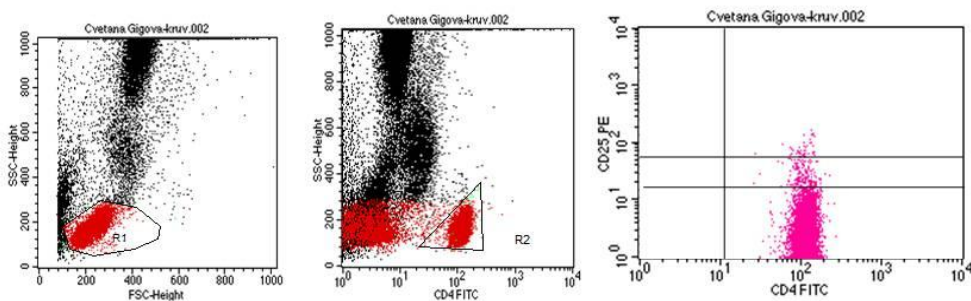
Въпреки описаните лимитиращи фактори, ранната история на Tregs акцентуира предимно върху идентификацията им по CD25 маркера (**Фиг. 24**).

По отношение на експресията на CD45RO, CD4+CD25+ могат да се разделят на експресиращи или неекспресиращи, като само за експресиращите CD45RO е описана имунорегулаторна функция (*Jonuleit et al. 2001*).

Експресията на CD28, CD69, CD62L, CD95, CD154 (CD40L) не показва убедителни разлики между CD4+CD25+ и CD4+CD25- Т лимфоцитите (*Diekmann et al. 2001*).

Като цяло би могло да се обобщи, че субпопулацията определена като Tregs, на етапа на натрупване на информация в началото на века, не се отличава с уникален фенотип, който категорично да я разграничи от другите Т хелпери. Tregs проявяват фенотип, който до голяма степен се припокрива с този на „хронично активирани“ Т

хелпери, като поради тази причина се допуска, че при определянето на Tregs в пула им попадат и нерегулаторни Т клетки, експресиращи CD25, поради активацията си (Baecher- Allan et al. 2004)



**Фиг. 24** Фенотипно определяне на CD4+CD25+ лимфоцити. Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри (ляво), Вторият гейт се поставя върху CD4+ положителните клетки (срещна). Десният плот е гейтиран по логичен гейт направен чрез комбинация между гейт едно и гейт две. Както се вижда (дясно) има две субпопулации CD4+CD25+ като се счита, че истинските Tregs са с висока експресия на CD25 (CD25<sup>high</sup>) (Алтъркова и кол.)

## 2.4.Механизми на супресия

### 2.4.1.Цитокинова секреция

По отношение на цитокиновата секреция на Tregs при неактивирани прясно изолирани CD4+CD25+ не се установяват имunosупресивни цитокини (Stephens et al. 2001), докато след активация се установява секреция на IL-10 и TGFβ, за разлика от CD4+CD25- Т клетките в които се установява секреция и на IL-2 (Levings et al. 2001, Jonuleit et al. 2001). При изследвания на CD4+CD25+ чрез RT-

PCR, иРНК е установена само за IL-10 и TGF $\beta$ , както за активираните, така и за неактивираните клетки, за разлика от CD4+CD25- лимфоцитите, където се установява иРНК и за IL-2, IL-4 и IFN $\gamma$  (Jonuleit et al. 2001). Счита се, че един от механизмите на имунна супресия осъществяван от CD4+CD25+ е индуцирането на намалена синтеза на IFN $\gamma$  и IL-2 от CD4+CD25- Т клетките, което се описва от няколко изследователски групи при условия на ко-култивиране (Stephens et al. 2001, Jonuleit et al. 2001, Baecher- Allan et al. 2001, Levings et al. 2001 ). Доказаната секреция на TGF $\beta$  и IL-10 цитокините от страна на CD4+CD25+ повдига въпроса за приоритетната им роля в осъществяване на имунната супресия.

Налице са данни, че въпреки установените от по-голямата част от изследователите IL-10 и TGF $\beta$ , секреторния механизъм не е единствен и далече не е достатъчен. При използване на антители срещу IL-10 и TGF $\beta$  не се установява блокиране на супресивния ефект на CD4+CD25+, както и не се установява имунна супресия осъществявана само от супернатантите на активирани Tregs (Stephens et al. 2001, Taams et al. 2001, Jonuleit et al. 2001). Това води до извода, че в имунната супресия важна роля има прекия контакт между клетките.

#### **2.4.2. Контакт – обусловена супресия**

Необходимо условия за осъществяването на контакт- обусловената супресия е стимулирането на Tregs чрез ТКР, като е важно тази стимулация да бъде в определена степен, тъй като съществуват данни, че свръхстимулацията им чрез ТКР, лишава Tregs от тяхната имуносупресивна функция (Baecher- Allan et al. 2001, 2002).

CTLA-4, CD25, HLA-DR, GITR (glucocorticoid – induced tumor necrosis factor receptor), PD-1, Notch лигандите са проучвани кандидати за имуносупресивни молекули, въввлечени в процеса на контактна инхибиция (Jonuleit et al. 2001, Baecher- Allan et al. 2001, Baecher- Allan et al. 2002, Levings et al. 2001 ). Също така съществуват убедителни сведения, че CD4+CD25+ клетките са способни да свързват TGF $\beta$  на повърхността си и по този начин по контактен път да подтискат Т клетките (Nakamura et al. 2001).

През 2002 две проучвания (*Diekmann et al. 2002, Jonuleit et al. 2002*), обогатяват информацията за супресивните механизми на Tregs, като преоткриват механизма дефиниран в миналото като „инфекциозен толеранс” (*Gershon and Kondo 1971*). И при двата вида експерименти се установява, че под влияние на CD4+CD25+ клетки, Т клетките респондери започват да проявяват имunosупресивни функции, чрез секреция на IL-10 и TGFβ. Така се осъществява индиректно имunosупресивно действие на Tregs, като една малка субпопулация води до създаване и регулация на супресивнен фенотип при множество други клетки. На тази база се предлага модел включващ първична контакт- обусловена супресия, водеща до анергични клетки, секретирани IL-10 и/ или TGFβ, чрез които се осъществява вторичната секреторно обусловена фаза на супресия (**Фиг. 25**).



**Фиг. 25** Предполагам механизъм на имунна супресия осъществяван от Tregs. Първата фаза е контактнo обусловена, като Tregs се свързват с CD4+CD25- клетки, индуциращи в тях анергия и способност за секреция на IL-10 и/или TGFβ. За контактната фаза се счита, че роля има мембранно свързани TGFβ на повърхността на Tregs. Втората фаза е секреторна, анергизираните Т лимфоцити

секретират IL-10 и/или TGF $\beta$ , чрез което осъществяват супресия на други Т хелпери. Малката супресорна популация създава нови супресори.

Както ще стане ясно по-нататък този модел, предложен през 2002 година до голяма степен кореспондира със съвременните концепции за имунорегулация, осъществявани и от МСК.

## **2.5. Съвременни маркери определящи Tregs фенотипа**

### **2.5.1. FoxP3**

Вторият етап от историята на Tregs започва с откритието на ролята на ДНК свързващия транскрипционния фактор известен като FoxP3 (Forkhead Box P3). Търсенето на специфичен маркер за Tregs, води до установяване, че мутация в ген, който кодира FoxP3 води до фатално автоимунно заболяване известно като IPEX (X- свързана полиендокринопатия и ентеропатия, дължащи се на имунна дисрегулация), при мишки известни като “scurfy” (люспести). Става ясно, че мутацията засягаща ген, кодиращ FoxP3 води до ранни прояви на тежки лимфопролиферативни и автоимунни заболявания (*Brunkow et al. 2001*). Връзката между експресията на FoxP3 и развитието и функцията на Tregs за първи път се прави от *Fontenot et al. 2003*, които забелязват, че иРНК на FoxP3 е значително увеличена в популацията CD4+CD25+ и в последствие демонстрира, че при мишки с липсващи гени за FoxP3 липсва Т регулаторна функция. Трансферът на CD4+CD25+ лимфоцити чувствително ограничава автоимунната патология, която се наблюдава при тези мишки. Нещо повече при интегриране на FoxP3 чрез ретровирусни вектори в CD4+CD25-, както и при CD8+ Т лимфоцити се установява, че тези клетки придобиват имуносупресивни свойства. По нататъшни изследвания доказват, че CD25+ Tregs произхождат само от FoxP3 положителни хематопоеични прекурсори (*Fontenot et al. 2003*). На базата на тези факти би могло да се обобщи, че FoxP3е изключително важен за диференциацията на Tregs и е характерен за този подклас лимфоцити, с добре изразена супресивна активност (*Rudensky et al. 2011*). Важно е да се отбележи, обаче, че това не изключва наличие на FoxP3 и в други, макар и малко на брой типове клетки, като са описани такива от субпопулациите на CD4+CD25- клетките, на CD8+ Т лимфоцитите, а дори и

при неимунни клетки, като всички тези представители също проявяват имunosупресивни свойства. Тоест, би могло да се направи извода, че наличието на FoxP3 само по себе си води до имунорегулаторен фенотип клетки (*Fontenot et al. 2005, Rudensky et al. 2011*). Като доказателство за това служи фактът, че генът, кодиращ FoxP3 се свързва с механизмите на централен (тимусен) и периферен толеранс, изразяващи се чрез негативна регулация на Т клетъчен имуноен отговор (*Fontenot et al. 2004*). На базата на това, се обосновава концепцията, че Tregs експресират ТКР с афинитет срещу „свое“ и при дефекти във гените за FoxP3, именно тези клетки атакуват собствените структури. С други думи казано, автореактивните клетки неуспяли да станат Tregs поради дефекти във FoxP3 гена, се явяват основни „играчи“ в автоимунните заболявания, обусловени от този дефект. От друга страна, тази идея противоречи на установените факти, че автореактивни Т лимфоцити има, както в пула на регулаторните, така и в този на нерегулаторните Т клетки (*Hsieh et al. 2006*). Наред с това една от функциите на Tregs се свързва с взаимоотношенията им с дендритните клетки, като е установено, че в отсъствие на Tregs се наблюдава масирана експанзия на автореактивни Т лимфоцити, активирани от ДК, което сочи към възможността една от функциите на Tregs да е „възспирането“ на имуногенността на ДК (*Swee et al. 2009, Rudensky et al. 2011*). Въпреки липсата на достатъчна яснота, очевидно се наблюдава сложен и взаимносвързан регулаторен баланс между супресивните Tregs, ДК и активираните Т ефекторни клетки.

Изследванията върху конкретната роля на FoxP3 при Tregs при мишки разкриват, че FoxP3 не е безусловно необходим за оцеляването на прекурсорите на Tregs, но е критичен за супресорната функция на тези клетки, като е установено, че десетократното намаление на FoxP3 протеина води до неспособност на Tregs да подтиснат автоимунни прояви. Въпреки, че някои компоненти на Tregs, свързани с имунорегулаторната им функция (напр. CTLA-4 и CD25 експресията), се появяват преди експресията на FoxP3, последния засилва тяхната изява и стабилизирайки ги, ги прави перманентно експресирани и ефективни (*Wan et al. 2007*). Ролята на FoxP3 се свързва и с модификация на повърхностните клетъчни и сигнални молекули,

действайки едновременно като транскрипционен активатор/супресор, както и на епигенетично ниво (Zheng et al. 2007). При експерименти планирани, така че да се осъществи FoxP3 транскрипция, но не и транслация на протеин, се установява, че експресията на някои маркери основни за Tregs като CD25, CD44, CTLA-4, GITR са независими от FoxP3, но въпреки това клетките нямат супресивна активност в отсъствието му (Gavin et al. 2007).

Описано е, че бивши Tregs, “загубили” FoxP3 придобиват способност да секретират IFN $\gamma$ , IL-4 и IL-17 и трансферирани в лимфопенични реципиенти водят до тежки тъканни лезии (Yang et al. 2008). Изследвания при хора върху ролята на FoxP3 разкриват, че експресията му се наблюдава при всички активирани T клетки, но по-правило тази експресия е временна и слаба (Wang et al. 2007).

Въпреки, че FoxP3 показва значителна стабилност, съществуват фактори, които повлияват експресията му: IL-1 намалява експресията на FoxP3 (Yang et al. 2008), както това прави и дефицитът на IL-2, като добавянето на екзогенен IL-2 възстановява FoxP3 експресията (Fontenot et al. 2005). Наред с това съществуват фактори потенциращи експресията на FoxP3, като сред тях особено място заемат консервативните некодиращи секвенции (CNS) намиращи се в локуса на FoxP3 (Rudensky et al. 2011).

От всичко казано дотук става ясно, че FoxP3 освен, че е тясно свързан с имуносупресивните функции на субпопулацията на T регулаторните лимфоцити би могъл да бъде и е много ефикасно използван като маркер, който идентифицира тази субпопулация. Както се вижда от **Табл. 6** FoxP3 категорично се смята за най-добрия и най-специфичния маркер характеризиращ Tregs субпопулацията (Ziegler 2006). Като негови недостатъци могат да се изтъкнат интрацелуларната му експресия и наличието му при някои клетки различни от CD4<sup>+</sup> T клетките, като за последното е трудно да бъде едностранно преценено дали е недостатък или плюс, с оглед на различните клетъчни типове, проявяващи имуносупресивни свойства.

На настоящия етап съществуват два подхода за идентифициране на Tregs: типизиране на CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup><sup>-</sup>, като значително по популярен и масово ползван е първия подход. И при двата подхода слабо място се

оказва CD25, поради причините, посочени по-горе. Важен момент се явява факта, че въпреки, че мнозинството от FoxP3 положителните Т лимфоцити, експресират високи нива на CD25, CD25 отрицателни клетки, също експресират FoxP3 и имат имunosупресивни функции (*Fontenot et al. 2005*), като този факт, ще бъде подробно разгледан по-нататък

### **2.5.2.CD127**

В последните години за идентификация на Tregs се наложи и още един маркер – CD127, като е установено, че Tregs имат много ниска до отрицателна експресия за него (*Liu et al. 2006*). Авторите описват субпопулация от Т лимфоцити, които са CD4+CD25+CD127<sup>low/-</sup>, те са анергични, в 88-96% положителни за експресията на FoxP3 и имат имunosупресивно действие (*Shen et al. 2009*). CD127 се смята за много добър маркер, бележещ Tregs субпопулацията. Той е рецептор за IL-7, което дава ценната възможност, използването му да разграничи Tregs клетките от ефектор/ мемори субпопулацията. Tregs могат да бъдат характеризирани като IL-7R<sup>low/-</sup> / IL-2R<sup>+</sup> (CD127<sup>low/-</sup> CD25<sup>+</sup>), докато при ефектор/ мемори Т лимфоцитите се наблюдава обратния фенотип IL-7R<sup>high</sup> / IL-2R<sup>low</sup> (CD127<sup>high</sup> / CD25<sup>low</sup>) (*Liu et al. 2006*). Това разпределение отговаря до голяма степен на динамиката на лимфоцитното активиране и развитие. Високата експресия на IL-2R е логично следствие на необходимостта Tregs да бъдат „пробудени” от анергичното си състояние, като е известно, че IL-2 е цитокин, който е ранен в Т клетъчната активация. От друга страна IL-7 е цитокин секретирани на места, свързани с възпалителен процес и води до повишена експанзия и оцеляване, необходими за популацията на ефектор/ мемори Т лимфоцитите. Трябва да се отбележи, че CD127 намалява експресията си при активация на всички видове Т лимфоцити, но при Tregs тази експресия остава ниска, за разлика от другите Т клетки, където бързо се възстановява (*Liu et al. 2006*).

Аргументи в полза на използването на CD127 е също така неговата повърхностна експресия, позволяваща лесно да бъдат сепарирани Tregs клетките, което прави CD127 един много полезен биомаркер за идентификацията им. Използването му в комбинация със CD25 води до извода, че Т regs са около 7-8% от общия пул на

CD4, което е почти двойно повече от описаните 2-3 % , установени на базата на FoxP3 определянето. (Liu et al. 2006). Доказано е, че негативната експресия на CD127 до голяма степен се контролира от FoxP3, който взаимодейства с промотора на CD127 и го подтиска. Следователно при Tregs клетките се наблюдава висока експресия на FoxP3, комбинирана с ниска до липсваща на CD127.

### 2.5.3. CD25

CD25 е маркерът, който, както стана ясно, в миналото е служил за идентификация на Tregs, които са били определяни като CD4+CD25+. Той е непрекъснато експресиран на повърхността на Tregs, но негов съществен недостатък е, че се експресира и на повърхността на активираните Т лимфоцити. От тази гледна точка CD4+CD25+ субпопулацията не е хомогенна и може да бъде разделена на CD25<sup>low</sup> клетки, които нямат имunosупресивна функция и CD25<sup>high</sup>, които имат (Baecher-Allan et al. 2001). Това дава възможности за твърде големи спекулации при определяне на мястото за поставяне на маркера, разделящ двете субпопулации при флоуцитометрично определяне на Tregs, базирано на CD4+CD25<sup>high</sup> клетки (Фиг. 24). Нещо повече, има данни, че CD25 не се експресира единствено върху Т клетки и подобно на GITR, CTLA-4 и CD45RB, не се експресира върху всички CD4+ Т лимфоцити с имунорегулаторно действие (Shen et al. 2009). Наличието на клетки, които са CD25<sup>-</sup> Tregs, експресиращи FoxP3 ще бъде разгледано по нататък.

На настоящия етап етап за идентификацията на Tregs субпопулацията се използват следните маркери (Табл. 6)

**Табл. 6** Маркери, използвани за идентификация на Tregs (Guerin et al. 2009)

Маркер	локация	Ниво на експресия	Специфичност за Tregs	Експресия върху други клетки
CD25	повърхностен	висока	++	Ефектор/мемори Т
CD95	повърхностен	висока	++	Ефектор/мемори Т
GITR	повърхностен	висока	++	Ефектор/мемори Т
CTLA-4	повърхностен	висока	++	Ефектор/мемори Т

CD45RB	повърхностен	ниска	++	Ефектор/мемори Т
FoxP3	интрацелуларен	висока	+++++	Трофобластни клетки
NrpI	повърхностен	висока	+++	неврони
LAG-3	повърхностен	висока	+++	В
CD127	повърхностен	Ниска/ липсваща	++++	Новоактивирани Т

Реално в практиката за идентифициране на Tregs се използват CD25, FoxP3 и CD127, разбира се в комбинация със CD4, който идентифицира Т хелперната субпопулация клетки.

## 2.6.Формиране на Tregs

Точните механизми на формиране и произходът на Tregs са обект на интензивни проучвания, като съществуват множество доказателства за хетерогенност в субпопулацията им. Описани са най-малко два пътя на формиране на Т регулаторни клетки на базата , на които те се разделят на „естествени” (nTregs) и индуцирани (iTregs).

### 2.6.1. nTregs

Естествените Tregs произхождат от тимуса, където се формират вследствие на селективен процес, базиран на структурата на Т клетъчния им рецептор (*Guerin et al. 2009*). Известно е, че диференциацията на Т клетките в тимуса е в пряка зависимост от различния авидитет към собствени антигени, като оцеляването на Т клетките се определя от селекционен процес базиран на комуникацията между наивните Т лимфоцити и тимусния стромален епител. В зависимост от авидитета на свързване между ТКР и комплекса МНС/собствен антиген, експресиран на повърхността на стромалните тимусни клетки, се осъществяват процесите на negliжиране, положителна селекция, или отрицателна селекция (*von Boehmer et al. 1989*). Липсата на взаимодействие между ТКР на Т лимфоцита с комплекса МНС/ собствен антиген, представен от тимусните стромални клетки води до Т клетъчна

апоптоза поради липса на ТКР сигнал – negliжиране. Позитивната селекция води до оцеляване на Т клетката поради достатъчно силно авидитетен сигнал през ТКР, докато отрицателната селекция води до апоптоза, поради свързване с твърде висок авидитет между ТКР и МНС/ собствен антиген. Оцеляването на такива клетки би създавало възможност за потенциално патологични клетки реагиращи срещу „свое“ (*von Boehmer et al. 1989*). Формирането на nTregs в тимуса се дължи на промяна в процеса на негативна селекция, като се счита, че тяхното диференциране се осъществява точно на границата, където свършва позитивната и от която стартира негативната селекция. Тоест, това са клетки с висок авидитет срещу МНС/ собствен антиген, но авидитет с малко по-нисък от този, при който тези клетки биха загинали чрез апоптоза, вследствие на негативна селекция (*Jordan et al. 2001*). За осъществяване на този процес са необходими специфични условия, които могат да се формират единствено в тимуса, поради което nTregs представляват отделна тимус- произхождаща клетъчна линия (*de Lafaille and Lafaille 2009*). Все още обект на дискусии е въпросът, доколко TGF $\beta$  е ангажиран във формирането на nTregs. Преобладава мнението, че този цитокин няма роля в този процес, като е описано, че мишки дефицитни по TGF $\beta$ -1 имат нормален брой nTregs (*Fahlen et al. 2005, Li et al. 2006, Marie et al. 2006*). Съществува и алтернативно мнение, базирано на изследване, при което се установява, че мишки дефицитни по TGF $\beta$ 1 се характеризират с липса на nTregs на 3 и 5-ти ден след раждането. По късното формиране на този вид клетки, авторите обясняват с действието на IL-2 и доказват, че мишки дефицитни по TGF $\beta$ 1 и IL-2 показват пълна липса на nTregs (*Liu et al. 2008*). Това повдига въпросът за роля на други фактори, освен високо авидитетното свързване във формирането на nTregs, като се предполага роля на IL-2, въпреки че няколко проучвания разкриват, че IL-2 няма самостоятелна роля във формирането на nTregs в тимуса (*de Lafaille and Lafaille 2004, D’Cruz and Klein 2005, Setoguchi et al. 2005*). Допуска се, че в тимуса ролята на IL-2, играе IL-15, поради фактът, че CD122 (CD122 е общ рецептор за  $\beta$  веригата на IL-2 и IL-15) дефицитните мишки, показват пълна липса на nTregs развитие (*Burchill et al. 2007, Soper et al. 2007*). В подкрепа на това твърдение е и фактът, че nTregs конститутивно експресират

STAT5B молекулата, пряко ангажирана със сигналния път на IL-2 и IL-15 (Burchill et al. 2008). Друг фактор, участващ в диференциацията на nTregs е стимулацията чрез CD28 на повърхността на Т клетките, като е установено, че CD28 дефицитни мишки показват значително намален брой nTregs в тимуса (Tai et al. 2005).

Макар, че няма категорично установен маркер, бележещ субпопулацията на nTregs, има съобщения, че за такива могат да служат Helios (транскрипционен фактор от Icarus фамилията) (Thornton et al. 2010) и Neuropilin 1 (рецептор за TGF $\beta$ -1) (Weiss et al. 2012), като данните по отношение на тях не са еднопосочни.

Т- клетъчния рецептор на nTregs, със специфичност към „свое“ дава възможност за развитие на автоимунни прояви от страна на тези клетки. За предотвратяване на тази възможност е изключително важна стабилността на FoxP3, в смисъл на неподатливост на промяна под външни условия. Под влияние на някои фактори като IL-1, nTregs започват да секретират IFN $\gamma$ , IL-4 и IL-17, което ги превръща в екс-FoxP3 клетки с проинфламаторна функция и патогенен потенциал, като е доказано, че тези клетки причиняват тежки лезии в опитни лимфопенични животни (Williams et al. 2007). Въпреки това преобладаващото мнение относно nTregs е, че те са стабилни през целия живот на опитните животни (Robtsov et al. 2010, Shmitt and Williams 2013). Основна роля за контролирането на стабилността и композицията на FoxP3, са консервативните не-кодиращи секвенции (CNS), разположени в локуса на FoxP3. Описани са три CNS, изпълняващи тази роля, като CNS2 е особено важен. Изследвания върху метилирането на CpG мотивите на CNS2 разположени в консервативния регион на екзон 1 и наречени TSDR (Treg cell specific demethylated region), установяват пълна деметилация, като TSDR деметилацията е уникална за FoxP3 регулаторните клетки (Floess et al. 2007, Huehn et al. 2009). CNS3 също е от изключително съществена роля за индукцията на FoxP3 при nTregs в тимуса (Rudensky et al. 2011).

### **2.6.2. iTregs**

За разлика от nTregs, които представляват отделна клетъчна линия, формирана в централните органи на имунната система (тимус), iTregs са алтернативен източник на регулаторни клетки, независими от тимуса. Това са клетки образували се *de*

*novo*, вследствие на стимулация в периферията на конвенционални Т клетки (Cozzo et al. 2005), като множество експериментални постановки го доказват. Основен момент е стимулацията през ТКР с ниско дозови антигени при липса на оптимална ко-стимулация (Schmitt and Williams 2013). Така например Thorstenson and Khoruts 2001, използват интравенозни инжекции с ниско дозови пептиди, Apostolou and van Boehmer 2004, използват осмотична помпа, която в продължение на дълго време отделя нискодозов антиген, докато Cobbold et al. 2004 прилагат комбинация от кожен трансплантат, заедно с анти- CD4 не-деплетиращи антители. Оралната администрация на антигени, също така води до формирането на iTregs, които са функционално супресивни при миши модел на астма, и са част от механизмите, формиращи т.нар. орален толеранс (deLafaille et al. 2008). Коменсиалната микрофлора (Geuking et al. 2011) и хроничното възпаление са други фактори водещи до експериментално формирането на Tregs, като във втория случай е доказано формиране на Tregs при модели на колит (Haribhai et al. 2011) и инфекция с интестинални паразити (Geuking et al. 2010). Общото във всички изследвания е заключението, че нискодозови антигени с висок афинитет водят до формирането на T regs, чрез действието си върху ТКР.

#### 2.6.2.1 Антигени

За изключително важна при формирането на iTregs се счита ролята на периферните тъкани, което се доказва в редица експерименти. През 1999 Seddon and Mason доказват при мишки, че аблацията на тъканите намалява способността на донорни Tregs да предотвратят автоимунно орган-специфично заболяване, след адоптивен трансфер в интактен реципиент, за разлика от Tregs доставени от немодифицирани донори. Това показва, че наличието на антигени в периферните тъкани е от ключово значение за формирането на iTregs от наивни прекурсори. Тази роля на периферните антигени се потвърждава от изследванията на Abbas et al. 2007, които доказват, че персистираща нискодозова антигенна стимулация води до експресия на FoxP3 от страна на наивни Т клетки, което ги определя като Tregs. Наред с ролята си в новообразуването на Tregs, тъканните антигени са свързани и с поддържането на вече наличните Tregs, като водят до пролиферацията им, чрез

ТКР сигнали. Въпреки, широко приетото мнение, формирало се вследствие на експерименти *in vitro*, че Tregs са в анергично състояние, адаптивния трансфер *in vivo* доказва, че тези клетки могат да пролиферират при определени условия (*Gavin et al. 2002, Fisson et al. 2003, Walker et al. 2003*), като тази пролиферация поддържа пула на клетките.

Образуването на iTregs с рецептори към специфични периферни тъканни антигени, непредставени в тимуса дава, възможност на имунната система да регулира реакцията си към чужди екзогенни антигени, срещу които агресивния имуен отговор не би бил подходящ, като така се осигурява пластичност спрямо обкръжението (*Guerin et al. 2011*). Откритието, че FoxP3 експресията се наблюдава при всички активирани Т лимфоцити (*Wang et al. 2007*) (въпреки, че за тези, които нямат съдба на регулаторни тази експресия е временна и слаба и клетките са със съмнителна супресивност), поставя въпросът дали всеки Т лимфоцит може да стане Treg и защо при активация някои стават такива, а други не. Този въпрос все още няма своя отговор.

#### 2.6.2.2. Костимулация

Друг необходим фактор за образуването на iTregs от наивните Т лимфоцити е субоптималната ко-стимулация. Установено е, че силните сигналите през CD28 възпрепятстват образуването на iTregs. До същият резултат се стига чрез блокирането на CTLA-4 (*Zhent et al. 2006*), което дава основание да се твърди, че сигналите чрез CTLA-4 водят до генериране на iTregs, докато силните сигнали чрез CD28 водят до обратния резултат (*deLafaille and Lafaille 2009, Schmitt and Williams 2013*). Сигналите генерирани при взаимодействието между PD1 и неговият лиганд също водят до генериране и поддържане на Tregs фракцията (*Francisco et al. 2009*), докато тези, провеждани по оста PI3K-AKT-mTOR, се яват негативен регулатор на Tregs, тъй като AKT подтиска т.нар. Foxo протеин, който улеснява FoxP3 индукцията (*Kerdiles et al. 2010*). Блокирането на сигналите, предавани чрез комплементните рецептори за C3a и C5a, свързани със споменатата ос улеснява генерирането на iTregs (*Strainic et al. 2013*)

Съществуват множество други подходи, целящи индуциране на iTregs, чрез субоптимална стимулация, като се таргетират CD4, CD45, CD154, ICAM-1 и др., като това се осъществява чрез моноклонални антитела, или лиганди. Всички използвани реагенти имат общата способност да ограничат сигнала предаван чрез ТКР и да доведат до субоптимална Т клетъчна активация, която е ключов елемент във формирането на iTregs (*Lutz and Schuler 2002, Chai et al. 2004, Kretschmer et al. 2005, Graka et al. 2005, 2009, Ford and Larsen 2009*)

### 2.6.2.3. Цитокини и рецепторни лиганди

IL-2 и TGF $\beta$  са двата цитокина, безусловно необходими за генерирането на iTregs, които действат чрез взаимна координация.

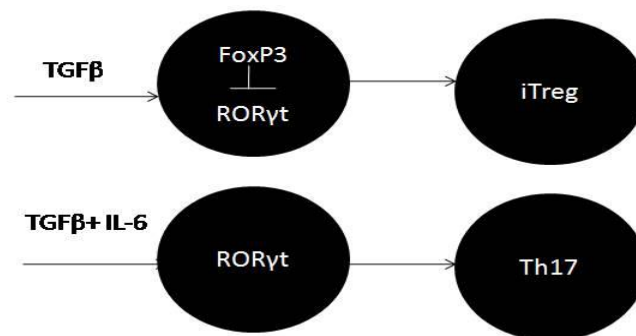
IL-2 е ключов цитокин за създаването и хомеостазата на iTregs. При култивиране на наивни CD4+Т лимфоцити, които са стимулирани чрез ТКР в присъствието на TGF $\beta$ , IL-2 се явява от изключително важно значение, за да „отключи” подтисната пролиферация, медирана от TGF $\beta$  (*Chen et al. 2003*). От тази гледна точка IL-2 се явява най-важния фактор, който „изважда” анергичните iTregs от тяхното състояние и ги насочва по пътя на пролиферацията. При експерименти с неутрализиране на IL-2 се установява, че той е необходим и за TGF $\beta$ - индуцираната транскрипция на FoxP3 и впоследствие обусловената супресорна активност (*Zheng et al. 2007*). Сигналят генериран чрез IL-2 активира STAT5, който свързва FoxP3 гена и действа в кооперация със STAT3 в индукцията на FoxP3 протеин (*Li and Flavell 2008*). IL-2 също така действа в посока ограничаване на поляризацията на активираните CD4+Т лимфоцити в посока Th17 (*Xiao et al. 2008*). Като цяло би могло да се обобщи, че IL-2 е от базисно значение за оцеляването на iTregs, тяхната пролиферация и стабилност. Както при повечето ситуации, свързани с цитокини, така и тук тези процеси се осъществяват в кооперация с други цитокини, най-съществен, от които е TGF $\beta$ .

Както е добре известно TGF $\beta$  е цитокин с имуносупресивни и анти-възпалителни свойства (*Gorelic and Flavell 2002*), като съществуват убедителни данни, че той е в състояние да преодолее пътя за генериране на не-супресивни Т клетки (*Sakaguchi 2000, Shevach 2002*). По късно е установено, че едновременната стимулация на ТКР

и присъствието на TGF $\beta$  води до диференцирането на наивни CD4+CD25- Т лимфоцити в iTregs, експресиращи FoxP3 (Chen et al. 2003), като TGF $\beta$ , заедно с IL-2 също така е ангажиран в подпомагането на пролиферацията на вече наличните зрели iTregs (Ghiringhelli et al. 2005). Влиянието на TGF $\beta$  заедно със стимулацията чрез ТКР и умерената стимулация чрез CD28 са достатъчни условия за генерирането на iTregs, *in vitro*, дори без наличието на антиген-представящи клетки (Chen et al. 2003). Доказано е, също така, че блокирането на TGF $\beta$  при опитни животни, нарушава механизмите на оралния толеранс (Faria and Weiner 2005) и образуването на iTregs (Mucida et al. 2005). Механизмът, чрез който TGF $\beta$  осъществява своите функции, конкретно индукция на транскрипцията на FoxP3, включва взаимодействие на транскрипционните фактори STAT3 и NFAT (Josefowicz and Rudensky 2009), които се свързват към CNS1 енхансър и стимулират FoxP3 индукцията (Tone et al. 2008). TGF $\beta$  също така ограничава привличането на ДНК метилтрансфераза I във FoxP3 локуса - ензим, който подтиска с индукцията на FoxP3 при ТКР стимулация (Josefowicz et al. 2009). Съществуват данни, че *in vitro* FoxP3 може да се експресира и съответно да се генерират iTregs при субоптимална активация на наивни Т клетки чрез CD3 или CD4 рецептора, без наличие на екзогенен TGF $\beta$ , като авторите твърдят, че при тези условия се секретират ендогенен TGF $\beta$ , който участва в индукцията на FoxP3 (Oliveira et al. 2011). iTregs за разлика от nTregs са толкова силно зависими от TGF $\beta$ , че губят експресията си на FoxP3 и супресивната си активност при рестимулация в негово отсъствие (Floess et al. 2007)

Важен момент относно участието на TGF $\beta$  в образуването и поддържането на iTregs е мястото, което този цитокин заема в регулацията и контрола между iTregs и Th17 клетките. iTregs и Th17 са клетки, които имат доста прилики по отношение на възможностите да се влияят от цитокиновото обкръжение, независимо от диаметрално противоположната си функция (Ziegler S and Buckner 2009). Основен момент, който определя насоката на Т клетката по посока iTreg или Th17 е съотношението TGF $\beta$  / IL-6 (Bettelli et al. 2006). В отсъствие на IL-6, TGF $\beta$  едновременно индуцира синтезата, както на FoxP3, така и на ROR $\gamma$ t (основния

фактор, определящ Th17 субпопулация), като FoxP3 директно взаимодейства с ROR $\gamma$ t и подтиска превръщането на наивните Т клетки в Th17. В присъствието на IL-6 този механизъм не действа и ROR $\gamma$ t осъществява трансформацията по посока Th17 (**Фиг 26.**) (Xu et al. 2007). Нарушаването на този фин баланс обяснява и описаното наскоро при автоимунни и злокачествени заболявания, наличие на клетки, секретирани IL-17, които имат експресия на FoxP3. (Li et al. 2013).



**Фиг. 26** TGF $\beta$  и IL-6 регулират iTregs/ Th17 лимфоцитите. При наличие на достатъчно количество TGF $\beta$  се експресират както FoxP3, така и ROR $\gamma$ t, като FoxP3 подтиска ROR $\gamma$ t насочва Т клетките по посока iTregs. При наличие на IL-6 не се експресира FoxP3 и Т клетките се насочват по посока Th17.

Освен двата основни цитокина IL-2 и TGF $\beta$  са описани и други, фактори които регулират съдбата на iTregs.

IL-10 е един от цитокините, за който се смята, че е ангажиран във генерирането на Tregs (Yang et al. 2006, Heo et al. 2010). Също така, ретиноидната киселина е фактор, за който се съобщава, че може да възпрепятства инхибирането на TGF $\beta$  от проинфламаторни цитокини, като по този начин индиректно толерира индукцията

на iTregs (*de Lafaille and Lafaille 2009*). Описана е също роля на PGE<sub>2</sub>, който действа заедно с TGF $\beta$  и засилва както инхибиторния потенциал на iTregs, така и индуцира формирането им от наивни Т клетки (*Baratelli et al. 2005*). Съобщава се за роля на IL-4 и IL-7 които имат роля в растежа и оцеляването на iTregs (*Thornton et al. 2004, Harnaha et al. 2006*). Някои цитокини действат съвместно върху iTregs. Например под действието на IL-6 заедно с IL-1, iTregs „се събуждат“ от състоянието си на анергия и стават чувствителни към регулаторни сигнали (*Kubo et al. 2004*), докато IL-6 заедно с IL-12, обратно, подтискат функцията на iTregs и запазват Th1 клетките от действието им (*King and Segal 2005*).

Както се вижда от казаното дотук, IL-6 по скоро подтиска развитието на iTregs, насочвайки Т лимфоцитите в посока Th17 или в най-добрия случай случай ги прави по податливи на пролиферативни сигнали и то не самостоятелно, а в комбинация с IL-1. През 2009 г. обаче *Nakagawa et al.* описват, че IL-6 директно увеличава субпопулацията на една интересна лимфоцитна субгрупа известна като CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, която има твърде много прилики с iTregs и също така имунносупресивно действие. Тези клетки и действието на IL-6 върху тях, както и аналозите им с iTregs, ще бъдат разгледани по нататък.

Върху поведението на iTregs влияят и лиганди, свързващи техните рецептори TLRs. Така например, свързването на TLR-2 води до повишен пролиферативен капацитет от страна на iTregs, който се съпровожда с намалена супресивна функция, като прекратяването на стимула води до нейното възстановяване (*Sutmuller et al. 2006*). Подобна ситуация се получава при ангажиране на TLR-8 (*Peng et al. 2005*), за разлика от ангажирането на TLR-5, което води до засилена супресивна активност (*Crellin et al. 2005*).

Доказването на наличие на iTregs допълват знанията ни по отношение на ключов компонент от механизъм за имунна супресия, описан с класическото понятие „инфекциозен толеранс“ (*Gershon and Kondo 1971*). Както вече беше споменато съвременния смисъл на понятието, касаещ Tregs, се свързва с възможността образуваните при субимуногенни условия iTregs от своя страна да създават такива условия които да водят до образуване на нови iTregs, от пула наивни Т клетки

(*deLafaille and Lafaille 2009*), като това действие се свързва предимно с активираните iTregs, които експресират /секретират TGF $\beta$  и секретират IL-10, а не с resting фракцията (*Andersson et al. 2008*). На базата на тези факти стои открит въпросът, защо само малка част от Т лимфоцитите придобиват имунорегулаторен фенотип.

## **2.7. Сравнение между nTregs и Tregs**

На **табл. 7** е дадено сравнение по отношение на основните характеристики на двата вида Tregs – nTregs и Tregs. Като цяло може да се обобщи, че iTregs са много по-слабо зависими от ангажирането на техния ТКР, в сравнение с nTregs, а доста по-зависими от фактори като IL-2, TGF $\beta$ , PD-1/ PD-1L връзка и др.

Съществуват някои съмнения доколко супресивните свойства на iTregs са количествено сравними с тези на nTregs (*Chen et al. 2003*), въпреки че принципно това тяхно качество не се поставя под съмнение. Една важна разлика между двата вида Tregs е че при iTregs деметилацията в TSDR региона на FoxP3 локуса е непълна, за разлика от тази на nTregs, като основна роля за стабилността и развитието на FoxP3 при iTregs има CNS1, (*Schmitt and Williams 2013*). Непълната деметилизация в TSDR региона на FoxP3 локуса се отразява на стабилността на FoxP3 молекулката, която при iTregs е по-ниска в сравнение с тази на nTregs. Някои субстанции могат да повишат тази стабилност като например съществуват данни за подобна роля на прогестерон (*Lee et al. 2012*).

За разлика с nTregs, които са ограничени от срещата си с определен брой собствени антигени, iTregs имат възможността да се срещнат с множество чужди антигени, на базата, на което са търсени прилики и разлики в репертоара на ТКР при двата вида клетки. iTregs произхождат от конвенционалните Т лимфоцити, за разлика от специализираната линия на nTregs, произхождаща вследствие на сравнително високо авидитетно свързване, следователно е логично да има разлика в ТКР репертоара на двата вида клетки. Макар и доста противоречиви, резултатите показват съществени разлики, но и известно припокриване ((*Schmitt and Williams 2013*).

**Табл. 7** Сравнение между nTregs и iTregs по отношение на базовите си характеристики

	<b>nTregs</b>	<b>iTregs</b>
<b>Произход</b>	тимус	периферия
<b>Специфичност</b>	Собствени, представени в тимуса антигени	Чужди и собствени антигени, вследствие на инфекции, неоантигени, възпаление, алергени, коменсална микрофлора
<b>Ко-стимулация</b>	CD28	CTLA-4
<b>Цитокинова зависимост</b>	TGFβ ? IL-2 и/или IL-15	IL-2, TGFβ, IL-10
<b>TSRD във FoxP3 локус</b>	Пълна деметилация, стабилна молекула FoxP3	Непълна деметилация, по-нестабилна молекула FoxP3
<b>Специфични маркери</b>	Helios? Neuropilin 1?	няма

## 2.8. Съвременни представи за механизмите на супресия

За да осъществят своята ефекторна функция Tregs първоначално трябва да разпознаят своя антиген чрез T клетъчния си рецептор, като важно условие наред с това е наличието на IL-2 (*Thornton and Shevach 1998*). От тази гледна точка, супресията която осъществяват е антиген-специфична, което важи и за nTregs и за iTregs, но веднъж аактивирани Tregs са способни да супресират и други клетки, а не само носителите на специфичните им антигени, което прави действието им антиген- неспецифично (*Thornton and Shevach 2000*). Tregs експресират T-bet, IRF4 и STAT3, което им дават възможност да контролират Th1, Th2 и Th17, като по този начин участват в поляризацията на имунния отговор (*Koch et al. 2009, Zheng et al. 2009, Chaudhry et al. 2009*). От съществено значение е способността на Tregs да експресират GATA-3, като е доказано, че липсата на GATA-3 води не само до

липсата на Tregs във възпалителните огнища, но и води до трансформиране на клетките във секретирани цитокини Т ефектори (*Wohlfert et al. 2011*). Новите данни за супресията, осъществявана от Tregs описват три пътя на супресия, действащи синергично: контактен, метаболитен и секреторен (*Schmitt and Williams 2013*).

### **2.8.1. Контактен път.**

Един от основните механизми на този път се свързва с IL-2, като Tregs действат като „сунгер”, който “засмуквайки” IL-2 чрез CD25, лишава от този цитокин Т лимфоцитите, с които са в контакт, което се отразява негативно на способността им за активация и пролиферация (*Scheffold et al. 2005*). Изследването на генния профил на подтиснатите CD4+Т лимфоцити показва индукция на гени, анагажирани в процесите на стопиране на растежа и пролиферацията, като впоследствие се стига до апоптоза поради липса на цитокини (*Skiennicki and Fowell 2006*).

Друг механизъм от контактния път на супресия е медиран от CTLA-4 (лиганд за B7, като връзката води до негативен сигнал в таргетната клетка), както и от мембранно свързан TGF $\beta$  и лимфоцит активационния ген 3 (LAG3) (*Tivol et al. 1995, Gorelik and Flavell 2000, Huang et al. 2004*). Част от контактния път е и цитотоксичната молекула Granzym B, която се секретира от Tregs в таргетната клетка при контакт и индуцира апоптоза (*Gondek et al. 2005*).

### **2.8.2. Метаболитен път**

Метаболитната супресия се осъществява чрез „доставяне” на цикличен аденозинмонофосфат (сАМР) при връзка между Treg и клетката мишена. CD39 и CD73 на повърхността на Tregs генерират аденозин, който се свързва със своя рецептор 2A на повърхността на таргетната клетка, като в резултат се увеличава интрацелуларния сАМР, който подтиска функцията на клетката мишена (*Bopp et al. 2007, Deaglio et al. 2007*)

### **2.8.3. Секреторен път**

Осъществява се, чрез секрецията на инхибиторни цитокини, като TGF $\beta$ -1 (*Powrie et al. 1996*), IL-10 (*Asseman et al. 1999*) и IL-35 (*Collison et al. 2007*), като основната роля на тези цитокини е свързана с влияние предимно върху антиген-

представящите клетки, но и върху Т ефекторите. Както става ясно, TGF $\beta$  има двойствена роля в биологията на Tregs, като от една страна е критично важен за образуването на iTregs, а от друга е ефекторен фактор, свързан с имуносупресията, осъществявана от имунорегулаторните Т лимфоцити. Без да се омаловажава ролята на TGF $\beta$  в индукцията на имунна супресия, осъществявана от Tregs, следва да се отбележи, че в този процес централно място заема IL-10. И при двата вида Tregs е установена свръхекспресия на гена за IL-10 в сравнение с конвенционалните Т клетки (*Haribhai et al. 2011*), като съответният цитокин контролира Th17 клетките, както и една малка Т клетъчна субпопулация, комбинираща качествата на Th1 и Th17 (*Huber et al. 2011*). Може би най-важната функция на IL-10 обаче е свързана с едно уникално качество на Tregs - индукцията на споменатият вече неколнократно „инфекциозен толеранс”, феномен известен още като ”bystander suppression”, изразяващ се във възможността Tregs да превръщат своите таргети в имунорегулаторни клетки (*Jonuleit et al. 2002*). Една от основните прояви на този процес е възможността Tregs, чрез секрецията си на IL-10 да модифицират ДК превръщайки ги в толерогенни дендритни клетки, с ниска експресия на B7 и MHC, способни от своя страна да секретират IL-10 (*Hubert et al. 2002, Zou 2006*).

### **2.9. CD4+CD25- FoxP3+ Tregs**

Както беше вече споменато, отдавна на изследователите прави впечатление, че в много ситуации CD4+CD25- клетките се оказват еднакво ефективни в супресивната си функция, осъществявана върху Т и В лимфоцитите и АПК, както класическите Tregs (*deLafaille and Lafaille 2002, Apostolou et al. 2002*). Нещо повече, на миши модели се установява, че свръхекспресия на FoxP3 се наблюдава при CD4+CD25- клетки, които показват същата супресивна активност, както и CD25 позитивните им еквиваленти (*Fontenot et al. 2004*). Следователно се прави извода, че експресията на FoxP3 осигуряваща процес на функционална супресия, сама по себе си води до имунорегулаторен фенотип, без непременно да е обвързана с независимата от нея експресия на CD25 (*Chen et al. 2003*).

Интересът към CD4+CD25-FoxP3+ клетките рязко нараства, когато от няколко групи почти по едно и също време, се установява, че те са увеличени в периферната кръв

на пациенти със системен лупус еритематодес (*Lin et al. 2007, Zhang et al. 2008, Bonelli et al. 2008, Suen et al. 2008*), като процентът им достига до 8% от общата фракция на CD4+ Т лимфоцитите (*Bonelli et al. 2009*). При имунофенотипизиране на CD4+CD25-FoxP+ субпопулацията се установява, че както при лупусни болни, така и при здрави контроли CD4+CD25-FoxP3+ клетките показват сходна експресия на основни Tregs маркери като CD62L, CD95, GITR, CD127, CTLA-4, както CD4+CD25+FoxP3+. Една от разликите е, че при СЛЕ болните CD4+CD25-FoxP3+ клетките са с memory фенотип, за разлика от тези при здравите контроли, където фенотипът е на наивни клетки (*Bonelli et al. 2009*). При СЛЕ, в периферна кръв, както CD4+CD25-FoxP3+, така и класическите CD4+CD25+FoxP3+ са увеличени, (*Lin et al. 2007, Zhang et al. 2008, Bonelli et al. 2008*) наред с увеличеното ниво на IL-6. (*Chun et al. 2007*), като това увеличение корелира с активността на заболяването. Съществува хипотезата, че CD4+CD25-FoxP3+ представляват периферен резервоар, от който се формират класическите CD4+CD25+FoxP3+ Tregs (*Yan and Liu 2009*). Доказано е, че при СЛЕ CD4+CD25-FoxP3+клетките са функционално непълноценни (*Walker et al. 2009*), което съответно води до промененото им влияние върху ефекторните Т клетки и АПК (*Horwitz et al. 2008, Yan et al. 2008, Venigalla et al. 2008*).

През 2010 година *Horwitz* критично разглежда две противоположни концепции относно CD4+CD25- FoxP3+ клетките при лупусни пациенти, публикувани предходната година.

От една страна групата на *Yang* описва, че тези клетки продуцират IL-2 и нямат супресорна активност, като от тази гледна точка CD4+CD25-FoxP3+ по скоро представляват активирани конвенционални Т лимфоцити (*Yang et al. 2009*). От друга страна *Bonelli* и колеги доказват, че CD4+CD25- FoxP3+ не продуцират IL-2, те нямат пролиферативен потенциал и имат, макар и частична супресивна активност, като подтискат Т клетъчната пролиферация. Тези резултати дават основание на авторите да твърдят, че CD4+CD25-FoxP3+ представляват Tregs, макар и частично дисфункционални (*Bonelli et al. 2009*).

Все още няма категорична яснота по отношение на CD4+CD25- FoxP3+, които *Horwitz* окачествява като „мистериозни” (*Horwitz et al. 2010*). Каквато и да е същността на тези клетки, установяването им хвърля сянка върху използването на CD25 като маркер, идентифициращ Tregs. Както вече беше коментирано наличието на CD4+CD25- FoxP3+, заподозряни като Tregs не е единствената причина за това, тъй като CD25 се експресира и при активирани клетки, които нямат имunosупресивна функция. Поради тази причина Tregs субпопулацията все по-често се определя като CD4+FoxP3+ клетки (*Suen et al. 2008, Andersson et al. 2008, Mayer et al. 2011, Li et al. 2013*). Наистина, FoxP3 също може да се експресира при активация на клетки които не биха следвали съдбата на iTregs, но тогава тази субпопулация придобива временен и неособено ефективен имunosупресивен фенотип. Както стана дума FoxP3 се експресира и при CD8+ клетки, за които също се счита, че имат имунорегулаторни функции (*Nakagawa et al. 2009*). Следователно се налага изводът, че FoxP3 сам по себе си обуславя състояние на имunosупресия, като може да се експресира, както върху класическите nTregs произлезли от тимуса, така и върху iTregs, а даже и върху други Т лимфоцитни субпопулации като CD4+CD25-FoxP3+ и CD8+FoxP3+, които се диференцират като регулаторни клетки, в зависимост от условията на средата.

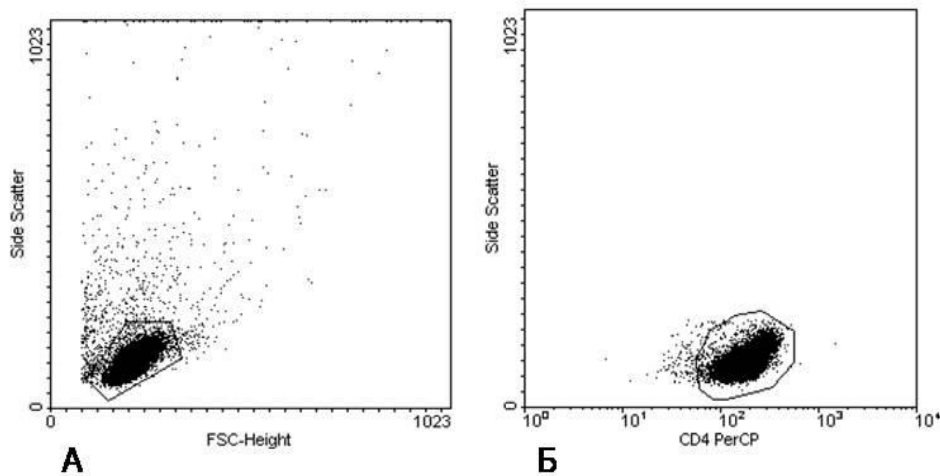
### **3. МСК и Tregs.**

В глава III бяха споменати някои механизми, чрез които МСК генерират Tregs, както и тяхната намеса в системата Th17/Tregs. Тук темата ще бъде допълнително дискутирана на базата на анализ на получените от нас резултати.

#### **3.1. Собствени резултати и дискусия**

Основната идея в експериментите ни засягащи МСК и CD4+FoxP3+, беше че мезенхимните стволови клетки осъществяват имунорегулаторното си действие не само директно върху ефекторните клетки на имунния отговор, но и по „индиректен” път, повлияващи други имunosупресори. В нашата експериментална постановка, използвахме супернатанти от МСК, изолирани от мастна тъка и култивирани, като клетките във всички експерименти бяха на

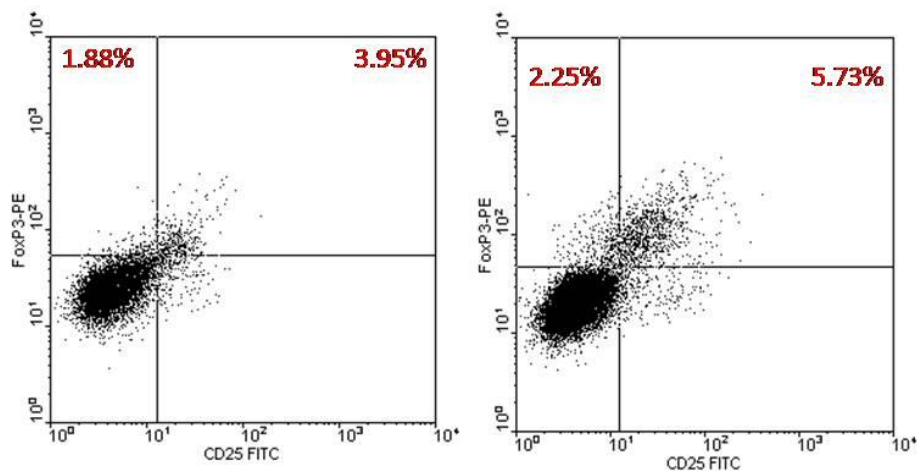
еднакъв пасаж, образували монослой на дъното на плаката, а супернатантата беше взета в еднакви количества, след като не беше сменяна 48 часа. В сравнителен план бяха използвано контролни среди, в които не бяха култивирани МСК. В така получените кондиционирани среди от МСК бяха култивирани CD4+T лимфоцити, получени чрез двойна (отрицателна спрямо CD14 и положителна спрямо CD4), магнитна сепарация, в резултат на която се установи наличие на хомогенна популация от CD4+T лимфоцити ( **Фиг.27**).



**Фиг. 27.** Хомогенна култура от CD4+T лимфоцити, доказана флоуцитометрично, чрез физичните параметри на клетките (А) и експресията им на CD4+(Б) (*Ivanova-Todorova et al. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, с модификации*)

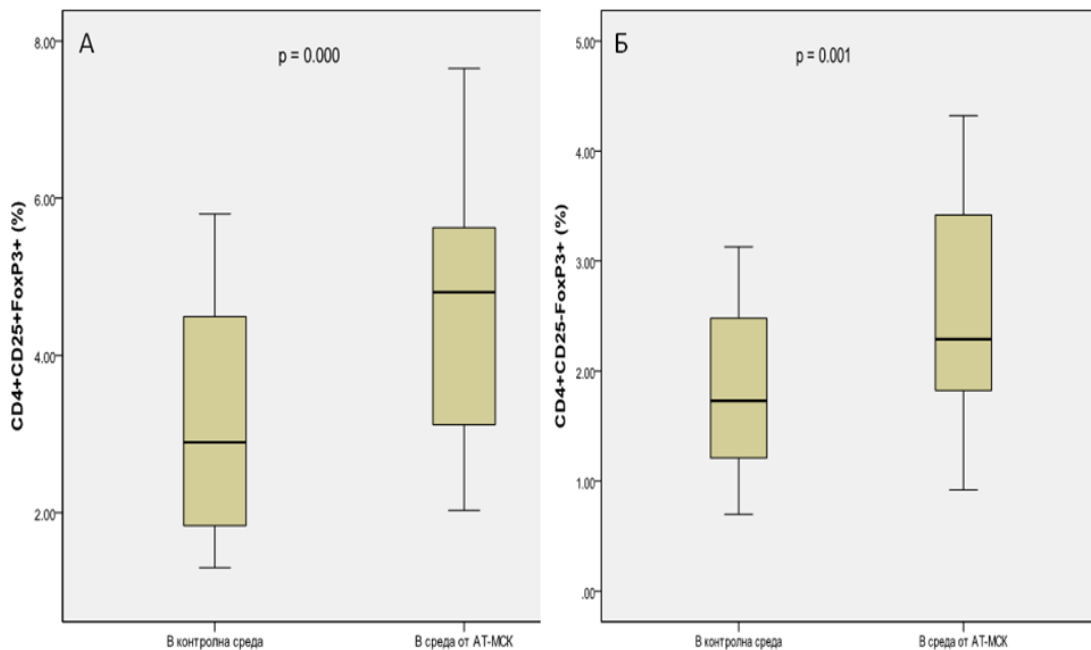
### 3.1.1. Секреторен/и фактор в средите на АТ-МСК води до индукция на Tregs

Култивирането на CD4+T лимфоцитите в среда от АТ-МСК доведе до увеличаване на фракцията на CD4+FoxP3+ клетките, в сравнение с постановката, при която CD4+T лимфоцитите бяха култивирани в контролна среда. Тази зависимост се наблюдаваше във всички 12 независими експеримента, както за CD4+CD25+FoxP3+ , така и за CD4+CD25-FoxP3+ клетките (Фиг.28, Фиг.29, Табл.8).



**Фиг. 28.** Под влияние на среда от АТ-МСК се увеличава процентът CD4+T лимфоцити, експресиращи FoxP3, като процесът засяга, както CD25+, така и CD25-клетки (дясно) в сравнение със CD4+T лимфоцитите, култивирани в контролни среди (ляво). Представителен резултат за 12 експеримента (*Ivanova- Todorova et al. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012*)

Следователно става ясно, че секреторен фактор/и в средите от МСК води до увеличаване на броя CD4+ Т клетки експресиращи FoxP3. Съществуват две теоретични възможности относно природата на клетките, експресиращи FoxP3 под въздействие на фактор/и секретирани от МСК. Първата е това да са активирани клетки, защото, както е известно при активация Т лимфоцитите временно експресират FoxP3 (Wang *et al.* 2007). Ние отхвърлихме тази възможност, поради факта, че изследваните CD4+Т лимфоцити с увеличена FoxP3 експресия, вследствие на МСК секреторно въздействие, показаха същата експресия на ранния и късен активационен маркер, съответно CD69 и HLA-DR, както клетките, култивирани в контролните среди (резултатите не са показани). Освен това в културите с увеличена експресия на FoxP3 липсваше статистическо увеличение на IFN $\gamma$  и IL-2, в сравнение с контролните клетки, а както е известно двата цитокина са ключови при Т клетъчната активация (Фиг.30 В, С).



**Фиг.29** Статистическа сигнификантност на разликите между процента CD4+CD25+FoxP3+ (A) и CD4+CD25-FoxP3+(B) при клетки, култивирани в

контролни среди и среди от АТ-МСК. Посочените стойности са средни от 12 независими експериментални постановка. ( $p < 0.05$ )

**Табл. 8** Под влияние на среда от АТ-МСК се увеличава процентът CD4+T лимфоцити, експресиращи FoxP3, като процесът засяга, както CD25+, така и CD25- клетки

Донор	%CD4+CD25+ FoxP3+ в контролна среда	%CD4+CD25+ FoxP3+ в среда от АТ-МСК	%CD4+ CD25 - FoxP3 + в контролна среда	%CD4+CD25 - FoxP3 + в среда от АТ-МСК
ДК	3.45	4.42	2.12	4.12
ЕИ	2.19	2.91	1.72	2.37
РД	5.04	5.52	1.74	2.26
ЕК	1.47	2.48	2.84	3.06
МГ	3.95	5.73	1.88	2.25
ЕЕ	2.87	4.55	1.01	1.95
ПС	5.80	7.65	2.84	4.32
ЕТ	5.69	5.81	3.13	3.78
ЙФ	1.30	3.33	1.41	2.32
ИФ	1.77	2.03	0.7	1.10
ИБ	1.90	5.39	0.7	0.92
ПП	2.92	5.06	1.6	1.7

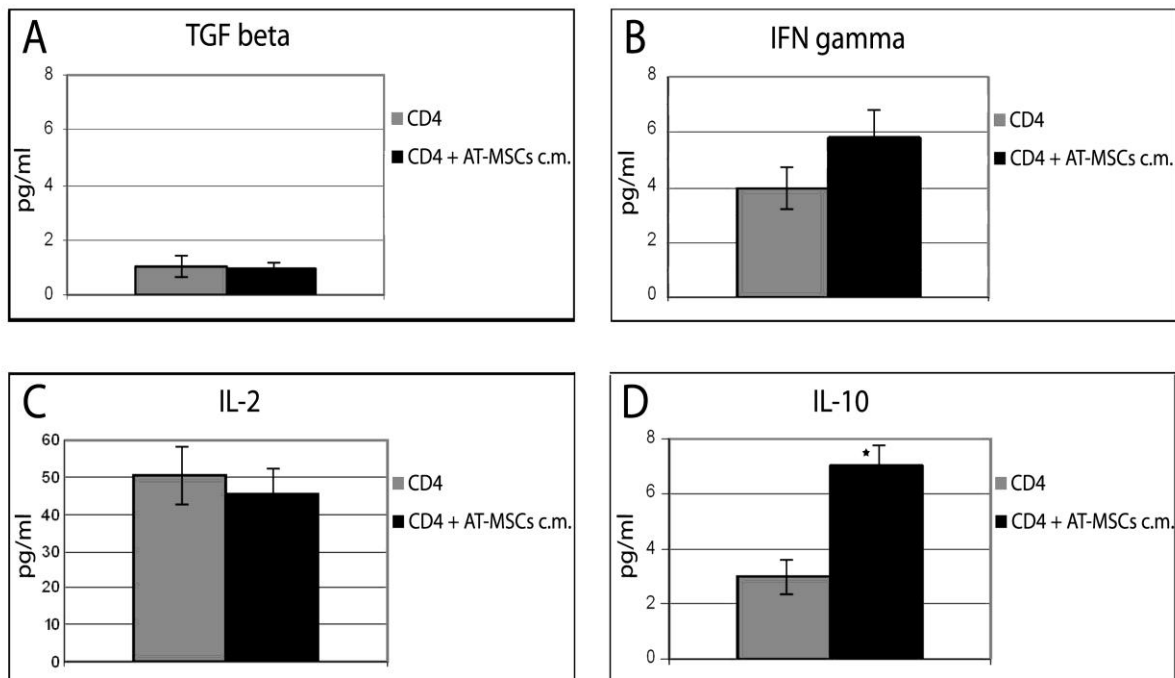
Следователно остава втората възможност, която е секретирани от АТ-МСК фактори да индуцират Tregs. Отговор на въпроса дали получените под влияние на средата от МСК Tregs са de novo генерирани (iTregs) или се засилва пролиферацията на налични nTregs не може да бъде даден с категоричност от нашата експериментална постановка. Въпреки това, наличните в литературата две проучвания по този въпрос са в консенсус, че под влияние на МСК става въпрос за

новогенерирани iTregs. *Engela et al. 2012* доказват, че iTregs получение при взаимодействието си AT-MSC имат метилиран TSDR в локуса на FoxP3, което, както беше казано е характерна черта за iTregs. В съгласие с това са и изследванията на *Luz-Crawford et al. 2013*, които установяват, че iTregs имат твърде ниска експресия на Helios и Nr1 – маркери по-скоро характерни за nTregs. На базата на това, без да е категорично доказано, може да се приеме, че при нашите условия под въздействието на среда на AT-MCK се формират нови iTregs.

Като индиректно доказателство за това може да служи и увеличения процент CD4+CD25-FoxP3+, които според *Yan and Liu 2009*, са резервоар, от който се формират класическите CD4+CD25-FoxP3+. При нашите резултати увеличеният процент на CD4+CD25-FoxP3+ клетките, които не секретират IL-2 (**Фиг.30 C**), подкрепят тезата на *Bonelli et al. 2009*, които твърдят, че тези клетки са, макар и видоизменени iTregs.

### **3.1.2. CD4+ Т лимфоцити секретират IL-10 под влияние на секреторни фактори от AT-MCK**

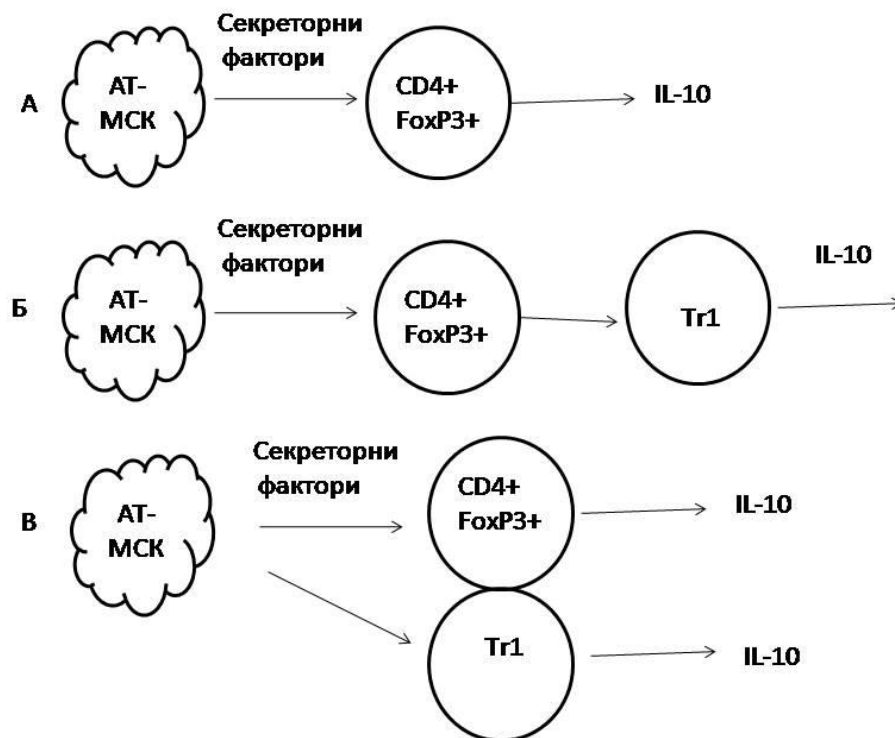
За да се изследва възможността увеличените CD4+FoxP+ Т лимфоцити да са iTregs, ние изследвахме културалните среди на CD4+Т клетките, култивирани със среда от AT-MCK, както и тези на контролните клетки, за секреция на основните цитокини секретирани от Tregs- IL-10 и TGFβ (**Фиг.30 D, A**). Трябва да се отбележи, че при тестиране, нито средата на AT-MCK, нито контролната среда в които бяха култивирани CD4+Т лимфоцитите не показаха секреция на IL-2, IFNγ, TGFβ, IL-10, факт коментиран и в глава II.



**Фиг. 30** Изследване на цитокини секретирани от CD4+Т лимфоцити, под влияние на среда от АТ-МСК (черни стълбчета), в сравнение с цитокини секретирани от CD4+Т лимфоцити, култивирани в контролни среди (сиви стълбчета). Наблюдава се статистически сигнификантно увеличение на IL-10 ( $p < 0,05$ ), докато другите, изследвани цитокини не показаха статистически значими разлики (Ivanova-Todorova et al. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012).

