



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

КАЛИНА ПЕТЕВА БЕЛЕМЕЗОВА

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

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор”

в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт
по професионално направление 7.1. Медицина
докторска програма „Имунология”

Научен ръководител:

проф. д-р Доброслав Станимиров Кюркчиев, дмн

София, 2022

Дисертационният труд е написан на 184 страници. Съдържа 7 таблици и 31 фигури. Библиографията включва 503 литературни източника. Номерата на таблиците и фигурите не съответстват на номерацията им в дисертационния труд.

Изследванията са направени в Катедра по клинична имунология на Медицинския факултет към Медицински Университет – София; Лаборатория по Клинична имунология на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София; Тъканна Банка БулГен АД – София и Генетична лаборатория на САГБАЛ „Д-р Щерев“ – София.

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Медицинския факултет, МУ – София, ул. „Св. Георги Софийски“ 1 и са публикувани на интернет страницата на МУ – София.

Дисертационния труд е обсъден и насочен за защита на разширен катедрен съвет на Катедра по клинична имунология към Медицински факултет, МУ- София.

Научно жури

Външни членове:

1. проф. Андрей Иванов Чорбанов, дб – Институт по микробиология на Българска академия на науките
2. доц. Милена Сергеева Мурджева, дб – Институт по биология и имунология на размножаването на Българска академия на науките
3. доц. Иванка Георгиева Цачева, дб – Катедра по биохимия на Биологически факултет при СУ „Св. Климент Охридски“

Вътрешни членове:

1. доц. д-р Екатерина Иванова Иванова-Тодорова, дм – Катедра по клинична имунология на Медицински факултет при МУ - София
2. доц. д-р Снежина Михайлова Кандиларова, дм – Катедра по клинична имунология на Медицински факултет при МУ – София

Резервни членове:

1. проф. д-р Иванка Исталианова Димова, дм – Катедра по медицинска генетика на Медицински факултет при МУ – София
2. доц. Цветелина Павлова Велева-Орешкова - Институт по биология и имунология на размножаването на Българска академия на науките

Технически сътрудник: Аделина Даниелова Йорданова

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на **30.06.2022 г.** от 12:00 часа в Аула, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София, бул. „Академик Иван Евстратиев Гешов“ 15.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На латиница:

CFU-F	фибробластна колония-формираща единица
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte antigen
GVHD	graft-versus-host disease
HO	heme oxygenase
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IDO	Indoleamine-2,3-dioxygenase
IFN γ R	рецептор за интерферон γ
IFN γ	интерферон γ
iNOS	индуцируема азотен оксид синтаза
ISCT	Международно дружество по клетъчна терапия
MLR	mixed lymphocyte reaction
NF- κ B	nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells
PBMC	мононуклеарни клетки от периферна кръв
PD	Programmed Death
PD-L	Programmed Death ligand
PDT	време за популационно удвояване
PGE2	Prostaglandin E2
TGF β	Transforming growth factor β
TLR	Toll-like рецептор
TNF α	тумор некротизиращ фактор α
Treg	регулаторни Т-клетки
WJ	Wharton's jelly
WJ-MCK	мезенхимни стволови клетки от Wharton's jelly

На кирилица:

АПК	антиген-представящи клетки
АТ-МСК	адипозни мезенхимни стволови клетки
ЕК	клоногенната ефективност
КМ-МСК	костно-мозъчни мезенхимни стволови клетки
МСК	мезенхимни стволови клетки
МСК γ	мезенхимни стволови клетки третирани с IFN γ