CD4+ Т лимфоцитите под влияние на среда от АТ-МСК не показаха секреция на TGF $\beta$  в сравнение с контролите, каквато би следвало да се очаква на базата на формираните се iTregs, но показаха статистически увеличена секреция на IL-10. Липсата на секреторен TGF $\beta$ , далеч не отхвърля тезата за новообразувани Tregs, тъй като е добре известно, че при тези клетки TGF $\beta$  може да бъде мембранно свързан, а не секретиран, и така да осъществява имunosупресорните си функции (Tivol et al. 1995). Наличието на IL-10, секретиран от CD4+Т лимфоцитите под влияние на среда от АТ-МСК, не ни дава категорично отговори да твърдим, че именно iTregs, са източниците на този цитокин, въпреки, че тази възможност е най-вероятна. Алтернативно, новогенерираните iTregs биха могли да продуцират секреция на IL-10 от ефекторните CD4+Т лимфоцити, превръщайки ги в Tr1 (вид имунорегулаторни клетки, секретират IL-10) (Groux et al. 1997), механизъм

описан при Tregs и известен като „инфекциозен толеранс”. Съществува и трета възможност, свързана с независимо индуциране на Tregs и Tr1, като и едните и другите клетки да секретират IL-10 (Фиг. 31). Във всички случаи имайки предвид увеличения брой iTregs и увеличената секреция на IL-10, който е типичен техен секреторен цитокин, възможността секреторен фактор/и отделян от АТ-МСК да генерира CD4+FoxP3+ клетки, секретирани IL-10 (Фиг.31А) е значително по-вероятна от другите две.



**Фиг. 31** Възможни пътища на секреция на IL-10 от CD4+Т лимфоцити под влияние на секреторни фактори, отделяни от АТ-МСК, съобразно нашите резултати

Наред с другите си свойства, подробно описани в глава II, IL-10, повлиява нееднозначно и апоптотичната активност, описана и от нашия екип при моноцитни дендритни клетки (*Ivanova- Todorova et al. 2009*). Това ни даде основания да

изследваме интрацелуларни про- и анти-апоптотични фактори при CD4+ Т лимфоцитите, като изследването ни не установи разлики между клетките култивирани в среди от АТ-МСК и контролни среди (*Ivanova-Todorova et al. 2012*). По отношение на цитокиновата секреция на Tregs вследствие генерирането им от МСК, както нашите резултати така и описаните в литературата категорично установяват секреция на IL-10 (*Prevosto et al 2007, Luz-Crowford et al. 2013*), докато за TGFβ данните са противоречиви, като групата на *Luz-Crowford* описва секрецията му от индуцираните Tregs, докато тази на *Prevosto* установява незначително увеличение в супернатантите, както последното е в съгласие и с нашите резултати. В изследване на *Engela and al. 2012* авторите описват увеличено количество IL-2, секретирани от ефекторните клетки под влияние на МСК, като се спекулира, че тази секреция води до спомагане на формирането на iTregs. Трябва да се отбележи, че постановката която групата на *Engela* използва, включва ко-култивиране на АТ-МСК и Т клетки, докато в нашите експериментални условия, CD4+Т клетките се култивират само със среда от МСК. Тези разлики биха могли да бъдат твърде съществени по отношение на установяването на IL-2 секреция.

### **3.1.3 IL-6, секретирани от АТ-МСК води до формиране на IL-10 секретирани Tregs?**

Нашите резултати дават логичното основание да се повдигне въпросът кой е факторът/ите, отделяни от АТ-МСК, които водят до индукция на CD4+FoxP3+ iTregs. Самият факт, че МСК водят до индукция на Tregs е добре известен и доказан, както на животински модели, така и при хора (*Prevosto et al. 2007, Selmani et al. 2008, Ye et al. 2008, Bassi et al. 2011, Ben-Ami et al. 2011, Gebler et al. 2011, Engela et al. 2012, 2013, Luz-Crowford et al. 2013, Eggenhofer et al. 2014*). Основните фактори, спрягани в литературата, свързани със de novo генерирането на iTregs от МСК са следните: пряк контакт между клетките (основно PD1/PD-L1), TGFβ, sHLA-G5, PGE2, IDO (*Engela et al. 2013*). Ролята на прекия контакт в генерирането на Tregs традиционно се счита за необходим, въпреки, че трудно би могла да се докаже като самостоятелен фактор (*Luz-Crowford et al. 2013*)

*TGFβ* – Наред с известната му и коментиранията му по-горе роля в генерирането на iTregs, е описано, че той е един от основните секреторни фактори свързани с образуването им под влияние на МСК (*Prevosto et al. 2007, Selmani et al. 2008, Ye et al. 2008, Gebler et al. 2011, Engela et al. 2012, Luz- Crowford et al. 2013, Eggenhofer et al. 2014*).

*sHLA-G5* – Разтворимата форма на нетипичната HLA молекула G5 се счита за един от факторите, водещ до индукция на iTregs от страна на МСК, като се предполага, че HLA-G5 секрецията, следва да се предхожда от пряк контакт между МСК и ефекторните клетки, които биха се диференцирали в Tregs. (*Selmani et al. 2008, Bassi et al. 2011, Ben-Ami et al. 2011, Luz- Crowford et al. 2013*). Интересно е, че този процес е зависим от IL-10, като е доказано, че IL-10 засилва интрацелуларното образуване на HLA-G5 в МСК, както и секрецията му.

*PGE2*- Ролята му се свързва с инхибиция на митогенезата и на IL-2 секрецията, както и с модулацията на FoxP3 протеина (*Engela et al. 2012*), като секрецията му от МСК е категорично доказана (*Selmani et al. 2008, Gebler et al. 2011, Eggenhofer et al. 2014*)

*IL-10*- Ролята на IL-10 в генерирането на iTregs е безспорна, но не така безспорна е секрецията му от МСК (проблемът е разгледан в глава II). Пряката секреция на IL-10 от МСК е дискутабилна, но категорично е установена непряката му роля, свързана със способността МСК да генерират IL-10 секретирани клетки (инфекциозен толеранс), които от своя страна да индуцират създаването на iTregs (*Eggenhofer et al. 2014*)

*IDO* – представлява секретирани от МСК ензим със способност да превръща триптофан в кинуренин. IDO има способността да генерира и активира Tregs (*Gebler et al. 2011*) и секрецията му е описана при МСК (*Engela et al. 2012, Eggenhofer et al. 2014*). IDO, както и I-309 са описани като фактори, които водят до формиране на iTregs, единствено когато МСК са стимулирани от провъзпалителни цитокини (възпалителна среда) (*Newman et al. 2009, Eggenhofer et al. 2014*).

В едно свое проучване *Prevosto et al 2007* година установяват, че блокиране на някои секреторни фактори, отделяни от МСК, които могат да индуциращи Tregs

формирането (TGF $\beta$ , IL-10 и PGE<sub>2</sub>), не спира процесът на генериране на Tregs. От това следва, че най-вероятно факторите действат комплексно или съществуват и допълнителни неописани досега такива.

В търсене на отговор на въпроса за фактора/ите ангажирани в индукцията на Tregs ние използвахме „изчистена” експериментална постановка, като в системата имаше само двама „участници”: среда от АТ-МСК и пречистени CD4+Т лимфоцити. Това ни даде основание да игнорираме редица фактори, свързани с формирането на Tregs, описани в научната литература. Очевидно при нашите условия субоптималното стимулиране чрез ТКР, както и чрез ко-стимулаторни молекули, едва ли биха могли да бъдат фактори за формирането на Tregs. В нашата постановка липсва и междуклетъчен контакт, така че остава единствено ролята на секреторните фактори. По тази причина средите от АТ-МСК бяха изследвани за 36 секреторни фактора. Основните секреторни фактори, обуславящи Tregs формирането, IL-2 и TGF $\beta$ , не бяха установени в средите на АТ-МСК. Също така не се установиха и други цитокини, участващи в Tregs формирането по литературни данни, като IL-10, IL-1, IL-4 и IL-7. Няма логика, също така средата на АТ-МСК да съдържа лиганди за TLR рецепторите на CD4+ Т лимфоцитите, още повече това би било спомагателен, а не основен фактор. Същото важи и за ретиноидната киселина, която влияе върху Tregs в комбинация с TGF $\beta$ . Нашите изследванията, освен, че изключват ролята на прекия контакт в генерирането на Tregs от МСК, не установиха в супернатантите на АТ-МСК и наличието на „обичайните заподозрени” TGF $\beta$ , IL-10, IL-2, I-309. Секреция на IDO не беше изследвана, но имайки предвид нейната роля при „активирани” МСК, в нашият модел едва ли би се открила, още повече, че другата подобна молекула, експресирана при същите условия (I-309) не беше установена.

Друг ключов фактор, секретирани от МСК и повлияващ формирането на Tregs е PGE<sub>2</sub>, който често е зависим от TGF $\beta$  и също не беше изследван.

Както беше описано в глава II, резултатите ни показаха наличие на CXCL-1/Gro $\alpha$ , IL-8, Serpin E, CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1, MIF, CXCL12/SDF-1 и IL-6 в супернатантите на АТ-МСК (Kyurkchiev et al. 2013, M.A. Hayat (ed.), *Stem Cells and*

*Cancer Stem Cells*). Както е добре известно Gro $\alpha$ , IL-8, Serpin E, RANTES и SDF-1 са хемокини и от тази гледна точка може да се спекулира, че *in vivo* са важни за привличането на Т ефекторни клетки с последващата индукция на iTregs от тях. Единственият сред установените от нас, секретирани от МСК хемокини, с описано действие върху формирането на iTregs е CCL2/MCP-1 (*Akiyamata et al. 2006*)

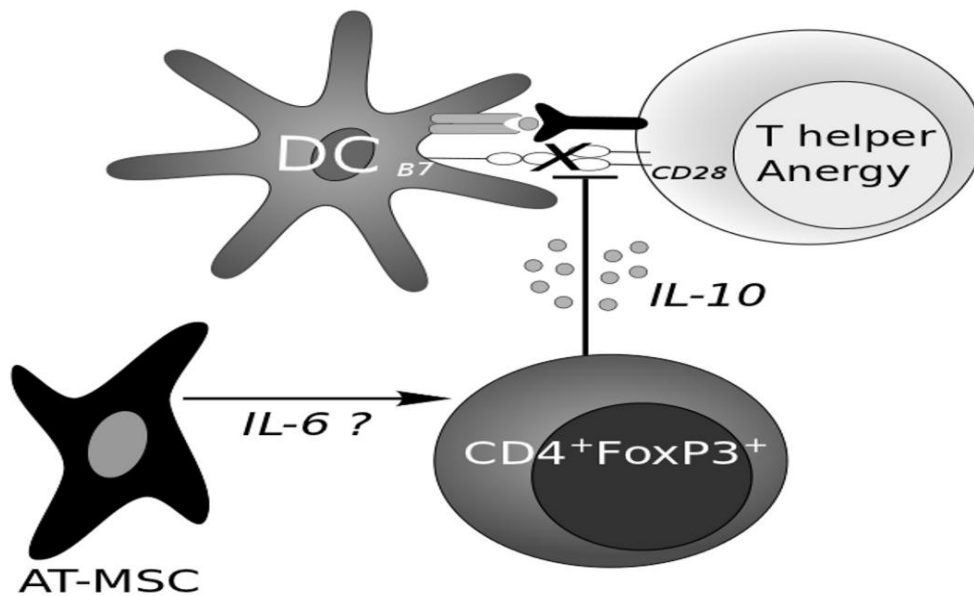
Цитокин с несъмнено имунорегулаторно действие, който установихме в супернатантите на МСК беше IL-6. Както подробно беше обяснено в глава II секрецията на IL-6 от МСК е категорично и недвусмислено доказана във всички проучвания по темата. Също така беше разгледана двойнствената му природа, до голяма степен свързана с анти-инфламаторното му действие и особено способността му да индуцира толерогенни дендритни клетки (*Djouad et al. 2007*) и да увеличава секрецията на IL-10 от тях, както и от Tregs (*Steensberg et al. 2003, Bouffi et al. 2010*). Няколко факта, наред с установяването му в среди на АТ-МСК ни дават основание да го свържем с генерирането на Tregs:

- При СЛЕ, в периферна кръв, CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> са увеличени, (*Lin et al. 2007, Zhang et al. 2008, Bonelli et al. 2008*) наред с увеличеното ниво на IL-6. (*Chun et al. 2007*)
- IL-6 заедно с IL-1, водят до „събуждане” на iTregs от състоянието на анергия и ги правят стават чувствителни към регулаторни сигнали (*Kubo et al. 2004*)
- IL-6 и PGE2 се секретират от МСК и действайки автокринно, взаимно потенцират действието си, като PGE2 категорично се свързва с генерирането на Tregs от МСК (*Bouffi et al. 2010*), като на базата на това авторите правят единствената открита в литературата директна спекулация, че IL-6 е ангажиран с създаването на Tregs.
- Наличие на CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> клетки, позивно регулирани под действието на IL-6 (*Nakagawa et al. 2009*)

CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> клетките са популация с еднакъв фенотип (с изключение на CD8) и развитие, както това на класическите Tregs (*Mayer et al. 2011*). Съществуват спорове доколко тяхната супресивна активност е еквивалентна на класическите

Tregs. Според някои изследвания  $CD8+FoxP3+$  само частично подтискат пролиферацията на Т клетките и секрецията им на  $IFN\gamma$ , докато според други  $CD8+FoxP3+$  са ефективни супресори и се създават именно под действието на IL-6, който контролира тяхното развитие и функции (*Nakagawa et al. 2009*).

В заключение нашите резултати показват, че под действието на секреторен/и фактори, отделяни от МСК се увеличава броя на  $CD4+FoxP3+$  регулаторните клетки и се увеличава секрецията на IL-10, като най-вероятно именно генерираните iTregs са източник на тази секреция. При анализът на секретирания цитокин от неактивирани МСК, ние считаме че роля за създаването на iTregs има секретирания от АТ-МСК IL-6 (Фиг. 32), който би могъл да действа заедно с PGE2 и CCL2/ MCP-1.



**Фиг. 32.** Теоретичен модел на имуномодулация, осъществявана от секреторни фактори, отделяни от АТ-МСК. Предполагаме, че секретирания IL-6 (вероятно заедно с PGE2 и CCL2), индуцира Tregs, секретирани IL-10. От своя страна IL-10 обуславя толерогенен тип дендритни клетки, които допълнително участват в процеса на имуносупресия (*Ivanova-Todorova et al. 2012*).

Мезенхимните стволови клетки, безспорно осъществяват имунорегулаторното си действие, използвайки едни от най-важните клетки „посредници“- Tregs. Тези клетки, обаче не са единствените „супресори“, които МСК повлияват в изпълнение на индиректната част от инхибиторната си функция. Въздействието на МСК върху дендритните клетки, както и сложните взаимни връзки МСК/Tregs/дендритни клетки, които на практика са в основата на МСК предизвиканата периферна супресия, ще бъдат предмет на следващата глава.

## **4. Използвани материали и методи**

### **4.1.Периферна кръв**

По 8 ml периферна венозна кръв беше взета чрез венепункция по от 12 здрави доброволци на възраст между 27 и 60 години. Всички бяха подписали информирано съгласие, в съответствие на етичните стандарти в УМБАЛ „Св. Иван Рилски“- София

### **4.2.Масна тъкан**

Бяха използвани 7 проби от масна тъкан, доставени ни след хирургични интервенции, свързани с операции на тазобедрената става и бедрената кост, извършени в Клиника по Ортопедия и травматология, Университетска болница „Царица Йоанна- ИСУЛ“, София. Донорите бяха подписали информирано съгласие в съответствие с правилата на Етичната комисия на Университетска болница „Царица Йоанна- ИСУЛ“

### **4.3.Мезенхимни стволови клетки**

Мезенхимните стволови клетки от масна тъкан бяха изолирани и култивирани и фенотипизирани, използвайки стриктно общоприетите лабораторни протоколи описани в глава I.

### **4.4.Кондиционирана среда**

След формирането на монослой АТ-МСК се отлепят от дъното на плаката чрез третиране с Trypsin-EDTA (РАА, Austria) и се посяват в 6 ямкова плака (пасаж 1) в концентрация  $5 \times 10^4$  на ямка в културална среда DMEM с 10% ФТС и антибиотици (РАА, Austria). Клетките се култивират до достигане на 80% конfluентност, като

културалната среда се сменя на 48 часа. След последната смяна, клетките достигнали 80% конfluентност се култивират още 48 часа, след което средата се събира. Тази процедура стриктно се следваше при 12 независими експеримента извършени с излолирани CD4+T клетки, от 12 индивида.

#### **4.5.Изолиране на CD4+T лимфоцити**

Изолирането на T хелперни лимфоцити, чрез магнитна сепарация е описано в глава III

#### **4.6.Клетъчно култивиране**

Изолираните CD4+T лимфоцити бяха култивирани със средата от AT-MCK за 60 часа. Като контрола бяха използвани CD4+T лимфоцити култивирани в DMEM със 10% ФТС. Клетките бяха посети в концентрация  $5 \times 10^6$  на ямка в 24 ямкови плаки (РАА, Austria).

#### **4.7.Флоуцитометрия**

Хомогенността на пречистената CD4+T клетъчна популация беше доказана чрез използването на anti- човешки моноклонални антитела anti-CD3 FITC, anti-CD4 PE. С цел определяне на активационния статус на anti-CD4+T лимфоцитите бяха използвани anti-CD4 FITC, anti-CD69 PE, anti-HLA-DR. Доказването на Tregs беше извършено по повърхностната експресия на CD4 и CD25 и интрацелуларната на FoxP3, използвайки anti-CD4 PerCP-Cy5.5, anti- CD25 FITC и anti-FoxP3 PE, както и FoxP3 buffer set, като се използваше стандартната процедура препоръчана от фирмата производител (BD, CA, USA). Отчитането беше извършено чрез флоуцитометър FACSCalibur (BD, CA, USA).

#### **4.8.Ензим свързан имуносорбентен метод (ELISA)**

Супернатантите на CD4+T лимфоцитите, култивирани в среди от AT-MCK, тези на лимфоцитите, култивирани в контролните среди, както и кондиционираната среда на AT-MCK бяха тествани за наличие на следните цитокини : IL-2, IL-10, TGF $\beta$ , IFN $\gamma$ , като бяха използвани Human Instant ELISA (Bender MedSystems, Austria), като бяха спазени стриктно изискванията на фирмата производител.

#### **4.9.Proteome Profiler kits**

Анализът на секретирани фактори от АТ-МСК беше извършен чрез Human Cytokine array panel A array kit (R&D Systems, MN, USA) , които е в състояние да идентифицира 36 цитокини, хемокини и растежни фактори (C5a, CD40L, G-CSF, GM-CSF, GRO $\alpha$ , I-309, sICAM-1, IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-16, IL-17, IL-17E, IL-23, IL-27, IL-32 $\alpha$ , IP-10, I-TAC, MCP-1, MIF, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , Serpin E1, RANTES, SDF-1, TNF $\alpha$ , TREM-1).

С цел да идентифицираме наличие на промяна в про- и анти апоптоичните фактори при CD4+Т лимфоцитите, култивирани в среда от АТ-МСК и контролна среда беше използван Proteome profiler human apoptosis kit (R&D Systems, MN, USA), способен да идентифицира интрацелуларната експресия на 35 фактора (Bad, Bax, Bcl-2, Bcl-x, Pro-Caspase-3, Cleaved Caspase-3, Catalase, clap-1, clap-2, Claspin, Clusterin, Cytochrome C, TRAIL R1/DR4, TRAIL R1/DR5, FADD, Fas/TNFSF6, HIF-1 $\alpha$ , HO-1/HMOX1/HPS32, HO-2/HMOX2, HSP27, HSP60, HSP70, HTRA2/Omi, Livin, PON2, p21/CIP1/CDKN1A, p27Kip1, Phospho-p53(S15), Phospho-p53(S46), Phospho-p53(S392), Phospho-AD17(S635), SMAC/Diablo, Survivin, TNF RI/TNFRSF1A, XIAP).

#### **4.10. Software**

Анализът на флуоцитометричните изследвания беше извършен със софтуерните продукти CellQuest (BD, USA) и WinMDI 2.9. Анализът на резултатите извършени с Proteome Profiler kits беше направен, чрез използването на Image J програма (NIH, Bethesda, USA)

#### **4.11. Статистически методи**

Статистическият анализ на данните от цитокиновите концентрации, изследвани чрез ELISA беше направен с използването на Students T-test, като за достоверни се приеха резултатите при  $p < 0,05$ .

# V. Въздействие на МСК върху моноцитните дендритни клетки

## 1. Въведение

Наред с влиянието върху Т регулаторните лимфоцити, мезенхимните стволови клетки оказват индиректното си имunosупресивно действие и чрез друг „посредник” – дендритните клетки.

Дендритните клетки (ДК) са може би най-разнообразните клетки на имунната система. Описани през 1973 година от *Sreinman and Cohn*, ДК са най-мощните антиген-представящи клетки и са хетерогенна група, която се различава по своя произход и функция. Някои от тях произхождат от лимфоидния ред и се означават като плазмацитоидни, а други от миелоидния, които съответно са миелоидни. Основаната част от последните са ДК произхождащи от кръвните моноцити. В зависимост от функцията си ДК са в състояние да осъществяват два противоположни ефекта – индукция на имунен отговор, функция, която определя ДК, като „имуногенни” и индукция на имунен толеранс, което ги определя като толерогенни (Фиг. 33).



**Фиг 33.** Видове дендритни клетки по отношение на произход и функция. Трябва да се отбележи, че „имуногенни” и „толерогенни” не са различни видове дендритни клетки, а функционално състояние, свързано предимно със степен на зрялост.

Различното действие върху имунния отговор се определя, не от различни видове дендритни клетки, а от степента на тяхното съзряване, като незрелите са ангажирани в индукция на толеранс, предимно чрез секреция на IL-10, докато съзряването води до индуциране на имунен отговор, предимно чрез IL-12. Иmunният отговор може да бъде по посока клетъчен или хуморален, което се определя от въздействието на ДК върху Т лимфоцитите. Дендритните клетки осъществяват три основни функции в имунния отговор- антигенно представяне, транспорт и регулация. По отношение на последната си функция, те влизат в сложни отношения и с други имуномодулаторни клетки като CD4+FoxP3+ и МСК. От казаното дотук може да се направи изводът, че ако в имунните

взаимоотношения има клетка, която може да се определи като „организатор”, на имунния отговор, това безспорно е дендритната клетка (*Banchereau and Steinman 1998*). Цялостно разглеждане на дендритните клетки е извън целите на настоящата работа, поради което настоящата глава ще бъдат разгледани миелоидните дендритни клетки, като се обърне по специално внимание на тяхната роля в имунния толеранс и взаимоотношенията им с мезенхимните стволови клетки.

## **2. Произход**

Относно произходът на ДК все още има твърде много неизяснени аспекти. Дендритните клетки произхождат от CD34+ хемопоеичните стволови клетки, разположени в костния мозък и в интестиналната lamina propria, като плазмацитоидните дендритни клетки, произхождат от лимфоиден прогенитор, а миелоидните – от миелоиден (*Bogunovic et al. 2009*). Относно миелоидните ДК са описани прогениторни клетки CD34+CD14+, които под влияние на PЕСАМ-1 се насочват към диференциацията в миелоидна посока (*Ferrero et al. 1998*). Част от прекурсорите на ДК пролиферират и се разполагат в костния мозък, слезката и лимфните възли, като се диференцират в миелоидни ДК при хомеостатични условия. Основната част от миелоидните ДК обаче се формират от кръвните моноцити при възпалителни условия (*Cheong et al. 2010*).

### **2.1.Плазмацитоидни дендритни клетки**

Установяват се в циркулацията и в периферните лимфоидни органи, имат ниска антиген-представяща способност, като секретират слабо МНС II и ко-стимулаторни молекули. Те не експресират типичните за миелоидните ДК маркери като CD11c, но експресират рецептор за IL-3 (CD123) и особено C тип лектиновия рецептор BDCA-a (CD303) (*Dzionek et al 2001*). Може би най-важната тяхна способност е да секретират големи количества IFN I ( $\alpha$  и  $\beta$ ), в следствие на активацията на Toll-like рецепторите им 7 и 9 (TLR-7 и TLR-9) от вирусни нуклеинови киселини (*Cella et al. 2009*).

### **2.2.Фоликуларни дендритни клетки**

Разположени са в герминативните центрове, където представят антигени на В лимфоцитите, като по този начин поддържат техния паметов фенотип. Друга тяхна функция е структурно- опорна по отношение на лимфоидния фоликул. Установено е, че експресират повърхностните рецептори CD21, CD23 и CD35, както и маркери специфични за определени стадии на клетъчния цикъл като DRG-1, Ki-M4 или DR53 (*Kim et al. 1994*). Като цяло се счита, че въпреки името си, взето поради морфологична прилика, фоликуларните дендритни клетки на практика не са дендритни клетки.

### **3. Миелоидни дендритни клетки**

Наричани са още „конвенционални дендритни” и под понятието „дендритни клетки” в настоящата работа се имат предвид именно те. Миелоидните дендритни клетки, и по точно, тази тяхна субпопулация, диференцирала се от кръвните моноцити, ще бъдат единствения обект на разглеждане в настоящата глава. Това са клетки с изключителна способност за антигенно представяне, експресиращи високи нива МНС II, интегрин CD11c, адхезивните молекули LFA-1 (CD11a), LFA-3 (CD58), ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD50), ICAM-3 (CD102) и CD80 и CD86 (двете молекули, образуващи B7 комплекса). След съзряването си ДК експресират и CD83. Лангерхансовите клетки в кожата са представители именно на този тип ДК (*Salusto and Lanzavecchia 1994*)

#### **3.1. Имуногенни дендритни клетки**

Дендритните клетки са най-мощните и ефективни антиген представящи клетки, които експресират високи нива на ко-стимулаторни молекули и молекули от МНС комплекса, като наред с това секретират множество цитокини и хемокини, които инициират или засилват Т и В лимфоцитните отговори (*Alaniz et al. 2004*). Тези отговори включват индуциране на диференциация по посока Th1 или Th2, активация както и стимулиране на CD8+ цитотоксичния Т клетъчен отговор, (*Maldonado-Lopez et al. 2001, Eisenbarth et al. 2003, Alaniz et al. 2004, Smith et al. 2004*) Имуногенните ДК участват и в съзряването на В лимфоцитите, превключване на класа и секреция на антитела (*Gerloni et al. 1998, MacPherson et*

*al. 1999*). Освен имуногенно действие ДК са изключително важни фактори в осъществяването на процесите, свързани с имунен толеранс, които поддържат имунната хомеостаза на организма. Тези противоположни действия на ДК намират своето обяснение във факта, че ДК не са хомогенна популация и най-вече не са на еднакъв стадий на съзряване. Като цяло се счита, че незрелите ДК са неинфламаторни и индуциращи толеранс, а зрелите са свързани с имуногенно действие. Въпреки, че тази догма звучи леко елементаризирано, тя отразява доста точно реалното положение на нещата (*Wallet et al. 2004*). Незрелият фенотип на ДК се характеризира с ниска експресия на ко-стимулаторни молекули като CD40, CD80 и CD86 и висок потенциал за фагоцитоза (*Mahnke et al. 2002*). Те циркулират в кръвта и могат да проникнат в периферните тъкани, където поемат антигени от инфекциозни огнища или умиращи клетки, чрез механизмите на фагоцитоза, макропиноцитоза и ендоцитоза (*Steinman et al. 1999*). Високият потенциал за фагоцитоза, характерен за незрелите ДК се определя от наличието на множество фагоцитни рецептори на повърхността им, като CD14, scavenger receptor A (SR-a) и Fc рецептори (FcγR1, FcγR2b и FcγRIII) (*Schuurhuis et al. 2002, Tobar et al. 2004*). Наред с описаните, важна роля и играят и рецепторите от C- лектиновата фамилия DEC205, DCIR и манозния рецептор CD206, които директно залавят антигена и го насочват по пътя на обработването му в ендозомите или цитозола (*Villadangos and Schnorrer 2007*). Дендритните клетки са в състояние да експресират и TLRs, NOD-like и RIG-like рецептори, които им позволяват да разпознават т.нар. PAMPs (pathogen associated molecular patterns) локализирани в/върху бактериите и вирусите, като LPS или вирусни нуклеинови киселини. (*Janeway and Medzhitov 2002*). Също така ДК са изключително ефективни в разпознаването на фактори от страна на организма, отделяни в екстрацелуларното пространство вследствие на клетъчната увреда, т.нар. DAMPs (damage associated molecular patterns), като HMGB1 или S100A/ В протеините. Сред рецепторите на ДК особено важно място заемат TLRs, като миелоидните ДК експресират TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 и TLR-8 за разлика от плазмацитоидните ДК, които експресират TLR-7 и TLR-9 (*Coccia et al. 2004, Ito et al. 2005*). След активирането на TLRs стартира сигнална

каскада с участието на адапторните молекула MyD88 и NFκB, както и интерферон регулаторни фактори, които водят до съзряването на ДК. Следователно, от една страна фагоцитозата, съпроводена със сигнал от TLRs води до съзряването на ДК, ускореното обработване на погълнатия материал и ефективното му представяне (Blander *et al.* 2004), а от друга различните субкласове ДК експресират специфични TLRs, което позволява осъществяването на специализиран отговор към различните типове патогени (Proietto *et al.* 2004).

След фагоцитозата и след последвалата активация и съзряване, ДК преминават от периферните тъкани в локалните лимфни възли, където съзряват допълнително и осъществяват антиген-представящата си функция. Вследствие на рецептор медираната фагоцитоза ДК обработват антигенния пептид и го представят на CD4+ Т лимфоцитите в комплекс с молекула от МНС клас II, с активното участие на ко-стимулаторни молекули, като транспортът на пептид свързаната МНС молекула се съпровожда с повишената експресия предимно на CD80 и CD86, образуващи B7 комплекса. Наред с това се повишава експресията и на HLA-DR, CD40, CD1a и CD54 (Reis e Sousa 2006).

Дендритните клетки са ангажирани в осъществяването на имунния синапс чрез четири вида взаимодействия. Първо, комплексът МНС/ пептид се разпознава от Т клетъчния рецептор, второ свързването на ICAM-1 на повърхността на ДК с LFA-1 на повърхността на Т лимфоцита засилва контакта между клетките, трето комуникацията B7 на ДК със CD28 на Т клетката, осигурява безусловно необходимата ко-стимулация и четвърто CD40 на ДК взаимодейства със CD40L на Т клетъчната повърхност, което води до повишена секреция на IL-12 - основния цитокини, насочващ Т клетъчния имунен отговор в посока Th1 (Schmidt *et al.* 2012). При определени обстоятелства, като например хелминтни инфекции съзрелите дендритни клетки могат да секретират цитокини, насочващи имунния отговор в Th2 посока (van Duivenvoorde *et al.* 2006).

Една интересна особеност на ДК е тяхната способност да представят екзогенни антигени в комплекс с молекула от МНС I на CD8+Т лимфоцитите – процес, който е изключение от класическите пътища на антигенно представяне, известен като

cross presentation и характеризиращ се с обработка на екзогенни антигени в цитозола (*Joffre et al. 2012*). Способността на ДК за осъществяване на cross presentation обогатява значително тяхната антиген-представяща способност и по този начин обогатява механизмите на имунния отговор, които могат да се включат чрез имуногените дендритни клетки.

Известни са много фактори, които допринасят за съзряването на ДК и формирането на имуногенни дендритни клетки, като основно място заемат: про-инфламаторните стимули, като PAMPs и DAMPs, които са, както обекти на разпознаване с цел фагоцитоза, така и фактор водещ до съзряването на ДК, което съзряване от своя страна е ключово за индукция на Т лимфоцитен имуноен отговор (*Werling et al. 2003*). Съзряването на ДК е от съществено значение и за тяхната способност за миграция в лимфните възли, като съзрелите ДК вследствие на про-инфламаторни стимули стават силно мобилни и мигрират в локалните лимфни възли, където достигат Т клетъчните зони (*Lindquist et al. 2004*). Този трафик на ДК се медира от хемокиновия homing рецептор CCR7 вследствие на действието на основно два хемокина- CCL19 и CCL21 (*Riol - Blanco et al. 2005*).

Вследствие на проинфламаторните стимули, част от които са PAMPs, се удължава времето на контакт между ДК и Т клетките, което е принципна разлика с незрелите дендритни клетки, които контактуват с Т лимфоцитите за кратък период. Именно този удължен контакт между зрели ДК и Т лимфоцити води до ефективна Т клетъчна активация и пролиферация (*Hugues et al. 2004*). Казано с други думи, дали дендритните клетки ще определят условия на имуногенност и толеранс зависи от две групи причини, свързани една с друга – стадия им на съзряване и времето им на контакт с Т клетките.

Активирането на различни TLRs при ДК и последвалото им съзряване е пряко свързано и със секрецията на различни про-инфламаторни цитокини като IFN-I, IL-1, IL-12 и TNF $\alpha$ , които са необходими за диференциацията на наивните Т клетки в посока на различни хелперни субпопулации (*Proietto et al. 2004*).

Между ДК и Т лимфоцитите има и други взаимоотношения, свързани с контакта им в Т лимфоцитните зони в лимфните възли. Т клетките непрекъснато

„инспектират“ съдържанието на комплексите МНС/ пептид, в търсене на антигенния пептид, към който е насочен техният рецептор. Контактът между тях и ДК, които НЕ носят специфичния им пептид, а носят собствени пептиди в комбинация с МНС, води до генериране на сигнал в Т лимфоцитите, който засилват тяхната антигенна чувствителност към все още несрещнатия антигенен пептид. (*Garbi and Kreutzberg 2012*) Този механизъм все още не е достатъчно изяснен, но води до поддържане на непрекъсната готовност на Т лимфоцитите.

От ключово значение за влиянието на ДК върху Т лимфоцитите (както и обратното) е взаимодействието между ко-стимулаторни молекули на повърхността на комуникаращите си клетки, осигуряващи т.нар. „втори сигнал“. Концепцията на три сигналния модел, необходим за имунния отговор е разработена първоначално от *Lafferty and Woolnough* през 1977 и дообогатена от групата на *Schwartz*. Според тази идея първият сигнал е връзката между ТКР и епитопа, представен от МНС молекулата, който обаче не се оказва достатъчен за имуноен отговор, и при наличието само на него Т лимфоцитите са неотговарящи и в състояние на анергия (*Jenkins and Schwartz 1987*). Следователно, вторият сигнал осъществяван чрез ко-стимулаторни молекули, се явява задължително условие за въздействие на ДК върху наивните Т лимфоцити. В тесен смисъл на думата под „втори сигнал“ обикновено се има предвид взаимодействието CD28 от страна на Т клетката със В7 комплекса ( CD80/ CD86) от страна на ДК (*Aruffo and Seed, 1987, Freeman et al. 1989*). В по широк смисъл „вторият сигнал“ може да бъдат и други молекули, осъществяващи ко- стимулация, която води до Т клетъчна пролиферация (**Табл. 9**) или ко-инхибиция, подтискаща Т клетъчния имуноен отговор (**Табл. 11**) (*Bakdash et al. 2013*)

Цитокините, секретирани от ДК, както и втория сигнал определя развитието на т.нар. „трети сигнал“, изразяващ се в диференциация на наивните Т лимфоцити в различни видове ефекторни или толерогенни клетки (*De Jong et al. 2005*). Няколко вида междурецепторни взаимодействия между ДК и Т клетките, осъществяващи ко-стимулация определят имуногенния фенотип дендритни клетки и са представени на **Табл.9**, (*Bakdash et al. 2013*).

**Табл.9** Ко-стимулаторни рецепторни взаимоотношения, водещи до имуногенност на ДК и Т клетъчна активация

Дендритни клетки	Т лимфоцити
CD80/ CD86	CD28
CD40	CD40L
ICOSL (inducible T cell co- stimulator ligand)	ICOS (inducible T cell co-stimulator)
CD70	CD27
Ox40L	Ox40
4-1BBL	4-1BB
GITRL (Glucocorticoid induced TNFR related gene ligand)	GITR (Glucocorticoid induced TNFR related gene)
LIGHT	HVEM (herpes virus entry mediator)
TIM 3 (T cell Ig domain and mucin domain)	Galectin 9
TIM 4	TIM 1
ICAM 1( intracellular adhesion molecule 1)	LFA-1
LFA-3 (lymphocyte function associated antigen)	CD2

Имуногенната функция на ДК се свързва и с прякото им влияние върху В лимфоцитите в техните зони в периферните лимфоидни органи, по Т независим механизъм, като ДК са в състояние директно да модулират В клетъчното оцеляване и диференциация. За целта са необходими две условия: а.) представяне на антиген от ДК на В клетките, които директно го разпознават със своя имуноглобулинов рецептор, б.) секреция от страна на ДК на BlyS (B -lymphocyte stimulator) и APRIL (a professional inducing ligand). BlyS и APRIL се свързват с рецепторите им на повърхността на В лимфоцитите, което засилва способността им за оцеляване по пътя на индукцията на NFκB и анти-апоптоичния Bcl-2 (*Xu and Banchemau 2014*)

Централната роля на дендритните клетки в имунния отговор се демонстрира много добре при изследване на участието им в патогенезата на автоимунните заболявания. Установено е, че модифицирани мишки със специфичен дефект в

апоптозата на ДК развиват лупусоподобни симптоми, характеризиращи се с акумулиране на ДК и хронична лимфоцитна активация (*Chen et al. 2006*). На тази база, изводът, който се прави е, че неконтролирани ДК сами по себе си водят до автоимунитет. При много експериментални модели на автоимунитет се описва натрупване на ДК в засегнатите тъкани и във вторичните лимфоидни органи (*Rosmalen et al. 2000, Kalled et al. 2001, Adachi et al. 2002, Colonna et al. 2006*). Други експерименти разкриват, че поемането на апоптотични клетки, опсонизирани с антитела засилва способността на ДК да представят „свое”, и тези ДК индуцират или засилват автоимунните състояния (*Bondanza et al. 2003, Eriksson et al. 2003*). Именно представянето на собствени антигени на Т лимфоцитите, както и участието им в активацията на автореактивните В лимфоцити е в същността на имуногенното действие на ДК при автоимунните състояния (*Gallo and Gallucci 2013*). Множество изследвания показват абнормно активирани ДК при пациенти с автоимунни заболявания (*Amodio and Gregori 2012*). При генетично модифицирани мишки с автоимунни заболявания, ДК показват абнормност при култивиране, много след като вече не са в микросреда благоприятстваща автоимунитет (*Sriram et al. 2012*). Това дава основание на хипотези, предполагащи вътрешен дефект в ДК който води до ексцесивната им активация (*Elkon and Stone 2011*). Алтернативни резултати обаче показват, че тези абнормности в ДК съществуват само *in vivo*, което дава основание да се счита, че те са по скоро следствие от „автоимунната среда”, а не причина за нея (*Colonna et al. 2006*).

Основно значение за имуногенността на дендритните клетки имат т.нар. *danger signals*, понятие въведено от *Polly Matzinger* през 1994, за да означаи ендогенни молекули отделяни при клетки в състояние на некроза или клетъчен стрес, които са в състояние да активират дендритните клетки. Малко по рано *Janeway 1989* формулира концепцията си, гласяща, че вродената имунна система се активира от високо консервативни молекули експресирани от еволюционно далечни микроорганизми, като тези молекули са наречени *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs). Тази теория до голяма степен осъвременява класическите виждания за отграничаване „свое”/ „чуждо”. *Matzinger* твърди, че фактори от

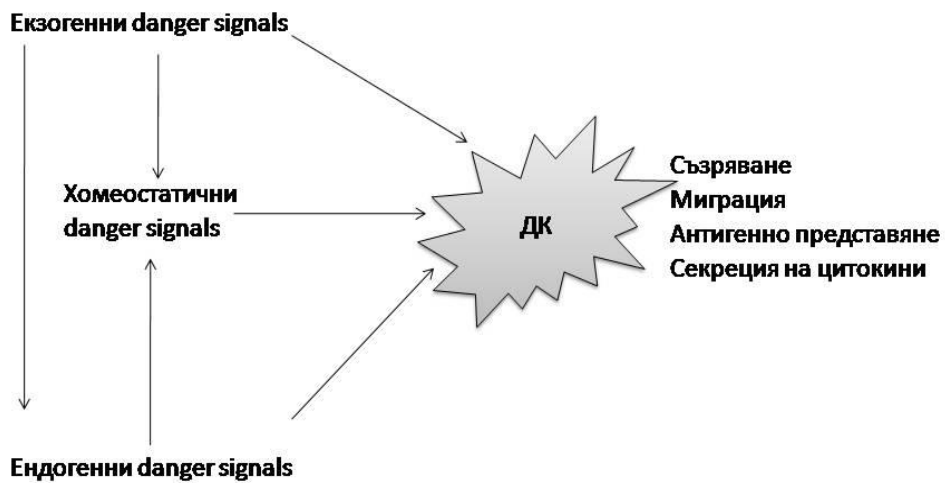
страна на макроорганизма, които се проявяват вследствие на клетъчно и тъканно увреждане въздействат по подобен на PAMPs начин, играейки роля на danger signals, които активират вродената имунна система (най-вече ДК), която е в състояние да разграничи „опасно” от „неопасно”. Тези danger signals, са наречени DAMPs (damage associated molecular patterns) по подобие на номенклатурата на Janeway (Seong and Matzinger 2004). Към по широкото определение за DAMPs се отнасят екзогенни фактори като PAMPs, както и ендогенни молекули отделяни от макроорганизма вследствие на клетъчен стрес, увреда и нефизиологична клетъчна смърт (DAMPs в тесен смисъл на думата) (Matsinger, 1998, 2002)

Gallo and Gallucci 2013 допълват концепцията за DAMPs като ги разделят на екзогенни, ендогенни и хомеостатични, като определят първите две категории като „класически” и разделят ендогенните на „първични” – когато се секретират от клетки в състояние на стрес или умиращи клетки и „вторични” – когато се продуцират от активирани имунни клетки. По отношение на хомеостатичните danger signals, които са подвид на ендогените, авторите ги определят като „нарушения на хомеостазата, вследствие на възпаление”. Класификацията на DAMPs, както и най-типичните представители от различните групи е представена на Табл. 10.

**Табл. 10** Damage associated molecular patterns (DAMPs) (Galli and Gallucci 2013 с модификации)

DAMPs	
Екзогенни	PAMPs на микроорганизмите
Ендогенни	Нуклеинови киселини, ендогенни вирусни елементи, пикочна киселина, протеини на топлинния стрес (HSPs), IFN I, продукти на деградация на екстрацелуларния матрикс, high mobility group box protein 1 (HMGB1)
Хомеостатични	Киселинност, осмоларитет, хипоксия, температура

Трите групи DAMPs, често си взаимодействат, като основната клетка обект на действието им е именно дендритната клетка, която отговаря със съзряване, повишена способност за миграция, повишена способност за антигенно представяне и цитокинова секреция (Фиг. 34)



**Фиг. 34** Трите основни групи DAMPs си взаимодействат и водят до активиране на ДК, изразявано, чрез нейното съзряване, миграция, способност за антигенно представяне и секреция на цитокини

Концепцията за ролята на вродения имунитет в генерирането на имунния отговор поставя дендритните клетки в центъра на събитията, като основен участник, организатор и посредник с по-съвършените механизми на придобития, специфичен имунитет.

### 3.2. Толерогенни дендритни клетки

Дендритните клетки имат основна роля в предотвратяването на автореактивните състояния и в индукцията на толеранс, като тези свойства са характерни за незрелите дендритни клетки, които са се диференциали от моноцитите, но не са съзрели. Както беше, описано те се характеризират с висока способност за фагоцитоза и ниска експресия на ко-стимулаторни молекули, което им дава възможност да поглъщат и представят антигени без наличието на ко-стимулация. Това от своя страна предизвиква индуциране на анергия в Т клетките (*Jonuleit et al. 2000, Lutz et al. 2000, Reis e Sousa 2006, Manicassamy and Pulendran 2011*). Въпреки, че тази догма безспорно е вярна, в последните години се описани напълно зрели ДК, експресиращи високи нива на ко-стимулаторни молекули, които проявяват имуносупресивни свойства (*Schmidt et al. 2012*). Нещо повече, описани са и ДК на междинен стадий между зрели и незрели, които експресират високи нива на ко-стимулаторни молекули, но секретират ниски нива на проинфламаторни молекули и се характеризират с имуноинхибираща функция (*Lutz and Schuler 2002*). Следователно, толерогенните ДК се характеризират с голяма хетерогенност, която вероятно се дължи на пластичността на ДК, които реагират на сигнали от микросредата и това определя функцията им.

### **3.2.1. Фактори повлияващи формирането на толерогенни ДК**

#### **3.2.1.1. IL-10**

Третирането на незрели ДК с IL-10, индуцира толерогенен фенотип, който води до подтискане на Т лимфоцитите, което засяга, както Th1 и Th2, така и CD8 цитотоксичните лимфоцити. Основното действие на IL-10 е не върху диференциацията на ДК, а по скоро върху способността им за съзряване, като под негово действие те:

- не секретират про-инфламаторни цитокини като IL-12, TNF $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\beta$  (*De Smedt et al. 1997*).
- не могат увеличават експресията си на ко-стимулаторни молекули като CD80, CD86 и CD40 (*McBride et al. 2002*)
- не стимулират Т клетъчната пролиферация (*Jonuleit et al. 2000, Moore et al. 2001*)

Основният механизъм на действие, който се дискутира е индукцията на фосфоинозитол-3-киназа (PI3K) и сигналния трансдюсер и активатор на транскрипцията 3 (STAT-3), които блокират активацията на NFκB - ключов фактор, регулиращ ДК развитието, съзряването, цитокиновата секреция и ко-стимулаторната експресия. Тези процеси се отразяват, както на експресията на ко-стимулаторни молекули, така и на секрецията на проинфламаторни цитокини. Допълнителен механизъм е експресията на мембранните IL-3 и 4 (immunoglobulin-like transcript), които взаимодействат с Т клетките и индуцират в тях диференциация по посока Tr1. (Wallet *et al.* 2005). Описаният механизъм е класически пример за „инфекциозен толеранс”, тъй като една имунорегулаторна клетка (ДК) „създава” друга такава - Tr1

#### 3.2.1.2. TGFβ

TGFβ е друг цитокин ангажиран в ранното развитие на ДК, който води до потискане на активацията на незрелите дендритни клетки, както и на тяхното съзряване. Под негово действие върху ДК:

- се блокира експресията на CD80 и CD83, което се отразява негативно на способността на ДК да стимулират Т лимфоцитите (Strobl *et al.* 1999)
- намалява експресията на TLR-4, което води до намалена чувствителност към фактори съзряващи ДК (особено LPS) (Mou *et al.* 2004)
- намалява способността на ДК да секретират IL-12 и IL-6 (Tada *et al.* 2004)
- намалява експресията на CCR7 на повърхността на ДК, което се отразява негативно на техния трафик в лимфните възли (Ogata *et al.* 1999).

Точният механизъм на действие на TGFβ по посока толерогенни дендритни клетки не е установен, като се счита, че една възможна мишена на TGFβ действието е транскрипционния фактор, известен като RunX3 (Wallet *et al.* 2005)

#### 3.2.1.3. PGE2

За разлика от описаните дотук фактори, PGE2 има нееднозначно действие върху ДК, като при различни условия действа по посока индукция на имуногенност или толеранс, като това се определя от силата на сигнала, времето на експозиция и

комбинацията с други фактори. В условия на остро възпаление PGE2 засилва експресията на CCR7 на повърхността на ДК, което засилва способността им за трафик към лимфните възли (*Scandela et al. 2002*). По късно обаче се доказва, че това е временен ефект като под действието на PGE2, ДК намаляват секрецията си на CCL19 – ключов хемокин привличащ наивни и central memory Т лимфоцити (*Muthuswamy et al. 2010*). При условия на хронично възпаление, PGE2 влияе върху ДК в посока формиране на толерогенен фенотип клетки, секретирани IL-10 (*Kalinski et al. 1997*). Също така е установено, че PGE2 в комбинация с TNF $\alpha$  индуцират регулаторни дендритни клетки, секретирани IL-10 и IDO (*Popov and Schultze 2008*)

#### 3.2.1.4. Апоптотични материи

Клирънсът на апоптотични клетки и материи е многофакторен процес, в който са ангажирани и дендритните клетки, сред които само незрелите са способни на фагоцитоза на апоптотични материи. Ясно е, че при тези условия не е желателно развитието на имуноен отговор, а по скоро индукция на толеранс, в който активно участват и толерогенните дендритни клетки (*Steinman et al. 2000*) Незрелите ДК, третирани *in vitro* с апоптотични клетки показват нарушена способност за продукция на IL-12 и на стимулация на Т лимфоцитите, като третирането с LPS не дава възможност за преодоляване на незрялото състояние, от което може да се съди, че ефектът е стабилен и дълготраен (*Wallet et al. 2005*). Демонстрирано е, също така, че апоптотичните клетки подтискат дендритно клетъчните отговори към бактериален ендотоксин (*Stuart et al. 2002*). Тези ефекти на апоптотичните клетки са в ярък контраст с ефекта при некроза, където се индуцира съзряване и имуногенност на ДК (*Sauter et al. 2004*)

Един любопитен факт е, че незрелите ДК са в състояние да поглъщат апоптотични и некротични дендритни клетки, като вследствие на това не се генерира danger signal, а дендритните клетки се насочват в толерогенна посока и започват да секретират TGF $\beta$  (*Kushwah and Hu 2010*)

#### 3.2.1.5. IL-6

Под влияние на апоптотични клетки, дендритните клетки секретират IL-6, който действа по автокринен механизъм и засилва незрелия им толерогенен фенотип. Под действието на IL-6 се активира STAT-3, което води до блокиране на сигналите за съзряване на ДК и експресията на CD80, CD86, CD40 и МНС II, което от своя страна силно редуцира капацитета на ДК да активират Т лимфоцитите. (*Takahashi and Kobayashi 2003*).

Установено е, че целенасоченото активиране на гените свързани с IL-6 продукцията на ДК, води до формирането на толерогенни дендритни клетки, като knock-out мишки по IL-6 ген демонстрират чувствително повишение на броя на зрели имуногенни ДК (*Liang et al. 2008*). Тези факти директно свързват IL-6 с индукция на толерогенен тип дендритни клетки.

През 2008 *Liang et al.*, описват нов механизъм за формиране на толерогенни дендритни клетки включващ, както IL-6, така и HLA-G. Според този модел HLA-G се свързва с ILT-4, експресиран на повърхността на дендритните клетки, като това свързване води до активиране на две тирозин фосфатази – SHP-1 и SHP-2. Вследствие на това се активира NFκB, което води до продукция на IL-6. Новосинтезираният IL-6 действа автокринно върху ДК и след свързването си с gp130 активира STAT-3 системата, вследствие на което намалява вътреклетъчното ниво на цистатин С, който е ендегенен инхибитор на катепсините. Увеличава се експресията на катепсин S, което има като последици намалена експресията на МНС II на повърхността на дендритната клетка (*Liang et al. 2008*). Разбира се, IL-6 може да действа и паракринно върху ДК и да доведе до тези ефекти и без посредничеството на HLA-G.

### 3.2.1.6. Tregs

Взаимоотношенията между Т лимфоцитите и толерогенните ДК са изключително важни и двупосочни, като водят до взаимно формиране, както и до формиране на други видове имунорегулаторни клетки (T<sub>g</sub>1). Описани са няколко рецептора (**Табл.11**) на повърхността на ДК и Т лимфоцитите, свързването, между които влияе на комуникаращите си клетки по посока формиране на имуномодулаторен фенотип (*Bakdash et al. 2013*)

**Табл.11** Ко-инхибиторни рецепторни взаимоотношения, водещи до толерогенни ДК, имунорегулаторни Т клетки, и потиснат Т лимфоцитен отговор

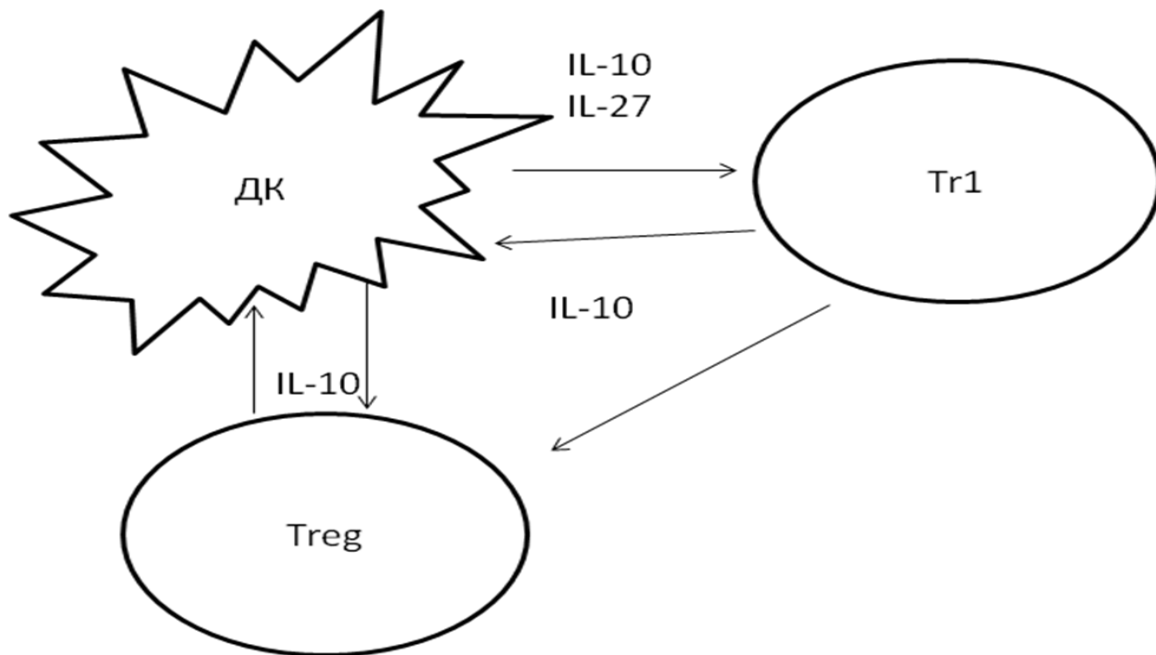
Дендритни клетки	Т лимфоцити
CD80/ CD86	CTLA-4
PD-L1, PD-L2	PD1
B7-H3, B7-H4	?
HVEM	BTLA, CD160
ILT3	?
ILT4	HLA-G
МНС II	LAG-3
	Nrp-1

Като най-важни в процеса на имуносупресия, както и като фактори повлиявани от МСК, ще бъдат разгледани основно взаимоотношенията между ДК и CD4+FoxP3+ клетките, наричани още Tregs.

Множество изследвания доказват въвличането на Tregs в създаването на толерогенни дендритни клетки, като под действието на Tregs, се описват ДК с намалената експресия на ко-стимулаторния комплекс В7 (CD80/ CD86) и като последствие потискане на капацитета за активация на Т ефекторните лимфоцити (*Caderbom et al. 2000*). При миши модел на астма отстраняването на Tregs води до наличието на ДК с висока експресия на МНС II, CD80 и CD86, от което следва повишен капацитет за активиране на Т ефекторни клетки (*Mahnke et al. 2007*). Счита се, че основна роля в този механизъм имат някои цитокини, секретирани от Tregs (IL-10, TGFβ) и някои рецепторни молекули експресиращи се на повърхността на Treg като CTLA-4, LAG3, Nrp-1.

Както беше споменато ефектът на IL-10 върху ДК води до понижена експресия на МНС и CD80/ CD86, както и до понижена секреция на проинфламаторни цитокини като IL-1β, IL-6 и TNFα за сметка на повишена секреция на IL-10, TGFβ и IL-27 (*Mahnke et al. 2007, Awasthi et al. 2007*). IL-10, секретираш се от ДК под действието

на IL-10 с източник Tregs, води до диференцирането на наивните Т лимфоцити, в друг вид имунорегулаторни клетки - Tr1, което е още една част от веригата на взаимодействия между клетки ангажирани в процеса на имуномодулация. Получава се взаимодействие между три вида клетки, всяка от които секретира IL-10, действащ върху другите две. Едновременно с това IL-10 действа и автокринно върху трите вида, секретирани го клетки(Фиг. 35)



**Фиг. 35** Под действието на IL-10, секретирани от Treg, ДК придобиват толерогенен фенотип и секретират IL-10. Този цитокин, води до създаването на регулаторните Tr1 от пула на наивните Т лимфоцити. Tr1 от своя страна секретират IL-10, който засилва толерогенния фенотип на ДК и имунорегулаторните свойства на Tregs. Вследствие на това ДК и Tregs взаимно се потенцират чрез IL-10 секреция.

Действието на TGFβ по отношение на индукция на толерогенни дендритни клетки беше коментирано по-горе.

По отношение на рецепторни взаимодействия между Tregs и толерогенните ДК, най-важна роля в генерирането на последните има CTLA-4 молекулата, която конститутивно се експресира на повърхността на Tregs. CTLA-4 е важен фактор в имунната супресия, като е установено, че дефицитът ѝ води до лимфопролиферация и тежки автоимунни заболявания (Wing *et al.* 2008).

Основната роля на CTLA-4, която е хомолог на CD28 е да свързва B7 (CD80/86) комплекса на повърхността на ДК, но ефектът на това свързване е точно противоположен на B7/CD28 взаимодействието (*Linsley et al. 1991*). CTLA-4 медира подтискане на експресията на B7 чрез интернализирането и деградацията му (процес известен като транс-ендоцитоза) (*Qureshi et al. 2011*) а също така води до индукция на IDO от ДК. IDO от своя страна проявява имуносупресивни свойства чрез действието си върху катаболизма на триптофан (*Baban et al. 2009*) B7-H4 и B7-H се рецептори на повърхността на ДК, които се експресират засилено под действието на секретирания IL-10 от страна на Tregs и са едни от факторите, които водят до толерогенен фенотип ДК (*Kryczek et al. 2006*). Също така лимфоцитния активационен ген 3 (LAG-3) който е CD4 хомолог и е експресиран на повърхността на Tregs свързва MHC II молекулите на повърхността на ДК и тази връзка води до инхибиторен сигнал, подтискащ съзряването на ДК (*Liang et al. 2008*). Друг фактор експресиран предимно от Tregs е Nrp-1 (неутропилин), който засилва адхезивните способности на Tregs и удължава контакта им с ДК (*Sarris et al. 2008*).

Следователно ДК и имунорегулаторните Т лимфоцити (особено Tregs) взаимодействат, както чрез цитокини, така и чрез преки контакти, като в резултат на тези взаимодействия, комукиращите си клетки засилват своя имуносупресивен фенотип.

## **4. Имунорегулаторни действие на толерогенните ДК**

### **4.1. Генериране на Т регулаторни клетки**

Както стана дума взаимодействията между ДК и Tregs са двустранни, и както Tregs участват във формирането на толерогенни ДК, така се наблюдава и обратния процес. Генерирането на Tregs от толерогенни ДК се медира, както от секреторни фактори (**Табл. 12**), така и от прекия контакт между клетките.

**Табл.12** Секреторни фактори отделяни от толерогенни ДК, които влияят на генерирането на Т регулаторни клетки

ДК секретирани цитокини	Ефект върху формирането на iTregs
IL-10	Заедно с IL-27 води до генерирането на iTregs и Tr1 ( <i>Awasthi et al. 2007</i> ), (Фиг. 35)
TNF $\alpha$	Индуцира формирането на iTregs, секретирани IL-10 ( <i>Mahnkete et al. 2007</i> )
TGF $\beta$	Насочват наивните Т лимфоцити към Tregs диференциация ( <i>Ghiringhelli et al. 2005</i> )
IL-2	Ключов цитокин за формирането на Tregs (действието му е подробно описано в глава IV)
IDO	Важна роля във формирането на iTregs ( <i>Mellor and Munn 2004</i> )

По отношение на прекия междуклетъчен контакт са описани няколко вида рецептори, ангажирането, на които води до индуциране на регулаторни Т клетки.

Свързването на антигени от DEC-205 рецептора на повърхността на незрелите ДК, води до интернализиране на антигена, липса на съзряване на ДК, формиране на толерогенен фенотип ДК, под действието, на които се създават на условия за формирането на Tregs (*Hawiger et al. 2001*).

*Gorczynski et al. 2006*, описва, че свързването на CD200R2 рецептора върху незрелите дендритни клетки също води до способност за генериране на Tregs, които подтискат реакцията на смесена лимфоцитна култура и отхвърлянето на присадката.

Взаимодействието между наивни Т лимфоцити, експресиращи PD-1 рецептор, който се свързва с PDL-1 и PDL-2 на повърхността на ДК, при наличието на TGF $\beta$  води до формиране *de novo* на Tregs. Нещо повече при наличните на iTregs, тази връзка води до повишена експресия на FoxP3 и засилен имunosупресивен капацитет (*Francisco et al. 2009*). Друг вид рецептори, експресирани от толерогенните ДК са ILT3 и ILT4, които при свързването си със своите Т клетъчни

лиганди са способни да трансформират ефекторните Т лимфоцити в iTregs (Manavalan et al. 2003). Донякъде парадоксално са описани имуногенни рецепторни взаимодействия (Табл. 9) на повърхността на ДК и Т клетките, връзката между които води до формиране на Tregs. Така например, установена е значителна експресия на OX-40 на повърхността на nTregs, който комуникира с OX-40L на повърхността на ДК, като се счита, че този сигнал е важен за оцеляването на nTregs. Същите сигнални взаимоотношения в отсъствие на IL-4 и IFN $\gamma$ , водят до експанзия на iTregs (Ruby et al. 2009). Подобна е ситуацията при имуногенните взаимодействия 4-1BBL/ 4-1BB, GITRL/ GITR и ICOSL/ ICOS, които действат синергично с IL-2 стимулирайки експанзията на Tregs (Elpek et al. 2007, Stephens et al. 2004, Burmeister et al. 2008).

#### **4.2.Подтискане на Т ефекторите**

Генерирането на Т регулаторни субпопулации далече не е единствен механизъм за супресия, осъществяван от толерогенните ДК, като наред с него, те могат директно да подтискат Т ефекторите. Освен чрез секрецията на имуносупресивни цитокини като IL-10 и TGF $\beta$ , тази супресия се осъществява и чрез някои междурецепторни взаимоотношения.

- Свързването на PD1 върху повърхността на Т клетките от неговите лиганди на повърхността на ДК (PD-L1 и PD-L2) води до блокирането на Т клетъчната пролиферация, цитокиновата продукция и цитолитичната активност, чрез нарушаване процесите свързани с Т клетъчното оцеляване (Riley 2009). По този начин се регулира реактивността, експанзията и функциите на ефекторните Т клетки (Keir et al. 2006)
- Свързването на B7-H3 от все още неустановения му Т клетъчен лиганд, води до подтискане на активацията на ефекторните Т клетки (Leitner et al. 2009), докато свързването на B7-H4 при стимулация на ТКР, има за резултат, както подтисната пролиферация, така и цитокинова продукция. Ефектът на B7-H4 при свързването на Т клетките се обуславя от индуциране на арест в клетъчния им цикъл (Sica et al. 2003).

- HVEM провежда негативни сигнали към Т клетките чрез своите лиганди BTLA и CD160, като при свързване с BTLA се подтиска антиген -зависимата Т активация (*Sedy et al. 2005*), докато при свързване със CD160, който се експресира предимно върху CD8+ и активирани CD4+ се подтиска активацията и цитокиновата продукция на Т лимфоцитите (*Cai et al. 2008*)
- Свързването на DEC-205 води до делеция на антиген-специфични Т клетки (*Hawiger et al. 2001*)
- Както беше споменато връзката B7/CTLA-4 води до формиране на толерогенни дендритни клетки които продуцират IDO – генератор за про-апоптотични метаболити вследствие на катаболизъм на триптофана (*Baban et al. 2009*) Под тяхно действие се стига до Т лимфоцитна активация, последвана от бърза апоптоза.

Може би най-важният механизъм обаче, чрез който толерогенните дендритни клетки подтискат ефекторните Т лимфоцити е липсата на класическия втори сигнал B7/CD28. Както вече беше коментирано той е дефинитивно условие за активация на Т лимфоцитите и липсата му води до състояние на анергия в тях, характеризираща се е драматичен срив на продукцията на IL-2 и други ефекторни цитокини, при наличие на стимулация на ТКР (първи сигнал) (*Schwartz 1997*). Това е и основният механизъм, чрез който ДК осъществяват толеранс срещу „свое” /„неопасно”. Незрелите дендритни клетки, представят собствени антигени и експресират ниски нива на CD80/ CD86, като по този начин не представят втори сигнал на Т лимфоцитите, което води до тяхната анергия и впоследствие, регулация на пропуснатите от тимуса автореактивни клонове (*Steinman and Nussenzweig 2002*)

Толерогенните дендритни клетки осъществяват своето действие при два вида ситуации, които се разглеждат в настоящия труд като пример за интензивна локална имунна супресия – бременност и злокачествени заболявания.

## **5. Толерогенни дендритни клетки при бременност**

Локалният имунен толеранс е дефинитивно изискване за развитие на успешна бременност, поради което не е изненадващ факта, че ДК присъстват в децидуата по време на бременност (*Kammerer et al. 2000, 2003, Gardner et al. 2003, Ivanova et al. 2005*). Утеринните дендритни клетки имат някои особености. Въпреки очакванията, че те индуцират толеранс и не експресират ко-стимулаторни молекули, е установено, че утеринните ДК експресират високи нива на CD83, CD80, CD86, CD40 и HLA-DR (*Kammerer et al. 2003, Miyazaki et al. 2003, Ivanova et al. 2005*), което според парадигмата им определя статут на зрели имуногенни ДК. При тестиране на цитокиновата им секреция, обаче, се установява ниска секреция на IL-12 и висока секреция на IL-10 и IDO, както и способност да насочват имунния отговор по посока Th2 (*Miyazaki et al. 2003, Gardner et al. 2003, Ivanova et al. 2005, Salamone et al. 2012*) Този интересен фенотип се определя от *Biois et al. 2007* като „полузрели“ ДК, които са частично имуногенни, но направляващи имунния отговор по посока благоприятна за развитието на бременността. Наред с това, съществуват данни, че утеринните ДК са ангажирани активно в процеса на имунен толеранс, като се счита, че основна роля за формирането му има контактът с трофобластните клетки и НК клетките (*Gardner et al. 2003, Biois et al. 2007*). По отношение на контакта с трофобластните клетки от важно значение е комуникацията HLA- G, експресиран върху трофобластните клетки и ILT4 експресиран на утеринните ДК. Както вече беше казано, това взаимодействие води до активиране на IL-6 секрецията, която по автокринен механизъм обуславя толерогенен фенотип ДК (*Linag et al. 2008*)

В децидуата са налични много от факторите обуславящи толерогенен фенотип ДК – PGE2, TGF $\beta$ , IL-10 и др., а самите ДК секретират IL-10, който е основен фактор за формиране и на други имунорегулаторни клетки като iTregs (*Biois et al. 2007*).

Може би най-важните елементи, които действат в посока на толерогенни и Th2 насочващи ДК са женските полови хормони, чието действие върху дендритните клетки е разгледано в глава VI.

Следователно в децидуата се наблюдават дендритни клетки, които едновременно носят белезите на имуногенни Th2 насочващи (CD83, B7, CD40, HLA-DR) и

толерогенни ( IL-10 и IDO секреция), ситуация, вероятно възникнала във връзка със специфичните условия по време на бременността.

## **6. Толерогенни дендритни клетки при злокачествени тумори**

Взаимоотношенията дендритни клетки/ злокачествени тумори, далеч надхвърлят целите на настоящия труд, поради което тук ще бъде обърнато внимание само на някои от по важните механизми, водещи до толерогенен фенотип на ДК в туморното обкръжение – една ситуация, която представлява основна пречка пред ефективния антитуморен имунен отговор.

Туморът силно наподобява собствени структури, поради което първоначално се развива при невъзпалителни условия, вследствие на което неговите антигени се представят от ДК по същия начин, както собствените антигени. Липсва стимул за съзряване на дендритните клетки, които остават в незряло състояние и представят антигени възприемани като „свои”. Впоследствие на това се индуцира пероферен толеранс (*van Duivendoorde et al. 2006*). Механизмите на това явление обаче са доста сложни и многостранни. При много видове злокачествени заболявания се установява, че ДК са силно намалени в туморното обкръжение, както и в циркулацията, което свидетелства за значителни промени в процеса на генериране на дендритни клетки (*Almand et al. 2000, Gabrilovich et al. 2004, Tjomsland et al. 2010*). При други тумори се засяга диференциацията и съзряването на ДК, което води като резултат до липса на Т клетъчна активация и анергия при Т лимфоцитите (*Ma et al. 2012, Shurin et al. 2012*). Твърде елементарно би било да се каже, че диференциацията или съзряването на ДК е просто блокирано и ДК остават незрели, поради което толерогенни. По скоро блокирането в съзряването на ДК, вследствие на туморното обкръжение, води до формиране на тумор асоциирани регулаторни дендритни клетки, описавани от някои автори като DCregs, които не само подтискат Т клетъчната активация, но и привличат допълнителни имуносупресивни клетки като Tregs (*Gabrilovich et al. 2012*). Следователно туморното обкръжение действа на ДК на две нива, от една страна блокира тяхното съзряване или диференциация, а от друга промотира формирането на

имуносупресивни дендритни клетки, надхвърлящи като способности обикновената незрялост.

### **6.1.Блокиране на диференциацията или съзряването на ДК**

Дендритни клетки в туморното обкръжение показват слаба способност за антигенно представяне, ниска експресия на костимулаторни молекули и намалени миграционни свойства (*Gabrilovich et al. 2004, Yang and Carbone, 2004*), в резултат на което имат слаба способност на индуцират Т клетъчна пролиферация в алогенна смесена лимфоцитна култура *in vitro* (*Troy et al. 1998*). При опити за диференциация на моноцити към дендритни клетки в кондиционирана среда от простатни или панкреасни туморни клетъчни линии, се установява ниско ниво на експресия на HLA-DR, CD40, CD80, CD86, както и CD83- маркер характеризиращ зрелите ДК (*Aalamian et al. 2001, Bharadwaj et al. 2007*). Също така, под действието на фактори на простатен карцином, дендритните клетки показват невъзможност за увеличаване на експресията си на CD80 и CD86 под влияние на LPS (*Michielsen et al. 2011*). Наши резултати, също показват намалена до лписваща B7 (CD80/ CD86) експресия от ДК при изолирането им от Glioblastoma multiforme (*Tumangelova-Yuzeir et al. 2014*)

Множество секреторни фактори, отделяни от туморите като IL-6, M-CSF, VEGF директно подтискат диференциацията на ДК, като тя остава до ниво моноцити, експресиращи ниски нива МНС и костимулаторни молекули, като клетките се характеризират с намалена NFκB активност (*Menetrier-Caux et al. 1998, Oyama et al. 1998*). Същото действие проявяват ганглиозидите GD2 и GM3 секретирани от невробластомни клетки, както и GD3 и GM3 секретирани от миеломните клетки, като последните не само инхибират диференциацията на ДК, но и индуцират апоптоза в тях (*Shurin et al. 2001, Péguet-Navarro et al. 2003, Bennaceur et al. 2009*). Циклооксигеназите COX-1 и COX-2 секретирани от простатен карцином, блокират ДК диференциацията, като е известно, че не само туморните, но и стромалните клетки в туморното обкръжение могат да са източник на тези медиатори. Последните отделят също така PGE2, който подтиска диференциацията на моноцитите в ДК (*Sombroek et al. 2002, Stock et al. 2011*)

Действието на туморното обкръжение върху процесът на диференциация на дендритните клетки не се организира само до нейното подтискане, но има и качествени измерения. Наблюдават се промени и диференциационната програма на прекурсорите на дендритните клетки, като диференциацията се насочва не по посока ДК, а по посока миелоидни клетки с имуносупресивна функция. Към тези клетки принадлежат две основни популации- миелоидно произхождащите супресорни клетки (MDSC) и тумор- асоциираните макрофаги (TAM) с M2 фенотип (*Hargadon et al. 2013*).

Както вече беше споменато туморното обкръжение засяга не само диференциацията на клетки предшественици в дендритни клетки, но и съзряването на пълно диференцирани незрели ДК. Съществуват проучвания, които доказват натрупването на голям брой незрели ДК в тумора (*Bell et al. 1999, Treilleux et al. 2004, Bergeron et al. 2006*). Все още няма категорична яснота, дали злокачествените тумори активно подтискат ДК матурацията или просто не подават необходимите сигнали за осъществяването ѝ. Според някои данни, туморът просто не фаворизира съзряването на ДК, като този процес би могъл да бъде обратим (*van Mierlo et al. 2004*). Алтернативното мнение е, че злокачествените тумори активно подтискат съзряването на ДК (*Preynat-Seauve et al. 2006*), въпреки че при определени условия това подтискане може да бъде обратимо (*Chaux et al. 1997, Vicari et al. 2002*). Факторите от страна на тумора, които действат на ниво подтискане на съзряването все още не са категорично установени, като данни за потенциална роля в това отношение има за PGE2, IL-10, IL-6, VEGF, TGF $\beta$  и млечната киселина (*Garufi et al. 2012, Wang et al. 2013*).

Цитираните данни, както и много други убедително доказват, че туморното обкръжение води до блокиране и/или качествена промяна в диференциацията или съзряването на дендритните клетки, като в резултат се формират, както предшественици на ДК с липса на антиген представяща способност, така и имуносупресивни клетки от моноцитен произход. Дълго време се е считало, че това е единствения имуносупресивен механизъм на злокачествените тумори върху дендритните клетки, но по-нови данни сочат, че това далеч не е така.

## 6.2. Туморно индуцирани регулаторни дендритни клетки

Формирането на имунорегулаторни дендритни клетки е друг, не по малко важен механизъм за влияние на тумора. Няколко съобщения доказват, че развитието на овариален карцином при мишки, от имунологично контролиран тумор до метастатичен тумор, се придружава от промяна във фенотипа и функциите на ДК. Докато ДК изолирани от асцит или дрениращи лимфни възли в началното развитие на тумора са способни да активират Т клетките, то при напредване на заболяването ДК са способни да предизвикат само минимална пролиферация (*Krempski et al. 2011, Scarlet et al. 2012*).

Под влияние на тумора имуносупресивните ДК действат, чрез експресия на рецептори, типични за толерогенни ДК и чрез секреция на имуносупресивни цитокини, като двете групи от фактори са зависими една от друга. Факторите в туморното обкръжение, влияят върху ДК, като те експресират инхибиторните рецептори B7-H1 и PD-L1, както и секретират аргиназа I, TGF $\beta$ , IL-10, IDO и др. При пациенти с овариален карцином изолираните от кръв дендритни клетки показват високо ниво на експресия на PD-L1 и предизвикват подтиснат Т клетъчен имунен отговор, който се възстановява при блокирането на този рецептор (*Curiel et al. 2003*)

Аргиназа I води до подтискане на Т клетъчната пролиферация чрез деплеция на аргинин, която от своя страна води до арест на клетъчния цикъл във фаза G0/G1 и намалена експресия на дзета веригите на ТКР. (*Liu et al. 2009, Rodriguez et al. 2004*)

Имунорегулаторни дендритните клетки секретират TGF $\beta$ , който наред с многото си имуносупресивни свойства предизвиква индукция на Tregs, които допълнително супресират локалния имунен отговор в туморното обкръжение (*Dumitriu et al. 2009*). Секрецията на IL-10 е друга отличителна характеристика на формиралите се под влияние на туморното обкръжение регулаторни ДК, като се счита че множество фактори (VEGF, CCL2, CXCL1, CXCL5) водят до тази повишена секреция (*Michielsen et al. 2011, 2012*). Засилената секреция на IL-10 от страна на формиралите се регулаторни ДК се осъществява и чрез някои пряк контакт, като за пример може да сложи свързването на туморните повърхностни клетъчни гликани

с дендритно клетъчния рецептор (DC- SIGN) (Nonaka et al. 2008). По подобен начин туморните муцини подтискат IL-12 секрецията и усилват тази на IL-10 от ДК, като е установено, че тези дендритни клетки са слаби стимулатори на Т клетъчната пролиферация и цитотоксичната функция, но са мощни индусери на Т клетъчна анергия и на формиране на Tregs (Monti et al. 2004, Rughetti et al. 2005). Други фактори ангажирани с IL-10 секрецията от регулаторните ДК са COX2/PGE2 и IL-6 (Sharma et al. 2003, Ahmadi et al. 2008)

Една от важните характеристики на формираните регулаторни ДК е експресията им на IDO, действието, на който води до деплеция на триптофан и секретиране на триптофанови метаболити, общо известни като кинуренини (Sugimoto et al. 2006), които водят до арест в Т клетъчната пролиферация и про-апоптотично действие (Von Bergwelt-Baildon et al. 2006). Наред с това действие IDO е активно ангажиран в генерирането на Tregs, като кинуренините свързват и активират арил - хиброкарбоновия рецептор върху Т клетките, което медуира Tregs формиране (Mezrich et al. 2010). IDO експресията се формира под действието на TNF $\alpha$  и PGE2 – два метаболита, на които е богато туморното обкръжение (Chemnitz et al. 2006), като процесът се придружава от секрецията на IL-10 и експресията на CD25 от регулаторните дендритни клетки. (Von Bergwelt-Baildon et al. 2006, Driesen et al. 2008). Експресията на CD25, както и неговата секреция „прихващат” IL-2 и по този начин допълнително инхибират Т лимфоцитите (Von Bergwelt-Baildon et al. 2006). Голяма част от имунорегулаторните молекули експресирани от тумор-асоциираните ДК, както при миши модели, така и при пациенти с простатен карцином се асоциират с повишената експресия на FOXO3, транскрипционен фактор, способен да подтиска стимулаторния капацитет на ДК (Dejean et al. 2009, Watkins et al. 2011).

Регулаторните ДК, формирани се под влияние на туморното обкръжение показват и някои други особености като хиперактивация на MAPK- сигналния път при меланома- променените ДК, като се установява, че ефектът е независим от IL-10, TGF $\beta$ , VEGF и PGE2 (Jackson et al. 2008). При рак на гърдата е описано, че тази хиперактивация се свързва с пренасочване на имунния отговор по посока Th2,

която е значително по-благоприятна за туморното развитие (*McCarter et al. 2005, Aspord et al. 2007*).

Един смущаващ ефект на някои от дендритни клетъчните ваксини е установеният факт, че под действието им се натрупват IDO положителни клетки, както и Tregs, което дава основание да се твърди, че при определени обстоятелства, дендритно-клетъчната терапия може да засили супресивните функции на ДК, а не на инициира тяхната имуногенност (*Wobser et al. 2007*). Основните характеристики на регулаторните дендритни клетки и известните фактори от туморното обкръжение, които действат за формирането им са представени на **Табл 13**.

**Табл.13** Някои фактори от туморното обкръжение и действието им върху повърхностните маркери и цитокинова секреция на имунорегулаторните дендритни клетки

Фактори от туморното обкръжение	Имунорегулаторни ДК	
	Секреторни фактори	Повърхностни маркери :
TGFβ, PGE2	Аргиназа I	B7-H1, PD-1L
VEGF, CCL2, CXCL1, CXCL5, гликани, COX2/PGE2, муцини, IL-6, IL-10	IL-10	
TNFα и PGE2	IDO	CD25
?	TGFβ	

## 7. МСК и дендритни клетки. Собствени резултати.

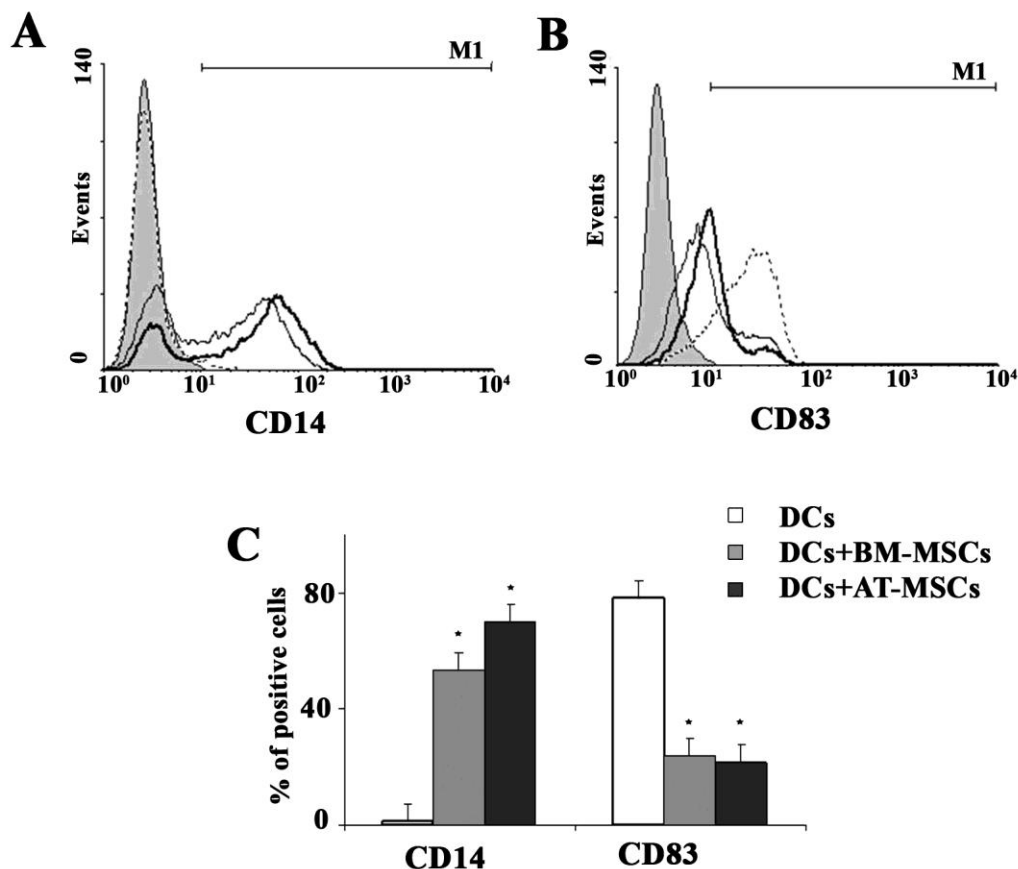
В нашите изследвания за влиянието на МСК върху ДК, използвахме магнитно сепарирани моноцити, които бяха култивирани с основните фактори, които ги диференцират в дендритни клетки – гранулоцит-макрофаг колонио образуващ фактор (GM-CSF) и IL-4, като в единия случай клетките бяха култивирани в

присъствие на МСК (изолирани от мастна тъкан или от костен мозък), а в другия самостоятелно. И в двата случая на 6-тия ден от култивирането на ДК беше добавен LPS с цел индуциране на тяхното съзряване.

Основната част (80-99,6%) от самостоятелно култивираните моноцити след 11 дни експресираха специфичните за зрели дендритни клетки маркери като CD80 (99,6%), CD86 (99,8%), HLA-DR (99,8%), CD83 (76%), като само много малък процент от клетките (1,3%) останаха CD14 позитивни. Тези резултати показват, че при описаните експериментални условия, хомогенната моноцитна култура успешно се диференцира и в последствие съзрява, като се образуват зрели дендритни клетки.

### **7.1.МСК инхибират диференциацията на моноцитите в дендритни клетки**

В условията на ко-култивиране с МСК, обаче се наблюдава чувствителна промяна в експресията на дендритно- клетъчните фенотипни маркери. Независимо дали се използват КМ-МСК или АТ-МСК, за ко-култивиране с моноцити в условия за диференцирането и съзряването им в ДК, процентът клетки, експресиращи CD14 остава значително по-висок, отколкото при самостоятелното култивиране на ДК. При ко-култивиране с КМ-МСК процентът е 53,2%, докато при използването на АТ-МСК той достига до 69,8%, като резултатите бяха статистически сигнификантни.(Фиг.35 А). Обратно, клетките експресиращи класическият маркер за зрели ДК CD83 значително намаляват в условията на ко-култивация, като при използването на КМ-МСК процентът им спада до 23,6%, а при използването на АТ-МСК до 21,5% (Фиг.36 В). Тези резултати показват, че МСК подтискат диференциацията на моноцитите в дендритни клетки, като АТ-МСК показват по силен ефект (Фиг. 36 С)

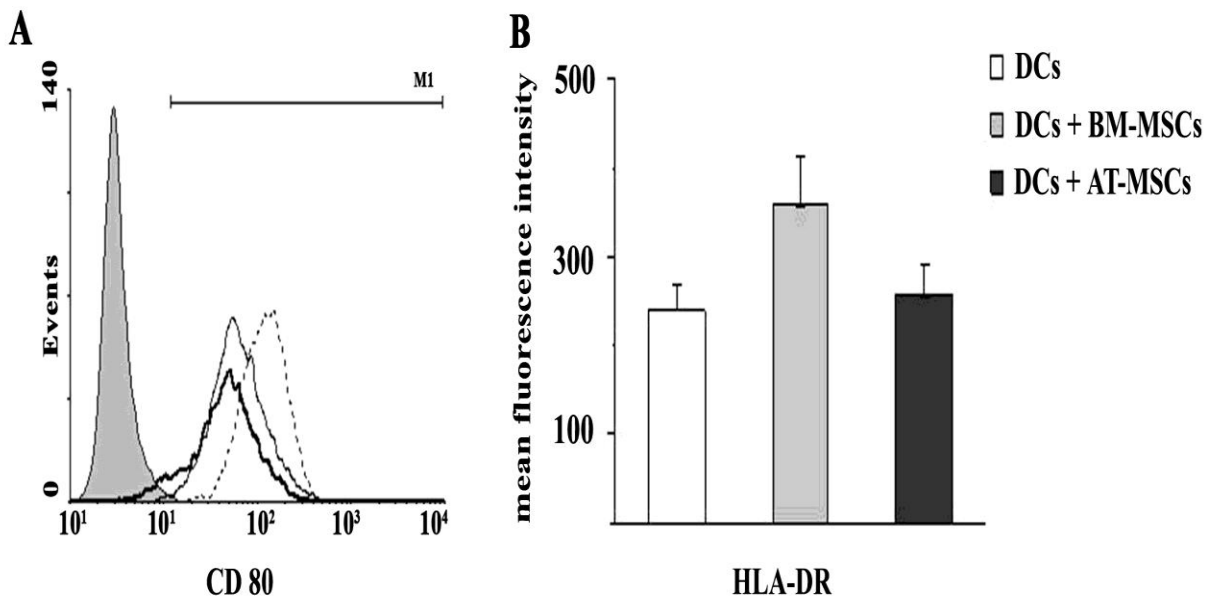


**Фиг. 36** Експресия на CD14 (A) и CD83 (B) от дендритни клетки, култивирани самостоятелно или ко-култивирани с КМ-МСК и АТ-МСК. Запълнената линия е отрицателна контрола, точковидната линия показва експресията при самостоятелно култивирани ДК, тънката линия показва ДК ко-култивирани с КМ-МСК, а дебелата ко-култивирани с АТ-МСК. На панел С се вижда сравнението на средния процент положителни клетки при 4 независими експеримента ( $p < 0,001$ ) (Ivanova-Todorova et al. *Immunology letters*, 2009)

## 7.2. МСК инхибират експресията на ко-стимулаторни молекули от ДК

При анализирането на молекулите HLA-DR и основния ко-стимулаторен комплекс В7 (CD80 и CD86), експресирани от ДК, сметнахме за по-важно резултатите да бъдат представени не като процент клетки, които експресират или не експресират тези молекули, а като сила на специфична експресия (mean fluorescent intensity-MFI). Този подход е по-адекватен от гледна точка на В7 и HLA комплекса, като се има предвид ролята им в ангажирането в процеса на антигенно представяне. При

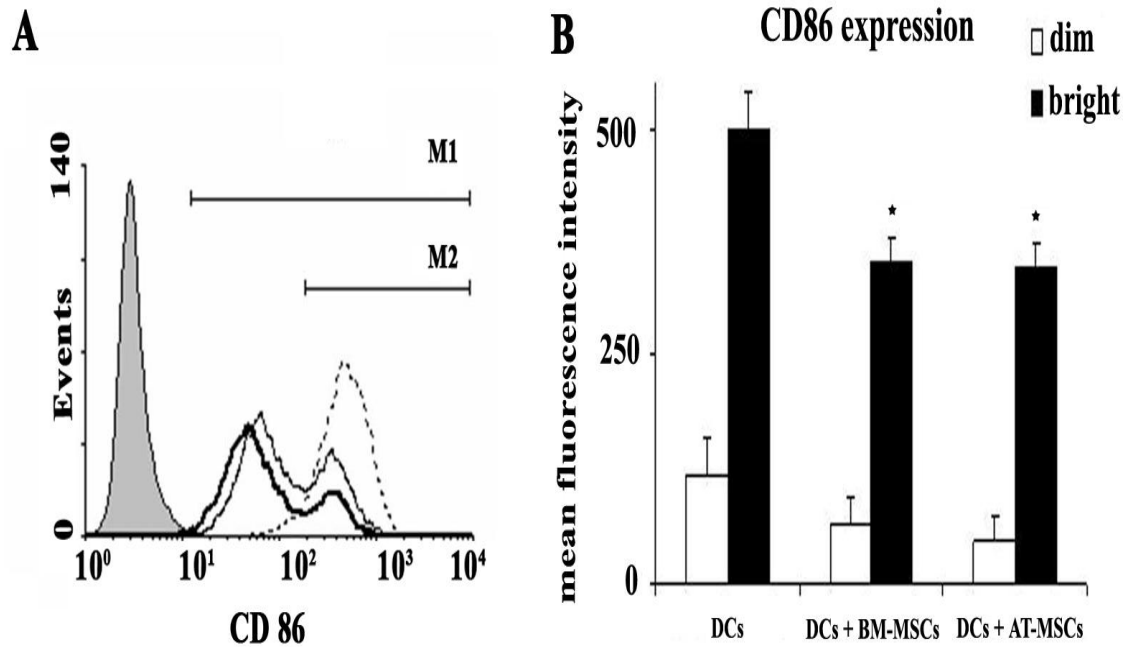
условия на ко-култивиране, се установи намаляване на специфичната флуоресценция за CD80 от MFI= 120,7 при самостоятелно култивирани ДК, на 61,5 при ко-култивиране с КМ-МСК и съответно на 51,8 при ко-култивиране с АТ-МСК (Фиг.37 А), като резултатите бяха статистически сигнификантни. При изследване на HLA-DR не се установиха статистически значими разлики (Фиг. 37 В)



**Фиг. 37** Експресия на CD80 (А) и HLA-DR (В), от ДК култивирани самостоятелно или ко-култивирани с КМ-МСК и АТ-МСК. Запълнената линия е отрицателна контрола, точковидната линия показва експресията на самостоятелно култивирани ДК, тънката линия показва ДК ко-култивирани с КМ-МСК, а дебелата ко-култивирани с АТ-МСК. (Ivanova- Todorova et al. Immunology letters, 2009)

При изследване на другата молекула от В7 комплекса – CD86, на флуцитометричните хистограми се установи, че при ко-култивирането на ДК с МСК се виждат два пика, като първия изобразява клетките експресиращи ниска степен на CD86 (CD86<sup>dim</sup>), докато втория изобразява тези с висока експресия на маркера (CD86<sup>bright</sup>) (Фиг. 38). Отново под влияние на МСК силата на експресията на CD86 значително намалява като от MFI 482,6 при самостоятелно култивирани

ДК, става на 102,7 при ко-култивирането с КМ-МСК и съответно на 61,5 при ко-култивирането с АТ-МСК. Под влияние на МСК се променя не само тоталната експресия на CD86, но и CD86<sup>dim</sup> и CD86<sup>bright</sup> по отделно, като в случая със CD86<sup>bright</sup> се установява статистическа сигнификантност (Фиг.38 В)

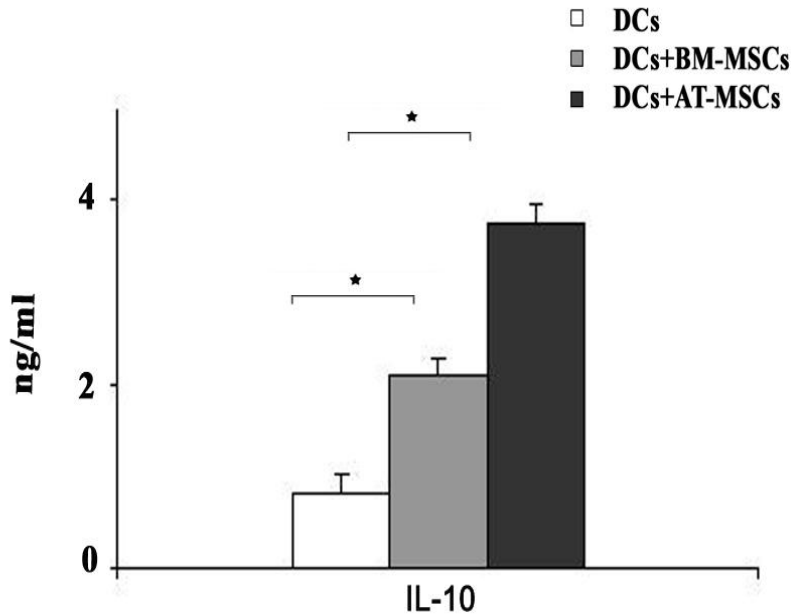


**Фиг. 38.** Експресия на CD86 (А). При ко-култивиране с МСК се установяват два пика на експресия на CD86. Запълнената линия е отрицателна контрола, точковидната линия показва експресията на самостоятелно култивираните ДК, тънката линия показва ДК ко-култивирани с КМ-МСК, а дебелата ко-култивирани с АТ-МСК. Панел (В) показва клетките с висока експресия на маркера (черни колони) и тези с ниска експресия (бели колони). Стойностите са средни за 4 независими експеримента, като за CD86<sup>bright</sup> показват статистическа сигнификантност ( $p < 0,05$ ) (Ivanova- Todorova et al. Immunology letters, 2009)

Данните от тези експерименти доказват, че МСК не само инхибират диференциацията на моноцитите в дендритни клетки, но и подтискат експресията на основните ко-стимулаторни молекули, безусловно необходими за процеса на антигенно представяне (Ivanova- Todorova et al. 2009).

### 7.3. МСК увеличават секрецията на IL-10 от ДК

Следващата цел на нашите изследвания беше да изследваме концентрацията на IL-10 в супернатанти на ДК и на ДК ко-култивирани с МСК, като резултатите показаха значително увеличение на IL-10 в супернатантите на ко-култивираните клетки. Отново ефектът беше по-изразен при използване на АТ-МСК (Фиг. 39)



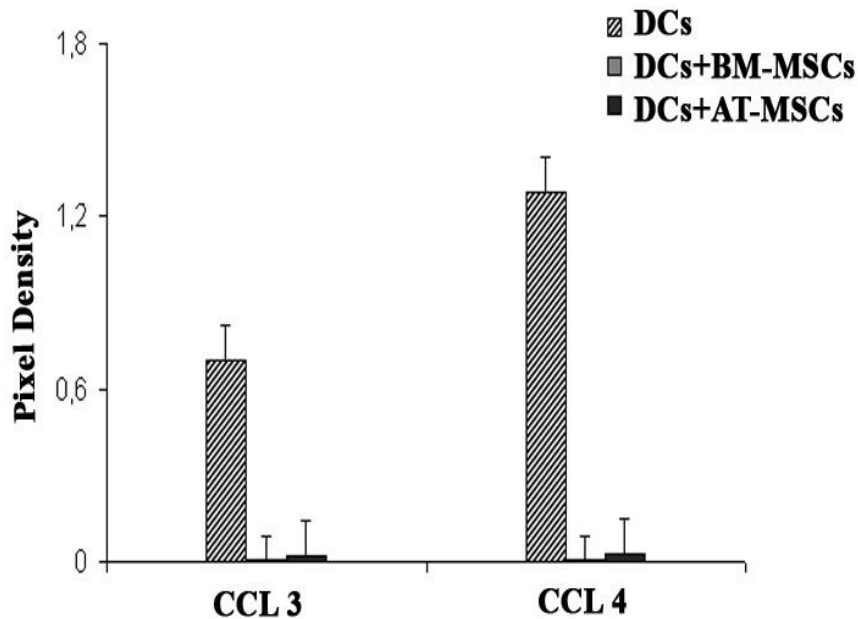
**Фиг. 39** Концентрация на IL-10 в супернатанти на: ДК култивирани самостоятелно (бели колонки), ДК ко-култивирани с КМ-МСК (сиви колонки), ДК ко-култивирани с АТ-МСК (черни колонки) Увеличението на IL-10 е статистически значимо ( $p < 0,05$ ), като показаните резултати са средни за 4 независими експеримента.

Разбира се, тъй като изследванията на супернатантите са направени след ко-култивиране, трябваше да се изключи теоретичната възможност, IL-10 да е с произход от МСК. Дали МСК секретират IL-10 е въпрос, който е доста противоречив в научната литература и който е подробно разгледан в глава II. Нашите многократни изследвания върху супернатанти на МСК от различен произход не установяват наличие на ДК. Разбира се съществува и възможността

контакта с дендритните клетки да активира МСК, тъй като е известно, че активираните МСК променят цитокиновата се секрция. За да изключим тази възможност ние стимулирахме култури от КМ-МСК и АТ-МСК с РМА и йономицин, след което ги тестирахме за IL-10 секрция, която отново не беше установена (резултатите не са показани). Вследствие на това ние правим извода, че секретията на IL-10 в системата се осъществява от дендритните клетки, още повече, че ДК секретират IL-10 и при самостоятелното си култивиране ((*Ivanova-Todorova et al. 2009*)).

#### 7.4.МСК инхибират секретията на CCL3 и CCL4 от дендритните клетки

Наред с IL-10, супернатантите на самостоятелно култивираните ДК, както и тези на ко-култивираните с МСК бяха изследвани за още 35 цитокини, като резултатите показаха, че под въздействието на МСК, два хемокина, които се секретират от ДК култивирани самостоятелно, на практика изчезват от супернатантите при ко-култивираните клетки (**Фиг.40**)



**Фиг. 40** Концентрация на CCL3 и CCL4, измерена като pixel density. Двата хемокина се секретират в супернатантите на ДК култивирани самостоятелно (раирани колонки) и изчезват от супернатантите на ДК ко- култивирани с КМ-МСК (сиви колонки) и АТ-МСК (чени колонки). Показаните резултати са средни за 4 независими експеримента.

CCL3 и CCL4 са описани като секретирани от ДК със способност да привличат Т лимфоцити, NK клетки, еозинофили и макрофаги в огнищата на възпалителния процес (*Jing et al. 2003, Piqueras et al. 2006*). Твърде възможно е блокирането на тези хемокини да представлява още един механизъм на супресия от страна на МСК върху дендритните клетки, осъществяван чрез ограничаване на способността им да привличат имунокомпетентни клетки. От всички фактори, които секретират МСК, в литература, на миши модел е описан единствено ефекта на PGE<sub>2</sub>, който подтиска експресията на CCL3 и CCL4 от ДК (*Jing et al. 2003*).

Получените резултати показват, че под въздействието на МСК, изолирани както от костен мозък, така и от мастна тъкан, моноцитите подтискат диференциацията си в дендритни клетки, като запазват своя маркер CD14, който при нормалното им развитие в посока ДК, изчезва под действието на IL-4, използван за диференциацията *in vitro* (*Diliouglou et al. 2003*). Обратно на това, броят клетки, експресиращи CD83, типичният маркер, характеризиращ популацията на зрелите дендритни клетки значително намалява. Успоредно на този процес значително намалява експресията на B7 комплекса и докато при CD80 това е предимно количествен процес, при CD86 под въздействието на МСК се наблюдават два пика на експресия- ниска и висока. CD86, както беше казано и по-горе, е ангажиран с „втория сигнал” и има два основни лиганда- CD28 и CTLA-4. Той се експресира на повърхността на моноцитите, още на ден 0 от култивирането, за разлика от CD80, който се експресира на по-късен етап от моноцитната диференциация (ден 3-4). И двата маркера засилват своята експресия при съзряването на ДК под действието на LPS (*Diliouglou et al. 2003*). На базата на това може да се спекулира, че първия пик (CD86<sup>dim</sup>) представляват клетките с блокирана диференциация още на ниво моноцити и/или незрели ДК, докато вторият пик

(CD86<sup>bright</sup>) представляват зрелите дендритни клетки със супресирана CD86 експресия.

Подтискането на дендритно клетъчната диференциацията под въздействието на МСК не е нов факт в научната литература, като подобни на нашите резултати са описани както при мишки (*Djouad et al 2007*) и плъхове (*Liu et al. 2013*), така и при човешки клетки (*Jiang et al. 2005, Nauta et al. 2006, Chen et al. 2013, Saedi et al. 2013*). Всички споменати автори, подобно на нас, единодушно съобщават, че под въздействието на МСК ко-култивирани с моноцити, се инхибира диференциацията им в ДК, което се изразява със запазване на CD14 (*Jiang et al. 2005, Nauta et al. 2006, Saedi et al. 2013*) и съответно, подтискане на CD83 експресията (*Jiang et al. 2005, Saedi et al. 2013, Chen et al. 2013*), на B7 комплекса (*Jiang et al. 2005, Djouad et al 2007, Liu et al. 2013, Saedi et al. 2013, Chen et al. 2013*), на HLA- II молекулите (*Jiang et al. 2005, Djouad et al 2007, Liu et al. 2013, Saedi et al. 2013, Chen et al. 2013*), на CD1a (*Jiang et al. 2005, Saedi et al. 2013*) и на CD40 (*Djouad et al 2007, Chen et al. 2013*). Наред с това, някои от авторите установяват и функционални промени, като подтисната секреция на IL-12 (*Chen et al. 2013, Liu et al. 2013*), подтисната способност за ендоцитоза (*Saedi et al. 2013, Chen et al. 2013*) и намалена способност за активиране на Т лимфоцити (*Nauta et al. 2006, Djouad et al. 2007, Chen et al. 2013*).

Нито нашият екип, нито някои от споменатите автори могат да се ангажират с категоричен отговор, на какво точно ниво се осъществява супресията на диференциацията в дендритни клетки. Пътят моноцити- незрели ДК- зрели ДК, не се характеризира с ясно отличими етапи, които да характеризират точното ниво на диференциация и съзряване на всеки етап. Маркерите HLA-II и CD80/86 се срещат на всеки етап, CD14 е типичен за моноцитите, а CD83 за зрелите дендритни клетки, но и двата маркера могат да се срещнат, макар и в по-ниска степен и при незрелите ДК. В експериментите на *Saedi et al. 2013*, незрели ДК и зрели ДК се култивират поотделно с МСК и при всички постановки се наблюдава засилена експресия на CD14 и подтисната експресия на B7, CD83, CD1a. Твърде опростено би било да се твърди, че моноцитите просто не се развиват в посока диференциация в ДК. Това

безспорно е така, но едва ли разкрива цялата картина. Като пример могат да се посочат нашите резултати разкриващи инхибиция на CD86, който е и моноцитен маркер. Тоест МСК се наместват някъде в процеса на диференциация моноцити – незрели ДК – зрели ДК, като предизвикват не само подтискане на този път, но и качествени промени. Като доказателство за тези качествените промени служат резултатите от изследванията на *Chen et al. 2013*, които доказват, че под влияние на МСК се осъществява пренасочване на диференциацията, от посока ДК към посока MDSC – хетерогенна миелоидна популация с имуносупресивни функции. В нашите експерименти, под МСК въздействие дендритните клетки показаха незрял фенотип, намалена В7 експресия и секреция на IL-10 – характеристики обединяващи незрелите и толерогенните дендритни клетки. Както беше казано по-горе, двете понятия не са напълно идентични, въпреки че толерогенността винаги включва незрял дендритно клетъчен фенотип.

Основен въпрос се явява кои са факторите водещи до описаните промени в диференциацията/съзряването на дендритните клетки. Едната възможност е прекият контакт между МСК и ДК предшествениците, да води до инхибиция и промени в последните. Макар тази възможност да не се отхвърля и се споменава в теоретичен аспект, на този етап липсват каквито и да е доказателства за нея. От една страна трудно може да бъде доказан прекия контакт като самостоятелен механизъм, тъй като е трудно да се изключи цитокиновата секреция на комуникиращите си клетки, а от друга на повърхността на МСК все още не са установени рецептори способни да се свързват с инхибиращите рецептори на ДК и техните миелоидни предшественици (*Docheva et al. 2008*).

Обратно, в полза на идеята, че МСК повлияват дендритно клетъчната диференциация чрез секреторни фактори има редица доказателства. Множество изследователски групи доказват ефекта на МСК върху ДК чрез т.нар. transwell система, като така недвусмислено се доказва, че ефектът се осъществява чрез цитокини. В тази насока са изследванията на *Jiang et al. 2006*, *Saedi et al 2013* (ефектът се доказва и при КМ-МСК и при МСК, изолирани от стена от пълна връв) и на *Liu et al. 2013* (при плъщи модел). Установява се, че условията на ко-

култивиране и transwell системата имат еднакво количествено изражение върху подтиснатата диференциация/съзряване на ДК, което още веднъж до голяма степен игнорира влиянието на прекия контакт, за сметка на цитокиновата секреция (*Nauta et al. 2006*). По горе бяха дискутирани основните цитокинни, повлияващи формирането на толерогенни незрели ДК, като с оглед на нашите резултати два от тях (IL-6 и IL-10) ще бъдат подробно коментирани.

Изследването ни на супернатанти от различни видове МСК установяват наличие на IL-6, както беше описано в глава II. В литературата се дискутира ролята на IL-6, като един от цитокините, секретирани от МСК, под чието действие се осъществява инхибицията на дендритно клетъчната диференциация, както и качествените промени в ДК в толерогенна насока. Установено е, че при прилагането на моноклонални натитела срещу IL-6, дендритните клетки губят CD14 който, се запазва под действието на МСК (*Jiang et al. 2005, Nauta et al. 2006, Djouad et al. 2007*). Дискутира се прякото действие на IL-6 секретирани от МСК върху подтискане на експресията на HLA-II, CD40, CD80 и CD86 като се наблюдава доза-зависимост на ефекта (*Djouad et al. 2007*). Както беше описано в глава II, IL-6 се свързва на повърхността на дендритните клетки или техните предшественици с gp130, като впоследствие gp130 взаимодейства с JAK-STAT3 системата (*Kishimoto et al. 2010*). Свързването на gp130 активира STAT-3 вследствие на което намалява вътреклетъчното ниво на цистатин С, който е ендегенен инхибитор на катеписините. Увеличава се експресията на катеписин S вследствие на което намалява експресията на МНС II на повърхността на дендритната клетка (*Liang et al. 2008*).

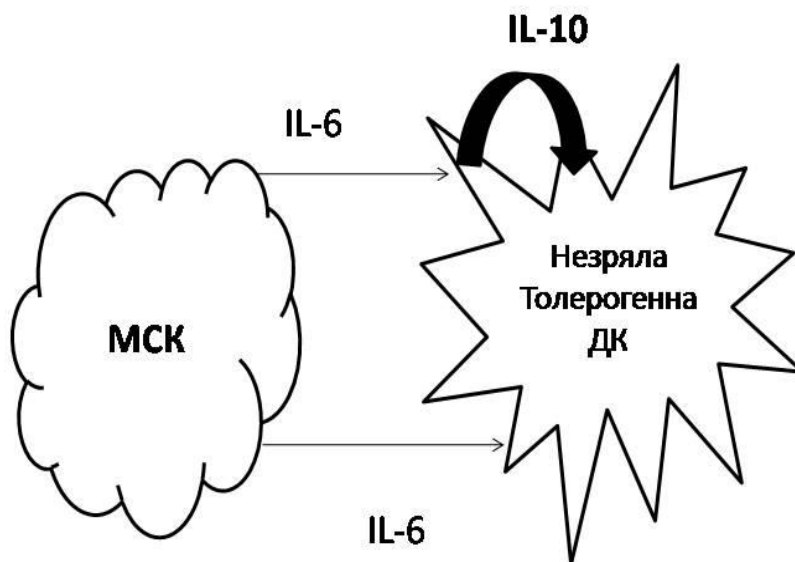
Този механизъм се доказва и от работите на *Park et al. 2004*, които използвайки миши модели с knockout мишки по IL-6 и gp130, демонстрират, че IL-6 чрез използване на споменатия път на действие е пряко ангажиран в подтискане на диференциацията на ДК, изразена чрез инхибиция на HLA-II, CD80/ CD86, CD40 и IL-12. Тази научна група твърди, че това действие на IL-6 се осъществява без връзка с автокринната секреция на IL-10 от страна на незрелите ДК.

Съществуват данни, според които IL-6 не действа самостоятелно, а заедно с други цитокини, като например секретирани от МСК, PGE2 и VEGF за които се твърди,

че имат адитивен ефект и засилват действието на IL-6 (*Djouad et al. 2007*). Наред с това, както вече беше отбелязано секреторните форми на HLA-G могат да свързват ILT-4 рецептора, експресиран на повърхността на дендритните клетки, като това свързване води до активиране на две тирозин фосфатази – SHP-1 и SHP-2. Вследствие на това се активира NFκB, което води до продукция на IL-6. Новосинтезираният IL-6 от своя страна действа автокринно върху ДК (*Liang et al. 2008*).

Другият цитокин с безспорно доказано действие, коментирано по-горе, върху диференциацията на ДК е IL-10, като се дискутират неговите паракринни и автокринни ефекти. Според модела предложен от *Liu et al. 2013*, МСК секретират IL-10, който повлиява на ДК като ги прави, секретирани от своя страна IL-10. Този цитокин, също като IL-6 въздейства чрез JAK1/ STAT3 системата и води до формиране на незрял толерогенен фенотип. Авторите спекулират, че взаимоотношенията МСК/ ДК силно наподобяват взаимоотношения Treg/ ДК като се установява положителна обратна връзка чрез IL-10. *Liu et al* доказват, че антитела блокиращи IL-10 игнорират подтискането на МНС-II, B7 и IL-12 под действието на МСК. Този модел залага на идеята, че МСК секретират IL-10, която не е еднозначно приета от изследователите. Нашите данни не показват такава секреция, поради което моделът който ние предлагаме е следния:

Вследствие секрецията на IL-6 от МСК, ДК придобиват незрял толерогенен фенотип, характеризиращ се със секреция на IL-10. От своя страна автокринно действащия IL-10 засилва формирането на незрял толероген фенотип ДК (**Фиг.41**). Предимството на този модел е съчетанието на безспорните свойства на двата цитокина в супресията на ДК диференциацията и избягване на спорното наличие на секреция на IL-10 от МСК.



**Фиг. 41.** Вследствие секрецията на IL-6 се наблюдават двоен ефект върху дендритната клетка. Първо IL-6 директно обуславя незрял/толерогенен фенотип и второ IL-6 води до автокринна секреция на IL-10, имаща като следствие същия ефект

Способността на IL-6 да предизвика IL-10 секрецията е описана от *Steensberg et al. 2003* и представената по-горе хипотеза е в съгласие с резултатите и спекулациите на *Ben-Ami et al. 2011*.

Наред с описаните цитокини съществуват данни и за други такива, които се секретират от MCK и водят до подтисната диференциация на ДК и тяхната секреция на IL-10, като например PGE2 (*Beyth et al. 2005*), IDO, който също действа чрез JAK/ STAT3 системата (*Liu et al. 2013*), TGF $\beta$  (*Ruaa et al. 2006*) и VEGF (*Dikov et al. 2005*, *Lin et al. 2007*, *Spaggiary et al. 2009*). Съществуват сведения за ролята на хемокина CCL2/MCP-1, под чието действие се увеличава IL-10 секрецията от

страна на толерогенните ДК (*Michielsen et. al. 2011*), като при нашите изследвания ние установихме наличието на този хемокин в кондиционирани среди от АТ-МСК и КМ-МСК.

Най-нови данни коментирани и по-горе доказват, че под влияние на секреторни фактори от МСК, дендритно клетъчните предшественици променят посоката на диференциацията си от ДК към MDSC, секретират IL-10 (*Chen 2013*). Според авторите причина за това са т.нар. Gro (growth regulated oncogene) хемокини, принадлежащи към IL-8 фамилията, за които е доказана способността им да медира арест в клетъчния цикъл на моноцитите.

На базата на нашите резултати от изследваните цитокини в супернатантите на МСК ние считаме, че ефектът свързан с формиране на секретират IL-10 незрели/ толерогенни ДК може да се дължи на секрецията на:

- IL-6, която се свързва с прякото действие на цитокина, с индукцията му на автокринна секреция на IL-10 от ДК, (**фиг.9**), както и с автокринното му действие, индуцирано от HLA-G/ ILT-4 връзката.
- CCL2/MCP-1 – засилва IL-10 секрецията от толерогенните ДК.
- CXCL1/Gro $\alpha$ , установен в МСК средата и водещ до формиране на IL-10 секретират MDSC

Независимо от конкретните цитокини, индуциращи толерогенни ДК, генерирането на последните е ключово в осъществяването на имуносупресивните действия на МСК. Имайки в предвид ролята на ДК като организатори на имунния отговор или съответно неговата супресия, намесата на това ниво е може би от най-съществено значение. Формираните се ДК, обуславят анергия в Т клетките, чрез липсата на „втори“ сигнал и секрецията си на IL-10. Те също така участват в създаването на iTregs, с които взаимно потенцират действието си отново чрез IL-10, и като вследствие на тези два механизма са налице почти всички условия необходими за имуносупресивно състояние.

## **8. Използвани материали и методи**

### **8.1.Донори на клетки**

Периферни кръвни мононуклеарни клетки (ПКМК) бяха изолирани от левкоцитен концентрат от здрави донори, като концентратът ни беше предоставен от Националния център по хематология и трансфузиология, София. Моноцитите бяха пречистени от ПКМК чрез магнитна сепарация, описана по-долу. Бяха използвани проби от 4 донора.

Проби от мастна тъкан и костен мозък бяха доставени след оперативни интервенции на бедрото, извършени в Клиника по Отропедия и травматология, Университетска болница „Царица Йоанна (ИСУЛ)”. Бяха използвани проби от 4 донора, след подписано информирано съгласие, съгласно правилата на Етичната комисия на болницата. В рамките на 2 часа след операцията пробите бяха доставени в лабораторията и обработени, спазвайки стриктно общоприетите лабораторни протоколи.

### **8.2.Магнитна сепарация на моноцити**

След изолиране на ПКМК на фиколов градиент, CD14 положителната популация беше изолирана чрез кит използващ магнитни частици (MACS, Miltenyi Biotech, Germany), като бяха следвани инструкциите на производителя. ПКМК в концентрация  $5 \times 10^7$  бяха центрофугирани на 250 x g за 10 минути и внимателно ресуспендирани в 400µl MACS буфер (PBS, pH 7.2, 2mM EDTA, 0.5% ФТС). Бяха добавени 100 µl микрочастици натоварени с моноклонално антитяло срещу CD14 (CD14 MicroBeads Miltenyi Biotech, Germany) и клетките бяха инкубирани за 15 минути на 4°. След инкубацията клетките бяха промити с 10 ml MACS буфер и центрофугирани на 250 x g за 10 минути. Клетъчната палета беше ресуспендирана в 500µl изстуден MACS буфер и пропуснати през колона с магнитна приставка (MS MACS Column, Miltenyi Biotech, Germany). След трикратно промиване на колоната с 500µl изстуден MACS буфер, колоната беше отделена от магнитната й приставка и CD14+ фракцията беше елуирана с 1 ml MACS буфер. Сепарираните по този начин клетки бяха анализирани чрез флоуцитометрия и използвани за последвалите експерименти

### **8.3.Клетъчно култивиране**

Изолираните моноцити в количество  $1 \times 10^6$  бяха разпределени по 1 ml на ямка в 24 ямкови плаки (Orange Scientific Belgium) в културална среда RPMI 1640 (PAA Laboratories, Austria) с 10% ФТС (A 15-151, PAA Laboratories, Austria) и антибиотици. С цел диференциране на моноцитите в дендритни клетки към средата беше прибавен 100 ng/ml GM-CSF (Immunev Corp. USA) и 50 ng/ml IL-4 (14269-5UG, Sigma- Aldrich, USA) Съзряването на дендритните клетки беше индуцирано, като на 6- тия ден от култивирането им беше добавен 50 ng/ml LPS (L-43-91 Sigma- Aldrich, USA) в свежа среда за 3 дни. След това клетките бяха анализирани флоуцитометрично, а супернатантите бяха събрани и замразени на  $-70^{\circ}$  преди да бъдат тестирани.

КМ-МСК и АТ-МСК на 3-ти пасаж бяха използвани в концентрация  $1 \times 10^4$  клетки на ямка и култивирани в 1 ml ямка в 24 ямкови плаки (Orange Scientific, Belgium). Към някои от ямките с цел активиране на МСК бяха добавени по 100 ng/ml PMA (Sigma- Aldrich, USA) и 1  $\mu$ g/ml Ca йонофор А 23187 (C-7522, Sigma- Aldrich, USA).

При ко-култивирането моноцитите бяха в концентрация  $1 \times 10^6$  ml, а алогенните МСК в  $1 \times 10^4$  клетки на ямка, като култивирането се извърши в 24 ямкови плаки (Orange Scientific, Belgium) в 1 ml среда с GM-CSF и IL-4, като на ден 6 беше добавен LPS в свежа среда.

#### **8.4.Флоуцитометричен анализ на дендритни клетки**

На 9- тия ден от култивирането клетките бяха събрани и изследвани за маркери характеризиращи дендритно клетъчната популация. Първоначално клетките бяха промити с PBS, рН 7,2 като се центрофугираха на 1200 rpm за 10 минути и бяха адаптирани от  $1 \times 10^6$ . След това клетките бяха инкубирани на тъмно за 30 минути със следните моноклонални антитела CD14 FITC, CD80 PE, CD86 PE, CD83 FITC и HLA-DR PE (BD, USA). След двукратно промиване със CellWash (BD, USA), клетките бяха фиксирани с CellFix (BD, USA). Специфичната флуоресценция беше изследвана на флоуцитометър FACSCalibur, (BD, USA), като анализът на данните беше направен със софтуерна програма CellQuest на същата фирма, както и с програма WinMDI 2.9.

### **8.5.Изследване на цитокини**

Супернатантите на ДК, КМ-МСК, АТ-МСК и ко-култивираните ДК/КМ-МСК и ДК/АТ-МСК бяха тествани за секрецията на IL-10 чрез Quantikine Human IL-10 ELISA kit (Bender MedSystems, USA), като бяха спазвани изискванията на производителя. Всяка проба беше изследвана в триплети.

Същите клетъчни супернатанти бяха изследвани и чрез Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit (R&D Systems). Нитроцелулозни мембрани съдържащи антитела срещу 36 цитокина (anti-C5a, anti-CD40 Ligand, anti-G-CSF, anti-GM-CSF, anti-GRO, anti-I-309, anti-sICAM-1, anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-1 $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-1ra, anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-6, anti-IL-8, anti-IL-10, anti-IL-12, anti-p70, anti-IL-13, anti-IL-16, anti-IL-17, anti-IL-17E, anti-IL-23, anti-IL-27, anti-IL-32\_, anti-IP-10, anti-I-TAC, anti-MCP-1, anti-MIF, anti-MIP-1 $\alpha$ , anti-MIP-1 $\beta$ , anti-Serpin E1, anti-RANTES, anti-CXCL12, anti-TNF- $\alpha$ , anti-sTREM-1) в дубликати бяха инкубирани със супернатантите и коктейл биотинилирани специфични антитела. Всеки комплекс цитокин/ специфично антитяло се свързва за имобилизираното си антитяло на мембраната. След промиване, с цел отстраняване на неспецифичното свързване, беше добавен стрептавидин пероксидаза и реагенти за установяване на хемилуминисценция. Полученият филм беше сканиран и беше направен денситометричен анализ чрез софтуерна програма Image J (NIH, Bethesda, MD, USA).

### **8.6.Статистически методи**

Промените на концентрацията на IL-10, изследван чрез ELISA и флоуцитометрично определените параметри бяха анализирани чрез непараметричен Mann-Whitney U тест за свързани извадки. И при двата вида тестове за сигнификантни бяха приети разлики  $p < 0,05$ .

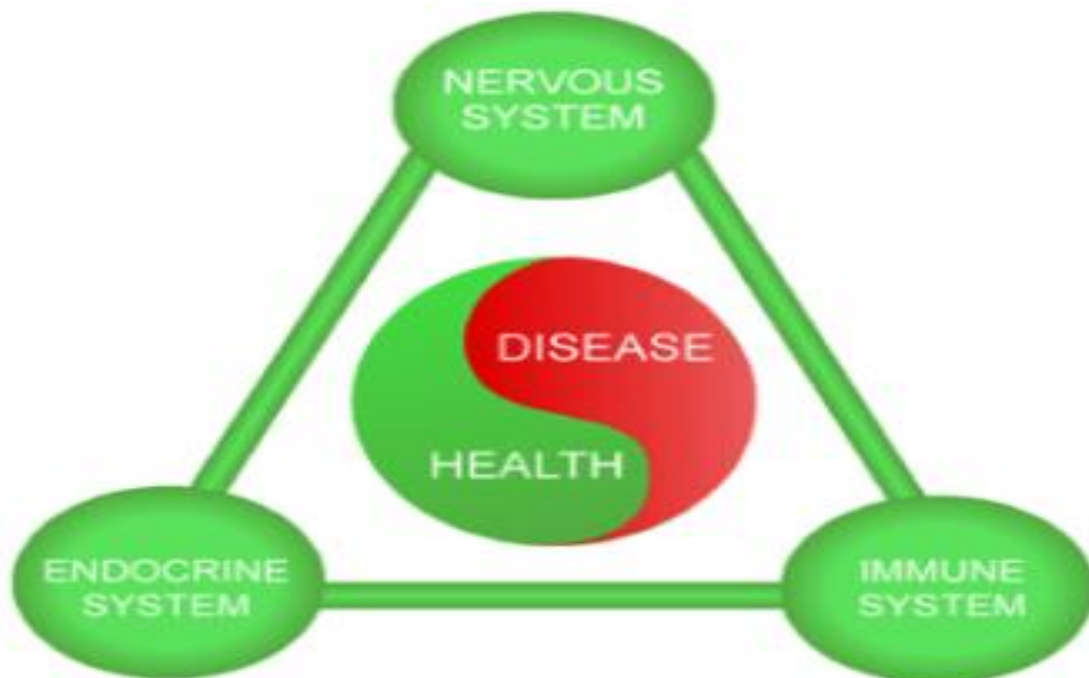
# VI. МСК, прогестерон и въздействието им върху имунните клетки в женския репродуктивния тракт

## 1. Общи положения

Общоприето е, че бременността при бозайниците е комплексен биологичен феномен, който се осъществява под влияние на ендокринни, неврологични и имунологични фактори, действащи в хармония, за да гарантират успешно развитие на семи-алогенния плод. Настъпилите промени в клетъчните популации, тъканното ремоделиране, промяната и адаптацията на ендокринните, паракринните и автокринните контролни механизми, са абсолютно необходими условия за успешна бременност. Сигнални молекули от различни източници формират комплексна мрежа, която контролира интеграцията на имунната, ендокринната и нервната система (Фиг. 42). Цитокини, хормони и невромедиатори, както и техните рецептори представляват важни елементи в тази мрежа. Въпреки научния напредък обаче, механизмите, чрез които плодът избягва имунното отхвърляне, все още остават ненапълно изяснени (*Billington 2003*).

Бременността и локалните промени, които тя предизвиква в репродуктивния тракт на жената би могла да се разгледа като един *in vivo* модел на локална имуносупресия и от тази гледна точка ролята на МСК при това състояние не може да бъде negliжирана.

Настоящата глава си поставя за цел да опише една малка част от взаимодействията между ендокринната и имунната система при бременността, а именно влиянието на прогестерон, върху мезенхимните стволови клетки, влияние което засилва имуносупресивните им свойства.



**Фиг. 42** Нервната, ендокринната и имунната система са взаимно свързани и определят състоянията на „здраве” и „болест”(ползвана с позволение на *prof. Istvan Berczi*)

## 2. МСК в децидуа

Поради факта, че в женския репродуктивен тракт се реализират механизми обуславящи имунна супресия, изглежда логично наличието на клетки, с такова действие. Както е известно, бременността е свързана с изменения в ендометриума, водещи до формирането на децидуа – високо специализирана структура, която се развива от диференциацията на ендометриалните стромални клетки, под влияние предимно на прогестерон (Пг). Наред с основната си функция, да гарантира оптимални условия за имплантацията на ембриона и формирането на плацентата, децидуата представлява физиологична бариера на майчино-феталната граница, която ограничава трофобластната инвазия. Клетките, разположени в децидуата се делят на децидуални стромални клетки (ДСК), glandуларни клетки и левкоцити. Левкоцитите в децидуата са разположени в базалния слой и включват фибробласти, макрофаги, Т лимфоцити и малко количество В лимфоцити, както и типичните за

периферната кръв NK клетки (CD16+CD56+). Основната левкоцитна субпопулация, обаче са утеринните NK клетки (uNK – CD16-CD56+), които са между 45-80%, от общия левкоцитен пул, като броят им силно варира от стадията на менструалния цикъл (*Bulmer 1995 Kammerer et al. 2004*). В децидуата присъстват и зрели моноцитни дендритни клетки (*Kammerer et al.2000, Ivanova et al. 2005*), като нашите резултати доказаха, че те са от локален произход (*Ivanova et al. 2005*). На практика в децидуата се намират всички клетки, ангажирани в имунните реакции, както и имунорегулаторния хормон Пг, който би могъл да им влияе. Налице са всички потенциални участници, както за индуциране на имуноен отговор, така и за действие на имунната система по посока индикция на толеранс.

По отношение на ДСК е установено, че вследствие на индукция секретират множество цитокини като IL-6, IL-8, M-CSF, MIP-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  (*Nasu et al. 1999*). ДСК, формиращи се от ендометриалните стромални клетки под действието на Пг се характеризират биохимично по способността си да секретират пролактин и инсулино-подобен растежен фактор- свързващ протеин, докато морфологично, формирането на големи и предимно кръгли клетки е израз на трансформацията на стромалните ендометриални клетки в ДСК (*Tang et al. 1994, Giudice 1996*).

Човешкият ендометриум е изключително динамична структура, която претърпява ежемесечни процеси на ремоделиране и самообновление, като тези процеси са най-акцентирани в процеса на бременност. В тази връзка е логично да се предположи, че МСК са основния източник на регенеративния капацитет на ендометриума. Описано е, както на протеиново, така и на ниво иРНК, че човешката децидуа съдържа популация от фибробласто-подобни стромални клетки, които могат да децидуализират *in vitro* в присъствие на женски репродуктивни хормони, като получените децидуални клетки са способни да продуцират пролактин и инсулино-подобен растежен фактор- свързващ протеин (*Richards et al. 1995*). Също така, на миши модели в ендометриума са идентифицирани клетки с характеристики на МСК (*Cervello et al. 2007*), а по късно, включително и от нашата група са докладвани стромални клетки от човешки ендометриум, които са изолирани и характеризирани с доказана способност да се диференцират като остеогенни,

миогенни, адипогенни и хондрогенни (*Schwab et al. 2007, Wolf et al. 2007, Dimitrov et al. 2008*). При сравнение с клетки, изолирани от миометриум и Фалопиеви тръби се доказва, че единствено стромалните ендометриални клетки имат способност за диференциация в хондрогенна посока. Авторите на изследването дефинират тези клетки като „мултипотентни стволови клетки” въпреки, че не успяват (или не опитват) да получат диференциация в друга насока (*Wolf et al. 2007*). По подобен начин, нашият екип описва изолиране на клетки от човешки ендометриум, които притежават способност за клоногенност и се диференцират в адипогени клетки (*Dimitrov et al. 2008*). От казаното дотук може да се направи заключението, че в човешкия ендометриум и децидуа съществува популация клетки, които до голяма степен отговарят на МСК, но сякаш във всички експериментални постановки, нещо не достига за да се направи категоричния извод, че тези клетки са МСК. През 2010 нашият екип за първи път доказва, че стромални клетки, изолирани от децидуа в първия триместър на бременността покриват всички необходими критерии, за да бъдат формулирани децидуални мезенхимни стволови клетки (Д-МСК) (*Dimitrov et al. 2010*). Получените клетки имаха фибробластоподобна морфология, при култивиране *in vitro*, поддържаха състоянието си повече от 10-12 пасажа и експресираха типичните за МСК фенотипни маркери. Голямата част от клетките, експресираха HLA-I (A, B, C) антигени, което доказваше, че техния произход не е от трофобласта, тъй като е добре известно, че трофобластът не експресира тези антигени. Култивираните клетки бяха способни да секретират пролактин и имаха същата характеристика, като описаните от други автори фибробласто-подобни стромални клетки (*Richards et al. 1995*). Получените стромални клетки проявиха клоногенен растеж и бяха диференцирани в остеогенна, адипогенна и в посока ендотело- подобни клетки, което наред с другите данни за тях даде пълното основание да бъдат категоризирани като Д-МСК (*Dimitrov et al. 2010*). Нещо повече, съществуват прилики между Д-МСК и класическите МСК и по отношение на цитокиновата секреция. Както беше казано ДСК секретират IL-6, IL-8, M-CSF, MIP-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  (*Nasu et al. 1999*) и въпреки, че авторите не доказват, че източникът на тази секреция са именно Д-МСК в пула на

общите ДСК, тази вероятност е твърде логична. Както вече беше неколнократно споменавано, МСК изолирани от мастна тъкан, костен мозък и стена от пъпна връв също секретират IL-6 и IL-8. (Kyurkchiev et al. 2014).

Един въпрос, който все още търси своя категоричен отговор е свързан с произхода на Д-МСК, които представляват съществен компонент в децидуата. Повечето изследователи са на мнение, че тези клетки са от екстраутеринен произход най-вероятно костно-мозъчен (Oliver et al. 1999, Garcia-Pacheco et al. 2001, Taylor et al. 2004). Предполага се, че МСК, произхождащи от костния мозък са привлечени в ендометриума, като те пролиферират и се диференцират под действието на Пг, участвайки във формирането на децидуата. Изолирането, култивирането и характеризиранието на Д-МСК са разгледани в глава I.

Доказването на МСК в децидуата, логично повдига въпросът за тяхното действие по посока индукция на толеранс- условие ключово необходимо за запазването на ембриона, а локализацията им на място богато на Пг повдига въпроса за взаимодействието им с този хормон.

### **3. Прогестерон и влиянието му върху клетките на имунната система**

Прогестеронът има множество и разнообразни действия, които не са проблем на настоящата работа, поради което ще бъдат разгледани само ефектите му върху клетките на имунната система, на базата на които ще се разгледат и действията му върху МСК.

Прогестеронът като типичен стероиден хормон проявява своя ефект върху таргетните клетки посредством два различни механизма: а.) като усилва транскрипцията на специфични гени след свързване със селективните си вътреклетъчни рецептори - геномно действие и б) като влияе директно чрез мембранни рецептори, различни от класическите интрацелуларни рецептори за стероиди – мембранно (негеномно) действие. Предполага се, че фосфорилирането на рецепторите за стероидните хормони може да доведе до тяхната активация в отсъствие на съответния лиганд. Този феномен е известен още като лиганд-

независимо рецепторно активиране и също спада към втория тип механизми (*Schumacher et al. 1999*).

#### **а.) Вътреклетъчни рецептори - геномно действие на прогестерон**

Прогестероновият рецептор е член на голямо семейство от лиганд активирани ядрени транскрипционни регулатори, които включват рецептори за стероиди, ретиноиди, тиреоидни хормони и витамин D (*Gronemeyer et al. 1991, Tsai et al. 1994*). Счита се, че липофилните стероидни хормони навлизат в съответните таргетни клетки посредством проста дифузия, въпреки че се дискутира и активния им транспорт през мембраната (*Schumacher et al. 1999, Bai et al. 1995*). Описани са две протеинови изоформи на прогестероновия рецептор ПгА и ПгВ, които са продукти на един ген.

Стероидните хормони, в частност прогестеронът, регулират транскрипцията на таргетния ген чрез свързване към селективни вътреклетъчни рецептори, които са структурно организирани в различни домени. Когато не е свързан със своя лиганд рецепторът за прогестерон е асоцииран в комплекс с белтъци, наречени шаперони, като най-често тази роля играят протеините на топлинния стрес (heat shock proteins- HSP). При свързването на прогестерона към съответния рецептор в цитозола протеинът HSP 90 и HSP 56, които поддържат рецептора в инактивирано състояние и висок афинитет за стероидните хормони, се отделят от рецептора (*Evans 1988, Gronemeyer 1997*). След транслокация в ядрото рецептор-лиганд комплексът свързва ДНК последователности наречени хормон-отговорни елементи (hormone response elements- HRE) и така започва инициацията на транскрипцията на прицелния ген (*Truss et al. 1993*)

#### **б.) Негеномно-мембранно действие на прогестеронът**

Стероидните хормони повлияват функциите на таргетните клетки, не само чрез регулиране на генната експресия след свързване с вътреклетъчни рецептори, но също и като действат директно върху клетъчната мембрана (*Falkenstein et al. 2002*). Тези мембранни действия често се определят като „некласически” действия и тяхното обозначаване като негеномни действия може да бъде неправилно, тъй като стероидното действие върху клетъчната мембрана, в много случаи повлиява

експресията посредством вътреклетъчни сигнални пътища. Във всички случаи тези ефекти са бързи, като се реализират чрез мембранни Пг рецептори, най-вероятните кандидати, от които са прогестеронов рецепторен мембранен компонент 1 (PGRMC1) и членовете на прогестин и адипоQ рецепторите (PAQRs) (*Gellersen et al. 2009*)

Според класификацията от Манхайм 1998, негеномните, бързи ефекти на стероидните хормони, включително и прогестерон се делят на:

- неспецифични - наблюдават се при добавянето на високи, не физиологични дози прогестерон и протичат с бързо покачване на вътреклетъчните  $Ca^{2+}$  йони секунди след добавянето на Пг, промяна в активността на фосфолипаза С, рН и липидния бислой на мембраната. Такива ефекти са наблюдавани при НК клетки, (*Falkenstein et al. 2002*).

- специфични - осъществяващи се чрез неklasически стероидни рецептори, разположени върху клетъчната мембрана. Тези ефекти се осъществяват главно посредством фосфорилиране на различни сигнални пътища и са свързани с промяна в цАМФ и  $Ca^{2+}$  йони (*Falkenstein et al. 2002*).

### **3.1. Прогестерон и Т лимфоцити**

Установено е, че чувствителността на Т лимфоцитите към прогестерон е 100 пъти по-висока при бременност (*Szekeres-Bartho et al. 1985*), но в същото време реактивността на Т клетките по време на бременността, не е свързана толкова с повишената концентрация на прогестерон в кръвната плазма, колкото с капацитета на лимфоцитите за свързване на прогестерон т.е. с експресията и активността на прогестероновите рецептори (*Szekeres-Bartho et al. 1983*). Конститутивната експресия на прогестеронови рецептори при Т клетките е ниска, но се увеличава при излагането им на прогестерон (*Hideki et al. 2002*).