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	6
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
МАТЕРИАЛИ	8
1. ПРОБИ ОТ ЧОВЕШКА ПЪПНА ВРЪВ	8
2. ПРОБИ ПЕРИФЕРНА ВЕНОЗНА КРЪВ ОТ ЗДРАВИ ДОНОРИ	8
МЕТОДИ	9
РЕЗУЛТАТИ	10
1. ИЗОЛИРАНЕ И КУЛТИВИРАНЕ НА МСК ОТ ПЪПНА ВРЪВ	10
2. ТРЕТИРАНЕ НА МСК С РАЗЛИЧНИ КОНЦЕНТРАЦИИ НА IFN γ	12
3. ФЕНОТИПИЗИРАНЕ НА МСК ОТ ПЪПНА ВРЪВ ТРЕТИРАНИ С IFN γ	12
4. МОРФОЛОГИЯ НА ТРЕТИРАНИТЕ С IFN γ МСК ОТ ПЪПНА ВРЪВ	15
5. КЛОНОГЕННА ЕФЕКТИВНОСТ НА МСК ОТ ПЪПНА ВРЪВ ТРЕТИРАНИ С IFN γ	16
6. РАСТЕЖНА КРИВА И ГЕНЕРАЦИОННО ВРЕМЕ НА КЛЕТЪЧНИТЕ КУЛТУРИ ТРЕТИРАНИ С IFN γ	17
7. ТЕСТ ЗА КЛЕТЪЧНА АПОПТОЗА	19
8. ЦИТОГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА КЛЕТКИ ТРЕТИРАНИ С IFN γ И КОНТРОЛНАТА ГРУПА НЕТРЕТИРАНИ МСК	21
9. ОСТЕОГЕННА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ	22
10. АДИПОГЕННА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ	24
11. ИЗСЛЕДВАНЕ НА КОНДИЦИОНИРАНИТЕ СРЕДИ ОТ ЧОВЕШКИ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ТРЕТИРАНИ С IFN γ И КОНТРОЛНАТА ГРУПА НЕТРЕТИРАНИ МСК ЗА НАЛИЧИЕТО НА IL-10, TGF β 1 И IDO	26
12. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МАРКЕРИ ВЪРХУ Т ЛИМФОЦИТИ ПОД ВЛИЯНИЕТО НА IFN γ	27
13. ИЗСЛЕДВАНЕ НА КОНДИЦИОНИРАНИТЕ СРЕДИ ОТ ЧОВЕШКИ РВМС КО-КУЛТИВИРАНИ С МСК ТРЕТИРАНИ С IFN γ ЗА НАЛИЧИЕТО НА IL-10, TGF β 1 И IDO.	29
ОБСЪЖДАНЕ	31
1. ВЛИЯНИЕ НА IFN γ ВЪРХУ ПРИРОДАТА И СВОЙСТВАТА НА МСК	34
1.1. Ефект на IFN γ върху морфологията на МСК от пъпна връв	35
1.2. Ефект на IFN γ върху фенотипа на МСК от пъпна връв	35
1.3. Ефект на IFN γ върху пролиферацията и клоногенността на МСК от пъпна връв	36

1.4.	<i>Ефект на IFNγ върху диференциацията на МСК от пълна връв</i>	37
1.5.	<i>Ефект на IFNγ върху степента на апоптоза на МСК от пълна връв</i>	37
1.6.	<i>Влияние на IFNγ върху хромозомната стабилност на МСК от пълна връв</i>	38
2.	ЕФЕКТ НА IFNγ ВЪРХУ МСК И ТЕХНИТЕ ИМУНОМОДУЛИРАЩИ СВОЙСТВА	38
2.1.	<i>Ефект на IFNγ върху експресията на МНС клас I и клас II</i>	39
2.2.	<i>Ефект на IFNγ върху експресията на PD-L1</i>	39
2.3.	<i>Ефект на IFNγ върху цитокиновата секреция на МСК</i>	40
2.4.	<i>Ефект на МСКγ върху T лимфоцити</i>	41
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	44
	БИБЛИОГРАФИЯ	46
	ИЗВОДИ	49
	ПРИНОСИ	50
I.	ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР	50
II.	ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР	50
III.	ПРИНОСИ С ДИСКУТАБИЛЕН ХАРАКТЕР	50
	ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ	51
1.	ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	51
2.	УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	51
3.	УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	52

ВЪВЕДЕНИЕ

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

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

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

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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

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

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

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

МАТЕРИАЛИ

1. Проби от човешка пъпна връв

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

2. Проби периферна венозна кръв от здрави донори

Проби периферна венозна кръв от здрави доброволци (на възраст между 22 и 48 год.) бяха получени след подписване на информирано съгласие. Като изключващи критерии бяха приети сърдечно-съдови, туморни, метаболитни, автоимунни и психични заболявания. От всеки донор бяха взети между 8 и 15 ml периферна венозна кръв във вакуумни епруветки BD Vacuntainer EDTA 4 ml. Непосредствено след пробовземането започваше процедурата по изолиране и култивиране на човешки мононуклеарни клетки от периферна кръв (PBMC).

МЕТОДИ



Фигура 1. Схематично обобщение на използваните методи в рамките на дисертационния труд.