#### **3.1.1 Th2 отговор при бременност**

Идеята, че по време на бременност съществуват регулаторни механизми, които подтискат или модулират имунните реакции на майката, за първи път се формулира от *Medawar* през 1953 г., като доста по-късно *Wegmann и Mosman 1993*

постулира теорията си, че по време на бременност се осъществява превключване на имунния отговор по посока на Th2 и това е дефинитивно изискване за успешна бременност. Тази концепция, въпреки прекалено „изчистения“ си вид е генерално приета, като обяснение за липсата на имунно отхвърляне на плода, въпреки, че далеч не може да го изясни изцяло.

Установено е, че прогестеронът директно подтиска Т-клетъчната диференциация в посока Th1 и едновременно с това засилва диференциацията в посока Th2 клетки, като в присъствие на Пг се наблюдава значително повишена синтеза и секреция на Th2 цитокините IL-4 и IL-5 (*Piccinni et al. 1995, Krishnan et al. 1996, Giangrande et al. 1999*). По този начин Пг играе особено важна роля за създаване на оптимален Th1/Th2 профил на майчино-феталната граница.

### **3.1.2. Активация и пролиферация**

Съществуват множество данни, че под влияние на физиологични за бременността дози Пг (10µg/ ml), Т лимфоцитите намаляват способностите си за митоген индуцирана активация, като този ефект се определя от промени в интрацелуларното йонно равновесие и подтискане на алкализацията, получавана вследствие на митогенното действие. Счита се, че отговорни за тези ефекти са въздействията върху бързите, негономи рецептори (*Miyaura et al. 2002, Chien et al. 2006, 2007*)

### **3.1.3. Цитотоксичност**

Прогестеронът подтиска лимфоцитната цитотоксичност чрез свързване с двата си специфични рецептора Пг-А и Пг-В, експресирани върху CD8 Т лимфоцитите (*Loosfelt et al. 1984, Daniel et al. 1988, King et al. 1996, Pasanen et al. 1998*).

### **3.1.4. Tregs**

Под влияние на прогестерон се увеличава броят и на Tregs, което е доказано, както на миши модел (*Aluvihare et al. 2004*), така и при хора, като увеличението е установено и на фето-материнната граница, и в периферната кръв (*Aluvihare et al. 2004, Heikkinen et al. 2004, Zenclussen et al. 2005, Tilburgs et al. 2006*). Във всички случаи се счита, че Пг не е единственият фактор, водещ до този ефект.

### **3.1.5. Т лимфоцити с γ/δ рецептор**

По отношение на разпределението на прогестероновия рецептор при отделните субпопулации от Т лимфоцити в децидуата, е доказано, че той се експресира предимно от Т-лимфоцити с  $\gamma/\delta$  рецептори. Ролята на прогестерона по отношение на  $\gamma/\delta$ Т-лимфоцити е твърде съществена, поради факта, че в децидуата, количеството на  $\gamma/\delta$  TCR-позитивните клетки е значително по-високо, в сравнение с периферната кръв. Сигнализирането през  $V\gamma 1.4\delta 1$  рецепторите на Т-клетките, води до увеличена експресия на рецептори за прогестерон, както и на увеличена продукция на IL-10. Нещо повече, третирани с прогестерон Т $\gamma/\delta$ -лимфоцити, както и децидуалните CD56+ клетки секретират 34кDa фактор, който намалява лимфоцитната цитотоксичност, простагландиновата синтеза и има антиаборивен ефект Тази субстанция се нарича Прогестерон Индуциран Блокиращ Фактор (Progesterone Induced Blocking Factor- PIBF) (Szekeres-Bartho et al. 1985) и ще бъде подробно разгледана по нататък.

### **3.2.В лимфоцити**

По време на бременност броят на В лимфоцитите се увеличава, като роля за това несъмнено има и Пг (Luppi et al. 2002, Maret et al. 2003). Един от възможните механизми, чрез които прогестеронът влияе върху В-лимфоцитите е непряк и е свързан с предизвиканата от Пг активация на CD4+Т клетките, както и на АПК, под действието на които се повишава секрецията на антитела от В-клетките (Lu et al. 1999). Влиянието на Пг води не само до количествено повишаване на имуноглобулините, но и на качествени промени по отношение на субкласовете (Lu et al. 1999). Важно свойство на прогестерона е, че в негово присъствие се повишава секрецията на т.н. асиметрични антитела - IgG тип антитела, които свързват антигена с относително висок афинитет (Zenclussen et al. 2001). Изследванията върху асиметричните антитела установяват наличието на две свързващи места с различен афинитет на свързване, което се дължи на присъствието на олигозахаридна група от манозен тип само в единия от двата антиген свързващи фрагмента (Malan et al. 1988, Blois et al. 2004). Асиметричните антитела представляват около 9%, от тоталния серумен IgG, като по време на бременност се

покачват до 29%. Характерно е, че асиметричните антитела са силно понижени (до 3%) при жени с рекурентни аборти (*Eblen et al. 2000*). Допуска се, че асиметричните антитела имат протективна роля, тъй като не се формират антиген-антитяло комплекси с адекватна структура. Поради асиметричното си гликозилиране те са неспособни да осъществяват ефекторните си функции, като фиксацията на комплемента, опсонизация и антитяло-медирана клетъчно зависима цитотоксичност (*Blois et al. 2004*). *In vitro* експерименти показват, че наред с Пг, друг фактор, който повлиява синтеза и секрецията на асиметрични антитела е IL-6, който я подтиска по дозо-зависим начин. Наред с увеличаване на пула на асиметричните антитела, Пг подтиска и IL-6 рецептора, чрез инхибиция на gp130. По този начин Пг и IL-6 чрез противоположните си ефекти, регулират пула на асиметрични антитела (*Canellada et al. 2002*). Наши резултати, показват, че под влияние на физиологични за бременността дози Пг се установява увеличено количество асиметрични антитела, както при изолирани В лимфоцити от бременни жени, така и при хибридомни клетъчни линии, като ние считаме, че Пг директно участва в засиленото гликозилиране на имуноглобулиновите молекули (*Ivanova-Todorova et al. 2008*)

### **3.3. НК-клетки**

Прогестеронът оказва влияние, както на децидуалните, така и на периферните НК клетки. Както вече беше казано, НК-клетките се установяват в човешка децидуа, където са най-голямата левкоцитна субпопулация и експресират прогестеронови рецептори (*Henderson et al. 2003*). Броят на утеринните НК-клетки значително се увеличава по време на ранната бременност, което може да бъде дължи на два механизма. Първият механизъм предполага, че НК-клетките от периферната кръв селективно се насочват към маточната лигавица благодарение на взаимодействията им с адхезивни молекули в децидуалните кръвоносни съдове. Вторият вероятен механизъм е *in situ* пролиферация на утеринните НК-клетки, стимулирана или от цитокини, продуцирани от други децидуални клетки, или от стероидни хормони, а най-вероятно е вследствие и на двете групи фактори (*Brabin et al. 1985*).

Периферните NK-клетки изолирани от бременни жени притежават понижена активност, в сравнение с NK-клетките при небременни (*Ober et al. 1998, Szereday et al. 2003*), експресират Пг рецептори и под влияние на Пг тяхната активност се инхибира. Счита се, че това се случва чрез индукция на каспаза медирана апоптоза и редуцирана IFN $\gamma$  експресия (*Arruvito et al. 2008*). Нещо повече, установена е повишена експресия на някои от инхибиторните рецептори на NK клетките (*Braud et al. 1998*). Промените в броя, фенотипа и активността на периферните NK-клетки по време на бременност е в съответствие с Th1/Th2 превключването на цитокиновия профил и предполага хормонална регулация, осъществявана и от прогестерон (*Aoki et al. 1995, Clifford et al. 1999*).

### **3.4.Макрофаги**

В децидуата макрофагите представляват около 20-30% от всички левкоцити (*Bulmer and Johnson 1984*). Има данни, че увеличението в броя на макрофагите в децидуата, зависи от действието на хемокина CCL2/MCP-1, като промяната в нивата на този хемокин е хормон-зависим процес, свързан с действието на Пг. (*Petrovska et al. 1996, Arici 1999, Penny 2000, Bouche et al. 2000*).

Предполага се, че както при лимфоцитите така и тук, хормоните на бременността са един от факторите, отговорни за регулацията на клетките на вродения имунитет, чрез модулиране на цитокиновия баланс. (*Beagley et al. 2003*).

### **3.5.Дендритни клетки**

Дендритните клетки са ключови по отношение осъществяване на имунния толеранс, поради което се очаква ролята на Пг по отношение на тях да бъде твърде съществена. Изследванията в периферната кръв показват, че под въздействие на Пг субпопулацията на миелоидните дендритни клетки се увеличават, а тази на лимфоидните намалява (*Ueda et al. 2003*).

В децидуата в ранните месеци на бременността, когато се наблюдава увеличение на количеството на прогестерон, са открити активирани CD83+ зрели дендритни клетки (*Kammerer et al. 2000, 2003, Gardner et al. 2003*). Децидуалните ДК имат фенотип CD83+, CD80+, CD86+ и показват намален капацитет за продукция на IL-12 (*Fijak et al. 2007*). Те са подходящи кандидати за осъществяване на имуен

толеранс по време на бременност, чрез секреция на IL-10 и/или експресия на инхибиторни рецептори (*Kammerer et al. 2004. Dietl et al. 2006*). Други автори съобщават, че едни и същи ДК могат да продуцират едновременно IL-10 и IL-12 и съответно да насочват имунния отговор към Th1, Th2 и Th17 (*Iwakura et al. 2006, Lee et al. 2006*).

Нашите резултати относно влиянието на физиологични за бременността дози Пг върху зрели моноцитни дендритни клетки показват че:

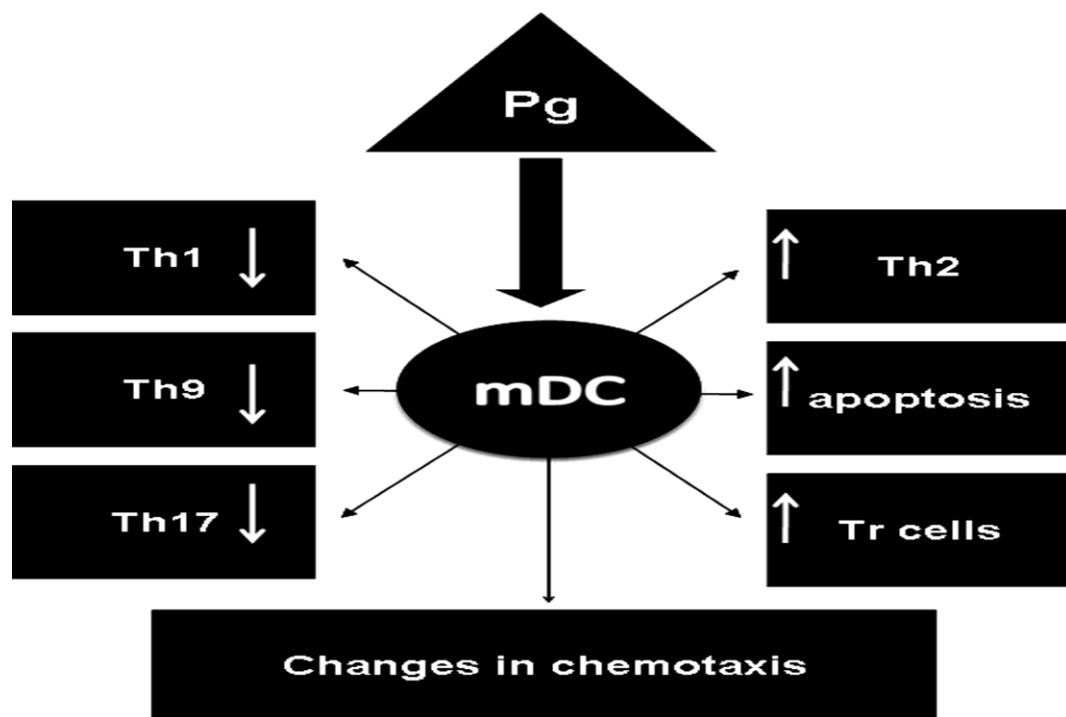
- Под действието на Пг се увеличава броя зрели моноцитни дендритни клетки, като процесът е доза зависим и се осъществява на ниво диференциация на моноцитите, а не на ниво съзряване на незрелите в зрели дендритни клетки
- Повишава се консумацията на IL-4 от ДК и се увеличава тяхната апоптоза
- Засилва се секрецията на IL-10, IL-27 и IL-3, докато тази на IL-23 намалява (*Kyurkchiev et al. 2007*)

На базата на получените резултати, ние считаме, че под влияние на Пг, дендритните клетки скъсяват жизнения си цикъл, като се диференцират, съзряват и умират по бързо. Причината за това би могло да е необходимостта от бързото им „изчистване” от децидуата с цел намален контакт с Т лимфоцитите и НК клетките, евентуално ангажиран с условия на имуногенност. Прогестеронът, водещ до повишена консумация на IL-4 от ДК се свързва и с друг ефект – блокиране на развитието на Th9 имунен отговор, който е силно зависим от IL-4. Ние спекулираме, че причината за индукция на апоптоза под действието на Пг би могла да бъде автокринната секреция на IL-10 от страна на ДК. По този начин под Пг индукция, ДК извършват „самоубийство”, съпроводено с подтисната секреция на Th1 цитокини (IL-23) и засилена секреция на Th2 цитокини като IL-13, IL-27 (*Kyurkchiev et al. 2011*).

Секрецията на IL-10 от ДК под влияние на Пг е докладвана и от други научни групи (*Biois et al. 2007*), като се счита, че IL-10 заедно с IL-27 влияят и върху формирането популацията известна като Tr1, която също участва в индукцията на имунния толеранс (*Flavell et al. 2007*). Подтиснатата секреция на IL-23 от ДК под Пг действие също е от доста съществено значение, тъй като IL-23 в някои

отношения е доста подобен на IL-12, бидейки сигнален цитокин, както за клетъчна пролиферация, така и за формирането на Th17 имунен отговор (Frucht 2002).

Сумарно нашите резултати показват, че под влиянието на физиологични за бременността дози прогестерон, дендритните клетки засилват своята апоптоза и ускоряват жизнения си цикъл, секретирайки цитокини, стимулиращи Th2 имунния отговор и водещи до формиране на регулаторни Т субпопулации. От своя страна те оказват влияние в посока подтискане на Th1, Th9 и Th17 имунния отговор (Фиг. 43)



**Фиг. 43.** Действие на прогестерон върху моноцитни дендритни клетки (Kyurkchiev, *Advances in Neuroimmune Biology*, 2011)

От казаното дотук става недвусмислено ясно, че прогестеронът, намиращ се в големи количества в децидуата, повлиява множество имунокомпетентни клетки, част от които ангажирани с процеса на имуномодуляция. От друга страна, фактите, че бременността е феномен, свързан с имуносупресия и наличието на Д-МСК в децидуата поставя въпроса за връзката между тези елементи. (Фиг.44).



**Фиг. 44** В децидуата прогестеронът и имунорегулаторните клетки (част от които са и Д-МСК) си взаимодействат осигурявайки имунна супресия

Целта на нашите изследвания в този аспект беше да се определи въздействието на Пг върху МСК, с оглед на индукция на определени молекули върху тях, обуславящи имунна супресия. Изследванията ни показаха, че под влияние на Пг мезенхимните стволови клетки експресират два специфични протеина, тясно ангажирани в процеса на супресия на имунния отговор: PIBF и HLA-G.

#### **4. Прогестерон индуциран блокиращ фактор (PIBF)**

PIBF е описан от *Szekerez-Bartho et al. 1985, 1989* като 34kD протеин, секретиран *de novo* под прогестеронова индукция по време на бременност, с активна роля в регулацията на имунния отговор. Същата група доказва способността му да инхибира лимфоцитната цитотоксичност, цитотоксичността на НК клетките, простагландиновата секреция и антиабортивния му ефект. Като основен негов източник се сочат Т лимфоцитите с  $\gamma\delta$  рецептор, както и децидуалните НК клетки,

като секрецията му се индуцира под прогестероново въздействие, чрез въздействие върху класическите и/или мембранните рецептори за Пг. (*Szekerez-Bartho et al. 2001a, Dosiou and Guidice 2005*). Имуномодулаторните ефекти на PIBF са различни, но общата им посока е протективно действие върху бременността (*Szekerez-Bartho et al. 2001b*). Според някои данни при около 89% от пациентите със спонтанни аборти се установява ниска концентрация на PIBF в сравнение с тези с нормално протекла бременност (*Chek et al. 1996*)

PIBF подтиска НК клетъчната активност в децидуата чрез два известни досега механизма:

а.) Подтискане на секрецията на перфорин, чрез блокиране на екзоцитозата на гранулите му, без да се повлиява свързването на НК към клетката мишена (*Laskarin et al. 1999, Szekerez-Bartho et al. 2009*)

б.) Подтискане секрецията на арахидоновата киселина и оттам простагландиновата синтеза. Следствие на това е и инхибирането на секрецията на IL-12, поради намаляването на PGE2 секрецията (*Szekerez-Bartho et al. 1985, van Kaer et al. 1991*)

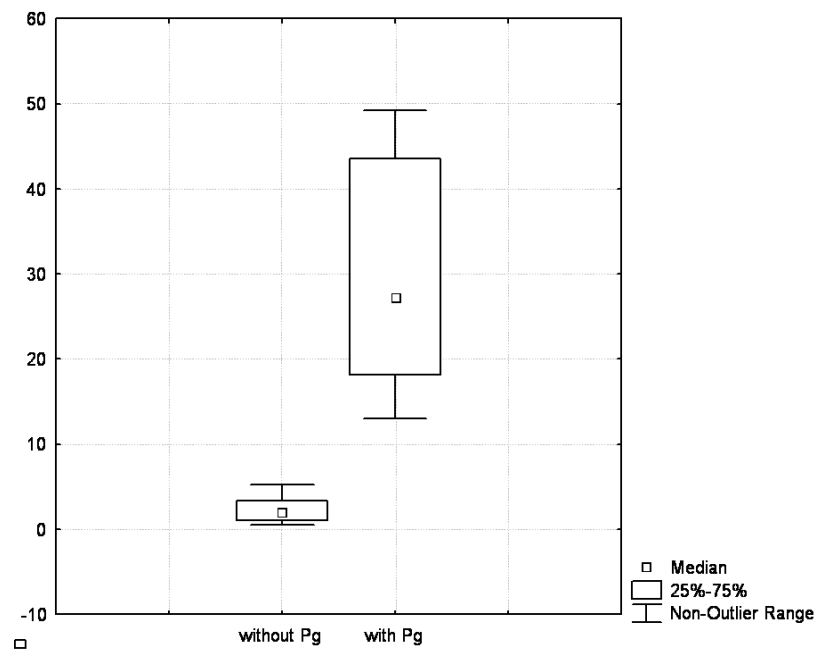
Детайлни изследвания доказват, че под влияние на PIBF се засилва секрецията на Th2 цитокините: IL-3, IL-4 и IL-10 от култивирани *in vitro* миши далачни клетки, докато продукцията им на IFN $\gamma$  не претърпява промяна (*Szekerez-Bartho and Wegman 1996*). PIBF се счита за свързан със синтеза и секрецията на асиметрични антитела, като също така е установена корелация между количеството асиметрични антитела и процента PIBF експресиращи лимфоцити (*Canellada et al. 2002*).

Изследванията на *Polgar et al. 2003* доказват, че PIBF може да бъде поне в две форми – пълен 90kD протеин, локализиран в ядрото и „орязана” форма на 34kD протеин, установен в цитоплазмата, като същата група доказва, че биологичната активност на PIBF се медира от N- терминалната част на протеиновата молекула.

Рецепторите за PIBF се експресират върху лимфоцитите, като има данни, че в случая със CD8+T клетките, рецепторите се установяват само по време на бременност (*van Kaer et al. 1991*). Установено е, че ефектът на PIBF, се медира от рецептор, съставен от  $\alpha$  веригата на IL-4R и PIBF рецептор, представляващ глюкозофосфатидилинозитол (GPI) закотвящ протеин. Активационният сигнал

индуцира фосфорилация и нуклеарна транслокация на STAT6 и подтискане на STAT3 сигналния път (Kozma et al. 1996).

Въпреки първоначалните мнения, че PIBF се синтезира и секретира от  $\gamma\delta$  Т лимфоцитите, Т клетките с  $\alpha\beta$  рецептор също могат да бъдат негови източници, като нашите данни показват, че за целта са необходими две условия – клетките да бъдат изолирани от бременна жена и да бъдат култивирани с прогестерон поне за 48 часа. При тези условия третирането с прогестерон, чувствително увеличава процента PIBF позитивни Т клетки (**Фиг. 45**) (Ivanova-Todorova et al. 2008).



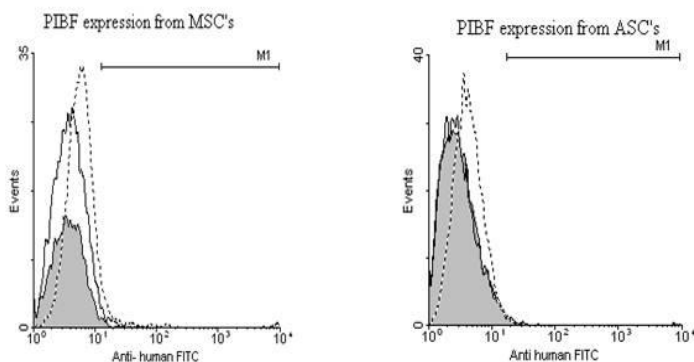
**Фиг. 45** Сравняване промените в експресията на PIBF от лимфоцити на 10 жени с нормална бременност, култивирани в присъствие и отсъствие на прогестерон. Присъствието на ПГ води до статистически значимо увеличение в експресията на PIBF ( $P < 0.05$ ). (Ivanova-Todorova et al. *Journal of Reproductive Immunology*, 2008).

Множество данни описват локализацията на иРНК за PIBF, или съответно експресиран протеин, не само в Т лимфоцитите, но и в други клетки, характеризиращи се с интензивна пролиферация, като човешки трофобласт, туморни клетъчни линии и ендометриални клетки (Check et al. 2009, Mikoja et al. 2011). Общото между всички тях е, че те не са крайно диференцирани клетки,

което ни даде основание да изследваме експресията на PIBF при мезенхимни стволови клетки, изолирани от различни източници.

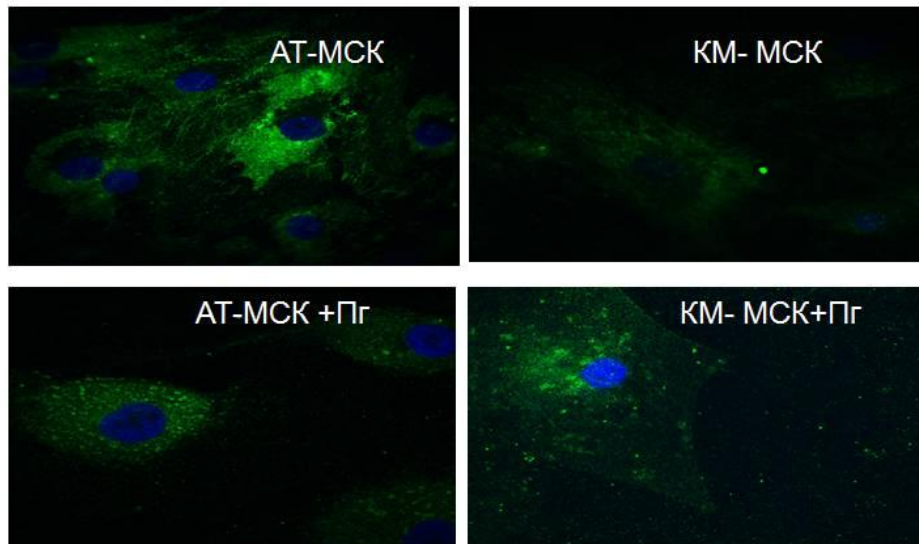
#### **4.1. Собствени резултати и дискусия**

Абсолютно необходимо условия за изследването на PIBF в различни видове МСК беше наличието на анти-PIBF моноклонално антитяло, което беше създадено, характеризирани и описано от нашия екип. Glutathione S transferase-PIBF fusion протеин беше изолиран от щамове E.coli трансформирани с GST- PIBF вектор, любезно предоставен ни от prof. Szekeres-Bartho (Pecs University Medical School, Pecs, Hungary). На базата на това, използвайки класическата хибридомна техника беше създадено моноклонално антитяло, наименовано от нас 3A6 (*Ivanova-Todorova et al. 2008*). То показва способност да разпознава PIBF при използване на имуноблот, флоуцитометрия и имунофлуоресценция, което ни даде възможност да изследваме наличието на PIBF върху МСК чрез два алтернативни метода- флоуцитометрия и конфокална микроскопия. При флоуцитометричните изследвания установихме слаба до липсваща експресия на повърхностен PIBF, като култивирането на клетките с Пг, не води до увеличаване на процента експресиращи PIBF клетки (*Kyurkchiev et al. 2013*) (**Фиг. 46**).



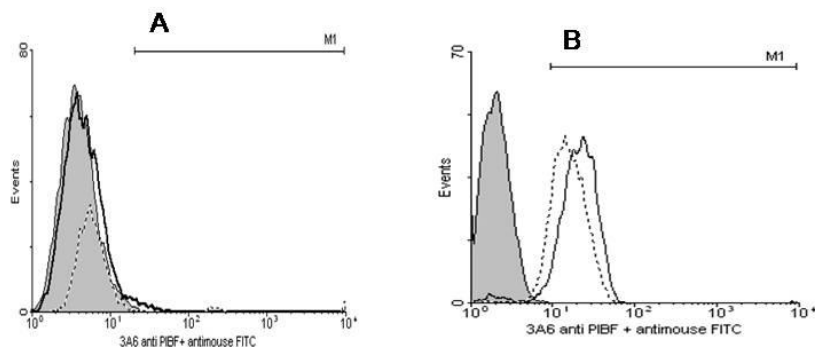
**Фиг. 46** Повърхностна експресия на PIBF от КМ-МСК (вляво) и АТ-МСК (вдясно). Запълнената линия изобразява отрицателната контрола, плътната черна линия – МСК, а точковидна линия МСК култивирани с Пг. Установява се минимална до липсваща PIBF повърхностна експресия, независимо от наличието на Пг.  
**Легенда:** MSCs – КМ-МСК, ASCs- АТ-МСК

При конфокалното изследване на двата вида клетки, обаче се установи специфично перинуклеарно грануларно цитоплазмено светене, като култивирането с Пг не променя съществено характера и интензивността му. Прави впечатление, че АТ-МСК се характеризират с по голяма експресия на PIBF (**Фиг. 47**).



**Фиг. 47.** Специфично перинуклеарно грануларно цитоплазмено светене за P1BF, установено с конфокална микроскопия.

Флуориметричното изследване на Д-МСК показва около 2.4% специфична повърхностна експресия на P1BF, която както и при другите видове МСК не се повлиява от култивирането на клетките с Пг (**Фиг. 48А**), докато при изследването на интрацелуларната P1BF експресия се установи, че 90% от Д-МСК експресират специфично P1BF. Култивирането с прогестерон, намали на пръв поглед парадоксално този процент на 72% (**Фиг. 48В**).

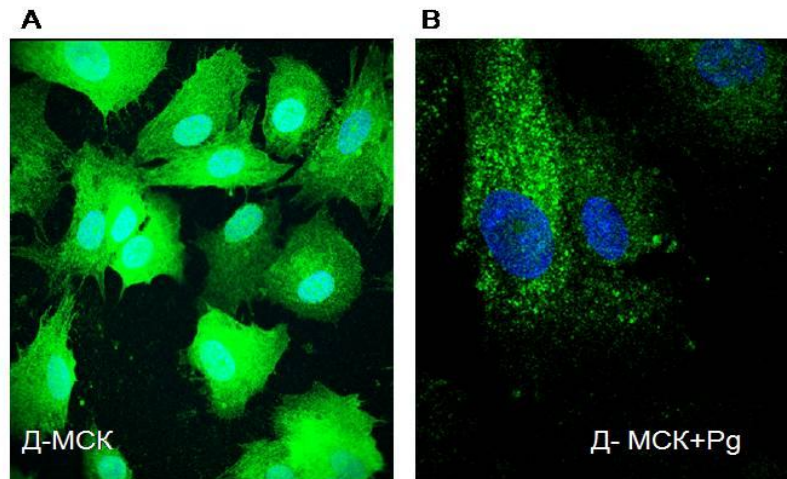


**Фиг.48** Експресия на PIBF от Д- МСК. А- повърхностна експресия, В- интрацелуларна експресия (запълнена графика – отрицателна контрола, плътна черна линия –Д-МСК, точковидна линия Д-МСК култивирани с Пг) (*Ivanova-Todorova et al. Compt. Rend. Acad. Bulg.Sci 2009*)

Този резултат се потвърди и при изследването чрез конфокална микроскопия, където почти всички Д-МСК показаха интензивно хомогенно интрацелуларно оцветяване (**Фиг. 49 А**), както в ядрото, така и в цитоплазмата, а култивирането с Пг доведе до по-слабата му интензивност и променен характер. Под прогестероново влияние, клетките демонстрираха перинуклеарно цитоплазмено гранулирано оцветяване (**Фиг. 49 В**).

Наличието на интрацелуларен PIBF във почти всички Д-МСК некултивирани с Пг, ни дава пълното основание да спекулираме, че вероятно  $\gamma\delta$  Т клетките далеч не са основния източник на PIBF, по време на ранната бременност, тъй като са сравнително малка популация в ранната човешка децидуа, за сметка на Д-МСК, които са основен клетъчен тип там. Ние считаме, че Д-МСК са алтернативен

източник на P1BF, като допускаме, че те представляват депо за този протеин (Kyurkchiev et al. 2011a,b).



**Фиг. 49** Д-МСК демонстрират интензивно хомогенно интрацелуларно оцветяване в ядрото и цитоплазмата (А), а култивирането с Пг доведе до по-слабо интензивно перинуклеарно цитоплазмено гранулирано оцветяване (В) (Ivanova-Todorova et al. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci 2009)

Установяването на P1BF експресия в клетъчните ядра на Д-МСК, ни дава също така основание да допуснем, че P1BF е свързан с клетъчния цикъл на Д-МСК, като в съгласие на това са данните, че иРНК на P1BF е свръхекспресирана при силно пролифериращи клетки (като Д-МСК), независимо от наличието им на прогестеронови рецептори (Lachmann et al. 2004). Фактът, че P1BF изчезва от ядрото и намалява в цитоплазмата при култивиране на Д-МСК с Пг, би могъл да е вследствие на това, че под въздействие на прогестерон Д-МСК секретират „складираня“ P1BF (Kyurkchiev et al. 2011a,b). Това твърдение е твърде логично, като се има предвид факта, че прогестеронови рецептори са описани при МСК (Movagar et al. 2008, Han et al. 2008).

Ролята на PIBF се свързва и с действието му като ядрен фактор, който може директно да свърже промотора на гена на IL-6 и да бъде един от факторите, осигуряващи секрецията на цитокина (*Halasz et al. 2013*), а както стана ясно IL-6 е класически цитокин, секретирани от МСК.

В заключение нашият екип за първи път описва интрацелуларна PIBF експресия в МСК, като в Д-МСК се установява, че тя намалява под прогестеронова индукция, вероятно поради секретиранието на PIBF от тези клетки.

## 5. HLA- G

Добре изветно е, че наред с „класическите“ антигени от HLA системата (A, B, C), съществуват и „некласически“ (E, G, F), които са в състояние да индуцират имунен толеранс при свързването си с инхибиторни рецептори.

В края на 80-те години за първи път е описан нов член на фамилията на човешките левкоцитни антигени клас Ib (HLA-Ib), който е означен като HLA-G. Установено е, че той се характеризира с ниска степен на полиморфизъм и рестриктирано тъканно разпространение (*Geraghty et al. 1987, Le Bouteiller 1994*). Полиморфизмът на HLA-G се свежда до 4 мембранни изоформи (HLA- G1 – HLA-G-4) и три разтворими (HLA-G5- HLA-G7). Подобно на класическите HLA клас I протеини, HLA-G е съставен от  $\alpha$  верига, съдържаща три домена, която е не-ковалентно свързана с  $\beta$ 2-микроглобулин.

Чрез използване на моноклонални антитела се разкрива, че HLA-G има повърхностни и интрацитоплазмени форми, като първият описан клетъчен източник на HLA-G са човешките цитотрофобластни клетки (*Kovats et al. 1990*). По късно става ясно, че HLA-G се намира в екстравилозния цитотрофобласт, хорионалните ендотелни клетки, плацентарните макрофаги, активирани от IFN $\gamma$  (*McMaster et al. 1995, Blaschitz et al. 1997, Chu et al. 1998*), както и в ниски количества при култури от ДСК (*Blanko et al. 2008*). Въпреки първоначалните мнения, че разпространението на HLA-G е ограничено до клетките и тъканите в репродуктивния тракт, множество данни сочат, че това далеч не е така и впоследствие експресията на HLA-G се установява в тимусния епител (*Mallet et al.*

1999), някои туморни клетки (*Wiendal et al. 2002*) и патологично променена интестинална мукоза (*Torres et al. 2006*). HLA-G може да бъде открит и при клетки на трансплантирани пациенти, при вирусни инфекции и аутоимунни заболявания. Всичко това показва, че HLA-G няма толкова рестриктирано разпространение, колкото се е считало в началото на откриването му. Нещо повече, иРНК на HLA-G е установена в множество тъкани, но експресията на самия протеин се установява в сравнително малко видове клетки, от което може да се направи извода, че експресията на този протеин е силно зависима от средата.

HLA-G безспорно е фактор, който предотвратява отхвърлянето на семи-алогенния плод, като по този протектира бременността. Многобройни са механизми, чрез които той действа в тази насока, като се повлияват множество типове имунни клетки, както чрез директен междуклетъчен контакт, където роля играят мембранните форми на HLA-G, така и чрез индукция на цитокинова секреция от други клетки и/или индукция на имунорегулаторни субпопулации. Основните мишени за имunosупресивните функции на HLA-G са Т лимфоцитите, НК клетките и антиген-представящите клетки. По отношение на Т клетките е доказано, че HLA-G подтиска пролиферацията на CD4+Т лимфоцитите и индуцира апоптоза в активираните CD8+Т лимфоцити, като тези взаимодействия се определят от свързването на HLA-G с инхибиторни рецептори като ILT2 и ILT4 (*Bainbridge et al. 2000, Fournel et al. 2000*). Известно е също така, че HLA-G е един от факторите, отговорен за Th1/Th2 превключването по време на бременността, характеризиращо се с увеличена секреция на IL-4 и намалена секреция на TGFβ и TNFα. Наред с това секреторният HLA-G5 е един от факторите, пряко ангажирани с генерирането на CD4+CD25<sup>high</sup>FoxP3+ имунорегулаторни клетки, както беше споменато в глава IV.

Една от най-важните имunosупресивни функции на HLA-G засяга НК клетките като се счита, че HLA-G се свързва с един от killer immunoglobulin-like receptor (KIR) – 2DL4 и ILT2 и това взаимодействие инхибира НК клетъчната активност (*Marchal-Bras-Goncalves et al. 2001*). Механизмът на супресия включва цитоскелетна ре-организация на НК клетките, изразяваща се в липса на бърза

поляризация на литичните им гранули, които остават дифузно в цитоплазмата (Favier et al. 2010).

HLA-G въздейства и върху моноцитните дендритни клетки, като води до верига от събития, имащи краен резултат – подтисната диференциация на ДК, процес разгледан в глава V (Liang et al. 2008)

Както вече беше споменато експресията на HLA-G се регулира от множество фактори като вируси, цитокини и хормони. Докладвано е, че някои невротропни вируси като херпес симплекс тип 1 и вируса на беса, стимулират експресията на HLA-G в човешки неврални клетки (Lafon et al. 2005), докато други вируси като HIV значително подтискат секрецията му при макрофаги и глиомни клетки (Derrien et al. 2004). Сред цитокините особено значимо място заема IL-10, който засилва, както експресията, така и секрецията на HLA-G върху клетки от първичен кожен лимфом, както и върху моноцити (Moreau et al. 1999, Rizzo et al. 2011). Влияние върху експресията на HLA-G има и IFN $\gamma$ , под влияние на който моноцитите и макрофагите експресират много ниски количества HLA-G, чувствително увеличават тази експресия (Yang et al. 1996).

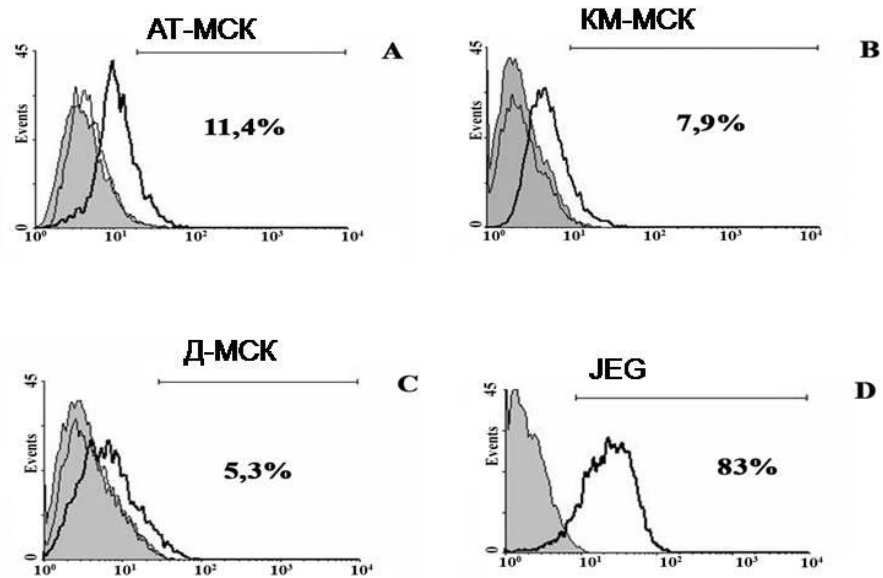
Прогестеронът категорично е един от основните фактори, регулиращи експресията и секрецията на HLA-G. При използване на имуноензимни и флоуцитометрични методи се открива, че гладкомускулните клетки и клетките на сърдечните съдове, които не експресират HLA-G, запозват да го правят при третирането им с Пг, като се наблюдава както мембранната, така и секреторната форма на HLA-G (Sheshgiri et al. 2008). Отново и двете форми на HLA-G са намерени в значително увеличени количества след прогестеронова индукция на цитотрофобластни култури и JEG-3 хорионкарциномна клетъчна линия, като процесът демонстрира време и доза зависимост (Yie et al. 2006). Още едно доказателство за влиянието на Пг върху експресията на HLA-G са експериментите на Blanco et al. 2008, вследствие на които се установява, че HLA-G увеличава експресията си при култури на ДСК, третирани с Пг и цАМФ. По отношение на експресията на HLA-G от ДСК се установява, че тя е налична във фетални МСК (Gotherstrom et al. 2005), докато Nasef et al. 2007 за първи път описват тази експресия и секреция при КМ-МСК, изолирани от

възрастни индивиди, като доказателствата им се базират на използване на широк набор от методи – RT-PCR, имунофлуоресценция, флоуцитометрия и ELISA.

### **5.1. Собствени резултати и дискусия**

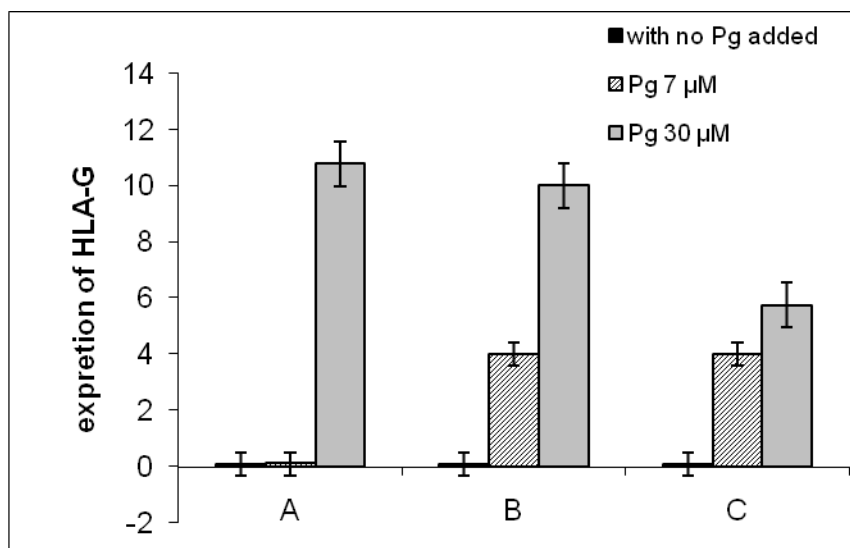
Данните относно експресията на HLA-G от множество клетъчни типове (включително и МСК), както и описаната способност тази експресия да се влияе от множество фактори (включително прогестерон) ни дадоха основание да изследваме връзката Пг/МСК от гледна точка на HLA-G.

За целта използвахме МСК изолирани от мастна тъкан (АТ-МСК), костен мозък (КМ-МСК), и децидуа (Д-МСК), които бяха култивирани с Пг. При флоуцитометричното изследване ние не установихме повърхностна експресия на HLA-G, нито при АТ-МСК, нито при КМ-МСК, нито при Д-МСК култивирани самостоятелно. Култивирането с Пг, обаче доведе до повърхностна експресия на HLA-G и при трите вида клетки, съответно АТ-МСК -11.4%, КМ-МСК 7.9% и Д-МСК 5.3% (**Фиг. 50**) (*Ivanova-Todorova et al. 2009*). Интересно беше, че докато при КМ-МСК и Д-МСК, повърхностната експресия на HLA-G показва доза-зависимост от Пг, това не се наблюдаваше при АТ-МСК, които не реагираха на по-ниските дози Пг (7µm), въпреки, че показаха най- добра експресия на високите (30µm). (**Фиг. 51**)



**Фиг. 50** Експресия на HLA-G под влияние на Пг при АТ-МСК (А), КМ-МСК (В) и Д-МСК (С). Експресия на HLA-G от JEG клетки, за които е известно, че експресират HLA-G и служат за положителна контрола (D)

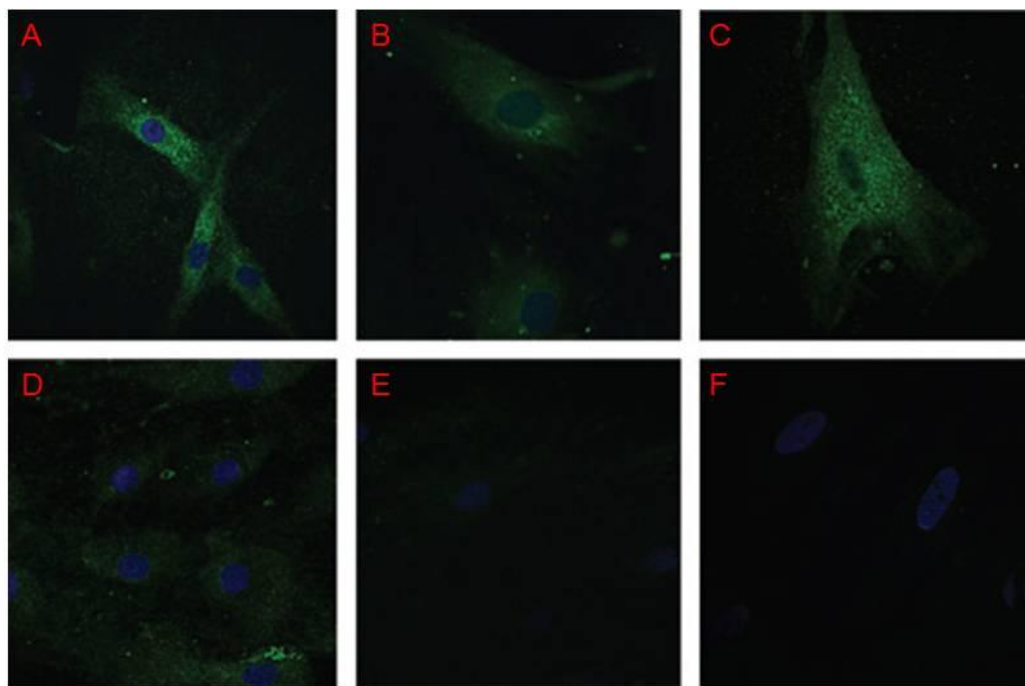
Запълнена линия – отрицателна контрола, тънка линия – клетки култивирани без Пг, дебела линия- клетки култивирани с Пг. (Ivanova-Todorova et al. Am. J. Reprod. Immunol. 2009)



**Фиг. 51.** Доза зависимо действие на Пг върху АТ-МСК (А), КМ-МСК (В) и Д-МСК (С)  $p < 0.05$  (Ivanova-Todorova et al. Am. J. Reprod. Immunol. 2009)

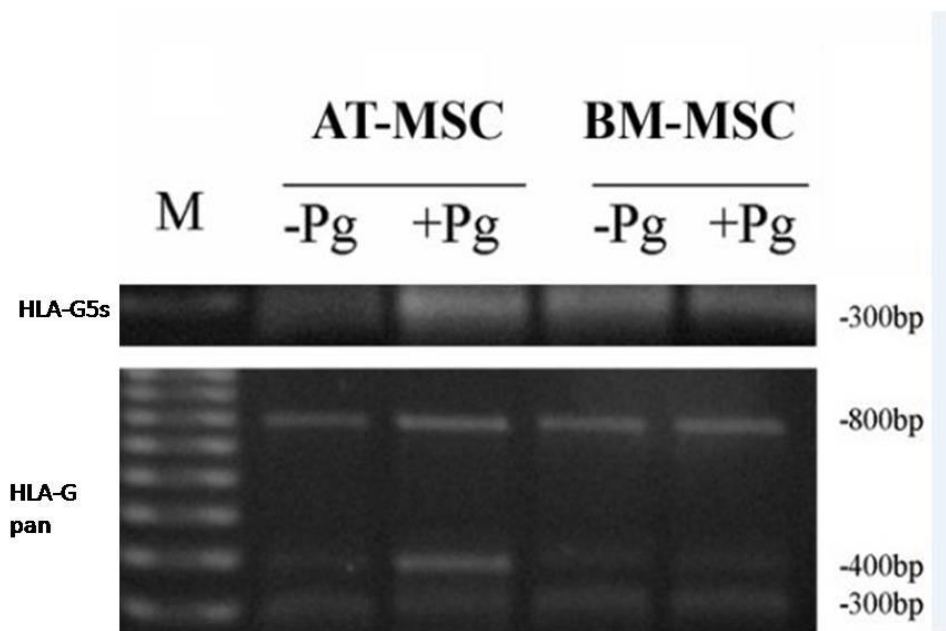
Тези резултати ни дават основания да считаме, че в случая АТ-МСК реагират по различно от другите два типа МСК, като вероятно, върху тяхната Пг индуцирана HLA-G експресия действа общия ефект на стероидните хормони, докато при КМ-МСК и Д-МСК ефектът е по специфичен за Пг.

При изследването с конфокална микроскопия също не се установи нито повърхностна, нито интрацелуларна експресия на HLA-G при трите вида МСК (Фиг 52 d, e, f). Добавянето на Пг обаче доведе до наличието на специфично за HLA-G перинуклеарно оцветяване и при трите вида МСК, като най-интензивно беше за Д-МСК (Фиг 52 a,b, c).



**Фиг. 52.** Конфокално изображение на експресията на HLA-G от три вида МСК култивирани с Пг АТ-МСК (А), КМ-МСК (В) и Д-МСК (С). D, E, F показват съответните клетки, култивирани без Пг. (*Ivanova-Todorova et al. Am. J. Reprod. Immunol. 2009*)

Въпреки липсата на HLA-G при МСК, култивирани без прогестерон, установена с флоуцитометрия и конфокална микроскопия, при АТ-МСК и КМ-МСК, изследванията чрез RT-PCR доказаха, че иРНК на HLA-G се открива и при двата вида. Бяха използвани два вида праймери „пан HLA-G” праймер и такъв специфичен за секреторната форма HLA-G5. При всички изследвани проби бяха установени положителни сигнали като с „пан” праймера бендове бяха определени в регионите 300, 400 и 800 bp, докато с HLA-G5s праймера основния бенд беше в регион 300( **Фиг. 53**).



**Фиг. 53** RT-PCR изследване за HLA-G иРНК при АТ-МСК и КМ-МСК. Резултатите показват налична иРНК при двата вида клетки независимо от прогестероновата индукция (*Ivanova-Todorova et al. Am. J. Reprod. Immunol. 2009 с модификации*)

В нашите експерименти ние не можахме да установим секреторни форми на HLA-G в супернатантите, нито в клетките третирани с Пг, нито в контролните клетки, като това се отнася за всички изследвани видове МСК. Причините за това са свързани с липса на достатъчно качествен и достоверен търговски ELISA кит (поне по времето на нашите изследвания)

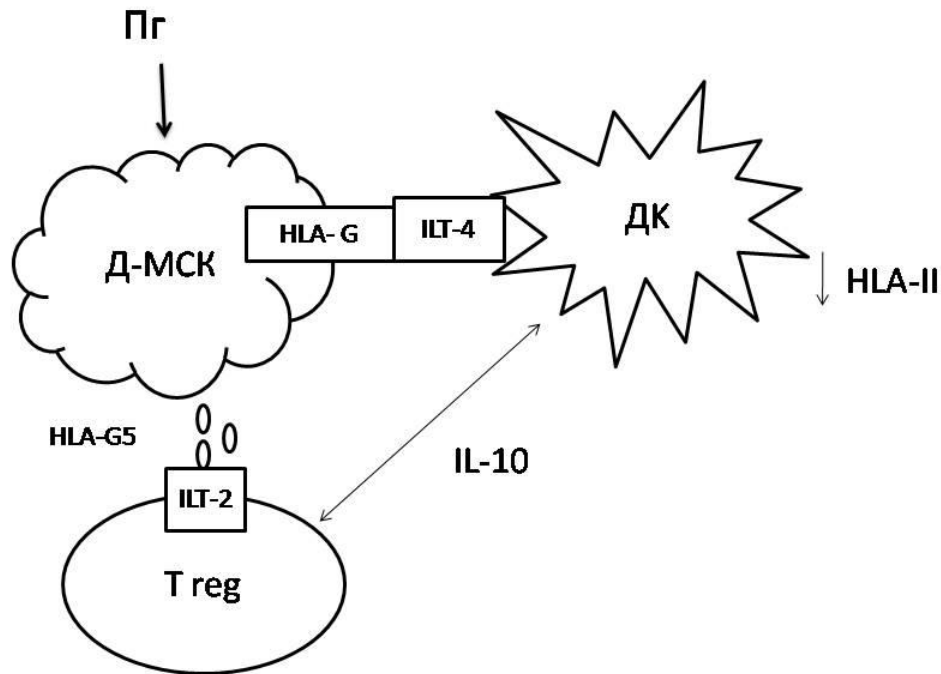
Резултатите, които получихме ни дават основание да твърдим, че HLA-G на ниво нуклеинови киселини се намира и в трите вида мезенхимни стволови клетки, но липсва експресия на повърхностен протеин. За сметка на това обаче под въздействието на прогестерон HLA-G протеина се експресира интрацелуларно, като най-значителната му експресия се наблюдава при Д-МСК, вероятно поради факта, че мястото, от което произхождат е с висока концентрация на Пг. Под

прогестеронова индукция се наблюдава и повърхностна експресия на HLA-G и от трите вида МСК.

Значението на експресията и евентуалната секреция на HLA-G под прогестеронова индукция би могло да се приеме като ключово в регулацията на имунния отговор в женския репродуктивен тракт по време на бременност. Под Пг действие, експресията на HLA-G върху Д-МСК вероятно е важен фактор в индукцията на толерогенни ДК в децидуата. *Liang et al. 2008* разискват генерирането им под HLA-G индукцията, като доказват, че HLA-G може да се свърже за ILT-4 на повърхността на дендритните клетки, връзка, която активира тирозин фосфатазите SHP-1 и SHP-2. Впоследствие, чрез транслокацията на NKкВ се секретира IL-6, който автокринно, чрез активация на STAT3 води до увеличени нива на катепсин S и в следствие инхибиция на HLA-II експресията от ДК. Разбира се, МСК сами по себе си секретират IL-6 могат да доведат до тези процеси и по паракринен механизъм, без посредничеството на HLA-G. Описаният механизъм демонстрира как под Пг индукция се реализира един типично контактен механизъм, чрез който МСК могат да доведат до развитие на толерогенни дендритни клетки, със всички последиствия от това.

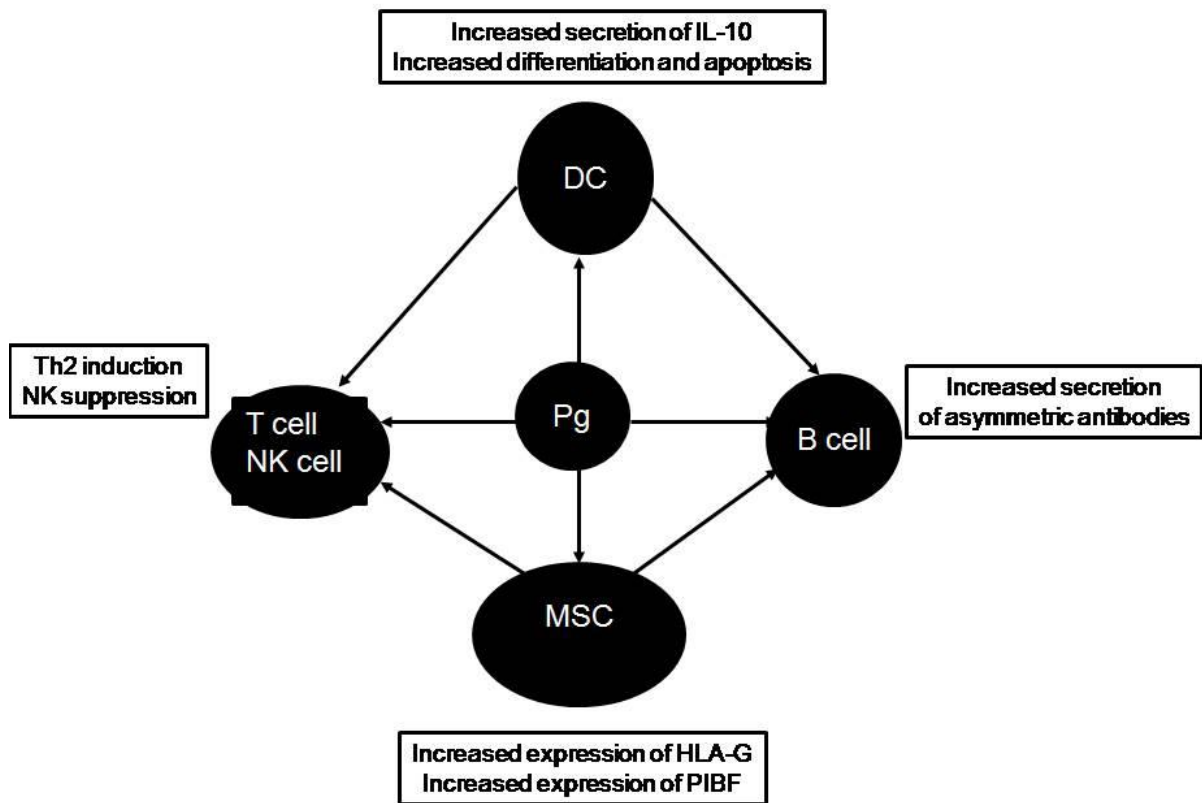
От друга страна секреторния HLA-G5 (за който нямаме директни данни, че се секретира под индукция на Пг, но това е твърде възможно, имайки в предвид интрацелуларното му намаляване след третиране на МСК с Пг) се свързва за ILT-2 на повърхността на Т клетките, което води до формирането на Tregs, като процесът е силно зависим от IL-10. (*Selmani et al. 2008, Mougiakakos et al. 2011*). Както вече беше казано Tregs и толерогенните дендритни клетки чрез двупосочната си секреция на IL-10, засилват взаимно имуносупресивния си фенотип. Следователно под влияние на прогестерон, експресията/секрецията на HLA-G от Д-МСК води до формиране на имунорегулаторна верига с участници: самите МСК, Tregs и толерогенните дендритни клетки (**Фиг.54**). Разбира се, трябва да се има в предвид, че М-ДСК не са единствената мишена на имунорегулаторното действие на ПГ в женската репродуктивна система (**Фиг.55**), а също така е редно да се отбележи, че въпреки, че Пг е в най-голямо количество в женската репродуктивна система по

време на ранната бременност, взаимодействието Пг/МСК може да се наблюдава в други органи и системи на човешкото тяло.



**Фиг.54** Под въздействието на прогестерон, Д-МСК експресират (и вероятно секретират) HLA-G, имунорегулаторна молекула индуцираща толерогенни дендритни клетки, както и Tregs. Двата вида клетки взаимно засилват качествата си чрез секреция на IL-10.

В заключение може да се обобщи, че протестронът засилва експресията на PIBF и HLA-G от страна на МСК, две от основните регулаторни молекули, контролиращи имунния баланс между майката и плода по време на развиващата се бременност. Така МСК се включват в групата на имунорегулаторните клетки които под хормонален контрол контролират необходимите условия на имуноен толеранс, при ситуация при която той е безусловно необходим.



**Фиг.55.**Комплексни взаимоотношения между клетките на имунната система и прогестерон. Ефектът на Пг върху имунокомпетентните клетки води до множество взаимодействия, които подпомагат процесът на имуноен толеранс и предимно хуморален имуноен отговор (*Kyurchiev et al. Advances in Neuroimmune biology, 2011*)

## 6. Използвани материали и методи

### 6.1.Тъканни проби

Бяха използвани мастна тъкан и костен мозък, доставени ни след хирургични интервенции, свързани с операции на тазобедрената става и бедрената кост, извършени в Клиника по Ортопедия и травматология, Университетска болница „Царица Йоанна- ИСУЛ”, София, след подписване на информирано съгласие и съгласно правилата на Болничната етична комисия.

Децидуалната тъкан беше доставена след прекратяване на бременността в 8-10 седмица, след подписване на информирано съгласие и съгласно правилата на Болничната етична комисия на Акушеро- гинекологична болница „Д-р. Щерев”. В рамките на 2 часа тъканните проби бяха доставени в лабораторията.

## **6.2. Мезенхимни стволови клетки**

Мезенхимните стволови клетки от мастна тъкан, костен мозък и децидуа бяха изолирани, култивирани и фенотипизирани, използвайки стриктно описаните лабораторни протоколи, част от които са разгледани в глава I. Клетъчното култивиране беше извършено в DMEM с 10 % ФТС, L- glutamine и антибиотици, като всички изброени продукти бяха на PAA, Pasching, Austria. Част от клетъчните култури бяха култивирани за 3-5 дни с прогестерин (7 и 30  $\mu$ l medroxyprogesterone-17-acetate, Sigma-Aldrich, USA)

## **6.3. Флоуцитометрия**

След като МСК от различен произход бяха събрани, преброени и промити (PBS, рН 7.4 на 300 g rpm за 10 минути), те бяха сведени до брой  $1 \times 10^6$  ml.

- По отношение на PIBF изследванията беше използвано моноклонално анти тяло 3А6, получено в лабораторията (*Ivanova- Todorova et al. 2009*), с 1ml от което клетките бяха инкубирани за 1,5 часа. В част от експериментите, МСК бяха предварително пермеабелизирани с CytoFix/ CytoPerm kit (BD, USA). След промиване, клетките бяха инкубирани с второ анти тяло anti-mouse FITC (SIGMA) за 30 минути.
- По отношение на HLA-G изследванията беше използвано анти тяло Anti-HLA-G-FITC/ MEMG-09 (Exbio, Czech Republic) като инкубацията се проведе за 30 минути на тъмно.

След двукратно промиване със CellWash (BD, USA) клетките бяха фиксирани със CellFix (BD, USA). Специфичната флуоресценция беше отчетена с флоуцитометър FACSCalibur (BD, USA), като се използва софтуерърна програма CellQuest (BD, USA) и програма WinMDI 2.9.

#### **6.4. Конфокална микроскопия**

Култивираните МСК бяха трипсинизирани и прехвърлени на стъкалца, където растяха на 37<sup>0</sup>, 5% CO<sub>2</sub> докато образуват монослой, след което част от тях бяха култивирани с прогестерон за 3 -5 дни. След този период стъкалцата бяха промити с PBS, рН 7.4 и фиксирани с 4% параформалдехид в PBS, Ph 7.4 за 20 мин. на стайна температура. След трикратни промивания за 5 мин. с PBS, клетките бяха едновременно пермеабелизирани и блокирани с 0.1% Triton X-100 (Sigma, USA) и 1% BSA (Sigma, USA) в PBS, за един час на стайна температура. След промиване с PBS, стъкалцата бяха инкубирани за една нощ на 4<sup>0</sup> със следните антитела:

- За PIBF - моноклонално anti- PIBF 3A6, PBS като контрола.
- За HLA-G - Anti-HLA-G-FITC/ MEMG-09

На сутринта стъкалцата бяха промити с PBS и инкубирани за 1 час на стайна температура със съответното второ антитяло: anti- mouse Alexa Fluor 488 1:1000 (Invitrogen, USA). След двукратно промиване с PBS, клетъчните ядра бяха оцветени с Hoechst 33258 (1:1000, Sigma, USA) за 5 минути и след промиване бяха монтирани в Fluoromount- G (Southern Biotecch, USA). Флуоресцентните проби бяха анализирани чрез конфокален лазерен сканиращ микроскоп (Leica TCS SPE, Germany).

#### **6.5. RT-PCR**

Тотална клетъчна РНК беше екстрахирана от клетките, чрез използването на imPREP blood RNA kit (AJ Roboscreen, Germany). Изолирането беше извършено по инструкции на фирмата и тоталната РНК беше използвана за обратна транскрипция чрез използването GeneAmp Gold RNA PCR Core kit (Applied Biosystems, Germany).

Копи- ДНК беше амплифицирана чрез използване на следните праймъри:

HLA-G5s G.526 CCAATGTGGCTGAACAAAGG,

HLA-G5s G.i4b AACGGAGGTGAAGGTGAGGG и

pan HLA-G g.257 GGAAGAGGAGACACGGAACA,

pan HLA-G g1004R CCTTTTCAATCTGAGCTCTTCTTT.

Като контрола беше използвана генната експресия на  $\beta$ -актин

Обратната транскрипция беше проведена при следните условия: 10 мин. на 25 C, последвани от 20 мин. на 42 C. За амплификация на копиДНК беше използван следния температурен профил:

- 1) първоначална денатурация при 95 C за 5 мин.
- 2) 35 цикъла на: денатурация при 94 C за 1 мин., свързване на праймерите при 61 C за 1 мин. 30 сек. и елонгация (полимеризация) при 72 C за 2 мин.
- 5) дореплициране на евентуални незавършени вериги при 72 C за 7 мин.

За протичане на обратната транскрипция и на полимеразната верижна реакция беше използван PCR апарат MJ Research, INC. След края на PCR реакциите, продуктите бяха натоварени на 2% агарозен гел, съдържащ етидиев бромид. Агарозната електрофореза беше проведена при 15 V/cm за 2 часа. Геловете бяха визуализирани чрез трансилюминатор CAMAG, Reprostar 3.

## **6.6. ELISA**

Клетъчните супернатанти на МСК от различни източници бяха тествани за секреторните форми на HLA-G, чрез използване на sHLA-G ELISA kit (Exbio, Czech Republic), съгласно изискванията на производителя.

## **6.8. Статистически методи**

С цел сравняване на промените в PIBF експресията при бременни жени, чиито лимфоцити са култивирани в присъствие и отсъствие на прогестерон, беше използван и за доказване на доза-зависимо действие на прогестерон върху експресията на HLA-G от различни видове мезенхимни стволови клетки беше използван непараметричен анализ за свързани извадки Mann-Whitney U test, като за статистически сигнификантни бяха приети стойностите  $< 0,05$ .

# **VII. МСК изолирани и култивирани от GBM? Имунорегулаторно действие**

## **1. Въведение**

Когато става въпрос за имуносупресивната функция на мезенхимните стволови клетки, трудно би могло да се избегне темата за ролята им в туморната имунология, тъй като потискането на имунната система (собено локалното) е основен проблем при злокачествените тумори. Един от базисните прийоми, които туморът използва за „имунно изплъзване“ е манипулирането на имунната система и по конкретно на имуносупресивните клетъчни популации. От друга страна, напредъкът в изучаването на стволовите клетки, установяването на тяхната екстремна недиференцираност, пластичност и способност за самообновление, даде основания за нова концепция относно туморогенезата. Тази глава ще акцентира върху описанието на клетки изолирани от глиобластома мултиформе, които показват качества, както на „ракови стволови клетки“ (РСК), така и на класически мезенхимни стволови клетки, като ще бъдат дискутирани и някои техни имуносупресивни действия.

## **2. Неврални стволови клетки (НСК)**

Глиобластома мултиформе (ГБМ) е най-злокачествения и най-често срещан първичен мозъчен тумор (*McLendon et al. 2011*). Една от модерните, широко разпространени и масово приемани концепции за неговото възникване е т.нар. “Cancer stem cell” хипотеза, която постулира, че промяната на нормалните неврални стволови клетки в ракови стволови клетки е основата, на която се създава и развива ГБМ (*Galli et al. 2004, Günther et al. 2008, Altaner et al. 2008, Gürsel et al. 2011, Schiffer et al. 2012*).

НСК са описани на всеки етап от развитието, от ембрион до възрастен организъм, като те се локализируют в специфичните си ниши в близост до кръвоносните съдове

в субвентрикуларните и субгрануларните зони, както и в gyrus dentatus на хипоталамуса, (Villa et al. 2001, Sanai et al. 2005, Gilbert et al. 2009, Matsuda et al. 2013). НСК са в непрекъсната комуникация с други клетки, както и с екстрацелуларния матрикс и два са основните фактори, които регулират тяхната преживяемост и състояние: епидермален растежен фактор (EGF) и базичен фибробласт растежен фактор (bFGF) (Schiffer et al. 2010). Друго важно условие за оцеляването и функцията на НСК е относителната хипоксия, която се наблюдава в специфичните ниши (Facchino et al. 2011). Там са описани няколко клетъчни типа: невробласти (тип А), НСК (тип В) и транзиторни амплифицирани прогенитори (тип С), като всички тези клетки са заобиколени от епендимални клетки (McLendon et al. 2011, Cho et al. 2013). НСК са плурипотентни клетки способни на самообновление и диференциация, като в резултат на последната те постепенно губят своята „стволовост“ (Facchino et al. 2011). Важно условия за този процес е наличието на кръвен серум и отсъствието на EGF и bFGF, ключовите фактори отговорни за пролиферацията на запазването на НСК в недиференцирано състояние (Sanai et al. 2005, Veselska et al. 2006, Schiffer et al. 2012, Matsuda et al. 2013). Пролиферативната способност на НСК и асоциирането им с кръвоносните съдове им дават възможност за голяма мобилност и продвижване в посока на зони, характеризиращи се с хипоксия (Villa et al. 2001, Facchino et al. 2011). НСК експресират някои специфични маркери, които дават възможност те да бъдат фенотипизирани, като най-важни са следните:

а.) Nestin – цитоплазмен микрофиламентен протеин, чиято експресия корелира със свойството „стволовост“. Той е ангажиран с организацията на цитоскелета, клетъчния signaling и метаболизъм, както и с органогенезата. При частична диференциация НСК губят експресията си на Nestin и експресират глиален фибриларен киселинен протеин (GFAP) (Günther et al. 2008, Gilbert et al. 2009, Facchino et al. 2011, Matsuda et al. 2013).

б.) GFAP- първоначално е описан като маркер за астроцитна диференциация, но при НСК може да се ко-експресира заедно с Nestin (Sanai et al. 2005, Schiffer et al. 2011).

в.) Sox-2 – транскрипционен фактор, експресиран от НСК с цитоплазмена локализация, свързан с процесите на диференциация (*Sanai et al. 2005, Matsuda et al. 2013*).

г.) CD44 – трансмембранна молекула с роля в адхезията между клетките и екстрацелуларния матрикс, която се експресира на повърхността на НСК (*Liu et al. 2004, Pluchino et al. 2009*).

д.) CD133 - специфичен повърхностен маркер за НСК (*Doetsch et al. 2002, Sanai et al. 2005*), чието значение ще бъде разгледано по долу.

Важно е да се отбележи, че тези маркери се срещат и при други видове клетки, а не са специфични за НСК, като въпросът за експресията на Nestin и GFAP е разгледан в глава I. По скоро съвкупността от наличието на изброените маркери, наред с други характеристики дава основание една клетка да се дефинира като НСК.

### **3. Ракови стволови клетки**

Както беше споменато Cancer stem cells хипотезата твърди, че промяната на НСК в ракови стволови клетки (РСК) е основната причина за възникването и развитието на глиобластома мултиформе, като съществуват няколко предположения как се осъществява този процес. От една страна мутации в НСК могат да доведат до трансформирането им в РСК, а от друга генетични промени в частично диференцирани прогениторни клетки, произлезли от НСК, могат да доведат до същия ефект (*Galli et al. 2004, Facchino et al. 2011*). Описано е, че под влияние на някои фактори, наред с EGF и bFGF, се осъществява трансформация в РСК, като това може да се случи, както с тип В клетките (НСК), така и с тип С, а даже и с диференцирани клетки (*Villa et al. 2001, Sanai et al. 2005, Pavon et al. 2012*). Трансформацията на НСК или прогениторите в РСК се описва като вследствие на „нормални клетъчни механизми, но в ненормален ред, време и интензивност” (*Villa et al. 2001*). Приема се, че регулаторните Hedgehog системи, свързани с гените за стволовост и самообновление, както и EGF сигналните пътища, ангажирани с процеса на диференциация са замесени в тези промени. Установено е също така, че мутациите в PTET, който е туморно супресивен ген също са ангажирани в процеса

на трансформация. В резултат на описаните процеси, както и на вероятно множество неизвестни механизми, се наблюдава блокиране на клетъчното съзряване и впоследствие интензивно клетъчно деление при липса на диференциация (Villa et al. 2001). В резултат се създават РСК, които се дефинират като малка популация от дялящи се клетки с капацитет за самообновление, туморогенност, наличие на гени специфични за НСК, способност за миграция, и диференциация в туморни клетъчни популации. (Yuan et al. 2004, Günther et al. 2008, Gürsel et al. 2011, Schiffer et al. 2012). РСК могат да бъдат описани и като клетки, които са в крайната фаза на процеса на дедиференциация, имат сходни сигнални пътища с НСК, сериозен пролиферативен потенциал, регулиран от EGF и bFGF, както и възможност за диференциация в неврони и глиални клетки в отсъствието на тези фактори, но в присъствие на кръвен серум (Schiffer et al. 2012, Matsuda et al. 2013).

От гледна точка на Cancer stem cells хипотезата клетъчната композиция на ГБМ представлява „организиран хаос” с наличие на плейоморфни туморни клетки, пролифериращи кръвни съдове, инфилтриращи имунни клетки и наличие на некроза. РСК представляват между 1 и 3% от клетъчната композиция и на практика са организаторите на тумора (Veselska et al. 2006, McLendon et al. 2011). Тези клетки се явяват на върха на йерархията на туморните и клетки и сами по себе си са способни да формират ГБМ (Nakahata et al. 2011). РСК сами по себе си не са еднородна популация, като са описани такива с различен туморогенен потенциал, генетични аномалии и различна локализация в тумора, което повдига въпроса доколко РСК се отделен тип трансформирани клетки или представляват специфично функционално състояние на НСК (Facchino et al. 2011, Schiffer et al. 2012).

Относно експресията на специфични маркери РСК, подобно на НСК експресират Nestin, или самостоятелно или като ко-експресия с GFAP (Gilbert et al. 2009, Gürsel et al. 2011, Matsuda et al. 2013). Наблюдава се също така аберантна експресия на Sox-2, която се смята за белег на дезорганизация на процеса на диференциация (Gilbert et al. 2009, Gürsel et al. 2011). Една отличителна разлика с НСК е, че при

НСК Sox-2 се експресира интрацитоплазмено, докато при РСК тази експресия се наблюдава в ядрото. Друг специфичен маркер, както за НСК, така и за РСК е CD44, който при РСК е описан откъм инвазивната част на тумора, поради което се счита за ангажиран в процеса на туморната инвазия (*Matsuda et al. 2013*).

CD133 е маркер, за който се смята, че се експресира в условия на хипоксия (*Pistollato et al. 2011, Matsuda et al. 2013*), като неговото значение за фенотипизирането на РСК е доста противоречиво. Някои автори претендират, че CD133 е маркерът, който идентифицира РСК (*Veselska et al. 2006, Gilber et al. 2009, McLendon et al. 2011, Nakahata et al. 2011, Pavon et al. 201*), че неговата експресия е лош прогностичен знак (*Matsuda et al. 2013*) и че само CD133+ клетки имат туморогенни свойства (*Singh et al. 2004, Veselska et al. 2006*). Предполага се йерархия, на върха на която са CD133 положителните клетки, които са „истинските” РСК (*Singh et al. 2004, Veselska et al. 2006*).

От друга страна много автори твърдят, че CD133 не може да служи за универсален маркер, бележещ РСК популацията (*Sanai et al. 2005*), не приемат концепцията за йерархична зависимост между CD133+ и CD133 - клетките (*Brescia et al. 2013*) и считат, че CD133- са клетки със същата туморогенност, способност за самообновление и пролиферативен капацитет, както CD133+ (*Gürsel et al. 2011, Beier et al. 2012, Matsuda et al. 2013*). Някои изследвания доказват експресия на CD133 при не повече от 60% от тестираните глиобластоми, като се счита, че тази молекула е способна да мигрира от цитоплазмата към клетъчната мембрана, което дава фалшиво отрицателни резултати за нейната експресия (*Brescia et al. 2013*). Нещо повече, някои глиобластоми експресират „преработена” форма на CD133, която не се разпознава от повечето моноклонални антитела (*Sanai et al. 2005*). Във всички случаи, въпреки че се правят такива опити, CD133 трудно би могъл да бъде приет като достатъчно достоверен маркер, който да бележи субпопулацията на РСК.

Както за НСК, така и за РСК се коментират и други маркери освен гореизложените като Musashi-1, CD15 и CXCR4 (*Matsuda et al. 2013*).

От представените данни става ясно, че НСК имат множество общи характеристики с РСК (**Табл.14**), което е базата на Cancer stem cells хипотезата за развитието на ГБМ. Логично е да се предположи, че съществуват и доста разлики, определящи туморогенността на едните (РСК), и липсата ѝ при другите (НСК).

**Табл.14** Прилики между НСК и РСК (*Kyurkchiev, OA stem cells London 2014, с модификации*)

	<b>НСК</b>	<b>РСК</b>
Самообновление	да	да
Диференциация	да	да
Мултипотентност	да	да
Сигнални пътища	подобни	
Генетични промени	подобни	
Nestin	да	да
GFAP	да или не	да или не
Sox-2	да (предимно цитоплазмена)	да (предимно ядрена)
CD133	да	да (дискутабилно)
CD44	да	да

### **3. Култивиране на клетки изолирани от ГБМ**

При култивирането на клетки, изолирани от ГБМ съществуват две основни концепции:

#### **3.1.Модел невросфери (НС)**

Невросфери се получават при култивиране на изолираните клетки в безсерумна среда (вместо серум средата съдържа B27 суплемент), при наличие на EGF и bFGF (*Yuan et al. 2004, Günther et al. 2008, Gürsel et al. 2011, Caldera et al. 2011, Brescia et al. 2013, Mao et al. 2013*). Тези условия обуславят тип клетъчен растеж - невросфери, който се наблюдава и при НСК и при РСК (*Schiffer et al. 2012*). Невросферите представляват хетерогенни агрегати (**Фиг.56а**), като се счита, че произлизат от единична клетка от тип В или тип С (*Sanai et al. 2005, Facchino et al. 2011*). НС имат капацитет за самообновление, клонален произход и след дисоциация са способни да формират вторични невросфери (*Sanai et al. 2005*). Презюмира се, че клетките образуващи НС представляват най-малигнените зони на

ГБМ (*Schiffer et al. 2012*), НС са формирани предимно от РСК и имат същите генетични и фенотипни характеристики като първичния тумор (*Yuan et al. 2004, Gürsel et al. 2011*). Клетките съставлящи НС се характеризират с експресия на „стволови маркери” като Nestin, Sox-2 и CD44, без експресия на GFAP (*Lee et al. 2006, Schiffer et al. 2012*). Както беше споменато по-горе, едновременната експресия на Nestin и GFAP е характерна за РСК и НСК, и също може да бъде наблюдавана и при невросферите. Някои автори считат, че CD133+ клетки са реалните „организатори” на НС (*Singh et al. 2004*), докато други твърдят, че CD133- също могат да образуват невросфери (*Cho et al. 2013*). В подкрепа на второто твърдение са публикации, описващи рядка и слаба експресия на CD133 (*Caldera et al. 2011*), като при изследване на 11 ГБМ проби, растящи като НС, само 4 експресират CD133, въпреки, че всички от тях демонстрират туморогенност (*Brescia et al. 2013*).

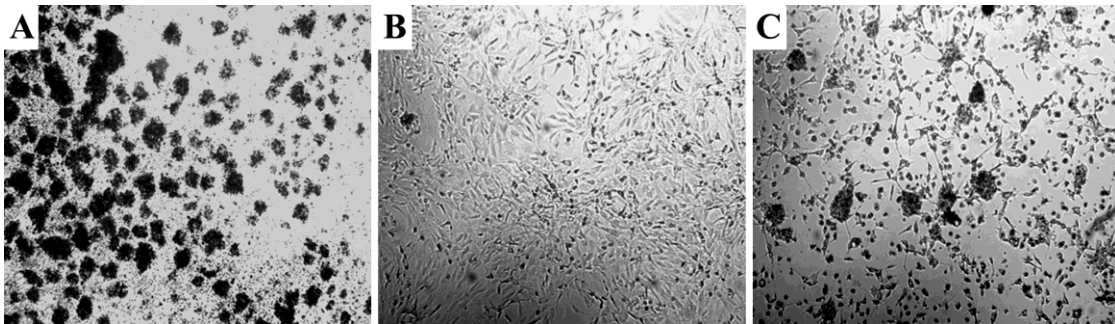
### **3.2. Модел адхерентни клетки (АК)**

Този модел се получават, когато изолираните клетки от ГБМ се култивират в отсъствие на EGF и bFGF, но при наличието на 10% ФТС (*Yuan et al. 2004, Caldera et al. 2011, Pavon et al. 2012, Brescia et al. 2013*). Клетките прилепват за дъното на плаката, първоначално се характеризират с хетерогенност, която преминава в хомогенен монослой от фибробласто-подобни клетки (**Фиг.56 b**). АК са способни на самообновление, но се считат за генетично и фенотипно различни от първичния тумор (*Sanai et al. 2004, Gürsel et al. 2011, Caldera et al. 2011, Schiffer et al. 2012*). По всяка вероятност серумът води до невъзвратими промени, които са свързани с частична диференциация на ГБМ клетките, процес който се отразява и на експресията им на маркери (*Lee et al. 2006*). В сравнение с НС, АК имат по слаба експресия на Sox-2 и Nestin, за сметка на по-високата на GFAP и  $\beta$ III- тубулин (*Yuan et al. 2004, Lee et al. 2006, Gilbert et al. 2009, Caldera et al. 2011, Schiffer et al. 2011*). И при АК е описан феноменът на двойна едновременна експресия на Nestin и GFAP. Култивирането със серум води до загуба на експресията на CD133 (*Yuan et al. 2004, Caldera et al. 2011*) и като цяло АК се характеризират с „частична стволовост” (*Schiffer et al. 2012*), загуба на някои типични за ГБМ характеристики,

по слаб капацитет за самообновление и дискутабилна туморогенност (*Sanai et al. 2005, Lee et al. 2006*).

### 3.3. Сравнение между НС и АК и „междинни модели“

Базирайки се на двата класически модела за култивиране на клетки, изолирани от ГБМ, преобладаващото мнение в научната литература е, че НС представляват по-добър модел за култивиране на РСК (*Lee et al. 2006*), с по-висока експресия на Nestin, Sox-2 и CD133 и с по-ниска на диференцировъчни маркери като GFAP (*Gilbert et al. 2009, Caldera et al. 2011*). В подкрепа на тази теза са наличието на същите генетични промени като при първичния тумор, по изявената туморогенност и по-високата способност за самообновление в сравнение с АК. Въпреки това, следва да се отбележи, че разликите между НС и АК не са чак толкова отличителни. Описана е и междинна форма между двата вида клетъчен растеж, наречена „семи-адхерентна“, като характерно за нея е, че в културата съществуват едновременно както НС, така и АК (**Фиг. 56 с**).



**Фиг.56** Различни типове растеж на клетки изолирани от ГБМ. НС (А), АК (В), семи-адхерентни клетки (С) (*Kyurkchiev, OA stem cells London, 2014*)

Още повече, АК в присъствие на серум могат да формират агрегати, които са твърде подобни на НС и когато се прехвърлят в безсерумна среда с фактори (EGF, bFGF), формират типични невросфери (*Caldera et al. 2011*). Като довод за липса на тотална разлика между двата вида модели служи и фактът, че те са способни да преминават един в друг – при прехвърляне на НС в среда със серум те започват да

растат като АК и обратно, макар и дискутабилно, се счита за възможно АК да растат като невросфери, при прехвърлянето си в среда без серум, но съдържаща EGF и bFGF. Всичко това повдига множество въпроси, като в резултат на търсенето на отговори се създават и някои „междинни модели” за култивиране на клетки изолирани от ГБМ. Единият от тях (*Lee et al. 2006, Gilbert et al. 2009*) залага на култивиране на ГБМ изолирани клетки в безсерумна среда, заедно с EGF и bFGF, но на дъното на плаката е сложен ламинин, който води до прилепване на клетките. При тези условия, независимо от средата за НС, клетките растат като АК и авторите считат условията за подходящи, за да могат EGF и bFGF да достигнат и да повлияят максимален брой клетки (прилепналите клетки са по открити от вътрешните клетки на невросферата). Като доказателство за тезата си, авторите докладват, че почти всички клетки са положителни за експресията на Nestin, Sox-2, CD133 и CD44 (**Табл. 15**).

Друг „междинен модел” използва плаки покрити с poly-Нема възпрепятстващи клетъчната адхезия за дъното на плаката. При тези условия клетки, култивирани само в присъствие на серум, формират т.нар. „серумни сфери”, които също имат многократно по- висока експресия на Nestin, Sox-2 и CD44 в сравнение с клетките на „класическите модели” НС и АК (**Табл.15**). Клетките в серумните сфери също така са с повишена способност за миграция и формиране на колонии (*Hong et al. 2012*).

**Табл.15** Условия на култивиране и експресия на РСК маркери при „класически” и „междинни модели” на култивиране на клетки изолирани от ГБМ (*Kyurkchiev OA Stem Cells London 2014, с модификации*)

Условия на култивиране	на	Растеж	Nestin	Sox2	CD133	CD44	GFAP
EGF, FGF, B27		НС	+	+	++	+	+/-
FBS		АК	+/-	+/-	+/-	+	+++
EGF, FGF, B27	ламинин	АК	+++	+++	+++	+++	+/-

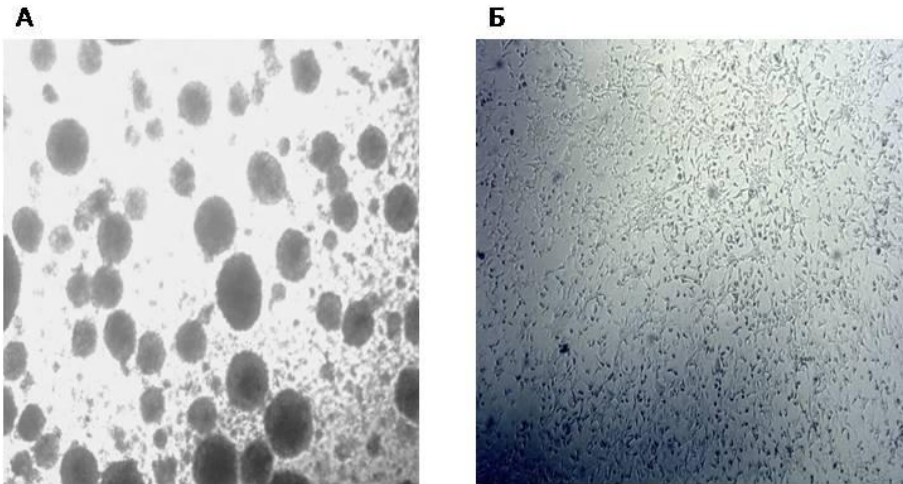
FBS, poly- НЕМА	“серумни сфери”	++	++	-	++	няма данни
-----------------	-----------------	----	----	---	----	------------

## 4. Собствени резултати и дискусия

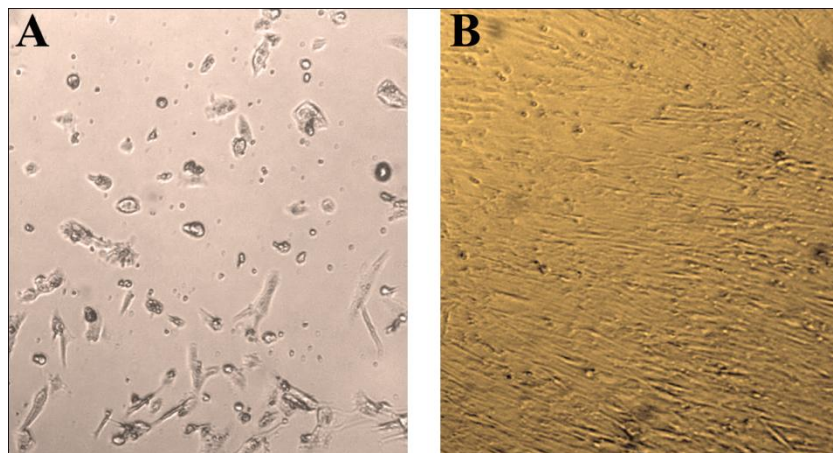
### 4.1. Култивиране, фенотипизиране и потенциал за самообновление на клетки, изолирани и култивирани от ГБМ

Както се вижда от разгледаното дотук, трудно може да се твърди със сигурност кой от моделите за култивиране на клетки изолирани от ГБМ се доближава най-много до РСК. Въпреки, че съществуват множество поддръжници на модела НС, има твърде много скорошни данни, които поставят под съмнение тази теза. В нашите изследвания ние използвахме класическите модели на НС и АК (Фиг.57), но и разработихме свой собствен „междинен модел”, резултатите от който ще бъдат обект на следващите страници.

Използвания модел се базираше на идеята за максимална близост до условията в нишите, където нормално се развиват НСК и РСК. Поради това, изолираните от ГБМ клетки бяха култивирани в среда съдържаща, както EGF и FGF, така и 10% фетален серум (Kyurkchiev *et al.* 2014a, Kyurkchiev 2014b). При тези условия нашите клетки след първоначален хетерогенен вид (Фиг.58А) демонстрираха адхерентен растеж (Фиг.58 В) като от всички 16 клетъчни култури само в един от случаите (ГБМ 4) растежът беше семи-адхерентен (Фиг.56с). Изследването на способността на клетките за самообновление беше извършено чрез тестове за клоногенност, като всички тествани култури показаха клоногенен растеж (Фиг. 59).



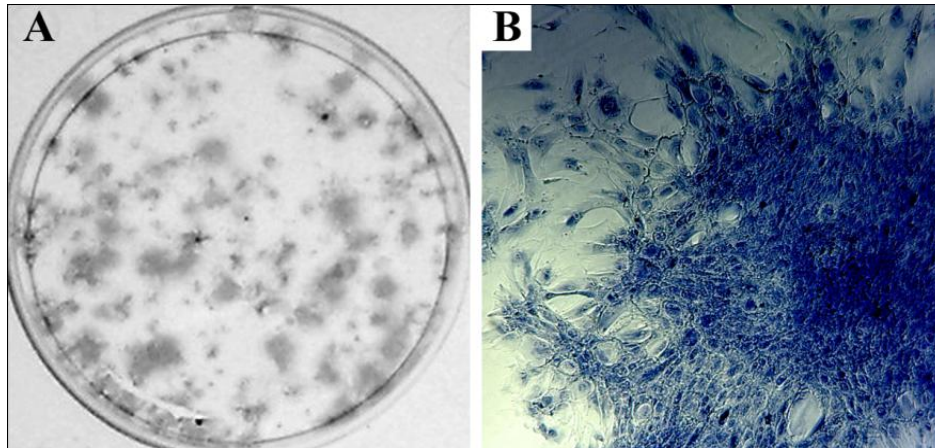
**Фиг.57** Невросфери, получени вследствие на култивиране на клетки от ГБМ в среда с EGF, FGF и B27(A). Адхерентни клетки получени вследствие на култивиране на клетки от ГБМ в среда с ФТС (Б).(*Кюркчиев и сътр.2014*)



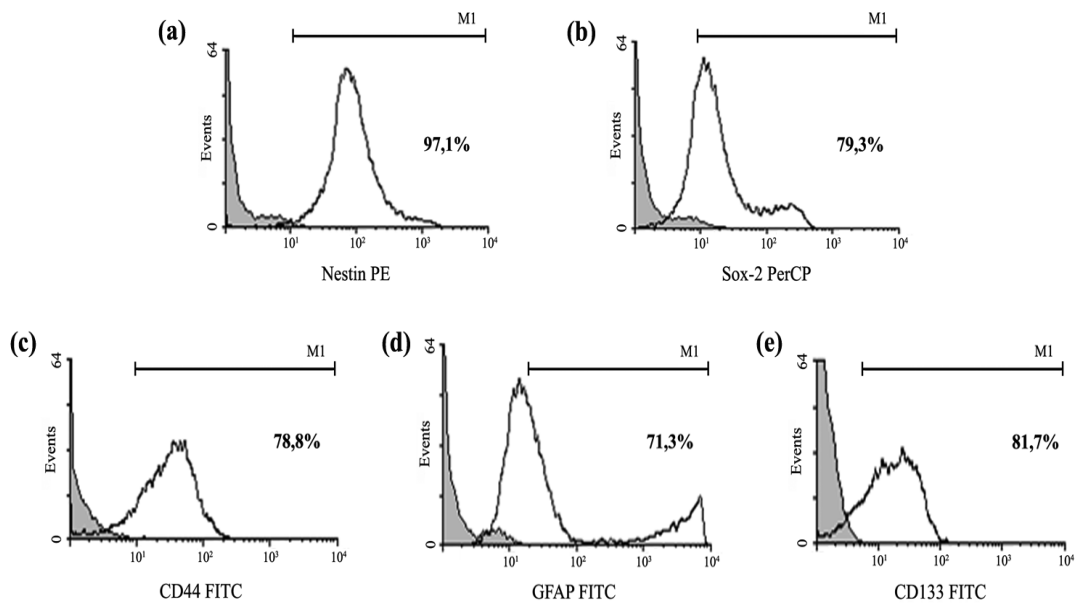
**Фиг.58** Морфология на клетки изолирани и култивирани в среда съдържаща, както FGF и bFGF, така и 10% ФТС. На 3-ти ден от култивирането си клетките демонстрират хетерогенен вид (А), който по-късно се заменя с хомогенен адхерентен растеж (В) (*Кюркчиев и сътр.2014*)

Способността за самообновление беше установена средно за около 2% от култивираните клетки, което отговаря на описания в литературата процент РСК от клетъчната композиция на ГБМ

При флоуцитометричното изследване на експресията на РСК маркерите от клетките на нашия модел, резултатите ни показаха експресия на Nestin, Sox-2, CD44, CD133 и GFAP (**Фиг.60**) Експресията на Nestin (**Фиг.61**) и Sox-2 (**Фиг.62**) беше потвърдена и чрез конфокална микроскопия), а тази на GFAP и чрез RT-PCR (**Фиг.63**).

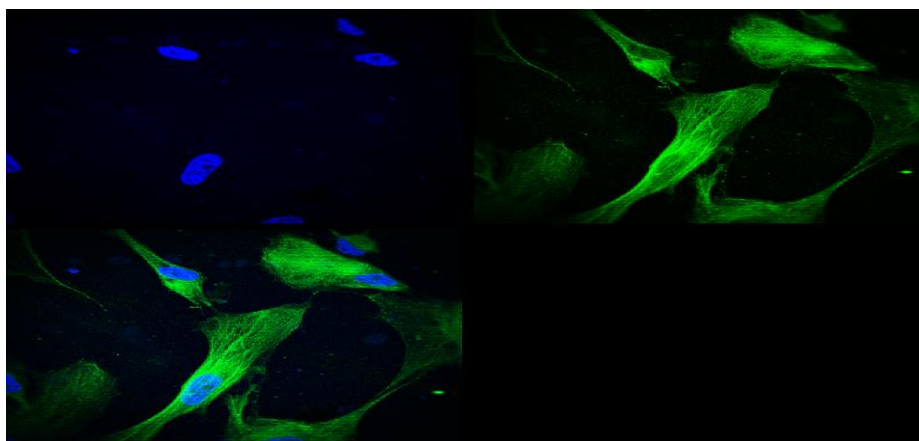


**Фиг.59** Клоногенен растеж на клетки изолирани от ГБМ и култивирани в среди с EGF, FGF и ФТС (А) Оцветяване с Crystal violet (В) (*Белемезова и сътр.2014*)



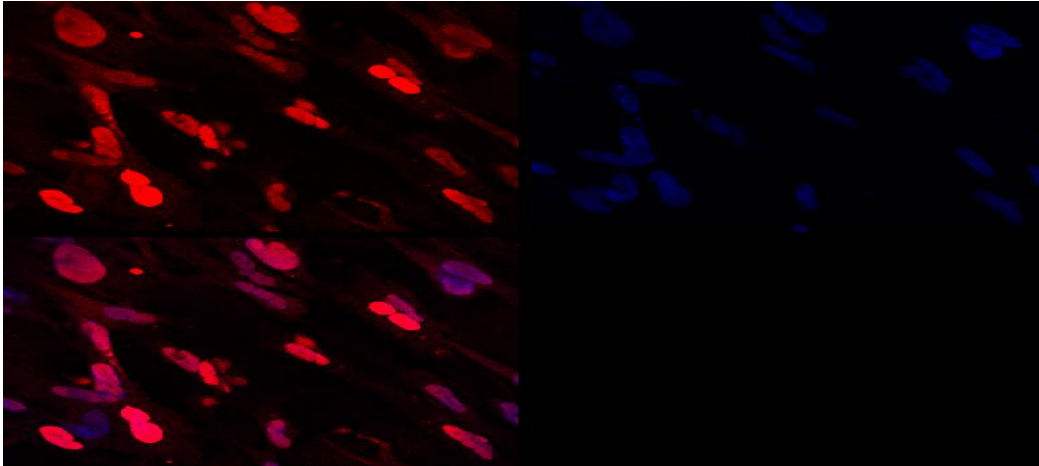
**Фиг.60** Флоуцитометрично определена експресия на РСК маркери от клетки изолирани от ГБМ и култивирани в среди с EGF, FGF и ФТС (*Kyurkchiev et al. Cell Mol Neurobiol. 2014*)

Nestin се експресираше от почти всички изследвани клетки, изолирани от всички глиобластоми, като експресията му се изразяваше с типично интрацитоплазмено оцветяване на цитоскелетни филаменти (**Фиг 61**).



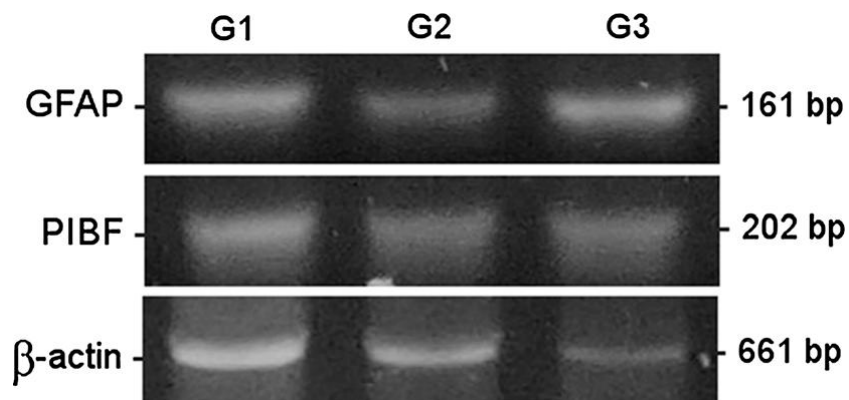
**Фиг.61** Конфокално изображение на експресията на Nestin (оцветен в зелено). В синьо са оцветени клетъчните ядра (*М. Мурджева и кол.2014*)

Средно 79,3% от клетките при всички глиобластоми показаха експресия на Sox-2 (Фиг. 60), която се характеризираше с интензивно интрацитоплазмено оцветяване локализирано в ядрата на клетките (Фиг.62). Ядрената експресия на Sox-2, както беше казано по-горе е характерно свойство за РСК, което е една от разликите им с НСК, където тази експресия е цитоплазмена.



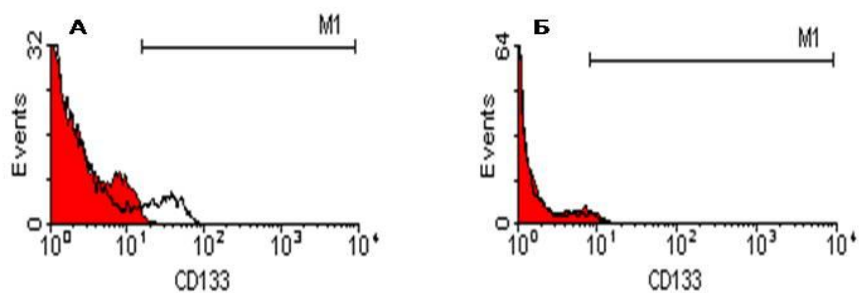
**Фиг. 62.** Конфокално изображение на експресията на Sox-2 (оцветен в червено). В синьо са оцветени клетъчните ядра(М. Мурджева и кол.2014)

Експреията на CD44 и съответно на GFAP бяха средно 78,8% и 71,3% от клетките при всички изследвани глиобластоми (Kyurkchiev *et al.* 2014) (Фиг.60 **c, d**). Резултатът за GFAP, потвърден и на ниво иРНК, чрез RT-PCR (Фиг. 63) ни насочва към идеята за частична зрялост на изследваните клетки, което е логично, имайки предвид, че в културалните условия съществува фетален телешки серум. Наличието на GFAP обаче не е категорично доказателство за това, тъй като съществуват публикации, описвайки ко-експресия на Nestin и GFAP при РСК (Villa *et al.* 2001, Gunther *et. Al* 2008, Gursel *et al.* 2011, Gilbert *et al.* 2011, Pavon *et al.* 2012).



**Фиг.63.** Агарозен гел показващ PCR продукт от амплификацията на на копи-ДНК изолирана от 3 глиобластома (*Кюркчиев et al. Cell Mol Neurobiol. 2014*)

Относно експресията на CD133 нашите изследвания бяха в синхрон с тези, които описват нееднозначната му функция като маркер за РСК. Част от глиобластомните клетъчни култури експресираха в голям процент CD133 (**Фиг. 60 е**), докато други в нисък или се наблюдаваше пълна липса на експресия (**Фиг. 64**).



**Фиг.64** Ниска (А) или липсваща експресия (Б) на CD133 при част от глиобластомните култури (*Кюркчиев и сътр.2014*)

Като цяло може да се обобщи, че в сравнение с „класическите” модели на култивиране на глиобластомни клетки, нашият се доближава повече до този на адхерентните клетки (**Табл.16**), като аналозиите са по отношение на типа растеж, експресията на CD133 и GFAP, както и по отношение на способността за самообновление. При нашите клетки обаче, експресията на Nestin, Sox-2 и CD44 многократно надхвърля тази, описана за модела на адхерентните, клетки, както и тази описана за модела на невросферите. По тези си характеристики култивираните от нас клетъчни култури по скоро напомнят на другите „междинните модели” (с използване на ламинин и poly-Нема), които също се характеризират с висока експресия на Nestin, Sox-2 и CD44 (**Табл.15**)

Въпреки доказаната способност за самообновление и въпреки експресията на почти всички основни интрацелуларни и повърхностни маркери, бележещи субпопулацията на раковите стволови клетки, ние не можем да твърдим категорично, че нашите култивирани при описаните условия клетки, представляват РСК. За целта би било необходимо извършването на допълнителни тестове, доказващи способност за диференциация в неврони и глиални клетки, доказване на туморогенност и установяване на генетични промени съпоставяни с първичния тумор.

Някои доказателства за „стволовост” на култивираните клетки, които насочват към идеята за РСК, ни дадоха основание да сравним ГЪМ клетките, характеризирани от нас с мезенхимните стволови клетки.

**Табл.16** Тип растеж и експресия на маркери, типични за РСК (*Kyurkchiev OA Stem Cells London 2014, с модификации*)

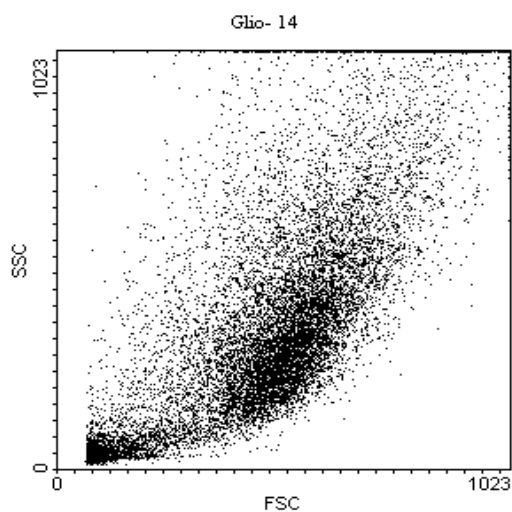
Условия на култивиране	EGF, FGF, B27	Фетален телешки серум (ФТС)	EGF, FGF, ФТС (наш модел)
Растеж	невросфери	адхерентни клетки	адхерентни клетки
Nestin	+	+/-	+++
GFAP	+/-	+++	+++
Sox-2	+	+	+++
CD133	++	+/-	+/-
CD44	+	+	+++
Самообновление	+++	+++	+++
Диференциация	++	+++	нетестирано

Туморогенност	+++	+	нетестирано
Генетични промени	Подобни на първичния тумор	Различни от първичния тумор	нетестирано

## 5. Прилики между клетки изолирани и култивирани от ГБМ и мезенхимни стволови клетки

### 5.1.Морфология

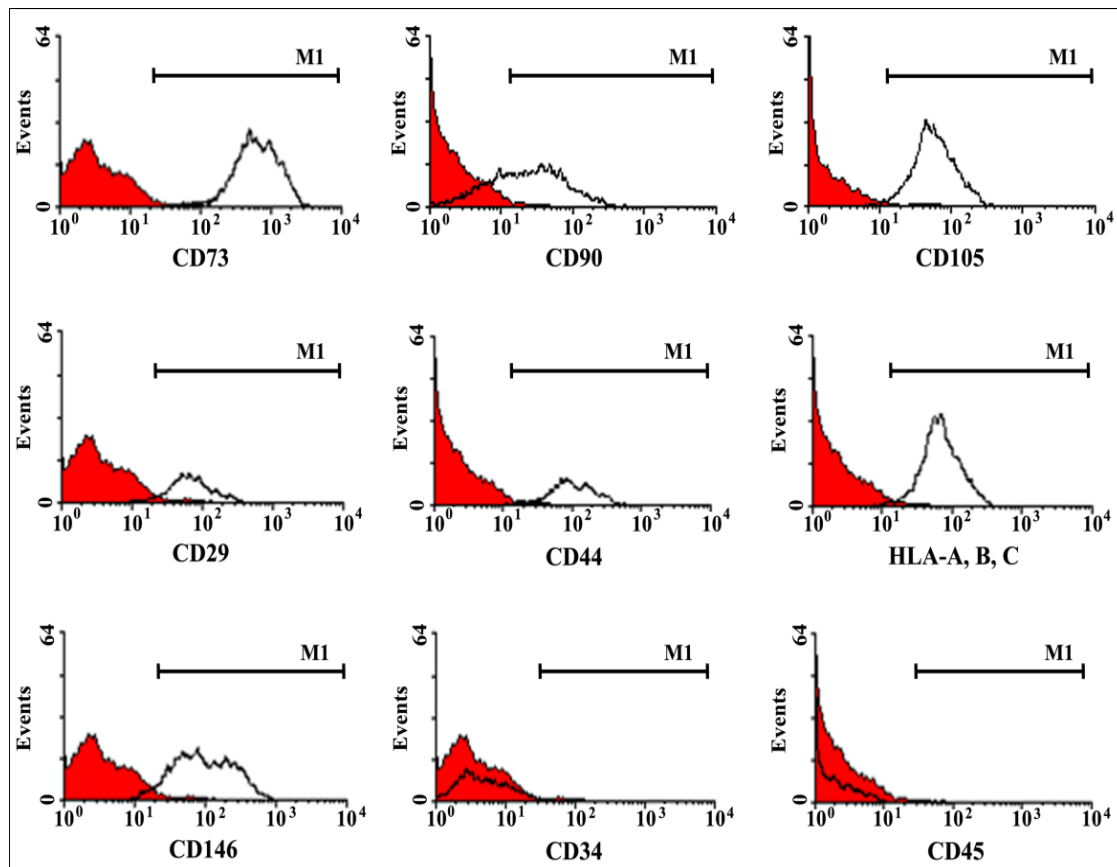
Клетките, изолирани от ГБМ и култивирани в среда, съдържаща EGF, FGF и ФТС, показаха типичен растеж подобен на МСК, характеризиращ се първоначално с хетерогенност (**Фиг.58**), която след около 15-18 дни придоби типичния вид за МСК – фибробластоподобни клетки, залепнали на дъното на плаката и образували монослой (**Фиг. 56В, Фиг.58 В**). Големината и гранулираността на клетките изследвана чрез флоуцитометрия също показва сходства с тези на МСК, като клетъчния облак се формираше на същото място, както при мезенхимните ствовлови клетки (**Фиг.65**)



**Фиг.65** Изследване на клетъчни култури получени от ГБМ по отношение на физичните им параметри (големина- FSC, гранулираност - SSC) (*Кюркчиев и сътр.*)

### 5.2.Фенотип

При изследване на глиобластомните култури се установи, че те експресират същите маркери, които характеризират МСК – CD73, CD90, CD105, CD29, HLA-I (A,B,C), CD146, като подобно на МСК са отрицателни за експресията на CD34 и CD45 (Фиг.66). По отношение на положителните маркери, експресията им беше установена във всички клетъчни култури, култивирани по описания начин, като по правило процентът клетки едновременно експресиращи CD90, CD73, CD105, CD29, CD44, HLA-I (A,B,C) и CD146 надхвърляше 90 %. Експресия на споменатите маркери не беше установена при глиобластомите, култивирани като невросфери (данните не са показани). Това повдига въпроса, доколко под влияние на серума се формира „мезенхимен фенотип” на култивираните клетки, който би могъл да е свързана с известната им диференциация, въпрос, който ще бъде разгледан по нататък.



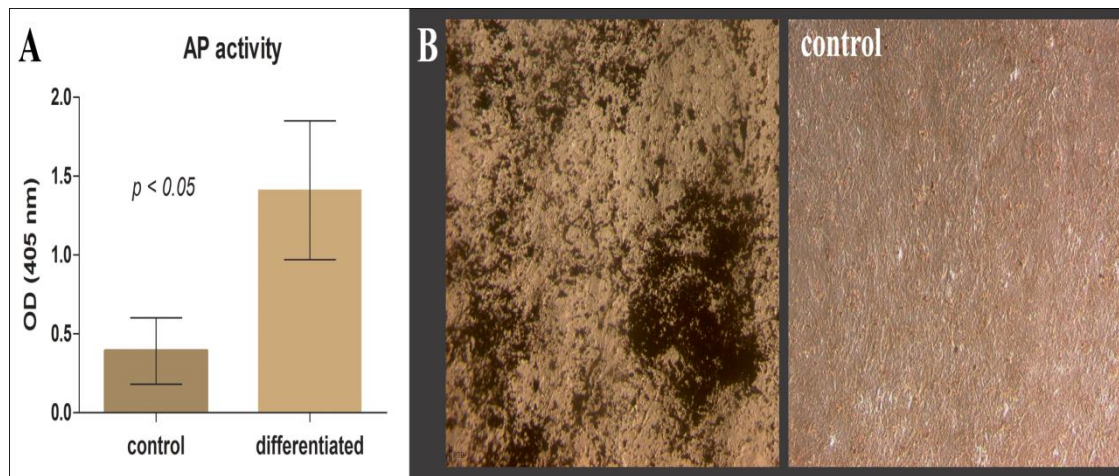
**Фиг.66** Експресия на маркери, типични за МСК от клетъчни култури, изолирани от ГБМ (Кюркчиев и сътр.2014)

### 5.3.Клоногенност

При съответните условия, около 1-2% от клетките изолирани и култивирани от ГБМ проявяваха потенциал за самообновление, доказан чрез тестове за клоногенност, като по този начин проявяват още едно сходство с МСК (**Фиг. 59**)

### 5.4.Диференциация

Както беше пояснено в глава I, типично свойство за мезенхимните стволови клетки е тяхната способност да се диференцират в клетки от остеогения, адипогения и хондрогения ред. Експериментите ни с клетъчни култури от ГБМ, култивирани с EGF, FGF и ФТС, показаха тяхната способност за остеогенна диференциация, при култивирането им в остеоиндуктивна среда. Тази диференциация беше доказана чрез способността на клетките да експресират интрацелуларно алкална фосфатаза (**Фиг.67A**), както и да се оцветяват специфично по Von Kossa (**Фиг.67B**) – свойства характерно за клетки от остеогения ред.

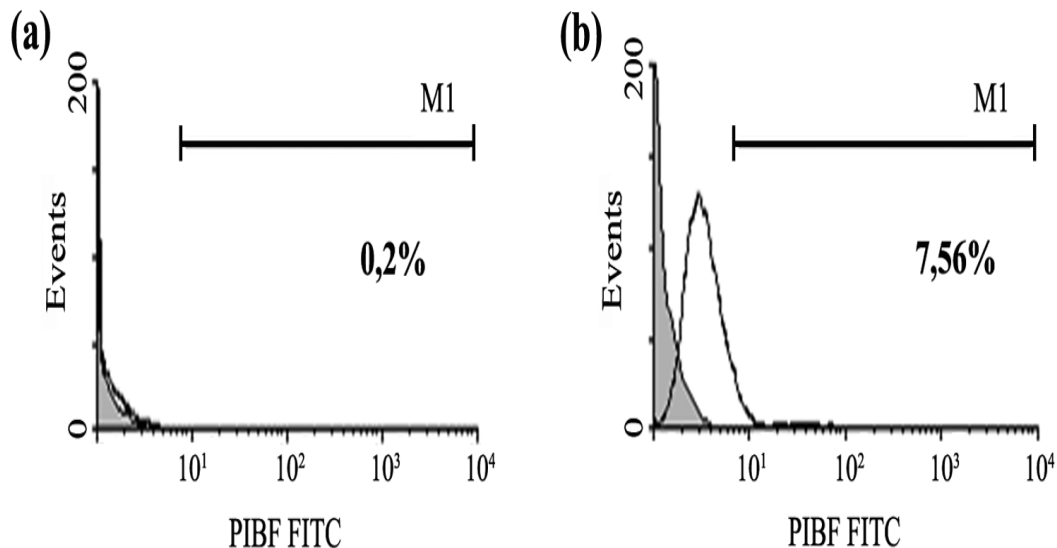


**Фиг. 67** Експресия на алкална фосфатаза от клетки от ГБМ култури под въздействието на остеоиндуктивна среда. Резултатите са средни за 6 независими експеримента (A). Специфично за остеогенни клетки оцветяване по Von Kossa. (Белемезова и сътр.2014) Легенда : AP – алкална фосфатаза

Опитите ни да получим адипогенна диференциация на ГБМ клетъчни култури не бяха успешни, като клетките запазиха своята виталност в адипо-индуктивна среда, но не се установиха характерните при диференциацията мастни капки (резултатите не са показани).

### 5.5. Експресия на PIBF

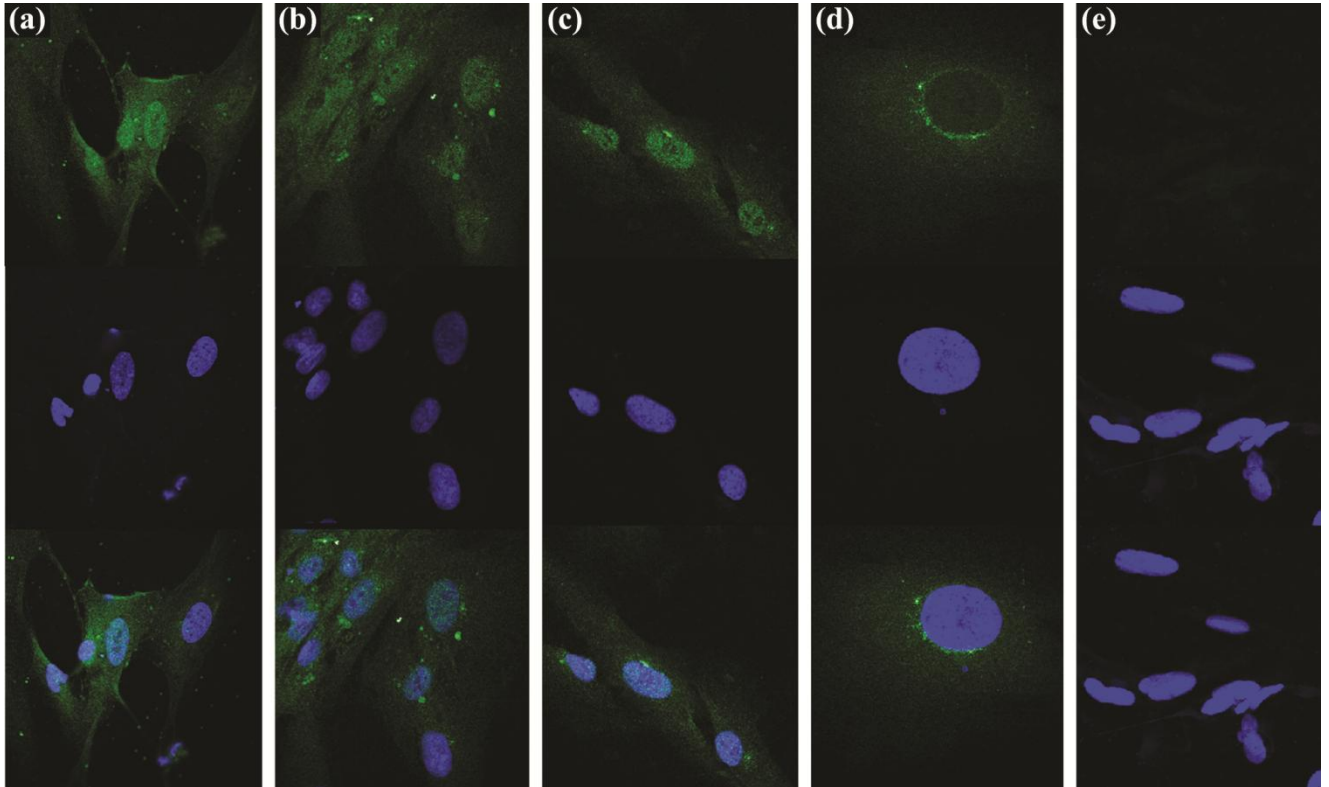
Както беше подробно описано в глава VI, PIBF е фактор, който обуславя част от имunosупресивните качества на МСК. Следвайки логиката, която се налага от приликата между МСК и ГБМ клетъчните култури, ние изследвахме неговата експресия при последните. Използвайки 3 различни метода: флоуцитометрия (Фиг.68), конфокална микроскопия (Фиг.69) и RT-PCR (Фиг.63) експресия на PIBF беше установена във всички изследвани култури (6 на брой). При флоуцитометричните изследвания, не се установи експресия на PIBF на повърхността на клетките, като процентът позитивни клетки беше около 0.2%, близък до негативната контрола (Фиг. 68a). За сметка на това при интрацелуларното изследване PIBF положителни клетки бяха около 7%. (Фиг.68b).



**Фиг. 68.** Експресия на PIBF установена чрез флоуцитометрия. Не се установява наличие на PIBF при изследване на мембраните на клетките (a), докато такава е налична (в случая 7,56% от клетките) при интрацелуларното им изследване.

Запълнените графики показват отрицателните контроли (*Kyurkchiev et al. Cell Mol Neurobiol. 2014*).

При изследването чрез конфокална микроскопия се наблюдаваше експресия на P1BF при част от клетките при всички изследвани проби, като се установиха както нуклеарно, така и интрацитоплазмено светения. ( **Фиг.69**)



**Фиг. 69** Конфокално изследване на P1BF в клетъчни култури от ГБМ  
а) Хомогенна цитоплазмена депозиция на P1BF (увеличение 400x). б) Грануларна цитоплазмена и точковидна перинуклеарна депозиция (увеличение 400x). в) Грануларна ядрена депозиция (увеличение 400x). г) Перинуклеарна депозиция (увеличение 630x). д) контролни клетки, към които не е добавено моноклонално анти тяло срещу P1BF (увеличение 400x). Специфичната флуоресценция се вижда в зелено, поради второто анти-мише анти тяло белязано с Alexa Fluor 488. Ядрата са оцветени със Hoechst 33258 и се вижат в синьо.

Например културите от ГБМ-2 показаха интензивно цитоплазмено оцветяване за P1BF (**Фиг. 69а**), докато тези от ГБМ-4 интензивно грануларно оцветяване с точковидна перинуклеарна депозиция (**Фиг. 69б**). Наред с цитоплазменото светене в ядрата при някои клетъчни култури беше наблюдавано грануларно оцветяване,

като това се установи за ГБМ-1, където беше особено показателно (Фиг. 69c). и за ГБМ-2 и ГБМ-4, където беше по-дискретно. При ГБМ-4 също така се наблюдаваше перинуклеарно светене при някои клетки (Фиг. 69d).

Различните видове светения, свидетелстват за различна локализация на РІВF при ГБМ културите, което ни дава основания за някои спекулации. Така например перинуклеарната локализация би могла да е свързана с взаимодействие РІВF с клетъчните органели, разположени около ядрото, като апарата на Голджи и микротубуларните структури. Друга възможност е тази локализация да е израз на наличие на гранули, които складират РІВF като резерв за бъдеща секреция. Както е известно РІВF има няколко изоформи, като откриването му в ядрото дава основания да се смята, че там се намира пълната му изоформа, която участва в синтеза и секрецията на ІІ-6, установена при ГБМ културите, както ще стане дума по нататък. Друг ефект на РІВF при ГБМ клетките, би могъл да е свързан с подтискането на имунния отговор, за което отговарят по-малките му изоформи локализиращи в цитоплазмата и израз на алтернативен сплайсинг (*Lachmann et al. 2004, Halasz et al. 2013*). Също така, наличието на различна локализация на РІВF при клетки, култивирани от ГБМ би могло да е белег на дисрегулация на споменатия алтернативен сплайсинг при ГБМ (*Caballero et al. 2001*). На този етап от нашите проучвания, ние не можем да твърдим със сигурност кои изоформи на РІВF се експресират от ГБМ клетките, култивирани от нас и възможните им функции в развитието на тумора.

Третият метод, с който доказахме наличието на РІВF в култивираните клетки беше RT-PCR, чрез който се установи наличието на иРНК за РІВF във всички тестирани проби (Фиг.63)

Наличието на РІВF клетки изолирани от тумор е нов научен факт по отношение на ГБМ, но не е такъв за туморната имунология, като експресията му е описана при множество солидни злокачествени тумори и туморни линии (*Chek et al. 2001, 2007, Lachman et al. 2004, Srivastawa et al. 2007, Mikoja et al. 2011*). При анализ на иРНК на РІВF при туморни клетъчни линии от рак на гърдата, се установява свръх-експресия му във всички интензивно пролифериращи клетки (*Szekeres – Bartho and*

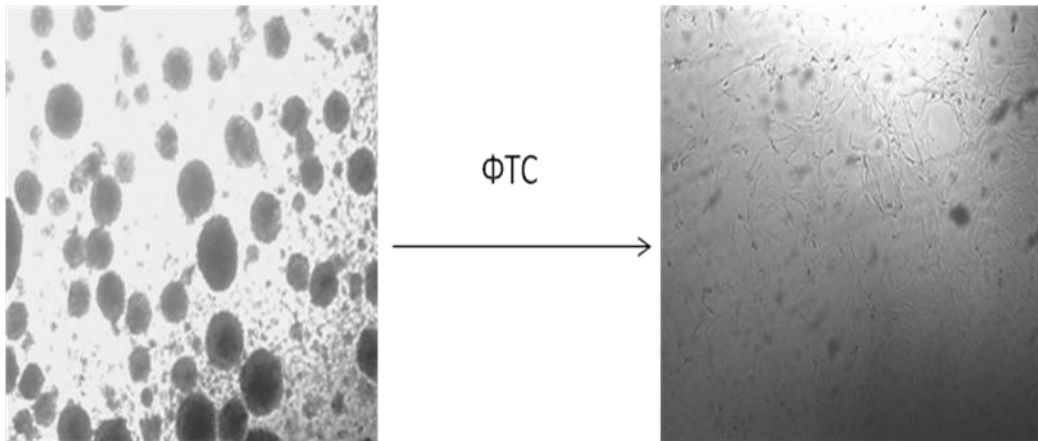
*Polgar 2010*). Наскоро е локализиран и генът на PIBF в хромозома 13 (13q21-q22), разположен в близост до гени, свързани с предразположение към рак на гърдата, както и такива обуславящи туморната прогресия (*Roseblum et al. 2002, Lachman et al. 2004, Chek et al. 2010, Szekeres – Bartho and Polgar 2010*). Анализът на някои тумори установява множество соматични мутации в тази зона, което предполага въвличането на PIBF в туморното развитие (*Caballero et al. 2001, Halasz et al. 2013*) Тези данни, наред с безусловното имunosупресивно действие на PIBF, го определят като важен фактор за протичането на множество процеси свързани с канцерогенезата (*Chek et al. 2009*).

Наличието на PIBF неизбежно повдига въпроса за ролята на прогестерона в експресирането на този протеин, тъй като е известно, че PIBF се експресира под индукция на този хормон. Прогестеронът е невростероид, който влияе върху невроналната диференциация при фетуса и има невропротективна роля, доказана от няколко научни групи, които установяват, че третирането с прогестерон благоприятства неврологичните поражения при травматична мозъчна (*Wright et al. 2007, Xiao et al. 2008*). Експериментални данни сочат, че прогестеронът предпазва кръвно-мозъчната бариера и намалява мозъчния оток, като подтиска възпалителния процес (*Singh 2006, Vandromme et al. 2008*). Тези данни, както и много други, подробно разгледани в глава VI, дават категорично основание за твърдението, че прогестеронът осъществява имunosупресивни функции.

Клетките, на които изследвахме експресия на PIBF не са култивирани в среда, съдържаща прогестерон, но от друга страна не можем да изключим подозрението, че глиобластомите, от които произлизат, са били под влияние на този хормон, имайки в предвид факта, че в ЦНС се намира прогестерон в концентрация между 30 и 80 nmol/kg, в зависимост от мозъчния отдел (*Weill- Engerer et al. 2002*). Нещо повече, редица изследвания доказват, че въпреки наименованието си, PIBF може да се експресира под влияние и на други все още недобре проучени фактори, като това е описано при множество тумори (*Lachman et al. 2005, Szekeres – Bartho and Polgar 2010*).

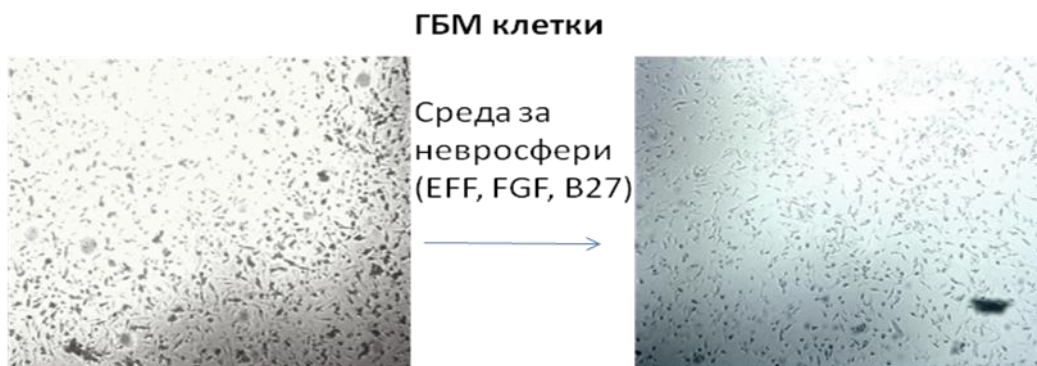
### 5.6. Растеж свързан с условията на култивиране

Известно е, че клетки, изолирани от ГБМ и култивирани в безсерумна среда с EGF, bFGF и B27 формират невросфери, които поставени в серумна среда формират типичен растеж на адхерентни клетки. Нашите резултати също доказаха тази трансформация (**Фиг.70**)



**Фиг. 70.** Под действието на среда, съдържаща 10% фетален телешки серум, клетките от ГБМ, култивирани в условия на НС и формирали такива, се променят, растейки под формата на АК

Както беше споменато, това се свързва с частичното диференциране на клетките и частична загуба на тяхната стволовост. При опити да постигнем обратната ситуацията – АК да се трансформират в НС, ние не установихме подобна възможност за клетки от ГБМ (**Фиг. 71**), което ни дава основания да смятаме, че частичната диференциация, израз, на която са АК е до известна степен невъзвратима.



**Фиг. 71** Под действието на среда, съдържаща EGF, FGF и B27, адхерентните клетки, получени от ГБМ, запазват начина си на растеж

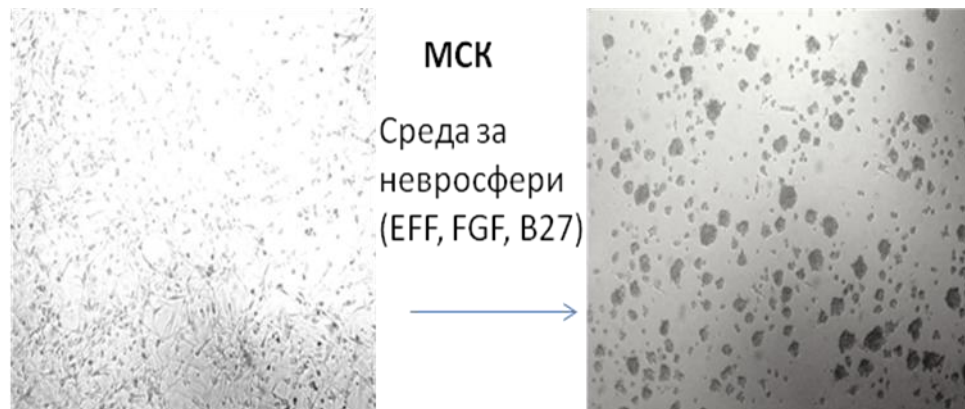
Веднъж станали АК, адхерентните клетки остават такива независимо от действието на среда, фаворизираща формирането на невросфери, дори при култивиране повече от 40 дни. При изследването им на маркери типични за МСК, се установява, че липсва промяна в експресията им, или промяната е незначителна, което корелира със запазения адхерентен фенотип (**Табл. 17**)

**Табл. 17** АК от ГБМ, променят незначително експресията на мезенхимните си маркери при култивиране в среда за НС

МСК маркери	АК култивирани от ГБМ	АК култивирани от ГБМ, прехвърлени в среда за НС
CD90	100%	98%
CD73	98,3%	96,5%
CD105	91.1%	87,8%

При същата експериментална постановка, извършени с МСК, изолирани от стена от пъпна връв, установихме, че поставени в съответната среда, тези клетки формират

класически сфери (**Фиг. 72**), като кореспондентно на това се наблюдаваше намалена експресия на мезенхимните им маркери (**Табл. 18**). Способността на МСК да растат образувайки сфери при определени условия (най-често върху плаки с повърхност непозволяваща адхезия), не е нов научен факт, като е доказано, че подобен вид клетки, експресиращи Nestin, подпомагат експанзията на хемопоеичните прогениторни клетки *in vitro* (Pinho et al. 2013)



**Фиг. 72.** Мезенхимни стволови клетки, изолирани от стена на пъпна връв формират сфери при култивирането си в среди с EGF, FGF и B27

**Табл. 18** МСК, намаляват значително експресията на мезенхимните си маркери при култивиране в среда за НС

МСК маркери	МСК	МСК култивирани в среда за НС
CD90	100%	20.1%
CD73	99,7%	66,3%
CD105	97.9%	5,88%

Налага се изводът, че в безсерумна среда, МСК губят типичния си фенотип, като формират сфери, характеризиращи се с липса на експресия на специфични МСК

маркери. Този процес не се наблюдава при клетки изолирани от ГБМ, които веднъж достигнали фенотип на АХ, трайно запазват, както фенотипа си, така и експресията на своите мезенхимни маркери. Това се оказва една от малкото разлики между клетки, изолирани от ГБМ и култивирани в среда с EGF, FGF и B27 и класическите мезенхимни стволови клетки. Тези резултати дават основание за спекулации, че МСК притежават по-голяма пластичност от ГБМ култивираните клетки, въпреки, че за категоричната интерпретация в тази насока са необходими допълнителни изследвания

### 6.6. Цитокинова секреция

Клетките изолирани от ГБМ и култивирани в среда съдържаща EGF, FGF и ФТС бяха изследвани за секрецията на основните имунорегулаторни цитокини, като беше установена същата секреция, каквато имат и мезенхимните стволови клетки (Табл. 19).

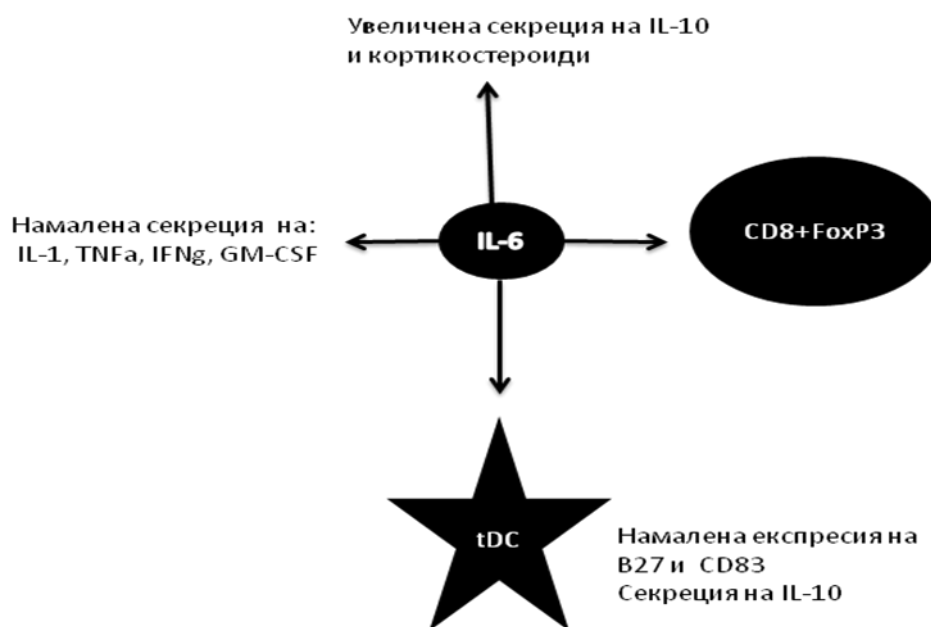
В супернатантите, от изследваните цитокини се наблюдава секрецията на IL-8 и на IL-6, за разлика от тези на невросферите, където се установиха и ниски нива на секреция на IL-10.

От гледна точка на имунорегулаторното действие на цитокините, прави впечатление интензивната секреция на IL-6, установена във всички изследвани супернатанти. Както беше обсъдено в глава II, концепцията за проинфламаторното действие на IL-6 търпи множество критики, поради установените му свойства в обратната насока. IL-6 е способен да участва във формирането на CD8+FoxP3+ клетки с подозирана имunosупресивна функция, води до намалена секреция на IL-1, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и GM-CSF, а увеличава секрецията на кортикостероиди и IL-10 (Фиг. 73).

**Табл. 19** Сравнение между цитокиновата секреция на клетки изолирани от ГБМ и култивирани с EGF, bFGF и ФТС, такива култивирани в среди за НС и мезенхимни стволови клетки

<b>Цитокини</b>	ГБМ култивирани	ГБМ култивирани	МСК
-----------------	--------------------	--------------------	-----

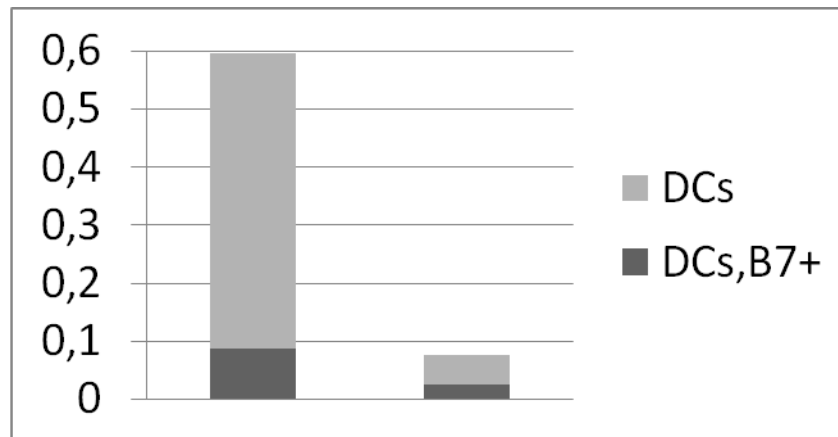
	(EGF, FGF, ФТС)	(EGF, FGF, B27)- HC	
IL-10	-	+	-
IL-12	-	-	-
IL-4	-	-	-
TNF $\alpha$	-	-	-
TGF $\beta$	-	-	-
IL-18	-	-	-
IL-23	-	-	-
IL-17A	-	-	-
sPECAM	-	-	-
sICAM	-	-	-
IL-8	+++	+++	+++
IL-6	+++	+++	+++



**Фиг. 73** Имунорегулаторно действие на IL-6.

Може би най-значимият ефект по отношение на имунната супресия, осъществяван от IL-6 е формирането на незрял, толерогенен фенотип дендритни клетки, характеризиращи се с намален експресия на B7 ко-стимулаторния си комплекс, които са в състояние да секретират IL-10. Наши изследвания върху

имунокомпетентни клетки, инфилтриращи глиобластомите, показаха, че дендритните клетки в централните и в периферните отдели на тумора са със силно редуцирана, а в някои случаи и липсваща експресия на ко-стимулаторния комплекс В7, което обуславя толерогенен фенотип ДК (*Tumangelova-Yuzeir et al. 2014*). (Фиг 74.)