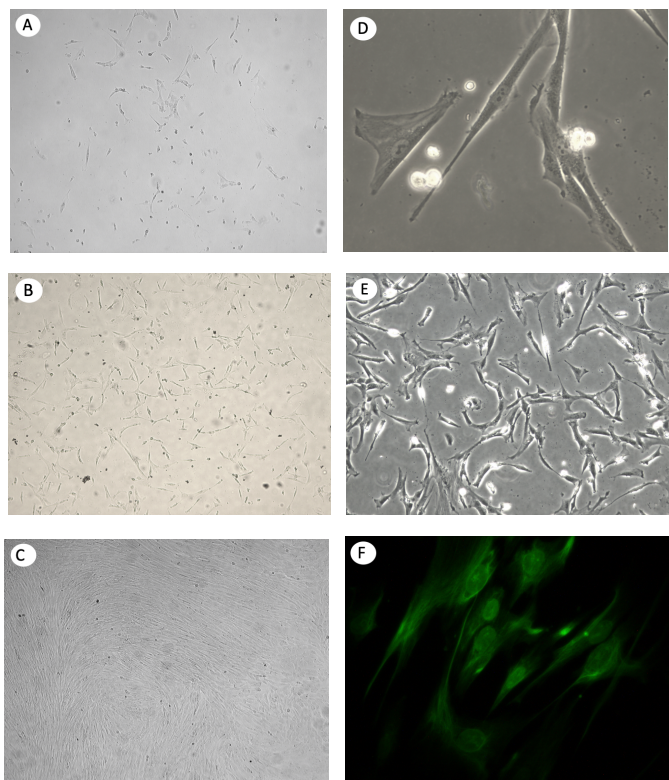
РЕЗУЛТАТИ

1. Изолиране и култивиране на МСК от пълна връв

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

Между втори и осми ден след началното посяване на изолираните МСК, в първичните култури ясно се наблюдаваха прилепнали фибробластоподобни клетки. В началото беше наблюдавана появата на първите единични прилепнали фибробластоподобни клетки с вретеновидна форма и сравнително малки размери, дифузно разпръснати измежду множество неадхерирани клетъчни типове. Между 7 и 12 ден клетките формираха плътен конфлуентен слой съставен изключително от удължени вретеновидни фибробластоподобни клетки (Фигура 2). Интензивната клетъчна пролиферация и хомогенността на културите се запазваха в продължение на 5 - 7 последователни пасажа.

Изследването на WJ-МСК беше допълнено чрез имунофлуоресценция за Vimentin (интермедиерен филамент при мезенхимни клетки). Отчетена беше силна позитивна реакция с характерно цитоскелетно оцветяване, в съответствие с вътреклетъчната му локализация (Фигура 2F).



Фигура 2. Светлинно-микроскопски снимки, представящи морфологията и степента на конfluентност на МСК от пънна връв на различни етапи от развитието на първичната клетъчна култура. (А) На ден 1 прилепналите клетки притежават фибробластоподобна морфология. (В) Ден 3 от началното посяване на МСК. (С) Клетките образуват пътен монослой между 7 и 10 ден (увеличение $\times 50$). (D) Фазово-контрастна микроскопска снимка на МСК (увеличение $\times 400$). (E) Фазово-контрастна микроскопска снимка на МСК (увеличение $\times 100$). (F) Имунофлуоресценция на МСК за Vimentin (увеличение $\times 400$).

Следователно нашите резултати показаха, че успешно усвоените и оптимизирани от нас работни протоколи ни позволиха да постигнем ефективни процедури за получаване на първични клетъчни култури от WJ-MCK.

2. Третиране на МСК с различни концентрации на IFN γ

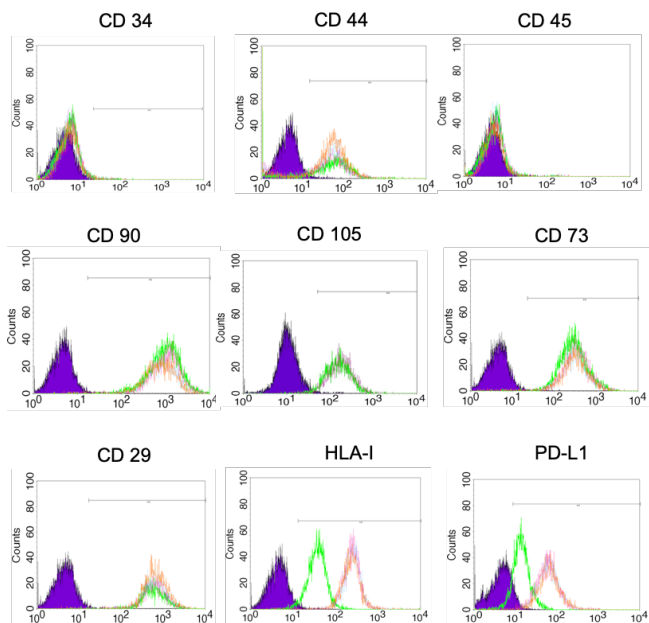
За да се определи подходяща концентрация на IFN γ за третирането на клетките в последващите експерименти, клетките бяха посяти в концентрация 1×10^5 клетки/ямка в 6-ямкови PVC плаки и третирани със следните концентрации IFN γ : 100 IU/ml, 200 IU/ml и 500 IU/ml за 5-7 дни (W. K. Chan et al., 2008; Prasanna et al., 2010). Свеж IFN γ се добавяше на всеки 48 часа. Флоуцитометричният анализ не отчете значими разлики в експресията на характерните за МСК маркери и свързаните с процеса на имunosupресия между трите варианта на третиране с IFN γ . Не се наблюдаваха и разлики в растежа и морфологията на клетките между трите използвани концентрации.