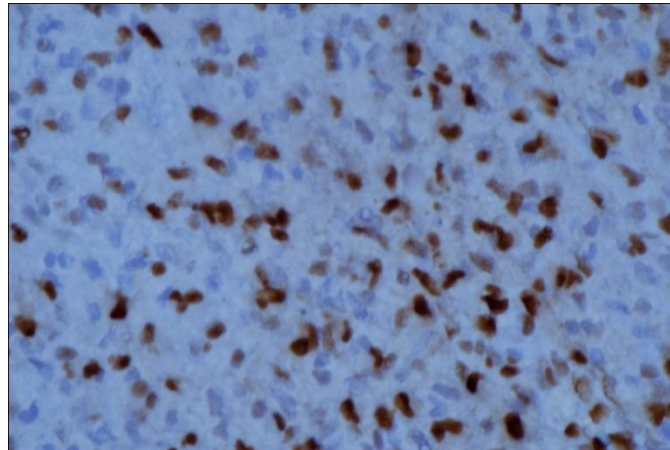
**Фиг.74** Основният брой дендритни клетки инфилтриращи централните (вляво) и периферните (вдясно) зони на ГБМ се характеризират с липсваща експресия на В7.

Такъв вид дендритни клетки, инфилтриращи ГБМ се описани и от други изследователски групи като се счита, че те са формирани от действието на тумора, чрез секрецията на множество фактори, сред които е и IL-6 (*Hussain et al. 2005, Gustafson et al. 2010, Dimov et. al. 2011, Verschuere et al. 2011*).

Фактът, че култивираните от нас туморни клетки секретират IL-6, фактът, че са установени толерогенни дендритни клетки, инфилтриращи ГБМ, и фактът, че IL-6 води до индукция на такива клетки, дават привлекателна възможност да се спекулира, че ГБМ чрез секрецията си на IL-6 индуцира развитието на толерогенни ДК, потискащи имунния отговор. Въпреки това, този вид спекулации достига извън сферата на критичния научен анализ, тъй като в единия случай става въпрос за тумор, а в другия за клетки изолирани и култивирани от тумора, което предполага тяхната промяна. Въпреки това описаният механизъм не е невъзможен, а дори

напротив доста логичен, още повече, че е доказана директната секреция на IL-6 от ГБМ (*Piperi et al. 2005*).

Както е известно IL-6 осъществява своето действие чрез системата STAT- JAK киназите, като особено важно значение за действието му има интрацелуларната експресия на STAT-3 (*Kishimoto et al. 2010*). В тъканни срези от ГБМ, чрез използване на имунохистохимични методи е описана експресията на STAT-3, като авторите свързват това с лош прогностичен маркер, водещ до понижена преживяемост при пациенти с ГБМ, в сравнение с такива с други малигнени глиоми) (*Berner et al. 2010*). (Фиг. 75).

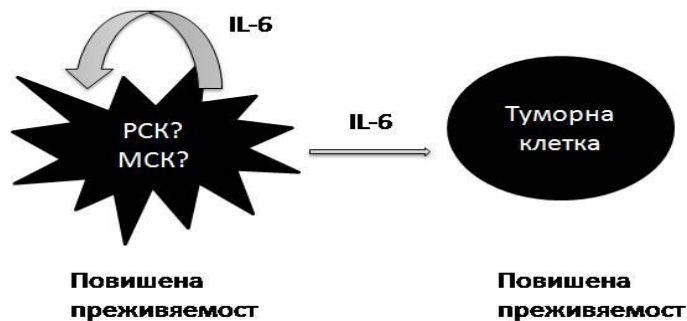


**Фиг. 75** Имунохистохимично установена експресия на STAT-3 в тъканни срези от ГБМ (*Тумангелова- Юзеир и сътр. 2012*)

На базата на тези данни може да се предположи, че IL-6, секретирани от клетки подобни на култивираните от нас, повлиява околните злокачествено променени клетки чрез въздействието върху експресията от тях STAT-3, обуславяйки повишената им преживяемост. Напълно възможно е също така, IL-6 да въздейства по автокринен път на секретиралите го клетки. По този начин IL-6, наред с описаните имunosупресивни свойства, вероятно оказва влияние и върху повишената способност за преживяемост на туморните клетки (Фиг. 76).

PI3F е един от факторите, който може да участва в процеса, като при ядрената си локализация, би могъл да свърже промотора на гена за IL-6 и да задейства неговата

транскрипция. След синтезирането си, IL-6 активира PI-3K/ АКТ и STAT3 сигналните системи, което има като резултат увеличени нива на матриксните металопроотеинази 2 и 9, ензими пряко свързани с туморната инвазивност (*Halasz et al. 2013*). Нашите резултати демонстрират ядрена експресия на P1BF, секреция на IL-6 и експресия на STAT-3 – основните необходими компоненти за реализация на описания механизъм. Разбира се трябва да се има предвид, че въздействието чрез STAT-3 не е строго специфично за IL-6, така че биха могли да бъдат замесени и множество други фактори.



**Фиг. 76** Секрецията на IL-6 от клетки еквивалентни на нашите в ГБМ, може да обослови повишена преживяемост по автокринен и по паракринен механизъм. Клетките са означени като ракови стволови клетки (PCK) и мезенхимни стволови клетки (MCK), тъй като нашите резултати показват, че носят безлези и на двата вида

По отношение на наблюдаваната секреция на IL-8, секретирани от култивирани от нас клетки, би могло да се спекулира, че ролята му е свързана с хемоатрактантно

действие на различни клетъчни субпопулации с предимно супресивен фенотип, каквито е описано, че ГБМ привлича, осъществявайки по този начин още един механизъм на подтискане на имунния отговор (*Piperi et al. 2005, Dimov et al. 2011*)

Изследванията ни върху клетки изолирани от ГБМ и култивирани в среда с EGF, FGF и ФТС показаха, че споменатите клетки делят множество характеристики с МСК. Подобно на МСК те имат адхерентен растеж, фенотипни маркери на МСК, потенциал за самообновление и диференциация в остеогенна посока, еднаква цитокинова секреция (поне по отношение на изследваните цитокини), както и експресия на P1BF (Табл.20).

**Табл. 20** Сравнение между МСК и клетки изолирани от ГБМ и култивирани в среда с EGF, FGF и ФТС

	МСК	Клетки от ГБМ култивирани в среда с EGF, FGF, ФТС
Морфология	адхерентни клетки	адхерентни клетки
МСК маркери	да	да
Клоногенност	да	да
Диференциация -остеогенна	да	да
-адипогенна	да	<b>неуспешна</b>
Интрацелуларен P1BF	да	да
Растат като НС в съответната среда	да	<b>не</b>
От 12 изследвани цитокини експресират само IL-6 и IL-8	да	да

Характеристики на МСК при клетки , изолирани от ГБМ са описани и от няколко други автори, като *Gunther et al. 2008* в своите експерименти установяват два вида клетъчни линии, получени от ГБМ – пронеурални и мезенхимни, като клетките са култивирани в условия за невросфери. При мезенхимните клетки е установена ко-експресия на Nestin заедно с GFAP, Sox-2 и липса на експресия на CD133. Изследванията на *Mao et al. 2013*, водят авторите до извода, че по принцип съществуват два вида глиобластоми – пронеурални и мезенхимни, които използват за своето развитие различни сигнални пътища, като за мезенхимните ключов се

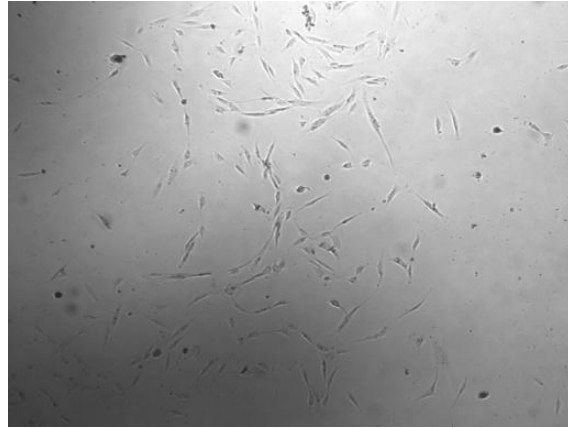
явява алдехид дехидрогеназния път. Според авторите и двата типа клетки са РСК, като мезенхимните имат по агресивен ход и устойчивост на радиация. Най- близки до нашите резултати описва групата на *Nakahata et al. 2011*, които изследвайки синтезираната човешка ГБМ клетъчна линия U87MG, установяват мезенхимен фенотип, експресия на CD44, CD73, CD90, CD105 и CD29, както и способност за диференциация в адипогенна, остеогенна и хондрогенна посока. За тази клетъчна линия е доказана и способността ѝ да предизвиква ГБМ при имунокомпетентни плъхове.

Опирайки се на класическото определение за мезенхимни стволови клетки като: „клетки, прилепващи към пласмаса, които са фибробласто-подобни с потенциал за самообновление и диференциация в мезенхимни линии” (*Pittenger et al. 1999*), описаните от нас клетки реално представляват МСК, още повече, че експресират същите маркери, PIVF и имат същата цитокинова секреция, поне що се отнася до изследваните цитокини. Въпреки това, фактът, че тези клетки не образуват НС след като са били АК, както и неуспешната им диференциация в адипогенна насока, поставя въпроса за някои разлики.

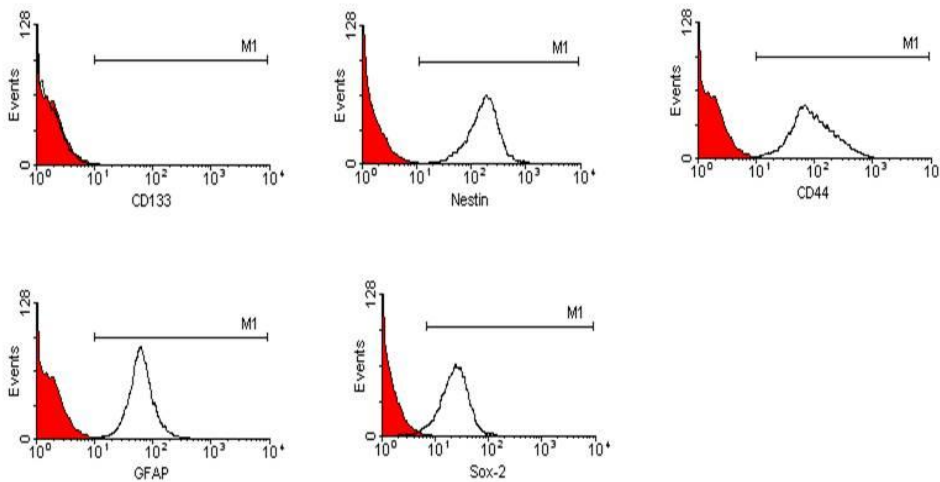
#### **6.7. Клетки, изолирани от индолентен В клетъчен лимфом с ЦНС локализация, показват прилики с МСК**

Наличието на клетки, подобни на МСК, очевидно не е явление характерно само за ГБМ, а се среща и при други тумори. Като доказателство на това твърдение, може да служи и нашия опит. Една от изследваните проби, работно означена като „ Glio-6” след хистологична диагноза в Лаборатория по Клинична патология на УМБАЛ „Св. Иван Рилски” се оказа индолентен В клетъчен лимфом. Поради изключително рядкото срещане на тази форма на лимфом, за второ мнение беше направена консултация с Националния център по хематология и трансфузиология, където диагнозата беше потвърдена. Клинична картина и магнитно-резонансния образ бяха неразличими от тези на ГБМ, поради, което „ Glio-6” ни беше доставен като такъв и съответно третиран от нас по същия начин. Подобно на другите изолирани клетки, култивирани със среда, съдържаща EGF, FGF и ФТС, “Gliо-6” показва

адхерентен растеж (Фиг.77) и експресия на маркери на ракови стволови клетки, (Фиг.78).

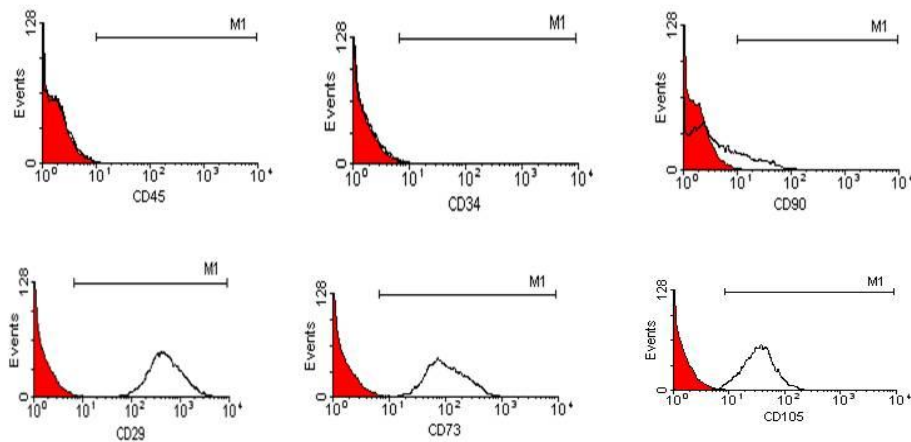


**Фиг. 77** Клетки, изолирани от индолентен В клетъчен лимфом и култивирани в среда съдържаща EGF, FGF и ФТС, показват типичен адхерентен растеж, подобно на клетки изолирани и кутивирани от ГБМ



**Фиг. 78** Клетки, изолирани от индолентен В клетъчен лимфом и култивирани в среда съдържаща EGF, FGF и ФТС, показват типична експреция на маркери характерни за РСК, подобно на клетки изолирани и култивирани от ГБМ

При тестирането му за МСК маркери, „Gliob-6” показва също така типичната експреция на маркери, характерни за мезенхимни стволови клетки, както всички клетъчни култури от ГБМ (**Фиг. 79**). Единствената разлика, която би могла да се направи е наличието на по-слаба експреция на CD90 от тази на ГБМ клетките. Хемопоеичните маркери CD45 и CD34 бяха напълно отрицателни, въпреки, че се касаеше за В клетъчен лимфом.



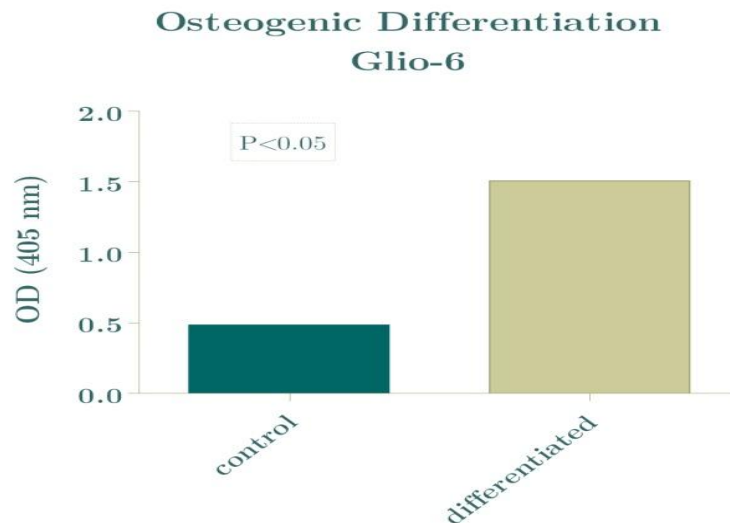
**Фиг. 79** Клетки, изолирани от индолентен В клетъчен лимфом и култивирани в среда съдържаща EGF, FGF и ФТС, показват експреция на МСК маркери, подобно на клетки изолирани и култивирани от ГБМ.

Клетките от „Gliob-6”, точно като тези от ГБМ, показва способност да се диференцират в остеогенна посока, когато се култивираха в остеоиндуктивна

среда, като тази способност се визуализира чрез демонстрация на алкално-фосфатазна активност (**Фиг. 80**).

Въпреки очевидните прилики еднопосочни интерпретации биха били твърде спекулативни. От една страна може да се спекулира, че туморогенезата е свързана с МСК, които са част от туморното обкръжение и участват в патогенетичните механизми. От друга страна обаче, никога не следва да се забравя, че клетките, които анализираме се развиват *in vitro*, тоест не са задължително да са в същото състояние, в което се намират в ЦНС. Може също така да се приеме, че описаните клетки са по-скоро свързани с глиалните клетки в ЦНС, тъй като, като В клетъчния индолентен лимфом, така и глиобластома мултиформе, засягат Централната нервна система. Във всички случаи, факт е, че при ГБМ, както и при един случай с В клетъчен индолентен лимфом с ЦНС локализация, се изолират клетки, които в среда, съдържаща EGF, FGF и ФТС показват изключително силна прилика с МСК.

31.12.2013



**Фиг. 80** Експресия на алкална фосфатаза от клетки, изолирани от индолентен В клетъчен лимфом и култивирани в среда съдържаща EGF, FGF и ФТС. Доказва се диференциация в остеогенна посока, подобно на клетки изолирани и култивирани от ГБМ (*Белемезова и сътр. 2013*).

## 7. Имуномодулаторно действие на клетки изолирани от ГБМ и култивирани в среди с EGF, FGF и ФТС

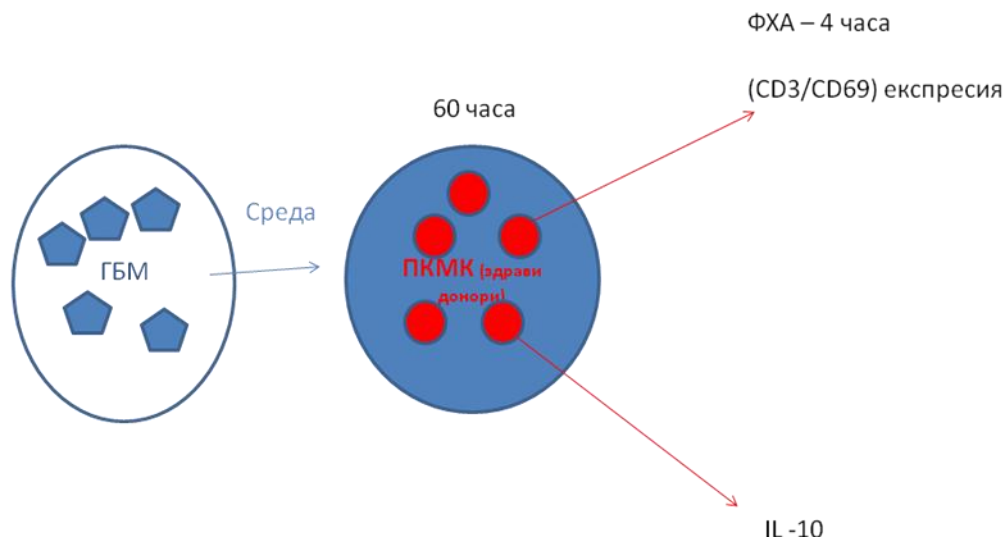
С оглед на по-натъшното сравнение между МСК и клетките, изолирани и култивирани от ГБМ, ние изследвахме възможността за имуносупресивно действие на последните.

За целта бяха проведени следните експерименти: от здрави донори от периферна кръв бяха изолирани ПКМК, които бяха преброени и поставени в концентрация по  $3 \times 10^6$  на ямка в 2 ямки в 6 ямкова плака. От всеки донор се изследваха две проби:

а) ПКМК култивирани в контролна среда с EGF, FGF и ФТС.

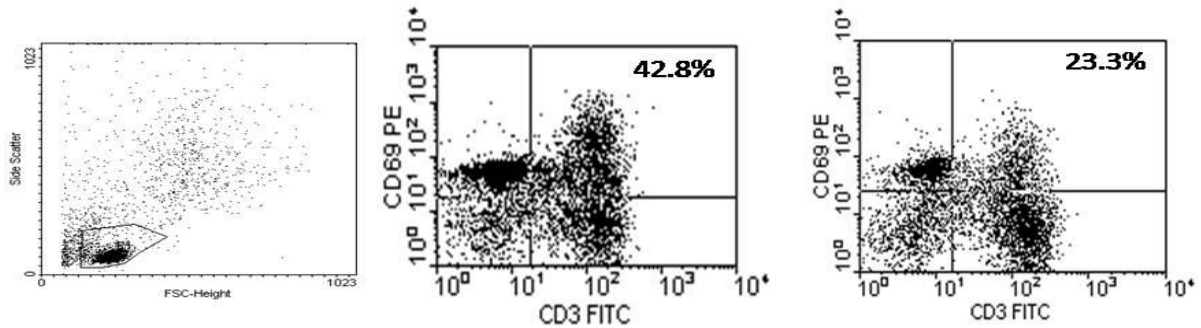
б) ПКМК култивирани в същата среда, но в която са се развивали клетки от ГБМ.

След 60 часа култивиране, ПКМК са промиха и активираха с фитохемаглютин (ФХА), който действа митогенно на Т лимфоцитите. След 4 часа на култивиране беше изследвана експресията на CD69 – маркер за ранна активация на Т лимфоцитите. Супернатантата съответно беше изследвана за наличие на IL-10 (Фиг.81)

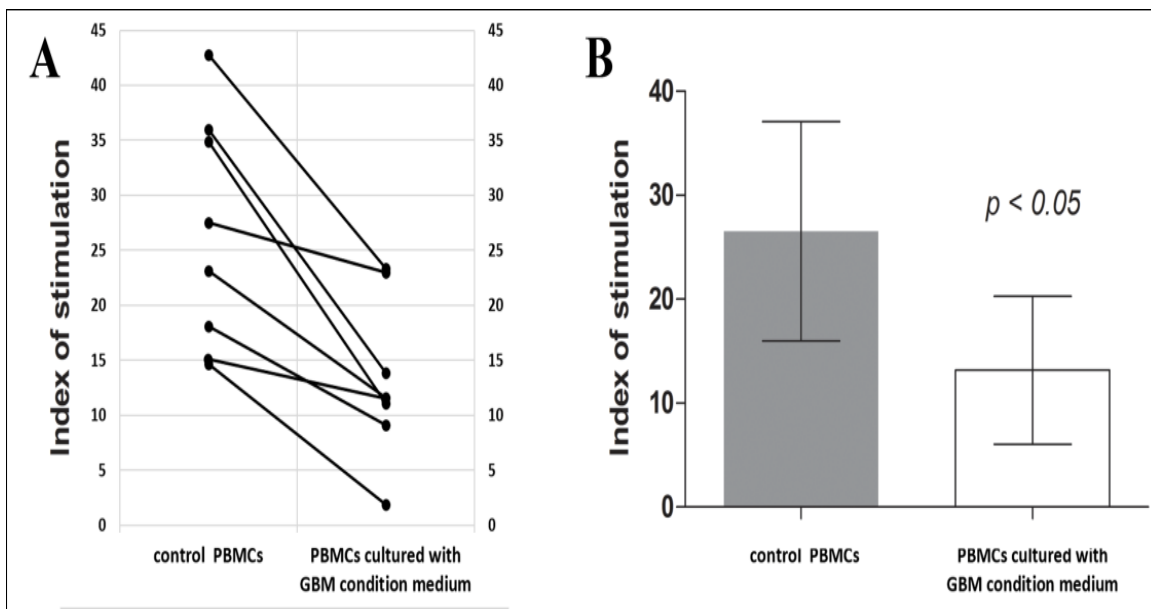


**Фиг. 81** Експериментална постановка за изследване на имуномодулиращо действие на секреторни фактори от ГБМ изолирани и култивирани клетки

Получените резултати показаха, че под влияние на фактори секретирани от ГБМ клетките, Т лимфоцитите значително намаляват способността си за активация в сравнение с Т лимфоцитите, култивирани в контролната среда. (Фиг. 82, Фиг. 83)



**Фиг. 82.** Среда от ГБМ култивирани клетки подтиска активацията на Т лимфоцитите. Вляво – лимфоцитен облак, на който е сложен гейта. Център-активирани контролни Т клетки (CD3+CD69+), вдясно, активирани Т лимфоцити (CD3+CD69+), култивирани в среда от ГБМ клетки. В конкретния случаи процентът активирани Т клетки спада почти наполовина.

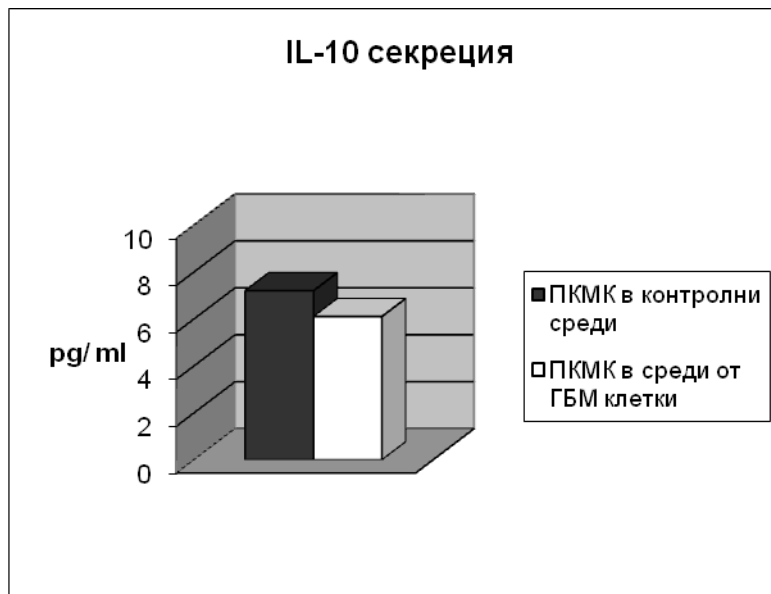


**Фиг. 83.** Процентът Т клетки, способни да се активират намалява, при култивирането им в среда от ГБМ клетки, в сравнение с процента Т клетки култивирани в контролната среда. Фигурата дава средните аритметични стойности от 8 независими експеримента (B), като резултатите са статистически сигнификатни (MW непараметричен анализ)

И при 8- те проведени по този начин експеримента, винаги се получаваше намален индекс на стимулация при периферните кръвни мононуклеарни клетки, култивирани в среда, където са култивирани клетки от ГБМ (Фиг. 83А)

Тези резултати дават основание да се направи категоричния извод, че фактори секретирани от ГБМ клетките подтискат Т клетъчната способност за активация. Секреторните фактори, които ние установихме в супернатантите на ГБМ клетките (IL-6, и IL-8 ) нямат описан подобен ефект. Естествено, в нашите експерименти са изследвани само 12 цитокина, което далеч не покрива целия потенциален спектър на секреторните фактори, способни да осъществят това действие. Чисто спекулативно, ако приемем, че ГБМ клетките секретират същите цитокини като МСК, ефектът би могъл да се осъществи от CCL-2/ MCP-1, IDO, VEGF, PGE2, като за всеки от тях е описана способност за подтискане на Т клетъчния имуен отговор, дискутирана в глави II и III. Разбира се, напълно възможно би било ГБМ клетките

да секретират и друг вид фактори неописани при МСК, въпреки че големите сходства между двата вида клетки правят тази възможност по-малко вероятна. Както беше споменато в глави IV и V, един от основните механизми, които МСК използват е да индуцират формиране на имунорегулаторни клетки (в постановката с ПКМК, това биха били моноцити и лимфоцити), секретират IL-10. Това ни даде основание, търсейки прилики между МСК и ГБМ клетките, да тестираме IL-10 секрецията на ПКМК, култивирани в среда от ГБМ клетки. Нашите резултати не показаха статистически разлики в концентрациите на IL-10 между супернатантите на ПКМК култивирани в среди от ГБМ клетки и тези култивирани в контролни среди (Фиг. 84)



**Фиг. 84** Концентрацията на IL-10 не се променя при ПКМК култивирани в среда от ГБМ клетки в сравнение с с култивирани в контролната среда. Фигурата дава средните аритметични стойности от 8 независими експеримента

Резултатите ни дават основание да коментираме една от функционалните разлики между МСК и ГБМ клетките, култивирани в нашите условия. Докато в първия случай предизвикване на секрецията на IL-10 от имунорегулаторни клетки е основен механизъм за индуциране на имуноен толеранс, при ГБМ клетките той

очевидно не се осъществява точно по този начин. Разбира се, горното твърдение важи за CD4+FoxP3+ клетките и за моноцитите (които евентуално се срещат в пула на ПКМК), докато все още тази възможност не е тествана за дендритни клетки.

В заключение би могло да се обобщи, че клетките изолирани от ГБМ и култивирани в среда с EGF, FGF и ФТС показват изключително близки фенотипни прилики с МСК, което води до сериозното подозрение, че става въпрос за един и същи тип клетки. Въпреки това съществуват и някои разлики, като все още не ни дават достатъчно основание да направим този категоричен извод.

## **8. Използвани материали и методи**

### **8.1. Пациенти**

Бяха изследвани проби от 16 пациента с диагноза Glioblastoma multiforme, като тъканта беше взета след стандартна оперативна интервенция, извършена в Клиниката по неврохирургия на УМБАЛ „Св. Иван Рилски” София. Всеки пациент подписа информиране съгласие, съобразно изискванията на Болничния етичен комитет. Всички туморни проби бяха хистологично доказани като ГБМ (с изключение на една, която беше доказана като индолентен В клетъчен лимфом, коментрирана по горе). Тъканната в размер на 1-2 cm<sup>3</sup> проба беше изрязана от солидната туморна зона описана като „жизнен регион, който поема контрастна материя, не се характеризира с клетъчен разпад и некроза и е свързан с нарастване и инвазия на тумора към подлежащата „здрава” мозъчна тъкан” (*Piccirillo et al. 2012*). Непосредствено след операцията пробата се поставя в стерилен фосфат буферизиран разтвор (PBS), Ph 7.4 и се доставя в лабораторията.

За изолиране на ПКМК беше използвана периферна кръв от 8 здрави доброволци.

### **8.2. Изолиране и култивиране на ГБМ клетки**

Всяка проба се раздробява механично на парченца до около 1 mm<sup>3</sup>, като сместа се слага в 1.5 ml Колагеназа тип IA (1 mg/ ml, Sigma, USA) и се инкубира на 37<sup>0</sup> за един час на шейкър. Получената клетъчна суспензия се разрежда със стерилен PBS Ph 7.4 и се прекарва през сито 70µm (BD Falcon, USA). Пробата се центрофугира на 2000 rpm за 10 минути и еритроцитите се лизират с 2 ml АСК буфер за 7-8 минути.

След центрофугиране, клетките бяха промити с 10 ml на проба стерилен PBS Ph и ресуспендирани в среда DMEM/HAM'sF12 (PAA, Austria), 20 ng/ml bFGF (Abcam, GB), 20 ng/ml EGF (Abcam, GB), 10% Nyclon ФТС (Thermo Scientific, USA), поставени в 24 ямкова плака (SPL, Korea) и инкубирани на 37<sup>0</sup>, 5% CO<sub>2</sub>. Културалната среда се обменяше частично на интервали от 2 дни, като след оформянето на монослой клетките бяха отлепени чрез трипсинизиране (0,05% Trypsin- EDTA, Biowest, France) за 1 минута и прехвърлени във фласкове 25 cm<sup>2</sup> (SPL, Korea). След формирането на монослой клетките бяха трипсинизирани до едноклетъчна суспензия и използвани за анализ.

### **8.3. Флуоцитометричен анализ**

Повърхностните маркери бяха изследвани чрез съответните моноклонални антитела: anti- CD44 FITC (BD Pharmingen, USA), anti- CD73 PE (BD Pharmingen, USA), anti- CD90 FITC (BD Pharmingen, USA), anti- CD105 PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen, USA), anti- CD29 PE (BD Pharmingen, USA), anti- CD3 FITC (BD Pharmingen, USA), anti- CD69 PE (BD Pharmingen, USA), anti- CD45 FITC/ CD34 PE (BD Pharmingen, USA), anti- CD146 PE (BD Pharmingen, USA), anti- CD133/2 (293C3) (Myltenyi Biotec), anti-PIBF 3A6 (моноклонално антитяло, получено и характеризирано от нашия екип (*Ivanova-Todorova et al. 2008*)). След белязването с антитела, клетките бяха инкубирани за 30 минути, промити с CellWash (BD, USA). Второ антитяло anti-mouse FITC IgG (eBioscience, USA) беше добавено при анализа за CD133 и PIBF с последваща 30 минутна инкубация и промиване. Клетките бяха фиксирани със CellFix разтвор (BD, USA)

Интрацелуларната експресия на Nestin, Sox-2, GFAP и PIBF беше анализирана след пермеабилзация на клетките, използвайки Cytofix/Citoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD, USA), като бяха спазени инструкциите на производителя. За белязване на клетките бяха използвани специфични моноклонални антитела: anti- Nestin PE (eBioscience, USA), anti-Sox-2 PerCP (eBioscience, USA), anti- GFAP Alexa Fluor488 (eBioscience, USA), anti- PIBF 3A6. Второ антитяло anti-mouse FITC IgG (eBioscience, USA) беше добавено при анализа за PIBF с последваща 30

минутна инкубация и промиване. Клетките бяха фиксирани със CellFix разтвор (BD, USA)

Специфичната флуоресценция беше отчетена на флоуцитометър FACSCalibur (BD, USA), като при анализа на резултатите бяха използвани софтуерните продукти CellQuest и WinMDI 2.9.

#### **8.4.Имуноензимни методи (ELISA)**

Наличието на секретирани цитокини беше изследвано при 60 часови кондиционирани среди от ГБМ, както и при съответстващите им контроли. За целта бяха използвани търговски китове, като за всеки кит бяха спазени инструкциите на производителя:

IL-4 (Arcus Biologicals, Italy), IL-6 (Gen-probe Diaclone SAS, France), IL-10 (Gen-probe Diaclone SAS, France), IL-12 (Gen-probe Diaclone SAS, France), TNF $\alpha$  (Gen-probe Diaclone SAS, France), IFN $\gamma$  (Gen-probe Diaclone SAS, France), IL-8 (Gen-probe Diaclone SAS, France), IL-18 (Gen-probe Diaclone SAS, France), IL-17A (Gen-probe Diaclone SAS, France), IL-23 (Gen-probe Diaclone SAS, France), sPECAM (Gen-probe Diaclone SAS, France), sICAM (Gen-probe Diaclone SAS, France).

#### **8.5.Имунохистохимия и конфокална микроскопия**

Култивираните от ГБМ клетки бяха трипсинизирани и прехвърлени на стъкалца, където растяха на 37<sup>0</sup>, 5% CO<sub>2</sub> докато образуват монослой, след което бяха промити с PBS, pH 7.4 и фиксирани с 4% параформалдехид в PBS, Ph за 20 мин. на стайна температура. След трикратни промивания за 5 мин. с PBS, клетките бяха едновременно пермеабелизирани и блокирани с 0.1% Triton X-100 (Sigma, USA) и 1% BSA (Sigma, USA) в PBS, Ph 7.4 за един час на стайна температура. След промиване с PBS, стъкалцата бяха инкубирани за една нощ на 4<sup>0</sup> със следните антитела: моноклонално anti- PIBF 3A6, козе anti-Sox-2 (1:50, R&D Systems, USA), моноклонално anti- Nestin (1:100, R&D Systems, USA) и PBS като контрола. На сутринта стъкалцата бяха промити с PBS и инкубирани за 1 час на стайна температура със съответните втори антитела: anti- мише Alexa Fluor 488 (1: 1000, Invitrogen, USA), за anti- PIBF и anti- Nestin, и anti козе Alexa Fluor 594 (1:1000, Invitrogen, USA) за anti-Sox-2. След двукратно промиване с PBS, Ph 7.4, клетъчните

ядра бяха оцветени с Hoechst 33258 (1: 1000, Sigma, USA) за 5 минути и след промиване бяха монтирани в Fluoromount- G (Southern Biotech, USA). Флуоресцентните проби бяха анализирани чрез конфокален лазерен сканиращ микроскоп ( Leica TCS SPE, Germany).

### **8.6.Изолиране на тотална РНК и RT-PCR**

Тотална РНК беше изолирана от клетъчните култури като се използва TRI Reagent (Sigma Aldrich, USA), съобразно инструкциите на производителя. За синтез на копиДНК беше използван Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR. PCR амплификацията беше проведена при следните условия: първоначална PCR активационна стъпка за 5 мин. на 95<sup>0</sup>, последвана от 30 сек. на 95<sup>0</sup>, 30 сек. на 56<sup>0</sup> и 50 сек. на 72<sup>0</sup> за 40 цикъла, последвани от 10 мин. на 72<sup>0</sup> за дореплициране на евентуални незавършени вериги. PCR реакцията беше извършена на апарат Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, USA), като се използва Luminaris Color HiGreen Low Rox qPCR Master Mix (Thermo Scientific, USA). Установиха се еднопикови профили на дисоционните криви за всяка двойка праймери, което доказва специфичността на протеклите амплификационни реакции. Праймерите използвани за амплификацията на PIBF, GFAP и  $\beta$ -актин бяха следните:

PIBF, 50-GTCAGCTTTACTACAGACGA-30 (прав)  
and 50-CTCTTTAGGCACATTCAAAGTC-30 (обратен);  
GFAP, 50-CCTCTCCCTGGCTCGAATG-30 (прав)  
and 50-GGAAGCGAACCTTCTCGATGTA-30 (обратен);  
b-actin, 50-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-30 (прав)  
50-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-30 (обратен).

PCR продуктите бяха изследвани чрез електрофореза на 1.5% агарозен гел и бяха оцветени с етидиев бромид. Като ДНК маркер беше използван O'GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)

### **8.7.Изолиране на ПКМК**

ПКМК бяха изолирани, както е посочено в глава III.

### **8.8.ФХА активация**

Изолирането на ПКМК беше последвано от разпределянето им в количество  $3 \times 10^6$  в 6-ямкова плака култивиране в среди от GBM клетки, и съответно контролни среди. След 60 часа, клетките бяха събрани, центрофугирани и сложени в по 1 ml на проба PBS, pH 7.4. След това бяха активирани с фитохемаглутинин (РАА, Austria) по 10  $\mu$ l на 1 ml за 4 часа на  $37^{\circ}$ . Впоследствие бяха промити с PBS и маркирани със съответните моноклонални антитела за флоуцитометрия.

### **8.9. Клоногенност**

Клетките от GBM (пасаж 2, над 80% конfluентност) бяха трипсинизирани, преброени и ресуспендирани в културална клетъчна среда DMEM, EGF 20 ng/ml, bFGF 20 ng/ml и 10% ФТС. Впоследствие те бяха посяти в гъстота 300 клетки/cm<sup>2</sup> в шестямкови плаки (Orange Scientific, Belgium). Култивирането протече в продължение на 14 дни при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub>. Хранителната среда беше сменяна на всеки 3 дни. Две седмици след посяване на клетките, формиралите се клетъчни колонии бяха оцветени с 0.5% Crystal violet.

### **8.10. Остеогенна диференциация**

За индуциране на остеогенна диференциация, достигналите над 80% конfluентност клетки от GBM на пасаж 2 бяха препосяти в 24-ямкови плаки (SPL Life Sciences, Korea) в концентрация  $5 \times 10^4$  клетки/cm<sup>2</sup> и култивирани в клетъчна среда DMEM/F12 в присъствие на 10% FBS, 100nM дексаметазон (Sigma-Aldrich, USA), 0,2 mM аскорбинова киселина-2-фосфат (Sigma-Aldrich, USA) и 10mM  $\beta$ -глицеролфосфат (Sigma-Aldrich, USA). Свежа остеогенна културална среда беше добавяна на всеки 3 дни в продължение на 21 дни. Паралелно, контролни клетки бяха култивирани единствено в DMEM и 10% FBS. В края на стимулационния период, степента на остеогенна диференциация беше определена чрез измерване на алкално-фосфатазна активност и чрез оцветяване по von Kossa.

### **8.11. Статистически методи**

Индексите на активация на Т лимфоцитите бяха анализирани чрез непараметричен Mann-Whitney U тест за свързани извадки. И при двата вида тестове за сигнификантни бях приети разлики  $p < 0,05$ .

## Заклучение

Стволовите клетки, и в частност мезенхимните стволови клетки, все още се намират в зоната между дълбокото непознаване и евтината сензация. Както обществото, така и голяма част от клиничните специалисти имат най-обща, повърхностна и често неверна представа, които варират между „несериозни неща” и „панацея”. Разбира се, нито едното, нито другото е вярно. Вероятната причина за тези крайни позиции, е че откритието на стволовите клетки предизвиква революция в базисни постулати на биологичните науки, основно догмата за линейна предопределеност на клетките.

Както всяко средство в медицината, така и стволовите клетки имат своето място, което все още не е намерено в нашата страна. За това разбира, се има много причини, основна, от които е комерсиалният интерес на фармацевтичните фирми. От друга страна, съществува и тенденцията за готовност на поголовното им прилагане, без да бъдат познавани, отново с оглед на комерсиален интерес. Настоящата дисертация няма идеята да дава отговори, а само да осветли един аспект на МСК, свързан с действието им върху клетките на имунната система. Дори повърхностният преглед на този въпрос показва, че използването на МСК следва да се прилага при автоимунни заболявания само след съответната сериозна преценка, извършена от имунолози и клинични специалисти. Много наивно би било да се каже, че мезенхимните стволови клетки „подтискат автоимунния отговор”, въпреки, че в известен смисъл, това е точно така. Действието им далеч не може да бъде определено единствено по този начин и една от целите на тази дисертация е именно да очертае цялата сложност на проблема. Първо, МСК не са само супресори, в определени ситуации, те имат активиращо действие върху някои клетки и в този случай ефекта, който би се постигнал от прилагането им, по скоро би бил нежелан. Второ, имунният отговор е мрежа от многопосочни взаимоотношения, все още недокрай изяснена. МСК се намесват в тази мрежа, като при супресивното си действие подтискат пряко ефекторните клетки, но и активират клетките, които сами по себе си са супресорни. Намесата в тази сложна и

многогранна междуклетъчна комуникация е деликатен момент, който в никакъв случай не е еднозначен. Трето, множество проучвания показват, че „активираните“ МСК имат по-силен инхибиращ ефект върху клетките на имунната система, като основния активиращ фактор е  $IFN\gamma$ . Изследванията по темата НЕ препоръчват предварителни активиране на МСК преди приложението им, поради множество неизвестности при този подход. Четвърто, концепцията, че МСК при прилагането си следват хемокинов градиент и се „заселват“ в зоната на увреда, все още не е категорично изяснена. Пето, мезенхимните стволови клетки са способни на мултилинейна диференциация и трансдиференциация, като особено вторият процес се свързва с потенциална опасност от злокачествена трансформация.

Въпреки описаните ограничения, които следва да се знаят и имат в предвид, мезенхимните стволови клетки се използват с добър ефект при редица автоимунни заболявания, което за съжаление все още не се случва в нашата страна. Основният „успокояващ“ момент за използването им е тяхната неимуногенност, което дава възможност, както за автоложна, така и за алогенната им трансплантация.

Един все още непълно изяснен въпрос, нерзагледан в настоящия труд, е този за разликите между мезенхимните стволови клетки, изолирани от различни източници. Като цяло се счита, че по-отношение на модулацията на имунния отговор, независимо от източника си на изолиране, мезенхимните стволови клетки не показват принципни различия. В един единствен аспект нашите изследвания установяват разлика в действията между АТ-МСК и КМ-МСК – ефектът върху активацията на лимфоцитите, определен чрез CD69 експресията, описан в глава III. Факт е обаче, че съществуват сериозни данни относно количествени разлики по отношение на силата на имунна супресия, осъществявана от различните видове МСК. В нашите резултати ние установяваме, по силно супресивно действие на МСК, изолирани от мастна тъкан, в сравнение с тези, изолирани от костен мозък, по отношение на почти всички изследвани аспекти – въздействие върху дендритните клетки, въздействие върху Т и В клетките и въздействие върху експресията на HLA-G. Тези убедителни резултати, показващи количествени разлики, доведоха до покана за написване на глава от книга, като главата

акцентираще именно върху този проблем. В сборник озаглавен “Stem cells and cancer stem cells” 2013, нашата част с име „Differences between adipose tissue derived mesenchymal stem cells and bone marrow derived mesenchymal stem cells as regulator of the immune response”, изтъкваше именно количествените разлики в полза на по-силното имunosупресивно действие на АТ-МСК. Едно е, обаче да опишеш феномен, а друго е да намериш неговото обяснение. На този етап ние нямаме такова и такова не е описано в научната литература, ето защо не акцентирам върху тези количествени разлики в настоящия труд, въпреки че ги споменавам там където те са налични.

В заключение, мезенхимните стволови клетки, наред с многопосочните си действия се явяват мултифункционални супресори на различни клетки на имунната система, както и стимулатори на основни имунорегулаторни клетки. Доброто теоретично познаване на техните действия в тази насока са важно и безусловно условие, с цел прилагането им за терапия при автоимунни заболявания.

# Литература

1. Кюркчиев Д и Пачаманов А. Стволови клетки- надежда за спасение или смъртен грях. 2007 Правен свят; бр. 3: 116-119
2. Стайс Д, Тер Е, Парслоу Т. Обща и клинична имунология. Първо издание на български език, под редакцията на доц. д-р. Хр. Тасков. Национален център по заразни и паразитни болести. София 1997; 30.
3. Aalamian M, Pirtskhalaishvili G, Nunez A, Esche C, Shurin G, Huland E, Huland H, Shurin M. Human prostate cancer regulates generation and maturation of monocyte-derived dendritic cells. *Prostate* 2001; 46:68–75.
4. Abbas A, Lohr J, Knoechel B. Balancing autoaggressive and protective T cell responses. *J Autoimmun* 2007; 28:59–61.
5. Abecassis L, Rogier E, Vazquez A, Atfi A, Bourgeade M. Evidence for a role of MSK1 in transforming growth factor- $\beta$ -mediated responses through p38 $\alpha$  and Smad signaling pathways. *J Biol Chem* 2004; 279:30474-30479.
6. Adachi Y, Taketani S, Toki J, Ikebukuro K, Sugiura K, Oyaizu H. Marked increase in number of dendritic cells in autoimmune-prone (NZWxBXSB)F1 mice with age. *Stem Cells* 2002; 20:61–72.
7. Aggarwal S and Pittenger M. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105:1815-22.
8. Ahmadi M, Emery D, Morgan D. Prevention of both direct and cross-priming of antitumor CD8+ T-cell responses following overproduction of prostaglandin E2 by tumor cells in vivo. *Cancer Res* 2008; 68:7520–7529.
9. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. TGF- $\beta$ 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells. *J Immunol* 2005; 174: 5215-5223.
10. Akbar A, Taams L, Salmon M, Vukmanovic-Stejic M. The peripheral generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Immunology*. 2003; 109:319-325.
11. Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, Cai T, Chen W, Sun L, Shi S. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 544-555.
12. Alaniz R, Sandall S, Thomas E, Wilson C. Increased dendritic cell numbers impair protective immunity to intracellular bacteria despite augmenting antigen-specific CD8+ T lymphocyte responses. *J Immunol* 2004; 172:3725-3735.
13. Almand B, Resser J, Lindman B, Nadaf S, Clark J, Kwon E, Carbone D, Gabrilovich D. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6:1755–1766.
14. Altaner C. Glioblastoma and stem cells Neoplasma. 2008; 55(5):369-374.
15. Aluvihare V, Kallikourdis M, Betz A. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 2004; 5(3): 266-271.
16. Ame-Thomas P, Maby E, Hajjami H, Monvoisin C, Jean R, Monnier D, Caulet-Maugendre S, Guillau-Deux T, Lamy T, Fest T, Tarte K., Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood* 2007; 109:693–702.
17. Amodio G and Gregori S. Dendritic cells a double-edge sword in autoimmune responses. *Front. Immunol.* 2012; 3:233.
18. Andersson J, Tran D, Pesu M, Davidson T, Ramsey H, O’Shea J, Shevach E. CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- $\beta$ -dependent manner. *J. Exp. Med.* 2008; 205:1975–1981.
19. Ankrum JA, Dastidar RG, Ong JF, Levy O, Karp JM. Performance-enhanced mesenchymal stem cells via intracellular delivery of steroids. *Sci Rep* 2014; 4: 4645.
20. Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y, Gleicher N. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 1995; 345:1340-1342.
21. Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer, H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat. Immunol.* 2002; 3:756–763.

22. Apostolou I and vonBoehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J. Exp.Med.*2004; 199:1401–1408.
23. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: A versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol* 2001; 22: 83-87
24. Arici A. Regulation of monocyte chemotactic protein-1 expression in human endometrial stromal cells by estrogen and progesterone. *Biol Reprod* 1999; 61:85-90.
25. Arruvito L, Giulianelli S, Flores AC, Paladino N, Barboza M, Lanari C, Fainboim L. NK Cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis. *The Journal of Immunology.* 2008; 180:5746-5753.
26. Aruffo A and Seed B. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1987; 84:8573-8577.
27. Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu C, Kuroda Y, Kandeel F, Mullen Y. Mesenchymal stem cells suppress B cell terminal differentiation. *Exp. Hematol.* 2009; 37(5):604-615.
28. Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian R, Gazit D, Gazit Z. Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells* 2006; 24:1728–1737.
29. Aspod C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton E, Su D. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J Exp Med* 2007; 204:1037–47.
30. Asseman C, Mauze S, Leach M, Coffman R, Powrie F. An essential role for interleukin10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp.Med.* 1999; 190: 995–1004.
31. Augello A, Tasso R, Negrini S, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur.J. Immunol.* 2005; 35:1482-1490.
32. Auletta J, Eid S, Wuttisarnwattana P, Silva I, Metheny L, Keller M, Guardia-Wolff R, Liu C, Wang F, Bowen T, Lee Z, Solchaga L, Ganguly S, Tyler M, Wilson D, Cooke K. Human mesenchymal stromal cells attenuate graft-versus-host disease and maintain graft-versus-leukemia activity following experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Stem cells* 2014; 33(2):601-614.
33. Awasthi A, Carrier Y, Peron J, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell R, Kuchroo V, Oukka M, Weiner H. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat.Immunol.* 2007; 8:1380–1389.
34. Baban B, Chandler P, Sharma M, Pihkala J, Koni P, Munn D, Mellor A. IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. *J. Immunol.* 2009; 183:2475–2483.
35. Baecher- Allan C, Brown J, Freeman G, Hafler D. CD4+CD25+ regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167:1245-1253
36. Baecher- Allan C, Viglietta V, Hafler A. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Seminars in Immunology.* 2004; 16:89-97
37. Baecher- Allan C, Viglietta V, Hafler D. Inhibition of human CD4+CD25high regulatory T cell function. *J Immunol* 2002; 169:6210-6217
38. Bai L, Lennon D, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller S, Miller R. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia* 2009; 57:1192-1203.
39. Bai W, Weigel NL. Phosphorylation and steroid hormone action. *Vitam. Horm.* 1995; 51:289-313.
40. Bainbridge D, Ellis, S, Sargent I. HLA-G suppresses proliferation of CD4+ T-lymphocytes. *J. Reprod. Immunol.* 2000; 48:17–26.
41. Bakdash G, Sittig S, Dijk T, Gidgor C, Vries J. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Frontiers of Immunology* 2013; 4: Article 53.
42. Baksh D, Song L, Tuan R. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 2004; 8(3):301-316.
43. Balkwill F. The molecular and cellular biology of the chemokines. *J Viral Hepat* 1998; 5: 1-14.
44. Banchereau J and Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245–252.

45. Baratelli F, Krysan K, Heuze-Vourc'h N, Zhu L, Escudro B, Sharma S, Reckamp K, Dohadwala M, Dubinett SM. PGE2 confers survivin-dependent apoptosis resistance in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2005; 78:555–564.
46. Barbero A, Ploegert S, Heberer M, Martin I. Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2003; 48:1315–25.
47. Barrio L, Cuevas V, Menta R, Mancheno-Corvo P, Delarosa O, Dalemans W, Lombardo E, Carrasco Y. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells promote B- cell motility and chemoattraction. *Cytotherapy* 2014; 16:1692-1699.
48. Barry F and Murphy J. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004; 36:568-584
49. Barry F, Boynton R, Liu B, Murphy J. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Experimental Cell Research* 2001; 268:189–200.
50. Barry F, Boynton R, Murphy M, Haynesworth S, Zaia J. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 289:519–524.
51. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002; 30:42-8.
52. Bassi EJ, Aita CA, Câmara NO. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J Stem Cells* 2011; 3:1-8.
53. Batten P, Sarathchandra P, Antoniow J, Tay S, Lowdell M, Taylor P, Yacoub M. Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves. *Tissue Eng* 2006; 12:2263-2273.
54. Beagley K, Gockel C. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol and Medical Microbiol* 2003; 38:13-22.
55. Beggs K, Lyubimov A, Borneman J, Bartholomew A, Moseley A, Dodds R, Archambault M, Smith A, McIntosh K. Immunologic consequences of multiple, high-dose administration of allogeneic mesenchymal stem cells to baboons. *Cell Transplant*. 2006; 15(8-9):711-721.
56. Beier C, Kumar P, Meyer K, Leukel P, Bruttel V, Aschenbrenner I, Riemenschneider M, Fragoulis A, Rummele P, Lamszus K, Schulz J, Weis J, Bogdahn U, Wischhusen J, Hau P, Spang R, Beier D. The cancer stem cell subtype determines immune infiltration of glioblastoma. *Stem Cells Dev*. 2012 ;21(15):2753-2761.
57. Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb G, Lebecque S. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 1999; 190:1417–1426.
58. Ben-Ami E, Berrih-Aknin S, Miller A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2011; 10:410-415.
59. Bennaceur K, Popa I, Chapman J, Migdal C, Péguet-Navarro J, Touraine J. Different mechanisms are involved in apoptosis induced by melanoma gangliosides on human monocyte-derived dendritic cells. *Glycobiology* 2009; 19:576–582.
60. Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, Mazurier C, Fouillard L, Bouchet S, Bertho J, Gourmelon P, Aigueperse J. Homing of in vitro expanded Stro-1– or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* 2004; 103:3313-3319.
61. Bergeron A, El-Hage F, Kambouchner M, Lecossier D, Tazi A. Characterisation of dendritic cell subsets in lung cancer microenvironments. *Eur Respir J* 2006; 28:1170–1177.
62. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 2013; 13:392-402.
63. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom T, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo V. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441:235–238.

64. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105:2214-9.
65. Bharadwaj U, Li M, Zhang R, Chen C, Yao Q. Elevated interleukin-6 and G-CSF in human pancreatic cancer cell conditioned medium suppress dendritic cell differentiation and activation. *Cancer Res.* 2007; 67:5479–5488.
66. Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Experimental Cell Research* 2003; 287:98–105.
67. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2000; 105:1663–1668.
68. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey P. Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19:180–92.
69. Bianco P, Robey P, Simmons P. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cells* 2008; 2:313-319.
70. Billington W. The immunological problem of pregnancy: 50 years with the hope of progress. A tribute to Peter Medawar. *J Reprod Immunol.* 2003; 60(1):1-11.
71. Biois S, Kammerer U, Soto CA, Tometten M, Shaikly V, Barrientos G, Jurd R, Rukavina D, Thomson A, Kiapp B, Fernandez N, Arck PC. Dendritic cells (DC): Key to fetal tolerance. *Biol Reprod.* 2007; 77(4):590-598.
72. Birner P, Toumangelova-Uzeir K, Natchev S, Guentchev M. Stat3 tyrosine phosphorylation influences survival in GBM. *Journal of neuro-oncology* 2010; 100(3):339-343.
73. Blaber SP, Webster RA, Hill CJ, Breen EJ, Kuah D, Vesey G, Herbert BR. Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations. *J Transl Med* 2012; 10:172.
74. Blanco O, Tirado I, Munoz-Fernandez R, Abadia-Molina C, Garcia-Pacheco M, Pena J, Olivares E. Human decidual stromal cells express HLA-G effects of cytokines and decidualization. *Hum. Reprod.* 2008; 23:144–152.
75. Blander J, Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* 2004;304:1014-1018.
76. Blaschitz A, Lenfant F, Mallet V, Hartmann M, Bensussan A, Geraghty D, Le Bouteiller P, Dohr G.. Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27:3380–3386
77. Blashki D, Short B, Bertoncello I, Simmons PJ, Brouard N. Identification of stromal MSC candidates from multiple adult mouse tissues. In *Int Soc Stem Cell Res 4th Annual Meeting* 2006; 206.
78. Blois S, Zenclussen AC, Roux ME, Olmos S, di Conza J, Arck PC, Margni RA. Asymmetric antibodies (AAb) in female reproductive tract. *J Reprod Immunol* 2004; 64:31-43.
79. Bocelli-Tyndall C, Bracci L, Spagnoli G, Braccini A, Bouchenaki M, Ceredig R, Pistoia V, Martin I, Tyndall A. Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and autoimmune disease patients reduce the proliferation of autologous and allogeneic-stimulated lymphocytes in vitro. *Rheumatology* 2007; 46:403–408.
80. Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altanokova I, Tivchev P, Kyurkchiev S. Mesenchymal stem cells from bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B cells immunoglobulin production in vitro. *Cell Bioogyl. International* 2008; 32:384-393
81. Bochev I, Kyurkchiev S. Immunomodulatory effect of human bone marrow or adipose tissue derived mesenchymal stem cells on T-helper cell cytokine production *in vitro*. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci* 2009; 62(12):1553-1558
82. Bogunovic M, Ginhoux F, Helft J, Shang L, Hashimoto D, Liu K, Jakubzick C, Ingersoll M, Leboeuf M, Stanley E, Nussenzweig M, Lira S, Randolph G, Merad M. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 2009; 31:513–525.
83. Boland G, Perkins G, Hall D, Tuan R. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells, *J. Cell. Biochem.* 2004; 93:1210-1230
84. Bondanza A, Zimmermann V, Dell'Antonio G, DalCin E, Capo-bianco A, Sabbadini M. Cutting edge : dissociation between autoimmune response and clinical disease after vaccination with dendritic cells. *J. Immunol.* 2003; 170:24–27.

- 85.** Bonelli M, Savitskaya A, Steiner C, Rath E, Smolen J, Scheinecker C. Phenotypic and functional analysis of CD4+ CD25- Foxp3+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2009; 182(3):1689-1695.
- 86.** Bonelli M, von Dalwigk K, Savitskaya A, Smolen J, Scheinecker C. Foxp3 expression in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67(5):664-71.
- 87.** Bonig H, Banning U, Hannen M, Kim YM, Verheyen J, Mauz-Korholz C, Korholz D. Transforming growth factor- beta1 suppresses interleukin-15-mediated interferongamma production in human T lymphocytes. *Scand J Immunol* 1999; 50: 612-618
- 88.** Boomsma RA, Geenen DL. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS One* 2012; 7: e35685
- 89.** Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling J, Palmeshofer A, Serfling E. Cyclic adenosinemonophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* 2007; 204:1303–1310
- 90.** Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: S460-475
- 91.** Boucher A, Lemay A and Akoum A. Effect of hormonal agents on monocyte chemotactic protein-1 expression by endometrial epithelial cells of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000; 74: 969-975.
- 92.** Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noël D. IL- 6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PloS One* 2010; 5: e14247
- 93.** Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noel D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS ONE* 2010; 5:e14247.
- 94.** Bouman A, Moes H, Heineman MJ, de Leij LF, Faas MM. The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: increasing sensitivity of human monocytes to endotoxin. *Fertil. Steril.* 2001; 76:555-559.
- 95.** Boumaza I, Srinivasan S, Witt W, Feghali-Bostwick C, Dai Y, Garcia-Ocana A, Feili-Hariri M. Autologous bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells promote PDX-1 and insulin expression in the islets, alter T cell cytokine pattern and preserve regulatory T cells in the periphery and induce sustained normoglycemia. *J Autoimmun* 2009; 32:33-42.
- 96.** Brabin B. Epidemiology of infection in pregnancy. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7:579-60
- 97.** Brabletz T, Pfeuffer I, Schorr E, Siebelt F, Wirth T, Serfling E. Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 1155-1162
- 98.** Braud V, Allan D, O'Callaghan C, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg G, Lazetic S, Young N, Bell J, Phillips T. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; 391:795-799.
- 99.** Brescia P, Ortensi B, Fornasari L, Levi D, Broggi G, Pelicci G. CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance. *Stem Cells.* 2013; 31:857-869
- 100.** Brock TG, McNish RW, Peters-Golden M. Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *J Biol Chem* 1999; 274:11660-11666
- 101.** Bruder S, Horowitz M, Mosca J, Haynesworth S. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 1997; 21:225–235.
- 102.** Bruder S, Jaiswal N, Haynesworth S, Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation, *J. Cell Biochem.* 1997; 64:278-294
- 103.** Brunkow M, Jeffery E, Hjerrild K, Paeper B, Clark L, Yasayko S, Wilkinson J, Galas D, Ziegler S, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001; 27:68–73
- 104.** Budnik A, Grewe M, Gyufko K, Krutmann J. Analysis of the production of soluble ICAM-1 molecules by human cells. *Exp Hematol* 1996; 24: 352-359
- 105.** Bulmer J and Johnson P. Macrophage populations in the human placenta and amniochorion. *Clin. Exp. Immunol.* 1984; 57:393-403

- 106.** Bulmer J. Immune cells in decidua. In: Kurpiz M, Fernandez N, eds. Immunology of human reproduction. Oxford: BIOS Scientific 1995:313–334.
- 107.** Burchill M, Yang J, Vang K, Moon J, Chu H, Lio C, Vegoe A, Hsieh C, Jenkins M, Farrar, M. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 2008; 28:112–121.
- 108.** Burchill M, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar B, Farrar M. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2007; 178:280–290.
- 109.** Burmeister Y, Lischke T, Dahler A, Mages H, Lam K, Coyle A. ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J. Immunol.* 2008; 180:774–782.
- 110.** Caballero O, de Souza S, Brentani R, Simpson A. Alternative spliced transcripts as cancer markers. *Dis Markers* 2001;17:67–75
- 111.** Cai G, Anumanthan A, Brown J, Greenfield E, Zhu B, Freeman G. CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpes virus entry mediator. *Nat.Immunol.* 2008; 9:176–185.
- 112.** Caldera V, Mellai M, Annovazzi L, Piazzzi A, Lanotte M, Cassoni P, Schiffer D. Antigenic and Genotypic Similarity between Primary Glioblastomas and Their Derived Neurospheres. *J Oncol.* 2011; Article ID314962
- 113.** Campagnoli C, Roberts I, Kumar S, Bennett P, Bellantuono I, Fisk N. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001; 98(8):2396–2402.
- 114.** Canellada A, Blois S, Gentile T, Margni RA. *In vitro* modulation of protective antibody responses by estrogen, progesterone and interleukin – 6. *Am J Reprod Immunol.* 2002; 48: 334-343.
- 115.** Canellada A, Farber A, Zenclussen AC, Gentile T, Dokmetjian J, Keil A, Blois S, Miranda S, Berod L, Gutierrez G, Markert UR, Margni R. Interleukin regulation of asymmetric antibody synthesized by isolated placental B cells. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48:275-282.
- 116.** Cantor H., Shen F, Boyse E. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II. Activation by antigen: after immunization, antigen-specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T-cell subclasses. *J. Exp. Med.* 1976; 143:1391–1340
- 117.** Cao D, Malmstrom V, Baecher- Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25 bright CD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2003; 33:215-223
- 118.** Caplan A. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 1991; 9:641–650.
- 119.** Caplan A. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994;21:429–435.
- 120.** Carrion F, Nova E, Luz P, Apablaza F, Figueroa F. Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 cell polarization according to the state of CD4(+) T cell activation. *Immunol Lett* 2011; 135:10-16.
- 121.** Carter R, Wicks I. Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106): a multifaceted regulator of joint inflammation. *Arthritis Rheum* 2001; 44:985-994.
- 122.** Casiraghi F, Azzollini N, Cassis P, Imberti B, Morigi M, Cugini D, Cavinato RA, Todeschini M, Solini S, Sonzogni A, Perico N, Remuzzi G, Noris M. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *J Immunol* 2008; 181:3933-3946.
- 123.** Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur.J.Immunol.* 2000; 30:1538–1543.
- 124.** Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat.Med.* 1999; 5:919–923.
- 125.** Cervello I, Martinez-Conejero J, Horcajadas J, Pellicer A, Simon C. Identification, characterization and co-localization of label-retaining cell population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers. *Hum Reprod* 2007; 22:45–51.
- 126.** Ceuppens J, Baroja M, Lorre K, vanDamme J, Billiau A. Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal. *J. immunol* 1988; 141:3868-3874
- 127.** Chai J, James E, Dewchand H, Simpson E, Scott D. Transplantation tolerance induced by intranasal administration of HY peptides. *Blood* 2004; 103:3951–3959.

- 128.** Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Meddleton J. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential of homing. *Stem Cells* 2007; 25:2739-2749
- 129.** Champagne B, Tremblay P, Cantin A, St Pierre Y. Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J Immunol* 1998; 161: 6398-6405
- 130.** Chan CK, Wu KH, Lee YS, Hwang SM, Lee MS, Liao SK, Cheng EH, See LC, Tsai CN, Kuo ML, Huang JL. The comparison of interleukin 6-associated immunosuppressive effects of human ESCs, fetal-type MSCs, and adult-type MSCs. *Transplantation* 2012; 94:132-138
- 131.** Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein R, Liang Y, Kas A. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 2009; 326, 986–991.
- 132.** Chaux P, Favre N, Martin M, Martin F. Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats. *Int J Cancer*; 1997; 72:619–624.
- 133.** Check J, Szekeres-Bartho J, O'Slaughnessy A. Progesterone induced blocking factor seen in pregnancy lymphocytes soon after implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1996; 35:277–280.
- 134.** Check J, Dix E, Sansoucie L. Support for the hypothesis that successful immunotherapy of various cancers can be achieved by inhibiting a progesterone associated immunomodulatory protein. *Med Hypotheses* 2009; 72:87–90
- 135.** Check JH, Nazari P, Goldberg J, Yuen W, Angotti D. A model for potential tumor immunotherapy based on knowledge of immune mechanisms responsible for spontaneous abortion. *Med Hypotheses* 2001; 57:337–343
- 136.** Check JH, Sansoucie L, Chern J, Amadi N, Srivastava M, Larece K. Evidence that progesterone receptor antagonists may help in the treatment of a variety of cancers by locally suppressing natural killer cell activity. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2007; 34:207–211
- 137.** Check JH, Sansoucie L, Chern J, Dix E. Mifepristone treatment improves length and quality of survival of mice with spontaneous lung cancer. *Anticancer Res* 2010; 30:119–122
- 138.** Chen D, Zhao M, Mundy G. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22:233-241.
- 139.** Chen F, Hui J, Chan W, Lee E. Cultured mesenchymal stem cell transfers in the treatment of partial growth arrest. *J Pediatr Orthop.* 2003; 23:425–429
- 140.** Chen H, Chen H, Wang L, Wang F, Fang L, Lai H, Chen H, Lu J, Hung M, Cheng Y, Chen M, Liu S, Chong P, Lee O, Hsu S. Mesenchymal stem cells tune the development of monocyte-derived dendritic cells toward a myeloid-derived suppressive phenotype through growth-regulated oncogene chemokines. *J Immunol* 2013; 190(10):5065-5077
- 141.** Chen K, Wang D, Du WT, Han ZB, Ren H, Chi Y, Yang SG, Zhu D, Bayard F, Han ZC. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clin Immunol* 2010; 135: 448-458
- 142.** Chen M, Wang Y, Wang Y, Huang L, Sandoval H, Liu Y. Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science* 2006; 311:1160–1164.
- 143.** Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl S. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 2003; 198:1875–1886.
- 144.** Chen Y, Teng F, Tang B. Coaxing bone marrow stromal mesenchymal stem cells towards neuronal differentiation: Progress and uncertainties. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63:1649 –1657.
- 145.** Cheong C, Matos I, Choi J, Dandamudi D, Shrestha E, Longhi M, Jeffrey K, Anthony R, Kluger C, Nchinda, Koh H, Rodriguez A, Idoyaga J, Pack M, Velinzon K, Park C, Steinman R. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 2010; 143:416–429.
- 146.** Cherry R, Yasumizu R, Toki J, Asou H, Nishino T, Komatsu Y, Ikehara S. Production of hematopoietic stem cell-chemotactic factor by bone marrow stromal cells. *Blood* 1994; 83(4):964–971.
- 147.** Chien E, Chang C, Lee W, Su T, Wu C. Non-genomic immunosuppressive actions of progesterone inhibits PHA induced alkalization and activation in T cells. *J Cell Biochem.* 2006; 99(1):292-304.
- 148.** Chien E, Liao C-F, Chang C, Pu H, Lu L, Shie M. The non-genomic effects on Na+/H+-exchange 1 by progesterone and 20-hydroxyprogesterone in human T cells. *J Cell Physiol.* 2007; 211(2):544-550
- 149.** Chinnadurai R, Copland I, Patel S, Galipeau J. IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN-γ-licensed human mesenchymal stromal cells. *J. Immunol.* 2014; 19(4): 1491–1501

- 150.** Cho D, Lin S, Yang W, Lee H, Hsu D, Lin H, Chen C, Liu C, Lee W, Ho L. Targeting cancer stem cells for treatment of glioblastoma multiforme. *Cell Transplant.* 2013; 22:731-739
- 151.** Cho K, Trzaska K, Greco S, McArdle J, Wang F, Je J, Rameshwar P. Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1. *Stem Cells* 2005; 23:383–391
- 152.** Choi E, Shin I, Park S, Park J, Kim J, Yoon E, Kang S, Ra J, Hong S. Reversal of serologic, immunologic, and histologic dysfunction in mice with systemic lupus erythematosus by long-term serial adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation. *Arthritis Rheum.* 2012; 64:243-253.
- 153.** Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol.* 2002; 1:92–100.
- 154.** Chou Y, Goldman R. Intermediate filaments on the move. *J Cell Biol* 2000; 150:F101–F106.
- 155.** Chu W, Fant M, Geraghty D, Hunt J. Soluble HLA-G in human placentas: Synthesis in trophoblasts and interferon-g-activated macrophages but not placental fibroblasts. *Hum. Immunol.* 1998; 59:435–442.
- 156.** Chun H, Chung J, Kim H. Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 2007; 27(5): 461-6.
- 157.** Clifford K, Flanagan A, Regan L. Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study. *Hum Reprod* 1999; 14:2727-2730.
- 158.** Cobbold S, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L, Humm S. Induction of FoxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J. Immunol.* 2004; 172:6003–6010.
- 159.** Coccia E, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli M, Julkunen I, Cella M, Lande R, Uze G. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004; 34:796-805.
- 160.** Collison L, Workman C, Kuo T, Boyd K, Wang Y, Vignali K. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; 450:566–569.
- 161.** Colonna L, Dinnall J, Shivers D, Frisoni L, Caricchio R, Gallucci S. Abnormal costimulatory phenotype and function of dendritic cells before and after the onset of severe murine lupus. *Arthritis Res. Ther.* 2006; 8, R49.
- 162.** Colter D, Class R, DiGirolamo C, Prockop D. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; 3213-3218, 2000
- 163.** Comoli P, Ginevri F, Maccario R, Avanzini M, Marconi M, Groff A, Cometa A, Cioni M, Porretti L, Barberi W, Frassoni F, Locatelli F. Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced invitro by allostimulation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008; 23:1196-12020.
- 164.** Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi G, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107:367-72.
- 165.** Covello K, Kehler J, Yu H, Gordan J, Arsham A, Hu C, Labosky P, Simon M, Keith B. HIF-2 $\alpha$  regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 2006; 20:557-570.
- 166.** Cozzo C, Lerman M, Boesteanu A, Larkin J, Jordan M, Caton A. Selection of CD4+CD25+ regulatory T cells by self-peptides. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 293:3–23.
- 167.** Crellin N, Garcia R, Hadisfar O, Allan S, Steiner T, Levings M. Human CD4+T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 2005; 175:8051–8059
- 168.** Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C, Corselli M, Park T, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng P, Traas J, Schugar R, Deasy B, Badyrak S, Bhuring H, Giacobino J, Lazzari L, Huard J, Peault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3:301-313
- 169.** Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: Implications and predictions. *J Rheumatol Suppl* 1997; 49: 15-19]

- 170.** Cui X, Liu J, Bai L, Tian J, Zhu J. Interleukin-6 induces malignant transformation of rat mesenchymal stem cells in association with enhanced signaling of signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Sci* 2014; 105: 64-71
- 171.** Curiel T, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated anti-tumor immunity. *Nat.Med.*2003; 9:562–567.
- 172.** D’Cruz L, and Klein L. Development and function of agonist-induced CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat. Immunol.* 2005; 6:1152–1159.
- 173.** D’Ippolito G, Schiller P, Ricordi C, Roos B, Howard G. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *Journal of Bone and Mineral Research* 1999; 14:1115–1122.
- 174.** Daniel L, Vincent C, Rousset F, Klein B, Bataille R, Flacher M. Estrogen and progesterone receptors in human myeloma cell lines and murine hybridomas. *J Steroid Biochem* 1988; 30:363-367.
- 175.** Darlington P, Boivin M, Renoux C, Francois M, Galipeau J, Freedman M, Atkins H, Cohen J, Solchaga L, Bar-Or A. Reciprocal Th1 and Th17 regulation by mesenchymal stem cells: implication for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010; 68:540-545.
- 176.** daSilva Meirelles L, Chagas L, Nardi N. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119:2204-2213.
- 177.** Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5545-
- 178.** Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Herve P, Etievent J, Kantelip J. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 2003; 108:11253–11258.
- 179.** Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3 T regulatory cells. *J Immunol* 2007; 178: 4022-4026
- 180.** Davies J. Mesenchyme to epithelium transition during development of the mammalian kidney tubule. *Acta Anat* 1996; 156:187–201.
- 181.** Dazzi F, Krampera M. Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011; 24: 49-57
- 182.** De Bari C, Dell’Accio F, Tylzanowski P, Luyten F. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001; 44:1928–1942.
- 183.** De Jong E, Smits H, Kapsenberg M. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin. Immunopathol.*2005; 26: 289–307.
- 184.** De Smedt T, Van Mechelen M, DeBecker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur.J. Immunol.* 1997; 27:1229–1235.
- 185.** De Ugarte D, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk P, Zhu M, Dragoo J, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick M. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003; 174:101–109.
- 186.** Deaglio S, Dwyer K, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp.Med.*2007; 204:1257–1265
- 187.** Deans R, Moseley A. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28:875–884.
- 188.** Dejean A, Beisner D, Chen I, Kerdiles Y, Babour A, Arden K. Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nat Immunol* 2009; 10:504–513
- 189.** deLafaille M, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille J. Adaptive Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell-dependent and-independent control of allergic inflammation. *Immunity* 2008; 29:114–126
- 190.** deLafaille M and Lafaille J. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* 2002; 14:771–778
- 191.** deLafaille M., Lino A, Kutchukhidze N, Lafaille J. CD25<sup>-</sup> T cells generate CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells by peripheral expansion. *J. Immunol.* 2004; 173:7259–7268.

- 192.** DelaRosa O, Dalemans W, Lombardo E. Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases. *Curr Opin Biotechnol* 2012; 23:978-983
- 193.** Delarosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheno- Corvo P, Ramirez C, Menta R, Rico L, Camarillo E, Garcia L, Abad J, Trigueros C, Delgado M, Buscher D. Requirement of IFN- $\gamma$ -mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *TISSUE ENGINEERING* 2009; 15(10):2795-2806
- 194.** DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheno-Corvo P, Ramirez C, Menta R, Rico L, Camarillo E, Garcia L, Abad JL, Trigueros C, Delgado M, Búscher D. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 2009; 15: 2795-2806
- 195.** Deng J, Petersen B, Steindler D, Jorgensen M, Laywell E. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells* 2006; 24:1054–1064.
- 196.** Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop D. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 282:148–152.
- 197.** Dennis J, Merriam A, Awadallah A, Yoo J, Johnstone B, Caplan A. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse, *J. Bone Miner. Res.*1999; 14:700-709
- 198.** Derrien M, Pizzato N, Dolcini G, Menu E, Chaouat G, Lenfant F, Barre´-Sinoussi F, Le Bouteiller P. Human immunodeficiency virus 1 downregulates cell surface expression of the non-classical major histocompatibility class I molecule HLA-G1. *J. Gen. Virol.* 2004; 85:1945–1954.
- 199.** Deschaseaux F, Gindraux F, Saadi R, Obert L, Chalmers D, Herve P. Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45(med/low) phenotype. *Br J Haematol* 2003; 122:506–17.
- 200.** Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009; 29: 313-326
- 201.** Dexter T, Allen T, Lajtha L. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J. Cell. Physiol.* 1977; 91:335–344.
- 202.** Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* 2005; 309:314-317.
- 203.** Di Iannia , Del Papaa B , De Ioannia M , Morettia L , Bonifacioa E, Cecchinia D, Sportolettia P, Falzettia F, Tabiliob A. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Experimental Hematology.* 2008; 36(3):309–318
- 204.** Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni P, Matteucci P, Grisanti S, Gianni A. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99:3838-43.
- 205.** Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-3843
- 206.** Dieckmann D, Plotner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4+CD25+ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; 193:1303-1310
- 207.** Diekmann D, Bruett C, Ploettner H, Lutz M, Schuler G. Human CD4+CD25+ regulatory, contact dependent T cells induced IL-10 producing, contact independent type 1-like regulatory T cells. *J Exp Med* 2002; 196:247-253
- 208.** Dietl J, Hönig A, Kämmerer U, Rieger L. Natural killer cells and dendritic cells at the human fetomaternal interface: an effective cooperation? *Placenta* 2006; 27:341-347
- 209.** Digirolamo C, Stokes D, Colter D, Phinney D, Class R, Prockop D. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999; 107:275-81.

- 210.** Dikov MM, Ohm JE, Ray N, Tchekneva EE, Burlison J, Moghanaki D, Nadaf S, Carbone DP. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2005; 174: 215-222
- 211.** Diliouglou S, Cruse MJ, Lewis RE. Function of CD 80 and CD 86 on monocytes and stem cell-derived dendritic cells. *Exp Mol Pathol* 2003; 75:217–227.
- 212.** Dimitrov R, Kyurkchiev D, Timeva T, Yunakova M, Stamenova M, Shterev A, Kyurjchiev S. First-trimester human deciduas contains a population of mesenchymal stem cells. *Fertility and Sterility* 2010; 93(1):210-219
- 213.** Dimitrov R, Timeva T, Kyurkchiev D, Stamenova M, Shterev A, Kostova P, Zlatkov V, Kehayov I, Kyurkchiev S. Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. *Reproduction* 2008; 135:551–558.
- 214.** Dimov I, Tasić-Dimov D, Conić I, Stefanovic V. Glioblastoma multiforme stem cells. *Sci World J.* 2011 ;11:930–958.
- 215.** D'Ippolito G, Diabira S, Howard G, Menei P, Roos B, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 2004; 117(14): 2971-81.
- 216.** Djouad F, Bouffi C, Ghannam S, Noël D, Jorgensen C. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 392-399
- 217.** Djouad F, Charbonneier L-M, Bouffi C, Louis- Plence P, Bony, C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noel D. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem cells* 2007; 25:2025-2031
- 218.** Docheva D, Haasters F, Schieker M. Mesenchymal stem cells and their surface receptors. *Current Rheumatology Reviews* 2008; 4(3):155-160
- 219.** Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo J-M, Alvarez-Buylla A. EGF Converts Transit-Amplifying Neurogenic Precursors in the Adults Brain into Multipotent Stem Cells. *Neuron.* 2002; 36:1021-1034
- 220.** Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Martin F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4):315-317
- 221.** Dosiou C. and Guidice L. NK cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: Endocrine and immunologic perspectives. *Endocr. Rev.* 2005; 26:44–62.
- 222.** Drago J, Samimi B, Zhu M, Hame S, Thomas B, Lieberman, Hedrick M, Benhaim P. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *The Journal of Bone and Joint Surgery.* 2003; 85:740–747.
- 223.** Drake P, Gunn M, Charo I, Tsou C, Zhou Y, Huang L, Fisher S. Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56 (bright) natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1alpha. *J. Exp. Med.* 2001; 193:1199-1212
- 224.** Driesen J, Popov A, Schultze J. CD25 as an immune regulatory molecule expressed on myeloid dendritic cells. *Immunobiology* 2008; 213:849–858.
- 225.** Duffy M, Ritter T, Ceredig R, Griffin M. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *J. Stem. Cell Res. Ther* 2011; 2:34-43
- 226.** Dumitriu I, Dunbar D, Howie S, Sethi T, Gregory C. Human dendritic cells produce TGF-beta1 under the influence of lung carcinoma cells and prime the differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2009; 182:2795–2807.
- 227.** Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J. Exp. Med.* 2001; 194:1823–1834.
- 228.** Eblen AC, Gercel-Taylor C, Shields LB, Sanfilippo JS, Nakajima ST, Taylor DD. Alteration in humoral immune responses associated with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2000; 73:305-313.
- 229.** Egerbacher M, Krestan R, Bock P. Morphology, histochemistry, and differentiation of the cat's epiglottic cartilage: A supporting organ composed of elastic cartilage, fibrous cartilage, myxoid tissue, and fat tissue. *Anat Rec* 1995; 242:471–482.

- 230.** Eggenhofer E, Lik F, Dahlke M, Hoogduijn M. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Immunology* 2014; 5: article 148
- 231.** Eisenbarth S, Piggott D, Bottomly K. The master regulators of allergic inflammation: dendritic cells in Th2 sensitization. *Curr Opin Immunol* 2003;15:620-626.
- 232.** Elkabets M, Ribeiro V, Dunarello C, Ostrand- Rosenberg S, Di Santo J, Apte R, Vosshenrich C. IL-1 $\beta$  regulates a novel myeloid- derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur. J. Immunol.* 2010; 40:3347-3357
- 233.** Elkon K and Stone V. Type I interferon and systemic lupus erythematosus. *J. Interferon Cytokine Res.* 2011; 31:803–812.
- 234.** Elman JS, Li M, Wang F, Gimble JM, Parekkadan B. A comparison of adipose and bone marrow-derived mesenchymal stromal cell secreted factors in the treatment of systemic inflammation. *J Inflamm (Lond)* 2014; 11:1
- 235.** Elpek K, Yolcu E, Franke D, Lacelle C.,Schabowsky R, Shirwan H. Ex vivo expansion of CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling. *J. Immunol.* 2007; 179:7295–7304
- 236.** Engela A, Baan C, Dor F, Weimar W Hoogduijn M. On the interaction between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. *Frontiers in Immunology* 2012; 3: article 126
- 237.** Engela A, Hoogduijn M, Boer K, Litjens N, Betjes M, Weimar W, Baan C. Human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells induce functional de-novo regulatory T cells with methylated FoxP3 gene DNA. *Clin Exp immunol* 2013; 173:343-354
- 238.** Engela AU, Baan CC, Peeters AM, Weimar W, Hoogduijn MJ. Interaction between adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and regulatory T-cells. *Cell Transplant* 2013; 22: 41-54
- 239.** English K, French A, Wood K. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell Stem Cell* 2010; 7:431-442.
- 240.** English K, Ryan J, Tobin L, Murphy M, Barry F, Mahon B: Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play nonredundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(high) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 2009; 156:149-160.
- 241.** Erices A, Conget P, Minguell J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* 2000; 109:235–242.
- 242.** Eriksson U, Ricci R, Hunziker L, Kurrer M, Oudit G, Watts T. Dendritic cell- induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity. *Nat. Med.* 2003; 9:1484–1490.
- 243.** Evans R. The steroid thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-895.
- 244.** Facchino S, Abdouh M, Bernier G. Brain Cancer Stem Cells: Current Status on Glioblastoma Multiforme. *Cancers.* 2011; 3:1777-1797
- 245.** Fahlen L, Rea S, Gorelik L, Hurst S, Coffman R, Flavell R, Powrie F. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2005; 201:737–746.
- 246.** Falkenstein E, Tillmann H-C, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple Actions of Steroid Hormones-A Focus on Rapid, Nongenomic Effects. *Pharmacol Rev.* 2002; 52:513-555.
- 247.** Faria A and Weiner H. Oral tolerance. *Immunol. Rev.* 2005; 206:232–259.
- 248.** Faunce DE, Stein-Streilein J. NKT cell-derived RANTES recruits APCs and CD8 T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance. *J Immunol* 2002; 169: 31-38
- 249.** Favier B, Lemaoult J, Lesport E, Carosella E. ILT2/HLA-G interaction impairs NK-cell functions through the inhibition of the late but not the early events of the NK-cell activating synapse. *FASEB J* 2010; 24:689–699
- 250.** Fernandez M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell J. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplantation* 1997; 20(4):265–271.
- 251.** Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors, *Science* 1998; 279: 1528-1530
- 252.** Ferrero E, Bondanza A, Leone B, Manici S, Poggi A, Zocchi M. CD14+CD34+ peripheral blood mononuclear cells migrate across endothelium and give rise to immunostimulatory dendritic cells. *J. Immunol.* 1998; 160:2675–2683.

- 253.** Ferry B, Starkey P, Sargent I, Watt G, Jackson M, Redman C. Cell populations in the human early pregnancy decidua: natural killer activity and response to interleukin-2 of CD56-positive large granular lymphocytes. *Immunology* 1990; 70:446-452
- 254.** Fijak M, Lustig L, von Wulffen W, Iosud R, Guazzone VA, Schneider E, Meinhardt A, Rival C. Expression of costimulatory molecules, chemokine receptors and proinflammatory cytokines in dendritic cell population in normal and chronic inflamed rat testis. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57(6):427-442
- 255.** Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, Selig M, Godwin J, Law K, Placidi C, Smith RN, Capella C, Rodig S, Adra CN, Atkinson M, Sayegh M, Abdi R. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol* 2009; 183:993-1004.
- 256.** Fischer L, Boland G, Tuan R. Wnt signaling during BMP-2 stimulation of mesenchymal chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2002; 84:816-831.
- 257.** Fisson S, Darrasse-Jeze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, Salomon BL. Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 2003; 198:737-746.
- 258.** Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang H, Bopp T, Schmitt E. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.*2007; 5: e38.
- 259.** Fontenot J, Gavin M, Rudensky A. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003; 4:330-336
- 260.** Fontenot J, Gavin M, Rudensky A. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 2003; 4:330-336.
- 261.** Fontenot J, Rasmussen J, Gavin M, Rudensky A. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2005; 6:1142-51.
- 262.** Fontenot J, Rasmussen J, Williams L, Dooley J, Farr A, Rudensky A. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005; 22:329-41.
- 263.** Ford M and Larsen C. Translating costimulation blockade to the clinic: lessons learned from three pathways. *Immunol. Rev.* 2009; 229:294-306.
- 264.** Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam A, Toubert A, Bensussan A, Le Bouteiller P. Soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD81 cells by interacting with CD81. *J. Immunol.* 2000; 164:6100-6104.
- 265.** Francisco L, Salinas V, Brown K, Vanguri V, Freeman G, Kuchroo, V. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp.Med.* 2009; 206:3015-3029.
- 266.** François M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther* 2012; 20: 187-195
- 267.** Francois S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, Sache A, Bouchet S, Thierry D. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 2006; 24:1020-1029.
- 268.** Franquesa M, Herrero E, Torras J, Ripoll E, Flaquer M, Goma M, Lloberas N, Anegón I, Cruzado J, Grinyo J, Herrero- Fresneda I. Mesenchymal stem cell therapy prevents IFTA in a rat kidney allograft model. *Stem Cells Dev.* 2012; 21(17):3125-3135
- 269.** Franquesa M, Hoogdijn M, Bestard O, Grinyo M. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. *Frontiers of Immunology* 2012; 3: Article 212
- 270.** Freeman G, Freedman A, Segil, J, Lee G, Whitman J, Nadler L. B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J. Immunol.* 1989; 143:2714-2722.
- 271.** Friedenstein A and Petrakova K. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *The Journal of Embryological Experimental Morphology* 1966; 16:381-390
- 272.** Friedenstein A, Chailakhjan R, Lalykina K: The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3:393-403.
- 273.** Friedenstein A, Chailakhyan R, Gerasimov U. Bone-marrow osteogenic stem cells - In vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20:263-72.

- 274.** Friedenstein A, Chailakhyan R, Latsinik N, Panasyuk A, Keiliss-Borok I. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974; 17:331–340.
- 275.** Friedenstein A, Gorskaja J, Kulagina N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology* 1976; 4(5):267–274.
- 276.** Friedenstein A, Petrakova K, Kurolesova A, Frolova G. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6:230–247.
- 277.** Friedenstein A, Piatetzky-Shapiro I, Petrakova K. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol. Exp Morphol.* 1966; 16: 381-390
- 278.** Frucht D. IL-23: A cytokine that acts on memory T cells. *SCI STKE.* 2002; 114:pe1.
- 279.** Gabrilovich D, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 1096-1103
- 280.** Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, Carbone DP. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 1998; 92: 4150-4166
- 281.** Gabrilovich D, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev.Immunol.* 2012; 12:253–268.
- 282.** Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic cell defects. *Nat.Rev.Immunol.* 2004; 4:941–952.
- 283.** Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004; 64:7011-7021
- 284.** Gallo P, Gallucci S. The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. *Frontiers in immunology* 2013; 4: Article 138
- 285.** Gao J, Dennis J, Muzic R, Lundberg M, Caplan A. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 2001; 169:12–20.
- 286.** Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Müller-Newen G, Grötzinger J, Rose-John S, Scheller J. Plasticity and crosstalk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 2012; 23:85-97
- 287.** Garbi N and Kreutzberg T. Dendritic cells enhance the antigen sensitivity of T cells. *Frontiers in Immunology* 2012; 3: Article389
- 288.** Garcia-Pacheco J, Oliver C, Kimatrai M, Blanco F, Olivares E. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:1151–1157.
- 289.** Gardner L, Moffett A. Dendritic cells in human deciduas. *Biology of reproduction.* 2003; 69:1438-1446
- 290.** Gardner L, Moffett A. Dendritic cells in the human decidua. *Biol Reprod* 2003; 69:1438-1446.
- 291.** Garufi A, Pistrutto G, Ceci C, Di Renzo L, Santarelli R, Faggioni A. Targeting COX-2/PGE(2) pathway in HIPK2 knockdown cancer cells: impact on dendritic cell maturation. *PLoS ONE* 2012; 7:e48342
- 292.** Gavin M, Clarke S, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 2002; 3:33–41.
- 293.** Gavin M, Rasmussen J, Fontenot J, Vasta V, Manganiello V, Beavo J. Foxp3- dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 2007; 445:771–775.
- 294.** Ge W, Jiang J, Arp J, Liu W, Garcia B, Wang H. Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Transplantation* 2010; 90:1312-1320.
- 295.** Ge W, Jiang J, Baroja M, Arp J, Zassoko R, Liu W, Bartholomew A, Garcia B, Wang H. Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance. *Am.J.Transplant.* 2009; 9:1760-1772.
- 296.** Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med* 2012; 18:128-134
- 297.** Gellersen B, Fernandes M, Brosens J. Human Nongenomic progesterone actions in female reproduction. *Reproduction Update.* 2009; 15(1):119-138.

- 298.** Genestier L, Kasibhatla S, Brunner T, Green DR. Transforming growth factor beta1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-Myc. *J Exp Med* 1999; 189: 231-239
- 299.** Geraghty D, Koller B, Orr H. A human majorhistocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84:9145–9149.
- 300.** Gerloni M, Lo D, Zanetti M. DNA immunization in reB-deficient mice discloses a role for dendritic cells in IgM→IgG1 switch *in vivo*. *Eur J Immunol* 1998;28:516-524.
- 301.** Gershon R and Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 1971; 21:903–914.
- 302.** Gershon R, Cohen P, Hencin R, Liebhaber S. Suppressor T Cells.*J Immunol* 1972;108:586–590.
- 303.** Gerstenfeld L, Barnes G, Shea C, Einhorn T. Osteogenic differentiation is selectively promoted by morphogenetic signals from chondrocytes and synergized by a nutrient rich growth environment. *Connect Tissue Res* 2003; 44(1):85-91.
- 304.** Geuking M, Cahenzli J, Lawson M, Ng D, Slack E, Hapfelmeier S. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory Tcell responses. *Immunity* 2011; 34:794–806.
- 305.** Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 2010; 1: 2
- 306.** Ghannam S, Pene J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol* 2010; 185:302-312.
- 307.** Ghiringhelli F, Puig P, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, Zitvogel L. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-β secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J. Exp.Med.* 2005; 202:919–929.
- 308.** Giangrande P, McDonnell D. The A and B isoforms of human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog. Horm. Res.* 1999; 54: 291-312
- 309.** Gilbert C, Ross A. Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies. *J Cell Biochem.* 2009; 108:1031-1038
- 310.** Giudice L, Ferenczy A. The endometrial cycle. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, eds. *Reproductive endocrinology, surgery and technology*. Philadelphia: Lippincott-Raven 1996:272–301.
- 311.** Glennie S, Soeiro I, Dyson P, Lam E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105:2821-7.
- 312.** Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, Hata J, Umezawa A. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research* 2003; 288:51–59.
- 313.** Gondek D, Lu L, Quezada S, Sakaguchi S, Noelle R. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzymeB-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol* 2005; 174:1783–1786.
- 314.** Gonzalez M, Gonzalez-Rey E, Rico L, Buscher D, Delgado M. Adipose derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 2009; 136:978-989.
- 315.** Goodwin M, Sueblinvong V, Eisenhauer P, Ziats N, LeClair L, Poynter M, Steele C, Rincon M, Weiss D. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells inhibit Th2-mediated allergic airways inflammation in mice. *Stem cells* 2011; 29:1137-1148
- 316.** Gorczynski R. Thymocyte/splenocyte-derived CD4+CD25+Treg stimulated by anti-CD200R2 derived dendritic cells suppress mixed leukocyte cultures and skin graft rejection. *Transplantation* 2006; 81:1027–1034.
- 317.** Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med* 2002; 195: 1499-1505
- 318.** Gorelik L, Flavell R. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 2000; 12:171–181.
- 319.** Gorelik L, Flavell R. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:46–53.
- 320.** Gorham JD, Guler ML, Fenoglio D, Gubler U, Murphy KM. Low dose TGF-beta attenuates IL-12 responsiveness in murine Th cells. *J Immunol* 1998; 161: 1664-1670

- 321.** Gotterstrom C, West A, Liden J, Uzunel M, Lahesmaa R, Le Blanc K. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica* 2005; 90:1017-1026
- 322.** Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 2003; 98: 257-265
- 323.** Graca L, Chen T, Le Moine A, Cobbold S, Howie D, Waldmann H. Dominant tolerance: activation thresholds for peripheral generation of regulatory T cells. *Trends Immunol.* 2005; 26:130–135.
- 324.** Graf T, Enver T. Forcing cells to change lineage. *Nature* 2009; 462(7273):587-594
- 325.** Grainger J, Smith K, Hewitson J, McSorley H, Harcus Y, Filbey K. Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-beta pathway. *J. Exp. Med* 2010; 207:2331–2341.
- 326.** Grayson W, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* 2006; 207:331-339.
- 327.** Gregory C, Ylostalo J, Prockop D. Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental “niches” in culture: A two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. *Sci STKE* 2005; 2005:pe37.
- 328.** Griffin M, Ritter T, Mahon B. Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. *Hum Gene Ther* 2010; 21:1641-1655.
- 329.** Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koç ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol* 2005; 33: 928-934
- 330.** Gronemeyer H. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu Rev Genet* 1991; 25:89-123.
- 331.** Gronemeyer H. Control of transcription activation by steroid hormone receptors. *FASEB J* 1997; 6:2524-2529.
- 332.** Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001; 189:54-63]
- 333.** Gronthos S, Graves S, Ohta S, Simmons P, The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors, *Blood* 1994; 84:4164-4173
- 334.** Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97:13625–13630.
- 335.** Gronthos S, Zannettino A, Hay S, Shi S, Graves S, Kortesidis A, Simmons P. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of Cell Science* 2003; 116(9):1827–1835.
- 336.** Groux H, O’Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389:737–742.
- 337.** Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 2000; 404: 407-411
- 338.** Guerin L, Prins J, Robertson S. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment. *Human reproduction Update.* 2009; 5:517-535
- 339.** Guerriero A, Worford L, Holland H, Guo G, Sheehan K, Waller E. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells. *Blood.* 1997; 90(9):3444–3455.
- 340.** Gunther H, Schmidt N, Phillips H, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Modrusan Z, Meissner H, Westphal M, Lamszus K. Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene.* 2008; 27:2897-2909
- 341.** Guo J, Yang J, Cao G, Fan H, Guo C, Ma YE, Qian Y, Chen L, Li X, Chang C. Xenogeneic immunosuppression of human umbilical cord mesenchymal stem cells in a major histocompatibility complex-mismatched allogeneic acute graft-versus-host disease murine model. *Eur J Haematol* 2011; 87: 235-243
- 342.** Gürsel D, Shin B, Burkhardt J, Kesavabhotla K, Schlaff C, Boockvar J. Glioblastoma Stem-Like Cells-Biology and Therapeutic Implications. *Cancers.* 2011; 3:2655-2666
- 343.** Gustafson M, Lin Y, New K, Bulur P, O’Neil B, Gaftineau D, Dietz A. Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14+HLA-DR<sup>lo/neg</sup> monocytes, tumor factors, and dexamethasone. *Neuro-Oncology* 2010;12(7): 631-644

- 344.** Gustafsson C, Hummerdal P, Matthiesen L, Berg G, Ekerfelt Ernerudh J: Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10, TGF $\beta$  and TNF $\alpha$ . *Journal of Reproductive Immunology* 2006; 71:41-56.
- 345.** Haddad R and Saldanha-Araujo. Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: What do we know so far? *BioMed research international* 2014; Article ID 216806
- 346.** Hadida F, Vieillard V, Mollet L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Debre P. Cutting edge: RANTES regulates Fas ligand expression and killing by HIV-specific CD8 cytotoxic T cells. *J Immunol* 1999; 163: 1105-1109
- 347.** Halasz M, Polgar B, Berta G, Czimbalek L, Szekeres-Bartho J. Progesterone-induced blocking factor differentially regulates trophoblast and tumor invasion by altering matrix metalloproteinase activity. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70:4617–4630
- 348.** Halvorsen Y, Wilkison W, Gimble J. Adipose-derived stromal cells—their utility and potential in bone formation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000; 24:S41–S44.
- 349.** Han K, Lee J, Kwon S, Park S, Shim S, Kim H, Moon J, Suh C, Lim H. Human amnion-derived mesenchymal stem cells are a potential source for uterine stem cell therapy. *Cell Prolif*. 2008; 41(5):709-725.
- 350.** Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371: 257-261
- 351.** Harada S, Rodan G. Control of osteoblast function and regulation of bone mass, *Nature* 2003; 423:349-355.
- 352.** Hargadon K. Tumor- altered dendritic cell function: implications for anti-tumor immunity. *Frontiers in Immunology* 2013; 4Article 192
- 353.** Haribhai D, Williams J, Jia S, Nickerson D, Schmitt E, Edwards B. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* 2011; 35:109–122.
- 354.** Harnaha J, Machen J, Wright M, Lakomy R, Styche A, Trucco M, Makaroun S, Giannoukakis N. Interleukin-7 is a survival factor for CD4+ CD25+ T-cells and is expressed by diabetes-suppressive dendritic cells. *Diabetes* 2006; 55:158–170.
- 355.** Hartmann C: A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol* 2006; 16:151-158.
- 356.** Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch J, Steinman R, Nussenzweig M. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions *in vivo*. *J. Exp. Med.* 2001; 194:769–780.
- 357.** Hay E. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat* 1995; 154:8 –20.
- 358.** Hay E. Epithelial-mesenchymal transitions. *Semin Dev Biol* 1990; 1:347–356.
- 359.** Haynesworth S, Baber M, Caplan A. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992; 13:69–80.
- 360.** Heikkinen J, Mottonen M, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol*. 2004; 136(2):373-378.
- 361.** Henderson T, Saunders P, Moffet-King A, Groome N, Critchley H. Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:440-449.
- 362.** Heo YJ, Joo YB, Oh HJ, Park MK, Heo YM, Cho ML, Kwok SK, Ju JH, Park KS, Cho SG, Park SH, Kim HY, Min JK. IL-10 suppresses Th17 cells and promotes regulatory T cells in the CD4+ T cell population of rheumatoid arthritis patients. *Immunol Lett* 2010; 127:150-156
- 363.** Hideki M, Makoto I. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. 2002; 168:1087-1094.
- 364.** Hoffmann A, Pelled G, Turgeman G, Eberle P, Zilberman Y, Shinar H, Keinan-Adamsky K, Winkel A, Shahab S, Navon G. Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells. *J Clin Invest* 2006; 116:940-952
- 365.** Holm T, Nielsen J, Claesson M. CD45+CD25+ regulatory cells: I. Phenotype and physiology. *APMIS* 2004; 112:629-641
- 366.** Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek A, Silberstein L. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 2006; met24:1030–41.

- 367.** Hong J, Hwang E, McManus M, Amsterdam A, Tian Y, Kalmukova R, Mueller E, Benjamin T, Spiegelman BM, Sharp TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 2005; 309:1074-1078
- 368.** Hong X, Chedid K, Kalkanis S. Glioblastoma cell line-derived spheres in serum-containing medium versus serum-free medium: a comparison of cancer stem cell properties. *Int J Oncol.* 2012; 41:1693-1700
- 369.** Horwitz D. Identity of mysterious CD4+CD25-FoxP3+ cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research&Therapy* 2010; 12:101
- 370.** Horwitz D. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future. *Arthritis Res Ther* 2008; 10(6):227-235.
- 371.** Horwitz E Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Deans R, Krause D, Keating A. International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7:393-395.
- 372.** Hsieh C, Zheng Y, Liang Y, Fontenot J, Rudensky A. An intersection between the selfreactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol.* 2006; 7:401-10.
- 373.** Hsu WT, Lin CH, Chiang BL, Jui HY, Wu KK, Lee CM. Prostaglandin E2 potentiates mesenchymal stem cell-induced IL-10+IFN- $\gamma$ +CD4+ regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis. *J Immunol* 2013; 190: 2372-2380
- 374.** Huang C, Workman C, Flies D, Pan X, Marson A, Zhou G, Hipkiss E, Ravi S, Kowalski J, Levitsky H. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004; 21:503-513.
- 375.** Hubert P, Jacobs N, Caberg J, Boniver J, Delvenne P. The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil? *J Leukoc Biol* 2007; 82:781-794.
- 376.** Huehn J, Polansky J, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: The key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9:83-89.
- 377.** Hugues S, Fetler L, Bonifaz L, Helft J, Amblard F, Amigorena S. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol* 2004; 5:1235-1242.
- 378.** Huss R, Lange C, Weissinger E, Kolb H, Thalmeier K. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells* 2000; 18(4):252-260.
- 379.** Hussain F, Yang D, Suki D, Aldape K, Grimm E, Heimberger A. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune response. *Neuro- Oncology* 2006; 11: 261-279
- 380.** Hwang JH, Shim SS, Seok OS, Lee HY, Woo SK, Kim BH, Song HR, Lee JK, Park YK. Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 547-554
- 381.** Ito T, Wang Y, Liu Y. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26:221-229.
- 382.** Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev, Tivchev P, Alrtankova I, Kyurkchiev D. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared with bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *Immunology Letters* 2009; 126:37-42
- 383.** Ivanova E, Kyurkchiev D, Altankova I, Dimitrov J, Binakova E, Kyurkchiev S. CD83+ monocyte-derived dendritic cells are present in human deciduas and progesterone induces their differentiation *in vitro*. *American journal of reproductive immunology* 2005; 53:199-205.
- 384.** Ivanova-Todorova E, Bochev I, Dimitrov R, Belezmezova K, Mourdjeva M, Kyurkchiev S, Kinov P, Altankova I, Kyurkchiev D. Conditioned medium from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induces CD4+FOXP3+ cells and increases IL-10 secretion. *J Biomed Biotechnol* 2012; 29:5167
- 385.** Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, Tivchev P, Altankova I, Kyurkchiev DS. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 2009; 126:37-42
- 386.** Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev D, Mehandjiev Tz, Chernev T, Kyurkchiev S. Influence of progesterone on asymmetric antibodies synthesis *in vitro*. *Comp. Rend. Bulg. Sci* 2008; 61(11):1476-1480

- 387.** Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev D, Mourdjeva M, Dimitrov R, Stoyanova E, Timeva T, Yunakova M, Shterev A, Kyurkchiev S. Pre- decidual multipotent stromal cells (PreDMSC) constitutively express progesterone induced blocking factor (PIBF). *Comp. Rend. Bulg. Sci.* 2009; 62(12):1567-1570.
- 388.** Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev D, Nalbanski A, Timeva T, Shterev A, Kyurkchiev D. Production and characterization of a novel monoclonal antibody against progesterone-induced blocking factor (PIBF). *Journal of Reproductive Immunology* 2008; 78:94-101
- 389.** Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Kyurkchiev D, Bochev I, Stoyanova E, Dimitrov D, Timeva T, Yunakova M, Bukarev D, Shterev A, Tivchev P, Kyurkchiev S. HLA-G expression is up-regulated by progesterone in mesenchymal stem cells. *Am J Reprod. Immunol.* 2009; 62:25-33
- 390.** Iwakura Y and Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 1218-1222.
- 391.** Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble J, Bunnell B. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2006; 99:1285-1597.
- 392.** Jackson A, Mulcahy L, Zhu X, O'Donnell D, Patel P. Tumour-mediated disruption of dendritic cell function: inhibiting the MEK1/2-p44/42 axis restores IL-12 production and Th1-generation. *Int J Cancer* 2008; 123:623–632.
- 393.** Jakkaraju S, Zhe X, Pan D, Choudhury R, Schuger L. TIPs are tension-responsive proteins involved in myogenic versus adipogenic differentiation. *Dev Cell* 2005; 9:39-49.
- 394.** Jana S, Jailwala P, Haribhai D, Waukau J, Glisic S, Grossman W, Mishra M, Wen R, Wang D, Williams CB, Ghosh S. The role of NF-kappaB and Smad3 in TGF-beta-mediated Foxp3 expression. *Eur J Immunol* 2009; 39: 2571-2583
- 395.** Janeway C and Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 2002; 20:197–216.
- 396.** Janeway C. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold SpringHarb.Symp.Quant.Biol.*1989; 54:1–13.
- 397.** Jankowski R, Deasy B, Huard, J. Muscle-derived stem cells. *Gene Therapy* 2002; 9:642–647.
- 398.** Jenkins M and Schwartz R. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induce santigen-specific Tcell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp.Med.* 1987; 165:302–319.
- 399.** Jeon E, Lee K, Choi N, Lee M, Kim H, Jin Y, Ryoo H, Choi JY, Yoshida M, Nishino N. Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *J Biol Chem* 2006; 281:16502-16511
- 400.** Jeong S, Ji Y, Yoon E. Immunosuppressive activity of adipose tissue derived mesenchymal stem cells in a rat model of hind limb allotransplantant. *Transplantation proceeding* 2014; 46:1606-1614
- 401.** Ji Y, Yang Z, Han Z, Meng L, Liang L, Feng X, Yang S, Chi Y, Chen D, Wang Y, Han Z. Mesenchymal stem cells support proliferation and terminal differentiation of B cells. *Cell Physiol. Biochem.* 2012; 20:1526-1537
- 402.** Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J. Clin. Invest* 2004;114:1198-1208
- 403.** Jiang X-X, Zhang Y, Liu B, Zhang S-X, Wu Y, Yu X-D, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105:4120–4126
- 404.** Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller R, Verfaillie C. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:11854 – 11860.
- 405.** Jiang Y, Jahagirdar B, Reinhardt R, Schwartz R, Keene C, Ortiz-Gonzalez X, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low W, Largaespada D, Verfaillie C. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418:41–49.
- 406.** Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie C, Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain, *Exp Hematol.* 2002; 30:896-904
- 407.** Jing H, Vassiliou E, Ganea D. Prostaglandin E2 inhibits production of the inflammatory chemokines CCL-3 and CCL-4 in dendritic cells. *J Leuk Biol* 2003; 74:868–879.
- 408.** Joffre O, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature reviews immunology* 2012; 12:557-566
- 409.** Jones and McGonagle. Human bone marrow mesenchymal stem cells *in vivo*. *Rheumatology* 2008; 47:126-131

- 410.** Jones E, Kinsey S, English A, Jones R, Straszynski L, Meredith D, Markham A, Jack A, Emery P, McGonagle D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:3349–3360.
- 411.** Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk A. Infectious tolerance : human CD25+ regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4+ T helper cells. *J Exp Med* 2002; 196:255-260
- 412.** Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk A. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2000; 192:1213–1222.
- 413.** Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk A. Identification and functional characterization of human CD4+CD25+ cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; 193:1285-1294
- 414.** Jordan M, Boesteanu A, Reed A, Petrone A, Hohenbeck A, Lerman M, Naji A, Caton A. Thymic selection of CD4+CD25+regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001; 2:301–306.
- 415.** Josefowicz S, Wilson C, Rudensky A. Cutting edge: TCR stimulation is sufficient for induction of Foxp3 expression in the absence of DNA methyltransferase 1. *J. Immunol.* 2009; 182:6648–6652.
- 416.** Josefowicz S and Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 2009; 30: 616–625
- 417.** Kadiyala S, Young R, Thiede M., Bruder S. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro, *Cell Transplant.* 1997; 6: 125-134
- 418.** Kagiwada H, Yashiki T, Ohshima A, Tadokoro M, Nagaya N, Ohgushi H. Human mesenchymal stem cells as a stable source of VEGF-producing cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2: 184-189
- 419.** Kalinski P, Hilkens C, Snijders A, Snijdwint F, Kapsenberg M. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naïve T helper cells. *J. Immunol.* 1997; 159:28–35.
- 420.** Kallied S, Cutler A, Burkly L. Apoptosis and altered dendritic cell homeostasis in lupus nephritis are limited by anti- CD154 treatment. *J. Immunol.* 200; 167:1740–1747.
- 421.** Kaminski D, Wei C, Quian Y, Rosenberg A, Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiles. *Frontiers in Immunology* 2012; 3: article 302
- 422.** Kammerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan A D, Geijtenbeek TB, Dietl J, et al. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am J Pathol* 2003; 162:685-711.
- 423.** Kammerer U, Schoppet M, McLellan A D, Kapp M, Huppertz Hans-Ilko, Kampgen E, Dietl J. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83+ dendritic cells. *Am.J.Pathology* 2000; 157:159-169.
- 424.** Kammerer U, Schoppet M, McLellan A, Kapp M, Huppertz Hans-Ilko, Kampgen E, Dietl J: Human decidua contains potent immunostimulatory CD83+ dendritic cells. *Am.J.Pathology* 2000; 157:159-169.
- 425.** Kammerer U, von Wolff M, Markert U. Immunology of human endometrium. *Immunology* 2004; 209: 569-574.
- 426.** Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay G, Demiralp D, Tukun A, Ickan D, Can A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: In situ and in vitro surveys. *Stem Cells* 2006; 25:319-331
- 427.** Karnoub A, Dash A, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; 449: 557-563
- 428.** Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WS, Hurst SD, Barrett TA. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J Immunol* 1997; 158: 4129-4136
- 429.** Kavanagh H, Mahon B. Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells. *Allergy* 2011; 66:523-531.
- 430.** Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem cell* 2012; 10:709-716
- 431.** Keir M, Liang S, Guleria I, Latchman Y, Qipo A, Albacker L. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 2006; 203:883–895.

- 432.** Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, Mehandjiev Tz, Dimitrov A, Nikolov A, Kyurkchiev S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biology International* 2008; 32:724-732
- 433.** Kerdiles Y, Stone E, Beisner D, McGargill M, Chen I, Stockmann C. Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. *Immunity* 2010; 33:890-904
- 434.** Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24:1294e301.
- 435.** Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, Ludlow JW, Stricker DM, Potiny S, Green P, Halvorsen YD, Cheatham B, Storms RW, Gimble JM. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol* 2007; 212:702-709
- 436.** Kim H, Zhang X, Choi. Activation and proliferation of follicular dendritic cell-like cells by activated T lymphocytes. *J. Immunol.* 1994; 153:2951-2961.
- 437.** Kim JY, Kim DH, Kim JH, Lee D, Jeon HB, Kwon SJ, Kim SM, Yoo YJ, Lee EH, Choi SJ, Seo SW, Lee JI, Na DL, Yang YS, Oh W, Chang JW. Soluble intracellular adhesion molecule-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell reduces amyloid- $\beta$  plaques. *Cell Death Differ* 2012; 19: 680-691
- 438.** Kim YS, Hong SW, Choi JP, Shin TS, Moon HG, Choi EJ, Jeon SG, Oh SY, Gho YS, Zhu Z, Kim YK. Vascular endothelial growth factor is a key mediator in the development of T cell priming and its polarization to type 1 and type 17 T helper cells in the airways. *J Immunol* 2009; 183: 5113-5120
- 439.** Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 2010; 40: 1830-1835
- 440.** King A, Gardner L, Loke Y. Evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in uterine mucosal lymphocytes. *Hum Reprod* 1996; 11:1079-1082.
- 441.** King I and Segal B. Cutting edge: IL-12 induces CD4+CD25- T cell activation in the presence of T regulatory cells. *J Immunol* 2005; 175:641-645.
- 442.** Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* 2010; 22:347-352
- 443.** Koch M, Tucker-Heard G, Perdue N, Killebrew J, Urdahl K, Campbell D. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.* 2009; 10, 595-602.
- 444.** Kohyama, J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A. Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 2001; 68:235-244
- 445.** Kolf C, Cho E, Tuan R. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self renewal and differentiation. *Arthritis & Therapy* 2007; 9:204-304
- 446.** Koller M, Manchel I, Palsson B. Importance of parenchymal:stromal cell ratio for the ex vivo reconstitution of human hematopoiesis. *Stem Cells* 1997; 15: 305-313
- 447.** Kong Q, Sun B, Wang G, Zhai D, Mu L, Wang D, Wang J, Li R, Li H. BM stromal cells ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th cells through the secretion of IDO. *Eur J Immunol* 2009; 39:800-809.
- 448.** Kopen G, Prockop D, Phinney D. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:10711-10716.
- 449.** Kovats S, Main E, Librach C, Stubblebine M, Fisher, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990; 248:220-223.
- 450.** Kozma N, Halasz M, Polgar B, Poehlmann T, Markert U, Palkovics T, Keszei M, Par G, Kiss K, Szeberenyi J, Grama L, Szekeres-Bartho J. Progesterone-induced blocking factor activates STAT6 via binding to a novel IL-4 receptor. *J. Immunol.* 2006; 176:819-826.
- 451.** Krabbe C, Zimmer J, Meyer M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells - a critical review. *APMIS* 2005; 113:831- 844.
- 452.** 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. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24:386-98.

- 453.** Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101:3722-9.
- 454.** Krempsi J, Karyampudi L, Behrens M, Erskine C, Hartmann L, Dong H. Tumor-infiltrating programmed death receptor-1+ dendritic cells mediate immunosuppression in ovarian cancer. *J Immunol* 2011; 186:6905–13.
- 455.** Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig M, von Boehmer. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* 2005; 6:1219–1227.
- 456.** Krishnan L, Guilbert L, Russel A, Wegmann T, Mosman T, Belosevic M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN- $\gamma$  response and increased production of Th2 cytokines. *J. Immunol* 1996; 156:644-657.
- 457.** Kryczek I, Wei S, Zou L, Zhu G, Mottram P, Xu H, Chen L, Zou W. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J. Immunol.* 2006; 177:40–44.
- 458.** Kubo T, Hatton RD, Oliver J, Liu X, Elson CO, Weaver CT. Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells. *J Immunol* 2004; 173:7249–7258.
- 459.** Kushwah R and Hu J. Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell Biosci.* 2011; 1:20.
- 460.** Kushwah R, Wu J, Oliver J, Jiang G, Zhang J, Siminovitch K, Hu J. Uptake of apoptotic DC converts immature DC into tolerogenic DC that induce differentiation of Foxp3+ Treg. *Eur.J.Immunol.* 2010; 40:1022–1035.
- 461.** Kuwahara M, Yamashita M, Shinoda K, Tofukuji S, Onodera A, Shinnakasu R, Motohashi S, Hosokawa H, Tumes D, Iwamura C, Lefebvre V, Nakayama T. The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF- $\beta$  and suppresses T(H)2 differentiation. *Nat Immunol* 2012; 13: 778-786
- 462.** Kuznetsov S, Mankani M, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey P. Circulating skeletal stem cells. *Journal of Cell Biology* 2001; 153(5):1133–1140.
- 463.** Kyurkchiev D, Naydenov E, Tumangelova-Yuzeir K, Ivanova-Todorova E, Belemzova K, Bochev I, Minkin K., Mourdjeva M, Velikova Ts., Nachev S, Kyurkchiev S. Cells isolated from human glioblastoma multiforme express Progesterone induced blocking factor (PIBF). *Cell Mol Neurobiol* 2014a; 34:479-489
- 464.** Kyurkchiev D, Ivanova E, Hayrabediyan S, Altankova I S, Kyurkchiev S. Female sex steroid hormones modify some regulatory properties of monocyte-derived dendritic cells. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:425-433
- 465.** Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Kyurkchiev S. Differences between adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells as regulators of the immune response. In: Hayat MA. *Stem cells and cancer stem cells*, volume 10. Netherlands: Springer, 2013:71-84
- 466.** Kyurkchiev D. Cancer stem cells from glioblastoma multiforme: culturing and phenotype. *OA stem cells London* 2014b; 10; 2(1):3
- 467.** LaBarge M, Blau H. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*, 2002; 111:589-601
- 468.** Lachmann M, Gelbmann D, Kalman E, Polgar B, Buschle M, von Gabain A, Szekeres-Bartho J, Nagy E. PIBF (progesterone induced blocking factor) is overexpressed in highly proliferating cells and associated with the centrosome. *Int J Cancer* 2004; 112:51–60
- 469.** Lafferty K and Woolnough J. The origin and mechanism of the allograft reaction. *Immunol.Rev.* 1977; 35:231–262.
- 470.** Lafon M, Prehaud C, Megret F, Lafage M, Mouillot G, Roa M, Moreau P, Rouas-Freiss N, Carosella E. Modulation of HLA-G expression in human neural cells after neurotropic viral infections. *J. Virol.* 2005; 79:15226–15237
- 471.** Lakshminpathy and Verfaillie. Stem cell plasticity 2005; 19(1): 29-38

- 472.** Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol* 2005; 6: 600-607
- 473.** Laranjeira P, Pedrosa M, Pedreiro S, Gomes J, Martinho A, Antunes B, Ribeiro T, Santos F, Trindade H, Paiva A. Effect of human bone marrow mesenchymal stromal cells on cytokine production by peripheral blood naïve, memory and effector T cells. *Stem Cell Research & Therapy* 2015; 6: *in press*
- 474.** Larocca R, Moraes-Vieira P, Bassi E, Semedo P, de Almeida D, da Silva M, Thornley T, Pacheco-Silva A, Camara N. Adipose tissue –derived mesenchymal stem cells increase skin allograft survival and inhibit Th17 immune response. *Plos One* 2013;8(10):e76396
- 475.** Laskarin G, Strbo N, Sotosek V, Podack RE, Szekeres-Bartho J, Rukavina D. Progesterone directly and indirectly affects perforin expression in cytolytic cells. *Am J Reprod Immunol.* 1999; 42:312.
- 476.** Lazarus H, Haynesworth S, Gerson S, Caplan, A. Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *Journal of Hematotherapy* 1997; 6(5):447–455.
- 477.** Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 2003; 31:890–896.
- 478.** Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth S, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003; 57:11-20.
- 479.** Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2003; 6:485– 489.
- 480.** Le Bouteiller P. HLA class I chromosomal region, genes, and products: Facts and questions. *Crit. Rev. Immunol.* 1994; 14: 89–105.
- 481.** Lee C, Christensen J, Yoder M, Tarantal A. Clonal analysis and hierarchy of human bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells. *Exp. Hematol.* 2010; 38:46–54.
- 482.** Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin N, Pastorino S, Purow B, Christopher N, Zhang W, Park J, Fine H. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell.* 2006; 9:391-403
- 483.** Lee J, Lydon J, Kim C. Progesterone suppresses the mOR pathway and promotes generation of induced regulatory T cells with increased stability. *Eur.J.Immunol.* 2012; 42: 2683–2696
- 484.** Lee R, Kang SJ, Liang H, Locksley R. T helper cell effector fates- who, how and where? *Current Opinion in Immunol* 2006; 18: 271-277.
- 485.** Lei J, Wang Z, Hui D, Yu W, Zhou D, Xia W, Chen C, Zhang Q, Wang Z, Zhang Q, Xiang A. Ligation of TLR2 and TLR4 on murine marrow-derived mesenchymal stem cells triggers differential effects on their immunosuppressive activity. *Cellular Immunology.* 2011; 271(1): 147–156
- 486.** Leitner J, Klausner C, Pickl W, Stockl J, Majdic O, Bardet A. B7-H3 is a potent inhibitor of human T-cell activation: no evidence for B7-H3 and TREM2 interaction. *Eur. J. Immunol.* 2009; 39:1754–1764.
- 487.** Lendahl U, Zimmerman L, McKay R. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990; 60:585–595.
- 488.** Levings M, Sangregorio R, Roncarolo M. Human CD4+CD25+ T cells suppress naïve and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of suppressor function. *J Exp Med* 2001;193:1295-1302
- 489.** Li H, Yu B, Zhang Y, Pan Z, Xu W, Li H. Jagged1 protein enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341: 320-325.
- 490.** Li L, Vassiliki A, Boussiotis. The role of IL-17 producing FoxP3+ CD4+ cells in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clinical Immunology* 2013; 148: 246-253
- 491.** Li M and Flavell R. Contextual regulation of inflammation: A duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity* 2008; 28:468–476
- 492.** Li M, Sanjabi S, Flavell R. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006; 25:455–471.

- 493.** Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 99-146
- 494.** Liang J, Wang J, Azfer A, Song W, Tromp G, Kolattukudy PE, Fu M. A novel CCCH-zinc finger protein family regulates proinflammatory activation of macrophages. *J Biol Chem* 2008; 283: 6337-6346
- 495.** Liang S, Ristich V, Arase H, Dausset J, Carosella E, Horuzsko A. Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6- STAT3 signaling pathway. *PNAS* 2008; 105(24):8357-8362
- 496.** Lin C, Chen H, Lin C, Kuo C, Ling Q, Chan C. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur J Clin Invest* 2007; 37(12):987-96.
- 497.** Lin W, Oh SK, Choo AB, George AJ. Activated T cells modulate immunosuppression by embryonic-and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells through a feedback mechanism. *Cytotherapy* 2012; 14: 274-284
- 498.** Lin YL, Liang YC, Chiang BL. Placental growth factor down-regulates type 1 T helper immune response by modulating the function of dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2007; 82:1473-1480
- 499.** Lindquist R, Shakhar G, Dudziak D, Wardemann H, Eisenreich T, Dustin M, Nussenzweig M. Visualizing dendritic cell networks *in vivo*. *Nat Immunol* 2004; 5:1243-1250.
- 500.** Linsley P, Brady W, Urnes M, Grosmaire L, Damle N, Ledbetter J. CTLA-4 is a second receptor for the T cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* 1991; 174:561-569
- 501.** Liu L, Zhao G, Fan H, Zhao X, Li P, Wang Z, Hu Y, Hou Y. Mesenchymal stem cells ameliorate Th1-induced preeclampsia-like symptoms in mice via the suppression of TNF- $\alpha$  expression. *PLoS One* 2014; 9: e88036
- 502.** Liu Q, Zhang C, Sun A, Zheng Y, Wang L, Cao X.(2009). Tumor-educated CD11b high low regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I. *J. Immunol.* 2009; 182:6207–6216
- 503.** Liu V, Wong, L, Jang T, Shah A, Park I, Yang X, Zhang Q, Lonin, S, Teicher B, Lee C. (2007). Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells:role of tumor-derived TGF-beta. *J. Immunol.* 178, 2883–2892.
- 504.** Liu W, Putnam A, Xu-yu Z, Szot G, Lee M, Zhu Sh, Gottlieb P, Kapranov Ph, Gingeras Th, de St. Groth B, Clayberger C, Soper D, Ziegler S, Bluestone J. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Treg cells. *JEM* 2006;203(7):1701-1711
- 505.** Liu WH, Liu JJ, Wu J, Zhang LL, Liu F, Yin L, Zhang MM, Yu B. Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PLoS One* 2013; 8: e55487
- 506.** Liu Y, Han S, Wu Y, Tuohu T, Xue H, Cai J, Back S, Sherman L, Fischer I, Rao M. CD44 expression identifies astrocyte-restricted precursor cells. *Developmental biology.* 2004; 276: 31-46
- 507.** Lodie T, Blickarz C, Devarakonda T, He C, Dash A, Clarke J, Gleneck K, Shihabuddin L, Tubo R. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Engineering* 2002; 8:739–751.
- 508.** Loosfelt H, Logeat F, Vu Hai M, Milgrom E. The rabbit progesterone receptor. Evidence for a single steroid binding sub-unit and characterization of receptor mRNA. *J Biol Chem* 1984; 295:14196-14202.
- 509.** Lotfi R, Eisenbacher J, Solgi G, Fuchs K, Yildiz T, Nienhaus C, Rojewski MT, Schrezenmeier H. Human mesenchymal stem cells respond to native but not oxidized damage associated molecular pattern molecules from necrotic (tumor) material. *Eur J Immunol* 2011; 41: 2021-2028
- 510.** Lu F, Ma Z, Rourke T, Srinivasan S, McChesney M, Miller CJ. Immunoglobulin concentrations and antigenspecific antibody levels in cervicovaginal lavages of rhesus macaques are influenced by the stage of the menstrual cycle. *Infect Immunol.* 1999; 67:6321-6328.
- 511.** Lu L, Wang J, Zhang F, Chai Y, Brand D, Wang X, Horwitz DA, Shi W, Zheng SG. Role of SMAD and non-SMAD signals in the development of Th17 and regulatory T cells. *J Immunol* 2010; 184: 4295-4306 [
- 512.** Lu P, Blesch A, Tuszynski M. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: Differentiation, transdifferentiation, or artifact. *J Neurosci Res* 2004; 77:174 –191

- 513.** Luo C, Jia W, Wang K, Chi F, Gu Y, Yan X, Zou G, Duan T, Zhou Q. Human amniotic fluid stem cells suppress PBMC proliferation through IDO and IL-10-dependent pathways. *Curr Stem Cell Res Ther* 2014; 9: 36-45
- 514.** Luppi P, Haluszczak C, Trucco M, DeLoia J. Normal pregnancy is associated with leukocyte activation. *Am J Reprod Immunol.* 2002; 47(2):72-81.
- 515.** Lutz M and Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 2002; 23:445–449.
- 516.** Lutz M, Kukutsch N, Menges M, Rossner S, Schuler G. Culture of bone marrow cells in GM-CSF plus high doses of lipopolysaccharide generates exclusively immature dendritic cells which induce alloantigen-specific CD4 T cell anergy *in vitro*. *Eur.J. Immunol.* 2000; 30:1048–1052.
- 517.** Luz-Crawford P, Kurte M, Bravo-Alegria J, Contreras R, Nova-Lamperti E, Tejedor G, Noel D, Jorgensen C, Figueroa F, Djouad F, Carrion F. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17. *Stem cell Research & Therapy* 2013; 4:1-12
- 518.** Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 2014; 21:216-225
- 519.** Ma Y, Shurin G, Gutkin D, Shurin M. Tumor associated regulatory dendritic cells. *Semin.Cancer Biol.* 2012; 22,298–306.
- 520.** Maby-El Hajjami H, Amé-Thomas P, Pangault C, Tribut O, DeVos J, Jean R, Bescher N, Monvoisin C, Dulong J, Lamy T, Fest T, Tarte K. Functional alteration of the lymphoma stromal cell niche by the cytokine context: role of indoleamine-2,3 dioxygenase. *Cancer Res* 2009; 69: 3228-3237
- 521.** MacPherson G, Kushnir N, Wykes M. Dendritic cells, B cells and the regulation of antibody synthesis. *Immunol Rev* 1999;172:325-334.
- 522.** Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Griffin M, Khan W. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization- A systemic review of literature. *The Open Orthopaedics Journal* 2011; 5(2):253-260
- 523.** Maghazachi AA, Al-Aoukaty A, Schall TJ. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *Eur J Immunol* 1996; 26: 315-319
- 524.** Mahnke K, Johnson T, Ring S, Enk A. Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship. *J. Dermatol. Sci.* 2007; 46:159–167.
- 525.** Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002;80:477-483.
- 526.** Majumdar M, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy W, Moorman M, McIntosh K, Mosca J. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.*2003; 10:228–241.
- 527.** Majumdar MK, Thieda MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res* 2000; 9:841-848
- 528.** Majumdar MK, Thieda MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998;176: 57-66
- 529.** Malan Borel I, Gentile T, Angelucci J, Margini RA, Binaghi RA. Asymmetrically glycosylated IgG isolated from non-immune human sera. *Biochim Biophys Acta* 1989; 24:162-164.
- 530.** Maldonado-Lopez R, Moser M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Semin Immunol* 2001;13:275-282.
- 531.** Mallet V, Blaschitz A, Crisa L, Schmitt C, Fournel S, King A, Loke Y, Dohr G, Le Bouteiller P. HLA-G in the human thymus: A subpopulation of medullary epithelial but not CD83- dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein. *Int. Immunol.* 1999; 11:889–898.
- 532.** Manavalan J, Rossi P, Vlad G, Piazza F, Yarilina A, Cortesini R, Mancini D, Suci-Foca N. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl.Immunol.* 2003; 11:245–258.
- 533.** Manicassamy S and Pulendran B. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol. Rev.* 2011; 241:206–227.
- 534.** Mao P, Joshi K, Li J, Kim S, Li P, Santana-Santos L, Luthra S, Chandran UR, Benos P, Smith L, Wang M, Hu B, Cheng S, Sobol R, Nakano I. Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated

glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110:8644-8649

**535.** Marchal-Bras-Goncalves R, Rouas-Freiss N, Connan F, Choppin J, Dausset J, Carosella E, Kirszenbaum M, Guillet J.-G. A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Transplant. Proc.* 2001; 33:2355–2359.

**536.** Maret A, Coudert J, Garidou L, Foucras G, Gourdy P, Krust A, Dupont S, Chambon P, Druet P, Bayard F, Guery JC. Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development *in vivo*. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *Eur J Immunol.* 2003; 33:512-521

**537.** Marie J, Liggitt D, Rudensky A. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 2006; 25:441–454.

**538.** Marti LC, Pavon L, Severino P, Sibov T, Guilhen D, Moreira-Filho CA. Vascular endothelial growth factor-A enhances indoleamine 2,3-dioxygenase expression by dendritic cells and subsequently impacts lymphocyte proliferation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; 109: 70-79

**539.** Martin I, Muraglia A, Campanile G, Cancedda R, Quarto R. Fibroblast growth factor-2 supports *ex vivo* expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology* 1997; 138:4456–4462.

**540.** Martinez GJ, Zhang Z, Reynolds JM, Tanaka S, Chung Y, Liu T, Robertson E, Lin X, Feng XH, Dong C. Smad2 positively regulates the generation of Th17 cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 29039-29043

**541.** Martins-Green M, Petreaca M, Wang L. Chemokines and Their Receptors Are Key Players in the Orchestra That Regulates Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013;2: 327-347 [PMID: 24587971 DOI: 10.1089/wound.2012.0380]

**542.** Massague J, Blain S, Lo R. TGFβ signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000; 103:295-309.

**543.** Matsuda Y, Yoshimura H, Suzuki T, Ishiwata T. Nestin: neural stem/progenitor cell marker in brain tumors. In: Lichtor T, editor. *Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications* 1<sup>st</sup> ed., InTech; 2013; Chapter 23: p 623-638

**544.** Matzinger P. An innate sense of danger. *Semin. Immunol.* 1998; 10:399–415.

**545.** Matzinger P. The danger model: are newed sense of self. *Science* 2002; 296:301–305.

**546.** Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev.Immunol.* 1994; 12: 991–1045

**547.** Mayer C, Floess S, Baru A, Lahl K, Huehn J, Sparwasser T. CD8+FoxP3+ T cells share developmental and phenotypic features with classical CD4+FoxP3+ regulatory T cells but lack potent suppressive activity. *Eyr. J. Immunol.* 2011; 41:716-725

**548.** McBeath R, Pirone D, Nelson C, Bhadriraju K, Chen C. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment, *Dev. Cell* 2002; 6:483-495

**549.** McBride C, Gaupp D, Phinney D. Quantifying levels of transplanted murine and human mesenchymal stem cells *in vivo* by real-time PCR. *Cytherapy* 2003; 5:7–18.

**550.** McBride J, Jung T, de Vries J, Aversa G. IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell Immunol* 2002; 215:162-172.

**551.** McCarter M, Clarke J, Richter D, Wilson C. Melanoma skews dendritic cells to facilitate a T helper 2 profile. *Surgery* 2005; 138:321–328

**552.** McIntosh K, Bartholomew A. Stromal cell modulation of the immune system: a potential role for mesenchymal stem cells. *Graft.* 2000; 3:324–328.

**553.** McKarns SC, Schwartz RH, Kaminski NE. Smad3 is essential for TGF-beta 1 to suppress IL-2 production and TCR-induced proliferation, but not IL-2-induced proliferation. *J Immunol* 2004; 172: 4275-4284

**554.** McLendon R, Rich J. Glioblastoma Stem Cells: A Neuropathologist's View. *J Oncol.* 2011; Article ID397195

**555.** McMaster M, Librach C, Zhou Y, Lim K, Janatpour M, DeMars R, Kovats S, Damsky, Fisher S. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J. Immunol.* 1995; 154:3771–3778.

**556.** Meirelles L, Chagastelles P, Nardi N. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119:2204–13.

- 557.** Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20: 419-427
- 558.** Mellor A and Munn D. Ido expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat.Rev.Immunol.* 2004; 4:762–774.
- 559.** Mellstedt. In vitro activation of human T and B limfocytes by pokeweed mitogen. *Clin. Exp. Immunol.* 1975; 19:75-82
- 560.** Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu M, BainC, Favrot M, Caux C. Inhibition of the differentiation of dendritic cells fromCD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998; 92:4778–4791.
- 561.** Menta R, Mancheno-Corvo P, Del Rio B, Ramirez C, Delarosa O, Dalemans W, Lombardo E. Tryptophan concentration is the main mediator of the capacity of adipose mesenchymal stromal cells to inhibit T-lymphocyte proliferation *in vitro*. *Cytotherapy* 2014; 16(12):1679-1691
- 562.** Mezrich J, Fechner J, Zhang X, Johnson B, Burlingham W, Bradfield C. An interaction between kynurenine and the arylhydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J. Immunol.* 2010; 185:3190–3198
- 563.** Miazaki S, Tsuda H, Sakai M, Hori S, Sasaki Y, Futatani T, Miyawaki T, Saito S. Predominance of Th2- promoting dendritic cells in early human pregnancy deciduas. *Journal of Leukocyte Biology* 2003; 74:514-522
- 564.** Michielsen A, Hogan A, Marry J, Tosetto M, Cox F, Hyland J, Sheahan K, O'Donoghue D, Mulcahy H, Ryan E, O'Sullivan J. Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. *PLoS ONE* 2011; 6:e27944
- 565.** Michielsen A, HoganA, Marry J, Tosetto M, Cox F, Hyland J. Tumour tissue microenviron- ment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. *PLoSONE* 2011; 6:e27944.
- 566.** Michielsen A, O'Sullivan J, RyanE. Tumor conditioned media from colorectal cancer patients inhibits dendritic cell maturation. *Oncoim- munology* 2012; 1:751–753.
- 567.** Miko E, Halasz M, Jericevic-Mulac B, Wicherek L, Arck P, Arato G, Skret Magierlo J, Rukavina D, Szekeres-Bartho J. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) and trophoblast invasiveness. *J Reprod Immunol* 2011; 90:50–57
- 568.** Mikoa E, Halasza M, Jericevic-Mulac B, Wicherekc L, Arckd P, Aratye G, Skret Magierlof J, Rukavinab D, Szekeres-Bartho J. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) and trophoblast invasiveness. *J Reprod Immunol* 2011; 90:50–57
- 569.** Mimeault M, Batra S. Concise review: Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem cells* 2006; 24:2319-2345
- 570.** Minguell J, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Experimental and Biological Medicine* (Maywood). 2001; 226(6):507–520.
- 571.** Miyaura H, Iwata M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol.* 2002; 168(3) 1087-1094.
- 572.** Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J LeukocBiol* 2005; 78:1043-1051
- 573.** Mokry J, Nemecek S. Angiogenesis of extra- and intraembryonic blood vessels is associated with expression of nestin in endothelial cells. *Folia Biol* 1998; 44:155–161.
- 574.** Monti P, Leone B, Zerbi A, Balzano G, Cainarca S, Sordi V. Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL- 10 high IL-12 low regulatory den dritic cell. *J Immunol* 2004; 172:7341–9. 122.
- 575.** Moore K, DeWaal Malefyt R, Coffman R, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu.Rev. Immunol.* 2001; 19:683–765.
- 576.** Moreau I, Duvert V, Caux C, Galmiche M, Charbord P, Banchereau J, Saeland S. Myofibroblastic stromal cells isolated from human bone marrow induce the proliferation of both early myeloid and B-lymphoid cells. *Blood.*1993; 82(8):2396–2405.
- 577.** Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella E, Paul P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int. Immunol.* 1999; 11:803–811.
- 578.** Mou H, Lin M, Cen H, Yu J, Meng X. TGF-beta1 treated murine dendritic cells are maturation resistant and down-regulate Toll-like receptor 4 expression. *J Zhejiang Univ Sci* 2004; 5:1239-1244.

- 579.** Mougiakakos D, Jitschin R, Johansson C, Okita R, Kiessling R, Le Blanc K. The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells. *Blood*. 2011; 117(18):4826–4835
- 580.** Movagar B, Tiraihi T, Mesbah N. Transdifferentiation of bone marrow stromal stem cells into Schwann cell phenotype using progesterone as inducer. *Brain research*. 2008; 1208: 17-24.
- 581.** Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M., Lafaille J, de Lafaille M. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J. Clin. Invest.* 2005; 115:1923–1933.
- 582.** Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. 2000; 113:1161–1166.
- 583.** Murakami M, Nakagawa M, Olson E, Nakagawa O. A WW domain protein is a critical coactivator for TBX5, a transcription factor implicated in Holt–Oram syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:18034-18039.
- 584.** Murphy J, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheumatism* 2002; 46:704–713.
- 585.** Muthuswamy R, Mueller-Berghaus J, Haberkorn U, Reinhart T, Schadendorf D, Kalinski P. PGE (2) transiently enhances expression of CCR7 but inhibits the ability of DCs to produce CCL19 and attract naïve T cells. *Blood* 2010; 116:1454–1459.
- 586.** Nadri S, Soleimani M. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from murine bone marrow and amniotic fluid. *Cytotherapy* 2007; 9:729–737.
- 587.** Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Morikawa S, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda T, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell* 2008; 2(4):392-403.
- 588.** Nakagawa T, Tsuruoka M, Ogura H, Okuyama Y, Arima Y, Hirano T, Murakami M. IL-6 positively regulates FoxP3+CD8+ T cells *in vivo*. *International Immunology* 2009; 22(2):129-139
- 589.** Nakahara H, Bruder S, Haynesworth S, Holecck J, Baber M, Goldberg V, Caplan A. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone* 1990; 11:181–188.
- 590.** Nakahata A, Suzuki D, Rodini C, Pereira M, Janjoppi L, Okamoto O. Human glioblastoma cells display mesenchymal stem cell features and form intracranial tumors in immunocompetent rats. *J Stem Cells*. 2011; 5:103-111
- 591.** Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor  $\beta$ . *J Exp Med* 2001; 194:629-644
- 592.** Nasef A, Mathieu N, Chapel A, Frick J, Francois S, Mazurier Ch, Boutarfa A, Bouchet S, Gorin N, Thierry D, Fouillard. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation* 2007; 84(2):231-237
- 593.** Nasu K, Narahara H, Matsui N, Kawano Y, Tanaka Y, Miyakawa I. Platelet-activating factor stimulates cytokine production by human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:548–553.
- 594.** Nauta A, Kruisselbrink, Lurvink E, Willemze R, Fibbe W. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+ derived and monocyte- derived dendritic cells. *J Immunol* 2006; 177(4):2080-2087
- 595.** Nauta A, Westerhuis G, Kruisselbrink A, Lurvink E, Willemze R, Fibbe W. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in nonmyeloablative setting. *Blood* 2006; 108:2114-2120
- 596.** Nelson BH, Martyak TP, Thompson LJ, Moon JJ, Wang T. Uncoupling of promitogenic and antiapoptotic functions of IL-2 by Smad-dependent TGF-beta signaling. *J Immunol* 2003; 170: 5563-5570
- 597.** Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009; 15: 42-49
- 598.** Newman RE, Yoo D, LeRoux MA, Danilkovitch-Miagkova A. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009; 8:110-123

- 599.** Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol* 2013; 4:129
- 600.** Ng W, Duggan P, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards A, Isaacs J, Lechler R. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001; 98:2736-2744
- 601.** Nie Y, Waite J, Brewer F, Sunshine M, Littman D, Zou Y. The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med* 2004; 200:1145-1156.
- 602.** Nonaka M, Ma B, Murai R, Nakamura N, Baba M, Kawasaki N. Glycosylation- dependent interactions of C-type lectin DC-SIGN with colorectal tumor-associated Lewis glycans impair the function and differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2008; 180:3347–3356.
- 603.** Noort W, Kruisselbrink A, Anker P, Kruger M., van Bezooijen R, de Paus R, Heemskerk M. Lowik C, Falkenburg J, Willemze R, Fibbe W. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Experimental Hematology* 2002; 30:870–878.
- 604.** Noth U, Osyczka A, Tuli R, Hickok N, Danielson K, Tuan R. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *Journal of Orthopaedic Research* 2002; 20:1060–1069.
- 605.** Nuttall M, Gimble J: Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4:290-294.
- 606.** Ober C, Hyslop T, Elias S, Weikamp L, Hauck W. Human leucocyte antigen matching and foetal loss: result of 10 year prospective study. *Hum Reprod* 1998; 13:33-38.
- 607.** O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:425-428
- 608.** Ogata M, Zhang Y, Wang Y, Itakura M, Zhang Y, Harada A, Hashimoto S, Matsushima K. Chemotactic response toward chemokines and its regulation by transforming growth factor-beta1 of murine bone marrow hematopoietic progenitor cell-derived different subset of dendritic cells. *Blood* 1999; 93:3225-3232.
- 609.** Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13866–13871.
- 610.** Oliveira V, Caridade M, Paiva R, Demengeot J, Graca L. Sub- optimal CD4<sup>+</sup>T cell activation triggers autonomous TGFβ- dependent conversion to FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41:1249-1255
- 611.** Oliver C, Cowdrey N, Abadia-Molina A, Olivares E. Antigen phenotype of cultured decidual stromal cells of human term decidua. *J Reprod Immunol* 1999; 45:19–30.
- 612.** Olsen B, Reginato A, Wang W. Bone development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2002; 16:191-220
- 613.** Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr CompPhysiol* 2002; 283: R7-28
- 614.** Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117:1162-1172
- 615.** Osada T, Chong G, Tansik R, Hong T, Spector N, Kumar R, Hurwitz HI, Dev I, Nixon AB, Lysterly HK, Clay T, Morse MA. The effect of anti-VEGF therapy on immature myeloid cell and dendritic cells in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 1115-1124
- 616.** Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, Gabrilovich DI. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1998; 160: 1224-1232
- 617.** Park CW, Kim KS, Bae S, Son HK, Myung PK, Hong HJ, Kim H. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *Int J Stem Cells* 2009; 2: 59-68
- 618.** Park S, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S, Kamimura D, Ueda N, Iwakura Y, Ishihara K, Murakami M, Hirano T. IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* 2004; 173:3844-3854
- 619.** Pasanen S, Ylikomi T, Palojoki E, Syvala H, Pelto-Huikko M, Tuohimaa P. Progesterone receptor in chicken bursa of Fabricius and thymus: evidence for expression in B-lymphocytes. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 141:119-128.

- 620.** Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, Corcoran KE, Bryan M, Rameshwar P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *J Immunol* 2010; 184: 5885-5894
- 621.** Patki S, Kadam S, Chandra V, Bhonde R. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Hum. Cell* 2010; 23:35-40.
- 622.** Pavon L, Marti L, Sibov T, Miyaki L, Malheiros S, Mamani J, Brandt R, Ribas G, Pagura J, Joaquim M, Feres Junior H, Gamarra L. Isolation, cultivation and characterization of CD133+ stem cells from human glioblastoma. *Einstein*. 2012; 10(2):197-202
- 623.** Péguet-Navarro J, Sportouch M, Popa I, Berthier O, Schmitt D, Portoukalian J. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol* 2003; 170:3488-3494.
- 624.** Peng G, Guo Z, Kiniwa Y, Voo K, Peng W, Fu T, Wang D, Li Y, Wang H, Wang R. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* 2005; 309:1380-1384.
- 625.** Peng W, Gao T, Yang Z, Zhang S, Ren M, Wang Z, Zhang B. Adipose derived stem cells induced dendritic cells undergo tolerance and inhibit Th1 polarization. *Cellular Immunology* 2012; 278:152-157
- 626.** Penny L. Monocyte chemoattractant protein 1 in luteolysis. *Rev Reprod* 2000; 5: 63-66.
- 627.** Pereira R, Halford K, O'Hara M, Leeper D, Sokolov B, Pollard M, Bagasra O, Prockop D. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995; 92(11):4857-4861.
- 628.** Perez-Pomares J, Munoz-Chapuli R. Epithelial-mesenchymal transitions: A mesodermal cell strategy for evolutive innovation in Metazoans. *Anat Rec* 2002; 268:343-351.
- 629.** Perrini S, Ficarella R, Picardi E, Cignarelli A, Barbaro M, Nigro P, Peschechera A, Palumbo O, Carella M, De Fazio M, Natalicchio A, Laviola L, Pesole G, Giorgino F. Differences in gene expression and cytokine release profiles highlight the heterogeneity of distinct subsets of adipose tissue derived stem cells in the subcutaneous and visceral adipose tissue in humans. *PLoS One* 2013; 8: e57892]
- 630.** Petrovska M, Dimitrov D, Michael S. Quantitative changes in macrophage distribution in normal mouse ovary over the course of the estrous cycle examined with an image analysis system. *Am J Reprod Immunol* 1996; 36:175-183.
- 631.** Phinney D and Prockop D. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair- current views. *Stem Cells* 2007; 25:2896-2902
- 632.** Phinney D, Isakova I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr Pharm Des* 2005; 11:1255-1265.
- 633.** Phinney D, Kopen G, Isaacson R, Prockop D. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 1999; 72:570-585.
- 634.** Phinney D. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 2002; 38:7-12.
- 635.** Piccinni P, Guidzi M, Biagotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti A, Annunziano F. Progesterone favors the development of human Th cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-6 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 1995; 155:128-136.
- 636.** Piccirillo S, Dietz S, Madhu B, Griffiths J, Price SJ, Collins VP, Watts C. Fluorescence-guided surgical sampling of glioblastoma identifies phenotypically distinct tumour-initiating cell populations in the tumour mass and margin. *Cancer Res* 2012; 107:462-468
- 637.** Pinho S, Lacombe J, Hanoun M, Mizoguchi T, Bruns I, Kunizaki Y, Frenette P. PDGFR $\alpha$  and CD51 mark human Nestin<sup>+</sup> sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *J Exp Med* 2013; 210(7):1351-1367
- 638.** Piperi C, Zisakis A, Lea R, Kalofoutis A. Role of cytokines in the regulation of glioma tumour growth and angiogenesis. *Am. J. Immunol.* 2005; 1:106-113
- 639.** Piqueras B, Connolly J, Freitas H, Palucka A, Banchereau J. Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood* 2006; 107(7):2613-2618.

- 640.** Pistollato F, Persano L, Puppa A, Rampazzo E, Basso G. Isolation and expansion of regionally defined human glioblastoma cells in vitro. In Schlaeger T, editor. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 1<sup>st</sup> ed. Wiley online library ; 2011; Chapter 3: Unit 3.4.: p 3.4.1-3.4.10
- 641.** Pittenger M and Martin B. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac theurapeutics. *Circ Res.* 2004; 95:9-20
- 642.** Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S, Marshak D. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143-147.
- 643.** Pittenger M, Mosca J, McIntosh K. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000; 251:3-11.
- 644.** Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147
- 645.** Pluchino S, Gritti A, Blezer E, Amadio S, Brambilla E, Borsellino G, Cossetti C, Del Carro U, Comi G, Hart B, Vescovi A, Martino G. Human neural stem cells ameliorate autoimmune encephalomyelitis in non-human primats. *Ann Neurol.* 2009; 66: 343-354
- 646.** Polgar B, Kispal G, Lachmann M. Molecular cloning and immunologic characterization of a novel cDNA coding for progesterone-induced blocking factor. *J. Immunol.* 2003; 171:5956-5963.
- 647.** Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. P27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8: 9-22
- 648.** Popov A andSchultze J. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J.Mol.Med.(Berl.)* 2008; 86:145-160.
- 649.** Potter and Moore. PHA stimulation of separated human lymphocyte populations. *Clin. Exp. Immunol.* 1975; 21:456-467
- 650.** Powrie F, Carlino J, Leach M, Mauze S, CoffmanR. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin4 in the suppression of Thelpertype1-mediated colitis by CD45RB(low)CD4+ T cells. *J. Exp.Med.* 1996; 183:2669-2674.
- 651.** Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi M, Poggi A. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *The Hematology Journal* 2007; 92(07):881-888
- 652.** Preynat-Seauve O, Schuler P, Contassot E, Beermann F, Huard B, French L. Tumor-infiltrating dendritic cells are potent antigen-presenting cells able to activate T cells and mediate tumor rejection. *J Immunol* 2006; 176:61-7.
- 653.** Prockop D, Sekiya I, Colter D. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy.* 2001; 3:393-396.
- 654.** Prockop D. Further proof of the plasticity of adult stem cells and their role in tissue repair. *J Cell Biol.* 2003; 160:807-809.
- 655.** Prockop D. Marrow stromal cells as steam cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276:71-4.
- 656.** Proietto A, O'Keeffe M, Gartlan K, Wright M, Shortman K, Wu L, Lahoud M. Differential production of inflammatory chemokines by murine dendritic cell subsets. *Immunobiology* 2004; 209:163-172
- 657.** Qian L, Saltzman W. Improving the expansion and neural differentiation of mesenchymal stem cells through culture surface modification. *Biomaterials* 2004; 25:1331-1337.
- 658.** Quaini F, Urbanek K, Beltrami A, Finato N, Beltrami C, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Chimerism of the transplanted heart. *New England Journal of Medicine* 2002; 346(1):5-15.
- 659.** Quereshi O, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt E. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell- extrinsic function of CTLA-4. *Science* 2011; 332:600-603.
- 660.** Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers G. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 2002; 30:783-91.
- 661.** Rafei M, Hsieh J, Fortier S, Li M, Yuan S, Birman E, Forner K, Boivin MN, Doody K, Tremblay M, Annabi B, Galipeau J. Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood* 2008; 112: 4991-4998

- 662.** Ramhorst RE, García VE, Corigliano A, Rabinovich GA, Fainboim L. Identification of RANTES as a novel immunomodulator of the maternal allogeneic response. *Clin Immunol* 2004; 110: 71-80
- 663.** Rasmuson I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringden O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand. J. Immunol.* 2007; 65:336-343.
- 664.** Rasmuson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 2005; 305:33-41.
- 665.** Rasmuson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K: Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 2003; 76:1208-1213
- 666.** Rasmuson I, Uhlén M, Le Blanc K, Levitsky V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2007; 82:887-893.
- 667.** Ratajczak M, Kucia M, Reza R, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells “hide out” in the bone marrow. *Leukemia* 2004; 18:29-40.
- 668.** Reinherz E and Schlossman S. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell.* 1980; 19:821-827
- 669.** Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6:476-483.
- 670.** Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 141-150
- 671.** Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L’Huillier A, Ling W, Roberts AI, Le AD, Shi S, Shao C, Shi Y. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* 2010; 184: 2321-2328
- 672.** Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker P, Verfaillie C. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* 2002; 109:337-346.
- 673.** Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie C. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* 2001; 98(9):2615-2625.
- 674.** Richards R, Rar A, Frank G, Hartman S, Jikihara H. Fibroblast cells from term human decidua closely resemble endometrial stromal cells: induction of prolactin and insulin-like growth factor binding protein-1 expression. *Biol Reprod* 1995; 52:609-615.
- 675.** Rieckmann P, Michel U, Albrecht M, Bruck W, Wockel L, Felgenhauer K. Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) block lymphocyte attachment to cerebral endothelial cells. *J Neuroimmunol* 1995; 60: 9-15
- 676.** Riley J. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol. Rev.* 2009; 229:114-125.
- 677.** Rio - Blanco L, Sanchez-Sanchez N, Torres A, Tejedor A, Narumiya S, Corbi A, Sanchez-Mateos P, Rodriguez-Fernandez J. The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J. Immunol.* 2005; 174:4070-4080.
- 678.** Rizzo R, Lanzoni G, Stignani M, Campioni D, Alviano F, Ricci F, Tazzari P, Melchiorri L, Scalinci S, Cuneo A, Bonsi L, Lanza F, Bagnara G, Baricordi O. A simple method for identifying bone marrow mesenchymal stromal cells with a high immunosuppressive potential. *Cytotherapy* 2011; 13:523-527
- 679.** Rodriguez P, Quiceno D, Zabaleta J, Ortiz B, Zea A, Piazuelo M, Delgado A, Correa P, Brayer J, Sotomayor E, Antonia S, Ochoa J, Ochoa A. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res.* 2004; 64:5839-5849.
- 680.** Rosmalen J, Homo-Delarche F, Durant S, Kap M, Leenen P, Drexhage H. Islet abnormalities associated with an early influx of dendritic cells and macrophages in NOD and NOD-scid mice. *Lab. Invest.* 2000; 80:769-777.
- 681.** Rossant J. Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem Cells* 2001; 19:477-482.
- 682.** Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217-242
- 683.** Roufosse C, Direkze N, Otto W, Wright N. Circulating mesenchymal stem cells. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2004; 36:585-597

- 684.** Rozenblum E, Vahteristo P, Sandberg T, Bergthorsson J, Sytjakoski K, Weaver D, Haraldsson K, Johannsdottir H, Vehmanen P, Nigam S. A genomic map of a 6-Mb region at 13q21-q22 implicated in cancer development: identification and characterization of candidate genes. *Hum Genet* 2002; 110:111–121
- 685.** Ruau D, Xin-Sheng J, Zenke M. Genomics of TGF $\beta$  signalling in stem cell commitment and dendritic cell development. *Cell Immunol* 2006; 244:116–20.
- 686.** Rubtsov Y, Rasmussen J, Chi E, Fontenot J, Castelli L, Ye X. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 2008; 28:546–558.
- 687.** Ruby C, Yates M, Hirschhorn-Cymerman D, Chlebeck P, Wolchok J, Houghton A. Cutting edge: OX40 agonists can drive regulatory T cell expansion if the cytokine milieu is right. *J. Immunol.* 2009; 183:4853–4857.
- 688.** Rudensky A. Regulatory T cells and FoxP3. *Immunological reviews.* 2011; 241:260-268.
- 689.** Ruegeger JJ, Ho SN, Augustine JA, Schlager JW, Bell MP, McKean DJ, Abraham RT. Regulatory effects of transforming growth factor-beta on IL-2- and IL-4-dependent T cell cycle progression. *J Immunol* 1990; 144: 1767-1776
- 690.** Rughetti A, Pellicciotta I, Biffoni M, Backstrom M, Link T, Bennet E. Recombinant tumor-associated MUC1 glycoprotein impairs the differentiation and function of dendritic cells. *J Immunol* 2005; 174:7764–72.
- 691.** Ryan J, Barry F, Murphy J, Mahon B “Interferon- does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2007; 149(2):353–363
- 692.** Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico, E., Ferrari, S, Robey P, Riminucci M, Bianco P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007; 131:324–336.
- 693.** Saeidi M, Masoud A, Shakiba Y, Hadjati J, Bonab M, Nicknam M, Latifpour M, Nickbin B. Immunomodulatory effects of human mesenchymal stem cells on differentiation, maturation and andocytosis of monocyte derived dendritic cells. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2013; 12(1):37-49
- 694.** Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda, T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 1985; 161:72–87.
- 695.** Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 2000; 101:455–458
- 696.** Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M.. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995; 155:1151–1164.
- 697.** Salamone G, Fraccaroli L, Gori S, Grasso E, Paparini D, Geffner J, Leiros C, Ramhorst R. Trophoblast cells induce a tolerogenic profile in dendritic cells. *Human Reproduction* 2012; 27(9):2598-2606
- 698.** Saldanha- Araujo F, Haddad R, Kelen C, de Fabrias M, Souza A, Palma P, Araujo A, Orellana M, Voltarelli J, Covas D, Zago M, Panepucci R. Mesenchymal stem cells promote the susutained expression of CD69 on activated T lymphocytes: roles of canonical and non- canonical NF $\kappa$ -B signals. *J. Cell. Mol. Med.* 2012; 16(6):1232-1244
- 699.** Salem H, Thiernemann C. Mesenchymal stem cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 2010; 28:585-596
- 700.** Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: Soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010; 5:103-110
- 701.** Sallusto F and Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 1994; 179:1109–1118.
- 702.** Samoylovich M, Pinevich, A, Shashkova O, Vartanian N, Kiseleva L, Kilmovich V. The influence of mesenchymal stromal cells on B-cell line growth and immunoglobulin synthesis. *Cell and Tissue biology* 2013; 7(3):227-234
- 703.** Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger M. Neural stem cells and origin of gliomas. *N Engl J Med.* 2005; 353:811-822

- 704.** Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman T, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper D, Sanberg P. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Experimental Neurology* 2000; 164:247–256.
- 705.** Sanchez-Ramos J. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 2002; 69:880–893.
- 706.** Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *TRENDS in Immunology* 2005; 26(3):136-140
- 707.** Sarris M, Andersen K, Randow F, Mayr L, Betz A. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhance their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 2008; 28:402–413.
- 708.** Sarugaser R, Hanoun L, Keating A, Stanford W, Davies J. Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PLoS ONE* 2009; 4:e6498.
- 709.** Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini M, Davies J. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors, *Stem Cells* 2005; 23(2):220-229
- 710.** Sauter B, Albert M, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 191:423-434.
- 711.** Scandella E, Men Y, Gillessen S, Forster R, Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2002; 100:1354–1361.
- 712.** Scarlett U, Rutkowski M, Rauwerdink A, Fields J, Escovar-Fadul X, Baird J. Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells. *J Exp Med* 2012; 209:495–506.
- 713.** Schafer-Somi S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. *Animal Reproduction Science* 2003; 75:273-942.
- 714.** Schall TJ, Jongstra J, Dyer BJ, Jorgensen J, Clayberger C, Davis MM, Krensky AM. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol* 1988; 141: 1018-1025.
- 715.** Schall TJ. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine* 1991; 3: 165-183.
- 716.** Scheffold A, Huhn J, Hofer T. Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-) two to tango. *Eur J Immunol* 2005; 35:1336–1341.
- 717.** Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 878-888
- 718.** Schena F, Gambini C, Gregorio A, Mosconi M, Reverberi D, Gattorno M, Casazza S, Uccelli A, Moretta L, Martini A, Traggiai E. Interferon-gamma-dependent inhibition of B cell activation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010; 62:2776-2786.
- 719.** Schiffer D, Mellai M, Annovazzi L, Piazzini A, Monzeglio O, Caldera V. Glioblastoma cancer stem cells: Basis for a functional hypothesis. *Stem Cell Discovery*. 2012; 2:122-131.
- 720.** Schiffer D, Mellai M, Annovazzi L, Piazzini A, Monzeglio O, Caldera V. On the origin and growth of gliomas. *Anticancer Res*. 2010; 30:1977-1998.
- 721.** Schmidt S, Nino-Castro A, Schiltze J. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Frontiers of Immunology* 2012; 3: Article № 274.
- 722.** Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978; 4:7-25.
- 723.** Schu S, Nosov M, O’Flynn L, Shaw G, Treacy O, Barry F, Murphy M, O’Brien T, Ritter T. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *J. Cell.Mol.Med.* 2012; 16(9):2094-2103.
- 724.** Schumacher M, Coirni H, Robert F, Guennoun M. Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behavior. *Behavioral Brain Research* 1999; 105:37-52.
- 725.** Schuurhuis D, Ioan-Facsinay A, Nagelkerken B, van Schip J, Sedlik C, Melief C, Verbeek J, Ossendorp F. Antigen-antibody immune complexes empower dendritic cells to efficiently prime specific CD8+ CTL responses *in vivo*. *J Immunol* 2002; 168:2240-2246.
- 726.** Schwab K, Gargett C. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod* 2007; 22:2903–2911.
- 727.** Schwartz R. T cell clonal anergy. *Curr.Opin.Immunol.* 1997; 9:351–357.
- 728.** Seddon B, Mason D. Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity. *J Exp Med* 1999; 189:877–882

- 729.** Sedy J, Gavrieli M, Potter K, Hurchla M, Lindsley R, Hildner K. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpes virus entry mediator. *Nat. Immunol.* 2005; 6:90–98.
- 730.** Sejersen T, Lenhahl U. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci* 1993; 106:1291–1300.
- 731.** Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier I, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiff N, Carosella E, Deschaseaux F. Human leucocyte antigen- G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25<sup>high</sup> FoxP3+ regulatory T cells. *Stem cells* 2008; 26:212-222
- 732.** Seong S and Matzinger P. Opinion: hydrophobicity :an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat.Rev.Immunol.*2004; 4:469–478.
- 733.** Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* 2005; 201:723–735.
- 734.** Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:230–242.
- 735.** Sharma S, Stolina M, Yang S-C, Baratelli F, Lin J, Atianzar K. Tumor cyclooxygenase-2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clin Cancer Res* 2003; 9:961–8. 124.
- 736.** Shen L, Wang J, Shen D, Yuang X, Dong P, Li M, Zhang F, Ge H, Xu D. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup> regulatory T cell express FoxP3 and suppress effector T cell proliferation and contribute to gastric cancer progression. *Clinical Immunology* 2009; 131:109-118.
- 737.** Sheshgiri R, Rao V, Tumiati L, Xiao R, Prodger J, Badiwala M, Librach C, Delgado D. Progesterone induces human leukocyte antigen-G expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circulation* 2008; 118:58–64.
- 738.** Shevach E. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:389–400.
- 739.** Shevach E. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J. Exp. Med.* 2001; 193:F41–F46.
- 740.** Shevach E. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18:423–449.
- 741.** Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003; 18:696-704.
- 742.** 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. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res* 2010; 20:510-518
- 743.** Shih D, Lee D, Chen S, Tsai R, Huang C, Tsai C, Shen E, Chiu W. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells* 2005; 23:1012–1020.
- 744.** Shmitt E and Williams C. Generation and function of induced regulatory T cells. *Frontiers in immunology.* 2013; 4: Article № 152.
- 745.** Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons P. Mesenchymal stem cells. *Archives Med Res* 2003; 34:565–71.
- 746.** Shurin G, Ouellette C, Shurin M. Regulatory dendritic cell sinthe tumor immuno environment. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012; 61:223–230.
- 747.** Shurin G, Shurin M, Bykovskaia S, Shogan J, Lotze M, Barksdale E. Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Res* 2001; 61:363–369.
- 748.** Sica G, Choi I, Zhu G, Tamada K, Wang S, Tamura H. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity 1. *Immunity* 2003; 18:849–861.
- 749.** Simmons P and Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; 78:55–62.
- 750.** Singh M. Progesterone-induced neuroprotection. *Endocrine.*2006; 29: 271.
- 751.** Singh S, Hawkins C, Clarke I, Squire J, Bayani J, Hide T, Henkelman R, Cusimano M, Dirks P. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 432:396-401
- 752.** Sioud M, Mobergslie A, Boudabous A, Fløisand Y. Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation. *Scand J Immunol* 2010; 71: 267-274.

- 753.** Sioud M, Mobergslie A, Boudabous A, Floisand Y. Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occur through secreted galectins. *International journal of oncology* 2011; 38:385-390.
- 754.** Smith C, Wilson NS, Waithman J, Villadangos J, Carbone F, Heath W, Belz G. Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat Immunol* 2004; 5:1143-1148.
- 755.** Smyth M, Strobl S, Young H, Ortaldo J, Ochoa A. Regulation of lymphokine-activated killer activity and poreforming protein gene expression in human peripheral blood CD8 T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta. *J Immunol* 1991; 146: 3289-3297.
- 756.** Solovyeva VV, Salafutdinov II, Martynova EV, Khaiboullina SF, Rizvanov AA. Human adipose derived stem cells do not alter cytokine secretion in response to the genetic modification with pEGFP-N2 plasmid DNA. *World Appl Sci J* 2013; 26:968-972.
- 757.** Sombroek C, Stam A, Masterson A, Lougheed S, Schakel M, Meijer C. Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2002; 168:4333-43.
- 758.** Son B, Marquez-Curtis L, Kucia M, Wysoczynski M, Turner A, Ratajczak J, Ratajczak M, Janowska-Wieczorek A. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells* 2006; 24:1254-1264.
- 759.** Song L, Tuan R. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, *FASEB J.* 2004; 18: 980-982.
- 760.** Soper D, Kasproicz D, Ziegler S. IL-2Rbeta links IL-2R signaling with Foxp3 expression. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 1817-1826.
- 761.** Sotiropoulou P, Perez S, Gritzapis A, Baxevas C, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006; 24:74-85
- 762.** Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* 2002; 30:699-704.
- 763.** Spaggiari G, Capobianco A, Adbelrazik H, Becchetti F, Mingari M, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer- cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3- dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*; 111(3):1327-1333.
- 764.** Spaggiari G, Capobianco A, Becchetti S, Mingari M, Moretta L. 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* 2006; 107:1484-90.
- 765.** Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 2009; 113: 6576-6583.
- 766.** Sriram U, Varghese L, Bennett H, Jog N, Shivers D, Ning Y. Myeloid dendritic cells from B6.NZMSle1/Sle2/Sle3 lupus-prone mice express an IFN signature that precedes disease onset. *J. Immunol.* 2012; 189:80-91.
- 767.** Srivastava MD, Thomas A, Srivastava BI, Check JH. Expression and modulation of progesterone induced blocking factor (PIBF) and innate immune factors in human leukemia cell lines by progesterone and mifepristone. *Leuk Lymphoma* 2007; 48:1610-1617.
- 768.** Steensberg A, Fischer C, Keller C, Moller K, Pedersen B. IL-6 enhances IL-1ra, IL-10 and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:433-437.
- 769.** Steinman R and Cohn Z. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 1973; 137:1142-1162.
- 770.** Steinman R and Nussenzweig M. Avoiding horror autotoxicus : the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* 2002; 99:351-358.
- 771.** Steinman R, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum. Immunol.* 1999; 60:562-567.
- 772.** Steinman R, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000; 191:411-416.
- 773.** Stephens G, McHugh R, Whitters M, Young D, Luxenberg D, Carreno B. Engagement of glucocorticoid- induced TNFR family-related receptor one effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J. Immunol.* 2004; 173:5008- 5020.

- 774.** Stephens L, Mottet C, Madson D, Powrie F. Human CD4+CD25+ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity. *Eur J Immunol.* 2001; 31: 1247-1254.
- 775.** Stock A, Booth S, Cerundolo V. Prostaglandin E2 suppresses the differentiation of retinoic acid producing dendritic cells in mice and humans. *J Exp Med.* 2011; 208:761-773.
- 776.** Strainic M, Shevach E, An F, Lin F, Medof M. Absence of signalingin to CD4(+) cells via C3aR and C5aR enables autoinductive TGF-beta1 signaling and induction of Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2013; 14, 162-171.
- 777.** Strobel E, Gay R, Greenberg P. Characterization of the in vitro stromal microenvironment of human bone marrow. *Int. J. Cell Cloning* 1986; 4: 341-356.
- 778.** Strobl H, Knapp W. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect* 1999; 1:1283-1290.
- 779.** Stuart L, Lucas M, Simpson C, Lamb J, Savill J, Lacy-Hulbert A. Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol* 2002; 168:1627-1635.
- 780.** Suen J, Li H, Jong Y, Chiang B, Yen J. Altered homeostasis of CD4 (+)FoxP3(+) regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2008; 127(2): 196-205.
- 781.** Sugimoto H, Oda S, Otsuki T, Hino T, Yoshida T, Shiro Y. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O2 incorporation by a heme containing dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103:2611-2616.
- 782.** Sukiennicki T and Fowell D. Distinct molecular program imposed on CD4+ T cell targets by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2006; 177:6952-6961.
- 783.** Sultani M, Stringer AM, Bowen JM, Gibson RJ. Antiinflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Chemother Res Pract* 2012; 490804.
- 784.** Sundin M, Ringden O, Sundberg B, Nava S, Gotherstrom C, Le Blanc K. No allo- antibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica* 2007; 92:1208-1215.
- 785.** Suttmuller R, den Brok M, Kramer M, Bennink EJ, Toonen L, Kullberg B, Joosten L, Akira S, Netea M, Adema G. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2006; 116:485-494
- 786.** Swee L, Bosco N, Malissen B, Ceredig R, Rolink A. Expansion of peripheral naturally occurring T regulatory cells by Fms-like tyrosine kinase 3 ligand treatment. *Blood.* 2009; 113:6277-87.
- 787.** Szekeres-Bartho J and Wegmann T. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J. Reprod. Immunol.* 1996; 31:81-95.
- 788.** Szekeres-Bartho J, Autran B, Debre P, Andreu, G, Denver L, Chaouat G. Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cell. Immunol.* 1989; 122:281-294
- 789.** Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Miko E, Polgar B, Palkovics T. The role of gamma/delta T cells in the fetomaternal relationship. *Semin. Immunol.* 2001a; 13:229-233.
- 790.** Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szereday L. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int. Immunopharmacol.* 2001b; 1:1037-1048
- 791.** Szekeres-Bartho J, Csernus V, Hadnagy J, Pacsa A. Influence of treatment with prostaglandin synthesis inhibitor or progesterone on cytotoxic activity and progesterone binding capacity of lymphocytes during pregnancy. *Prostaglandins* 1983; 26:187-195.
- 792.** Szekeres-Bartho J, Hadnagy J, Pacsa A. The suppressive effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: unique progesterone sensitivity of pregnancy lymphocytes. *J Reprod Immunol* 1985; 7:121-128.
- 793.** Szekeres-Bartho J, Halasz M, Palkovics T. Progesterone in pregnancy; receptor-ligand interaction and signaling pathways. *Journal of Reproductive Immunology.* 2009; 83:60-63.
- 794.** Szekeres-Bartho J, Polgar B. PIBF: the double edged sword. *Pregnancy and tumor.* *Am J Reprod Immunol* 2010; 64:77-86
- 795.** Szereday L, Barakony A, Milko E, Varga P, Szekeres-Bartho J. Gamma/delta T cell subsets, NKJ2A expression and apoptosis of Vdelta+ T cells in pregnant women with or without risk of premature pregnancy termination. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50:490-496.

- 796.** Taams L, Smith J, Rustine M, Salmon M, Poulter L, Akbar A. Human anergic suppressive CD4+CD25+ T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* 2001; 31:1122-1131
- 797.** Taams L, Vukamanovic-Stejic M, Smith J, Dunne P, Fletcher J, Plunkett F, Ebelin S, Lombardi G, Rustin M, Bijlsma J, Lafeber J, Salmon M, Akbar A. Antigen-specific cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2002; 32:1621-1630
- 798.** Tabera S, Perez-Simon J, Diez-Campelo M, Sanchez-Abarca L, Blanco B, Lopez A, Benito A, Ocio E, Sanchez-Guijo F, Canizo C, San Miguel J. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica* 2008; 93(9):1301-1309.
- 799.** Tada Y, Asahina A, Fujita H, Mitsui H, Torii H, Watanabe T, Tamaki K. Differential effects of LPS and TGF-beta on the production of IL-6 and IL-12 by Langerhans cells, splenic dendritic cells, and macrophages. *Cytokine* 2004; 25:155-161
- 800.** Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat. Immunol.* 2008; 6:152-162.
- 801.** Takahashi M, Kobayashi Y. Cytokine production in association with phagocytosis of apoptotic cells by immature dendritic cells. *Cell Immunol* 2003; 226:105-115.
- 802.** Takashima Y, Era T, Nakao K, Nakao O, Kondo S, Kasuga M, Smith A, Nishikawa S. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 2007; 129(7):1377-88
- 803.** Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, Takahashi R, Asakawa M, Muto G, Mori T, Hasegawa E, Saika S, Hara T, Nomura M, Yoshimura A. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGFbeta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J Immunol* 2010; 185: 842-855 [
- 804.** Tang B, Guller S, Gursipide E. Mechanism of human endometrial stromal cells decidualization. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 734:19-25.
- 805.** Tavassoli M, Takahashi K. Morphological studies on long-term culture of marrow cells: characterization of the adherent stromal cells and their interactions in maintaining the proliferation of hemopoietic stem cells. *Am. J. Anat.* 1982; 164: 91-111.
- 806.** Taylor H. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA* 2004; 292:81-85.
- 807.** Taylor S and Jones P. Changes in phenotypic expression in embryonic and adult cells treated with 5-azacytidine. *Journal of Cellular Physiology* 1982; 111:187-194.
- 808.** Thomas H, Jager M, Mauel K, Brandau S, Lask S, Flohe S. Interaction with mesenchymal stem cells provokes natural killer cells for enhanced IL-12/ IL-18- induced interferon-gamma secretion. *Mediators Inflamm.* 2014; 30: Article ID 143463
- 809.** Thomas Y. Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies.V. Suppressor cells within the activated OKT4+ population belong to a distinct subset. *J. Immunol.* 1982; 128:1386-1390
- 810.** Thornton A, Korty P, Tran D, Wohlfert E, Murray P, Belkaid Y. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 2010; 184:3433-3441.
- 811.** Thornton A, Piccirillo C, Shevach E. Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol* 2004; 34:366-376
- 812.** Thornton A, Shevach E. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T- cell activation in vitro by inhibiting interleukin-2 production. *J Exp Med* 1998; 188:287-296
- 813.** Thornton A, Shevach E. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000; 164:183-190
- 814.** Thorstenson K and Khoruts A. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J. Immunol.* 2001; 167:188-195.
- 815.** Tilburgs T, Roelen D, van der Mast B, van Schip J, Kleijburg C, de Groot-Swings G. Differential distribution of CD4-CD25 bright and CD8-CD28- T-cells in decidua and maternal blood during human pregnancy. *Placenta.* 2006; 27 (Suppl. A): S47.

- 816.** Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin- 6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: Induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 1994; 83:113-118
- 817.** Tivol E, Borriello F, Schweitzer A, Lynch W, Bluestone J, Sharpe A. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995; 3:541–547
- 818.** Tjomsland V, Sandstrom P, Spangeus A, Messmer D, Emilsson J, Falkmer U, Falkmer S, Magnusson K, Borch K, Larsson M. Pancreatic adenocarcinoma exerts systemic effects on the peripheral blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells: an indicator of disease severity? *BMC Cancer* 2010; 10:87.
- 819.** Tobar J, Gonzalez P, Kalergis A. Salmonella escape from antigen presentation can be overcome by targeting bacteria to Fc gamma receptors on dendritic cells. *J Immunol* 2004; 173:4058-4065.
- 820.** Tobin L, Healy M, English K, Mahon B. Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4+T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2012; 172:333-348
- 821.** Tögel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F1626-F1635
- 822.** Tomic S, Djokic J, Vasilijic S, Vucevic D, Todorovic V, Supic G, Colic M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. *Stem Cells Dev* 2011; 20: 695-708
- 823.** Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massi M, Mortier C, Delforge A, Bron D. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 2004; 72:319–326.
- 824.** Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski M, Greene M, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.* 2008; 9:194–202.
- 825.** Torres M, Lopez-Casado M, Luque J, Penna J, Rios A. New advances in coeliac disease: Serum and intestinal expression of HLA-G. *Int. Immunol.* 2006; 18:713–718.
- 826.** Traggiai E, Volpi S, Schena F, Gattorno M, Ferlito F, Moretta L, Martini A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of b cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells* 2008; 26:562-569.
- 827.** Treilleux I, Blay J-Y, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla J-P. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:7466–7474
- 828.** Troy A, Davidson P, Atkinson C, Hart D. Phenotypic characterisation of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer. *J. Urol.* 1998; 160:214–219.
- 829.** Truss M, Beato M. Steroid hormone receptors. Interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 1993; 14:459-479.
- 830.** Tsai M-J, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994; 63:146-163.
- 831.** Tse W, Pendleton J, Beyer W, Egalka M, Guinan E. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003; 75:389–397.
- 832.** Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:413-419.
- 833.** Tuan R, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res. Ther.* 2003; 5: 32-45
- 834.** Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner P, Hozack W, Danielson K, Hall D, Tuan R. Transforming growth factor- $\beta$ -mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem* 2003; 278:41227-41236.
- 835.** Tumangelova-Yuzeir K, Ivanova-Todorova E, Nachev S, Velikova Ts, Naydenov E, Dobroslav Kyurkchiev D. Missing B7 in a part of antigen-presenting cells infiltrating glioblastoma multiforme. *Acad. Bulg. Sci.* 2014; 67 (7):1005-1010

- 836.** Ueda Y, Masao H, Okamoto A, Higuchi A, Tanabe A, Hirabayashi K, Izumi Sh, Makino T, Kato Sh, Hotta T. Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults. *Human Immunol* 2003; 64:1144-1151.
- 837.** Vandromme M, Melton S, Kerby J. Progesterone in traumatic brain injury: Time to move on to phase III trials. *Crit Care*. 2008; 12: 153.
- 838.** vanDuivenvoorde L, van Nierlo G, Boonman Z, Toes R. Dendritic cells: Vehicles for tolerance induction and prevention of autoimmune diseases. *Immunobiology* 2006; 211:627-632
- 839.** vanElssen CH, Vanderlocht J, Oth T, Senden-Gijsbers BL, Germeraad WT, Bos GM. Inflammation-restraining effects of prostaglandin E2 on natural killer-dendritic cell (NK-DC) interaction are imprinted during DC maturation. *Blood* 2011; 118: 2473-2482
- 840.** vanKaer L, Wu M, Ichikawa Y, Ito K, Bouneville M, Ostrand-Rosenberg S, Murphy D, Tonegawa S. Recognition of MHC TL gene products by gd T cells. *Immunol Rev*. 1991; 120:89-115.
- 841.** vanMierlo G, Boonman Z, Dumortier H, Den Boer A, Fransen M, Nouta J. Activation of dendritic cells that cross-present tumor-derived antigen licenses CD8+ CTL to cause tumor eradication. *J Immunol* 2004; 173:6753-6759.
- 842.** vanRhijn M, Khairoun M, Korevaar S, Lievers E, Leuning D, Baan C, Jzermans J, Betjes M, vanKooten C, Fijter H, Rabelink T, Weimar W, Roelofs H, Hoogdijn M, Reinders M. Human bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells are immunosuppressive *in vitro* and in humanized allograft rejection model. *J. Stem. Cell Res. Ther.* 2013; 6(1):20780
- 843.** Vasanwala F, Kusam S, Toney L, Dent A. Repression of AP-1 function: a mechanism for the regulation of Blimp-1 expression and B lymphocyte differentiation by the B cell lymphoma-6 protooncogene. *J Immunol* 2002; 169:1922-1929
- 844.** Venigalla R, Tretter T, Krienke S. Reduced CD4+, CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+, CD25<sup>high</sup>, CD127<sup>-</sup>/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008; 58(7):2120-30.
- 845.** Verfaillie C. Adult stem cells: Assessing the case for pluripotency. *Trends in Cell Biology*. 2002; 12(11):502-508.
- 846.** Verschuere T, Vleeschouwer S, Lefranc F., Kiss R, Van Gool S. Galectin-1 and immunotherapy for brain cancer. *Expert Rev. Neurother.* 2011; 4: 533-543
- 847.** Veselska R, Kuglik P, Cejpek P, Svachova H, Neradil J, Loja T, Relichova J. Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme. *BMC Cancer*. 2006; 6:32 doi 10.1186/1471-2407-6-32
- 848.** Vicari A, Chiodoni C, Vaure C, Ait-Yahia S, Dercamp C, Matsos F. Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by Cp G immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *J Exp Med* 2002; 196:541-549
- 849.** Villa A, Rubio F, Navarro B, Bueno C, Martinez-Serrano A. Human neural stem cells *in vitro*. A focus on their isolation and perpetuation. *Biomed Pharmacother.* 2001; 55:91-95
- 850.** Villadangos J and Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets *in vivo*. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7:543-555.
- 851.** Voelkl S, Gary R, Mackensen A. Characterization of immunoregulatory function of human TCR- $\alpha\beta$ +CD4-CD8- double negative T cells. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41:739-748
- 852.** Vogel W, Grunebach F, Messam C, Kanz L, Brugger W, Buhning H. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 2003; 88:126-133.
- 853.** von Boehmer H, Teh H, Kisielow P. The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol Today* 1989; 10:57-61.
- 854.** von Bergwelt-Baildon M, Popov A, Saric T, Chemnitz J, Classen S, Stoffel M, Fiore F, Roth U, Beyer M, Debey S, Wickenhauser C, Hanisch F, Schultze J. CD25 and indoleamine 2, 3-dioxygenase are upregulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells *in vivo*: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood* 2006; 108:228-237.
- 855.** Waddington R, Roberts H., Sugars R, Schonherr E. Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation, *Eur. Cell Mater.* 2002; 6:12-21

- 856.** Wahl SM, Swisher J, McCartney-Francis N, Chen W. TGFbeta:the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 15-24
- 857.** Wakatsuki T, Kimura K, Kimura F, Shinomiya N, Ohtsubo M, Ishizawa M, Yamamoto M. A distinct mRNA encoding a soluble form of ICAM-1 molecule expressed in human tissues. *Cell Adhes Commun* 1995; 3: 283-292
- 858.** Walker L, Chodos A, Eggena M, Dooms H, Abbas A. Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med* 2003;198:249–258.
- 859.** Walker L. Regulatory T cells overturned: the effectors fight back. *Immunology* 2009; 126(4): 466-474
- 860.** Wallet M, Sen P, Tisch R. Immunoregulation of dendritic cells. *Clinical Medicine& Research* 2004; 3(3):166-175
- 861.** Wan Y, Flavell R. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature*. 2007; 445:766–70.
- 862.** Wang H, Hung S, Peng S, Huang C, Wei H, Guo Y, Fu Y, Lai M., Chen C. Mesenchymal stem cells in the Wharton’s jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004; 22:1330–1337
- 863.** Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort E, Huizinga T, Toes R. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4 T cells. *Eur J Immunol* 007;37:129–138.
- 864.** Wang J, Wang G, Sun B, Li H, Mu L, Wang Q, Li G, Shi L, Jin L, Kostulas N. Interleukin-27 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis during bone marrow stromal cell treatment. *J Autoimmun* 2008; 30:222-229.
- 865.** Wang M, Zhang W, Crisostomo P, Markel T, Meldrum KK, Fu XY, Meldrum DR. STAT3 mediates bone marrow mesenchymal stem cell VEGF production. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42: 1009-1015
- 866.** Wang Y, Deng B, Tang W, Liu T, Shen X. TGF- $\beta$ 1 secreted by hepatocellular carcinoma induces the expression of the Foxp3 gene and suppresses antitumor immunity in the tumor microenvironment. *Dig DisSci* 2013; 58:1644–52.
- 867.** Wang Y, Zhang A, Ye Z, Xie H, Zheng S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit acute rejection of rat liver allografts in association with regulatory T-cell expansion. *Transplant Proc* 2009; 41:4352-4356.
- 868.** Waterman R, Tomchuck S, Henkle S, Betancourt A. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS ONE* 2010; 5(4)Article ID e10088, 2010
- 869.** Watkins S, Zhu Z, Riboldi E, Shafer-Weaver K, Stagliano K, Sklavos M. FOXO3 programs tumor-associated DCs to become tolerogenic in human and murine prostate cancer. *J Clin Invest* 2011; 121:1361–1372
- 870.** Weber C, Weber KS, Klier C, Gu S, Wank R, Horuk R, Nelson PJ. Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1- like/CD45RO( ) T cells. *Blood* 2001; 97: 1144-1146
- 871.** Wegmann T, Huiin L, Guilbert L, Mosmann T. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: Is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today*. 1993; 14(7): 353-356.
- 872.** Weill- Engerer S, David J, Sazdovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, Schumacher M, Delacourte A, Baulieu E, Akwa Y. Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer’s and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(11): 5138-5143
- 873.** Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182:207–214.
- 874.** Weiss J, Bilate A, Gobert M, Ding Y, deLafaille M, Parkhurst C. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3 T reg cells. *J. Exp. Med.* 2012; 209:1723–1742
- 875.** Werling D, Jungi TW. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 2003;91:1-12.
- 876.** Wexler S, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows J. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal ‘stem’ cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British Journal of Haematology* 2003; 121(2):368–374

- 877.** Wickham M, Erickson G, Gimble J, Vail T, Guilak F. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clinical Orthopaedics and related research* 2003; 412:196–212.
- 878.** Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V., Wischhusen J, Bornemann A, Meyermann R, Weiss E, Melms A, Weller M. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: An alternative strategy of immune escape. *J. Immunol.* 2002; 168:4772–4780.
- 879.** Willert K, Brown J, Danenberg E, Duncan A, Weissman I, Reya T, Yates J, Nusse R, Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors, *Nature* 2003; 423:448-452
- 880.** Williams L, Rudensky A. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol.* 2007; 8:277–84.
- 881.** Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322:271–275.
- 882.** Wislet - Gendebien S, Leprince P, Moonen G, Rogister B. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 2003; 116:3295–3302.
- 883.** Wobser M, Voigt H, Houben R, Eggert A, Freiwald M, Kaemmerer U, Kaempgen E, Schrama D, Becker J. Dendritic cell based antitumor vaccination: impact of functional indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007; 56:1017–1024.
- 884.** Wohlfert E, Grainger J, Bouladoux N, Konkel J, Oldenhove G, Ribeiro C. GATA3 controls Foxp3(+) regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* 2011; 121:4503–4515.
- 885.** Wolff E, Wolff A, Du H, Taylor H. Demonstration of multipotent stem cells in the adult human endometrium by in vitro chondrogenesis. *Reprod Sci* 2007; 14:524–533.
- 886.** Wolfman N, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, Dube JL, DiBlasio-Smith E, Nove J, Song. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF- $\beta$  gene family. *J Clin Invest* 1997; 100:321-330.
- 887.** Woodbury D, Reynolds K, Black I. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *Journal of Neuroscience Research* 2002; 69:908–917.
- 888.** Woodbury D, Schwarz E, Prockop D, Black I. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research* 2000; 61, 364–370.
- 889.** Wright D, Kellermann A, Hertzberg V, Clark P, Frankel M, Goldstein F. ProTECT: A randomized clinical trial of progesterone for acute traumatic brain injury. *Ann Emerg Med.* 2007; 49(4): 391-404.
- 890.** Wu G, Nolte J, Jin Y, Barr M, Yu H, Starnes V, Cramer D. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation* 2003; 75(5):679–685.
- 891.** Xiao G, Wei J, Yan W, Wang W, Lu Z. Improved outcomes from the administration of progesterone for patients with acute severe traumatic brain injury: A randomized controlled trial. *Crit Care.* 2008; 12(2):R61.
- 892.** Xiao S, Jin H, Korn T, Liu S, Oukka M, Lim B. Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J. Immunol.* 2008; 181:2277–2284.
- 893.** Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998; 101:311-320
- 894.** Xu and Banchereau. The antigen presenting cells instruct plasma cell differentiation. *Frontiers in Immunology* 2014; 3: Article504
- 895.** Xu FF, Zhu H, Li XM, Yang F, Chen JD, Tang B, Sun HG, Chu YN, Zheng RX, Liu YL, Wang LS, Zhang Y. Intercellular Adhesion Molecule-1 Inhibits Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Impairs Bio-Scaffold-Mediated Bone Regeneration In Vivo. *Tissue Eng Part A* 2014 Jun 5; Epub ahead of print
- 896.** Xu J, Fu S, Peng W, Rao Z. MCP-1-induced protein-1, an immune regulator. *Protein Cell* 2012; 3: 903-910
- 897.** Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 2007; 178:6725–6729.

- 898.** Yan B, Liu Y. The nature of increased CD4+CD25-FoxP3+ T cells in patients with Systemic lupus erythematosus: a novel hypothesis. *The Open Rheumatology Journal* 2009; 3:22-24
- 899.** Yan B, Ye S, Chen G, Kuang M, Shen N, Chen S. Dysfunctional CD4+,CD25+ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon-alpha-producing antigen-presenting cells. *Arthritis Rheum* 2008; 58(3):801-12.
- 900.** Yanez R, Lamana M, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramire M, Bueren J. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 2006; 24:2582-91.
- 901.** Yang H, Zhang W, Zhao L, Li Y, Zhang F, Tang F, He W, Zhang X: Are CD4+CD25-Foxp3+ cells in untreated new-onset lupus patients regulatory T cells? *Arthritis Res Ther* 2009; 11:R153.
- 902.** Yang L and Carbone D. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction. *Adv.CancerRes.*2004; 92:13-27.
- 903.** Yang S, Li W, Liu W, Gao C, Zhou B, Li S, Li Y, Kong Y. IL-10 gene modified dendritic cells induced antigen-specific tolerance in experimental autoimmune myocarditis. *Clin Immunol* 2006; 121:63-73
- 904.** Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, Nam HY, Kim YH, Kim B, Park CG. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med* 2009; 41: 315-324
- 905.** Yang X. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity.* 2008; 29:44-56
- 906.** Yang Y, Chu W, Geraghty D, Hunt J. Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN-gamma. *J. Immunol.* 1996; 156:4224-4231
- 907.** Ye Z, Wang Y, Xie H, Zheng S. Immunossuppressive effects of rat mesenchymal stem cells: involvement of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7:608-614
- 908.** Yie S, Li L, Li G, Xiao R, Librach C. Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro. *Hum. Reprod.* 2006; 21:46-51.
- 909.** Yoshimura A, Muto G. TGF- $\beta$  function in immune suppression. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011; 350: 127-147
- 910.** Youd M, Blickarz C, Woodworth L, Touzjian T, Edling A, Tedstone J, Ruzek M, Tubo R, Kaplan J, Lodie T. Allogeneic mesenchymal stem cells do not protect nzbxnzw f1 mice from developing lupus disease. *Clin Exp Immunol* 2010; 161:176-186.
- 911.** Young R, Butler D, Weber W, Caplan A, Gordon S, Fink D, Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair, *J. Orthop.Res.*1998; 16: 406-413
- 912.** Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas D, Black K, Yu J. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 2004; 23:9392-9400
- 913.** Yun UJ, Park SE, Jo YS, Kim J, Shin DY. DNA damage induces the IL-6/STAT3 signaling pathway, which has antisenesence and growth-promoting functions in human tumors. *Cancer Lett* 2012; 323:155-160
- 914.** Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005; 106:1755-61.
- 915.** Zenclussen A, Gerlof K, Zenclussen M, Sollwedel A, Bertoja A, Ritter T. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: Adoptive transfer of pregnancy induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol.* 2005; 166(3):811-822.
- 916.** Zenclussen AC, Gentile T, Kortebani G, Mazzolli A, Margini R. Asymmetric antibodies and pregnancy. *AJRI* 2001; 45:289-294.
- 917.** Zhang B, Zhang X, Tang F, Zhu L, Liu Y, Lipsky P. Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2008; 67(7):1037-40.
- 918.** Zhao L, Duan W, Reyes M, Keene C, Verfaillie C, Low W. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats, *Exp. Neurol.* 2002; 174:11-20

- 919.** Zhao W, Wang Y, Wang D, Sun B, Wang G, Wang J, Kong Q, Wang Q, Peng H, Jin L, Li H. TGF-beta expression by allogeneic bone marrow stromal cells ameliorates diabetes in NOD mice through modulating the distribution of CD4+ T cell subsets. *Cell Immunol* 2008; 253:23-30.
- 920.** Zheng S, Wang J, Stohl W, Kim K, Gray J, Horwitz..TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generatead aptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J. Immunol.* 2006; 176: 3321–3329.
- 921.** Zheng S, Wang J, Wang P, Gray J, Horwitz, D. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+regulatory T cells and for expansion of these cells. *J. Immunol.* 2007; 178:2018–2027.
- 922.** Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz DA. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4 CD25- cells to CD25 Foxp3 regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol* 2007; 178: 2018-2027
- 923.** Zheng W, Flavell R. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89: 587-596
- 924.** Zheng Y, Chaudhry A, Kas A, Deroos P, Kim J, Chu T. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factorIRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 2009; 458:351–356.
- 925.** Zheng Y, Josefowicz S, Kas A, Chu T, Gavin M, Rudensky A. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature.* 2007; 445:936–40
- 926.** Zheng ZH, Li XY, Ding J, Jia JF, Zhu P. Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 22-30
- 927.** Zhou H, Guo M, Bian C, Sun Z, Yang Z, Zeng Y, Ai H, Zhao R. Efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease: clinical report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16:403-412.
- 928.** Zhou K, Zhang H, Jin O, Feng X, Yao G, Hou Y, Sun L. Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cell ameliorates the autoimmune pathogenesisin MRL/lpr mice. *Cell. Mol.Immunol.* 2008; 5:417-424
- 929.** Ziegler S and Buckner J. FoxP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microbes and infection* 2009; 11:594-598
- 930.** Ziegler S. FoxP3: Of mice and men. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; 24:209-226
- 931.** Zipori D. Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2004; 33:211-215
- 932.** Zischek C, Niess H, Ischenko I, Conrad C, Huss R, Jauch KW, Nelson PJ, Bruns C. Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of pancreatic carcinoma. *Ann Surg* 2009; 250: 747-753
- 933.** Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews.* 2006; 6:295-307
- 934.** Zou Y, Kottmann A, Kuroda M, Taniuchi I, Littman D. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998; 393:595-599.
- 935.** Zuk P, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte D, Huang J, Mizuno H, Alfonso C, Fraser J, Benhaim P, Hedrick M. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13:4279–4295.
- 936.** Zvaifler N, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards C, Moss J, Burger J, Maini R. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Research*, 2000; 2(6):477–488.

## Приноси

1. Изолиране характеризирание и доказване на МСК от костен мозък, мастна тъкан, стена от пъпна връв и децидуа.
2. Установяване на цитокиновата секреция на МСК.
3. Установяване на инхибиторен ефект на МСК върху цитокиновата секреция на Т лимфоцитите.
4. Установяване на инхибиторен ефект на МСК върху имуноглобулиновата секреция на В лимфоцитите.
5. Установяване на стимулиращ ефект на кондиционирана среда от МСК върху формирането на Tregs и секрецията им на IL-10.
6. Установяване на ефекта на МСК върху формиране на толерогенни дендритни клетки.
7. Установяване на влиянието на прогестерон върху имуносупресивни молекули, експресирани от МСК
8. Разработване на нов метод за култивиране на изолирани от ГБМ клетки и доказване на маркерите им за cancer stem cells.
9. Установяване експресия на PIVF от клетки изолирани и култивирани от ГБМ.
10. Установяване на идентичност между МСК и клетки изолирани и култивирани от ГБМ.
11. Кондиционирана среда от клетки изолирани и култивирани от ГБМ подтискат активацията на Т лимфоцитите.

# Публикации по темата

## Български списания

1. Kestendjieva S, Mourdjeva M, Kyurkchiev D, Mehandjiev Tz, Nickolova A, Kyurkchiev S. Isolation and characterization of umbilical vein mesenchymal stem cells. Compt. Rend. Bulg. Sci. 2006; 59:775-780
2. Bochev I, Kyurkchiev D, Tivchev P, Tzvetanov L, Kyurkchiev S Isolation and immunomodulatory activity of bone marrow mesenchymal stem cells Compt. Rend. Bulg. Sci.2006; 59:775-780
3. Кюркчиев Д, Пачаманов А. Стволови клетки- надежда за спасение или смъртен грях. Правен свят 2007; 3:116-119
4. Кестенджиева С, Кюркчиев Д, Цветкова Г, Механджиев Ц, Димитров А, Николов А, Кюркчиев С. Изследване на потенциала за диференциация на мезенхимни стволови клетки, изолирани от стената на пъпна вена. Съвременна Медицина 2008; 1:20-28
5. Бочев И, Кюркчиев Д, Цветанов Л, Алтънкова И, Тивчев П, Кюркчиев С. Характеристика на човешки мезенхимни стволови клетки, изолирани от мастна тъкан. Съвременна Медицина 2008;1:29-36
6. Бочев И, Кюркчиев Д, Иванова Годорова Е, Тивчев П, Алтънкова И, Кюркчиев С. Мезенхимни стволови клетки, изолирани от костен мозък, повлияват експресията на CD69 от моноцити. Съвременна Медицина 2009; 1-2:44-49

7. Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev D, Mourdjeva M, Dimitreov R, Stoyanova E, Timeva T, Yunakova M, Shterev A, Kyurkchiev S. Pre- decidual multipotent stromal cells (PreDMSC) constitutively express progesterone induced blocking factor (PIBF) Comp. Rend. Bulg. Sci. 2009; 62(12):1567-1570
8. Mourdjeva M, Ivanova Todorova E, Kyurkchiev D, Bochev I, Stoyanova E, Dimitrov R, Kyurkchiev S. Progesterone enhances the HLA-G expression in mesenchymal stem cells. Comp. Rend. Bulg. Sci.2009; 62(12):1567-1570
9. Иванова-Тодорова Е, Алтънкова И, Кюркчиев Д. Мезенхимните стволови клетки секретират фактори, увеличаващи експресията на FoxP3 и секрецията на IL-10 от Т- хелперните лимфоцити. Годишник на Българската асоциация по Клинична имунология 2010; 71-79
10. Тумангелова- Юзеир К, Найденов Е, Иванова- Тодорова Е, Младенова Ц, Начев С, Мурджева М, Кюркчиев Д. Клетки изолирани и култивирани от глиобластома мултиформе имат прилики с мезенхимни стволови клетки. Български медицински журнал 2013; VII (3):56- 60
11. Tumangelova-Yuzeir K, Ivanova-Todorova E, Nachev S, Velikova Ts, Naydenov E, Kyurkchiev D. Missing B7 in a part of antigen-presenting cells infiltrating glioblastoma multiforme Acad.Bulg. Sci. 2014; 67(7): 1005-1010
12. Тумангелова-Юзеир К, Иванова- Тодорова Е, Великова Ц, Найденов Е, Начев С, Кюркчиев Д. Периферни кръвни мононуклеарни клетки, изолирани от здрави хора, показват намалена способност за активация след култивиране със среда от клетъчни култури получени от глиобластома мултиформе. Годишник БАКИ 2014; 2015:58-70

## Чуждестранни списания

1. Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P, Kyurkchiev S. Mesenchymal stem cells from human bone-marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. Cell Biology International 2008; 32:384-393
2. Dimitrov R, Timeva T, Kyurkchiev D, Stamenova M, Shterev A, Kostova P, Zlatkov V, Kehayov I, Kyurkchiev S. Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. Reproduction 2008; 135:551-558
3. Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, Mehandjiev T, Dimitrov A, Nikolov A, Kyurkchiev S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. Cell Biology International 2008; 32:724-732
4. Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Kyurkchiev D, Bochev I, Stoyanova E, Dimitrov R, Timeva T, Yunakova M, Bukarev D, Shterev A, Tivchev P, Kyurkchiev S. HLA-G expression is up-regulated by progesterone in mesenchymal stem cells. American journal of reproductive immunology 2009; 62:25-33
5. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, Tivchev P, Altankova I, Kyurkchiev D. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared with bone-marrow derived mesenchymal stem cells Immunology Letters 2009; 126:37-42

6. Dimitrov R, Kyurkchiev D, Timeva T, Yunakova M, Stamenova D, Shterev A, Kyurkchiev S. First-trimester deciduas contain a population of mesenchymal stem cells. *Fertility and Sterility* 2010; 93:210-219
7. Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E , Kyurkchiev S. New target cells of the immunomodulatory effects of progesterone *Reproductive BioMedicine Online* 2010; 21:304-311
8. Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Murdjeva M, Kyurkchiev S Immunoregulation by progesterone: effects on immune cells and mesenchymal stem cells *Advances in Neuroimmune Biology* 2011; 1:105-123
9. Ivanova – Todorova E, Bochev I, Dimnitrov R, Belemezova K, Mourdjeva M, Kyurkchiev S, Kinov P, Altankova I, Kyurkchiev D. Conditioned medium from adipose tissue derived mesenchymal stem cells induces CD4+FoxP3+ cells and increases IL-10 secretion. *Journal of Biomedicine and biotechnology*. “Toward personalized cell therapies using stem cells” Volume 2012, Article ID 295167
10. Kyurkchiev D, Naydenov E, Tumangelova-Yuzeir K, Ivanova-Todorova E, Belemezova K, Bochev I, Minkin K., Mourdjeva M, Velikova Ts., Nachev S, Kyurkchiev S. Cells isolated from human glioblastoma multiforme express Progesterone induced blocking factor (PIBF). *Cell Mol Neurobiol* 2014; 34:479-489
11. Kyurkchiev D. Cancer stem cells from glioblastoma multiforme – culturing and phenotype. *OA Stem cells* 2014; 10;2(1):3
12. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belemezova K, Kyurkchiev S. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014; 6(5):552-570

## Глави от книги

1. Куркчиев Д., Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev S. Effect of progesterone on human mesenchymal stem cells. In Gerald Litwack, editor: 2011 *Vitamins and hormones*, Vol 87: Burlington: Academic press, 2011, pp. 217-234
2. Куркчиев Д., Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Kyurkchiev S. Differences between adipose tissue derived mesenchymal stem cells and bone marrow derived mesenchymal stem cells as regulator of the immune response. In M.A. Hayat editor: 2013. *Stem cells and cancer stem cells*, vol.10. Springer, pp 71-84