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

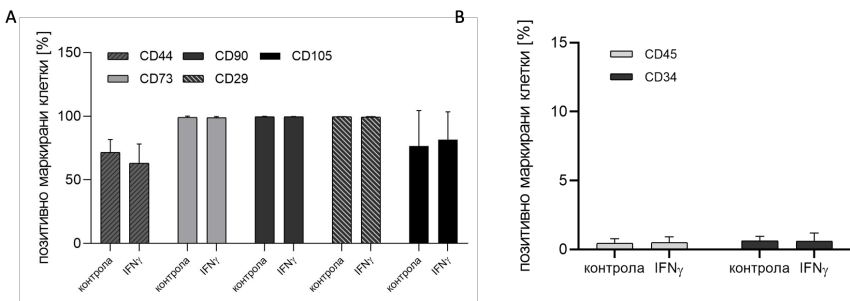
3. Фенотипизиране на МСК от пънна връв третиращи с IFN γ (FACS анализ)

Култивираните МСК от пънна връв от всички изследвани линии ($n = 8$) силно експресираха маркерните молекули характерни за МСК (представени като средна аритметична стойност \pm SD от процента позитивни клетки): CD29 (99.6 ± 0.05), CD44 (71.5 ± 10.14), CD73 (99.0 ± 0.99), CD90 (99.6 ± 0.32) и CD105 (93.5 ± 2.60) (Фигури 3 и 4A), и бяха негативни по отношение на хематопоетичните маркери CD45 (0.44 ± 0.34) и CD34 (0.63 ± 0.33) (Фигури 3 и 4B). Нетретираните контролни МСК също бяха позитивни за HLA-I (93.52 ± 2.60) и programmed death ligand 1 (PD-L1, 89.53 ± 3.41) (Фигури 3 и 5). След третирането на клетките с провъзпалителния цитокин IFN γ в продължение на пет дни, не се установи статистически значима разлика ($p = ns$) в процента позитивни клетки по отношение на следните маркери: CD29 (99.5 ± 0.20), CD44 (63.0 ± 15.16), CD73 (98.9 ± 0.80), CD90 (99.6 ± 0.25), CD105 (81.7 ± 21.77), CD45

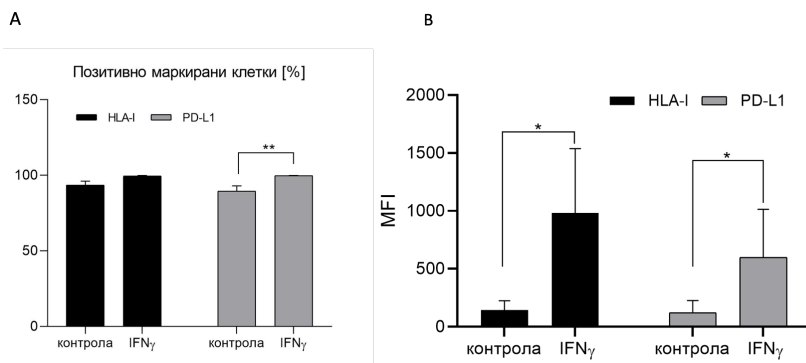
(0.49 ± 0.42), CD34 (0.61 ± 0.59), HLA-I (99.47 ± 0.32) (Фигура 4). Значително се увеличи процентът клетки, които експресират PD-L1 (99.7 ± 0.14) ($p < 0.01$) (Фигура 5A). Средната интензивност на флуоресценция (median fluorescence intensity, MFI) също беше анализирана и беше установено, че третираните с $IFN\gamma$ MCK притежават значително по-високи нива на MFI за следните маркери: HLA-I (980.43 ± 556.64) и PD-L1 (598.04 ± 416.90) в сравнение с MFI на третираните клетки за същите маркери – HLA-I (144.97 ± 78.5) и PD-L1 (122.05 ± 103.83) ($p < 0.05$) (Фигура 5B).



Фигура 3. Репрезентативно имунофенотипизиране на мезенхимни стволови клетки култивирани в присъствие на $IFN\gamma$ чрез FACS анализ (— автофлуоресцентна контрола; — контролни нетретиранни клетки; — MCK + $IFN\gamma$).



Фигура 4. Фенотипизиране на МСК от пълна връв на втори пасаж култивирани в присъствие на IFN γ . (A) МСК ($n = 8$) бяха позитивни за повърхностната експресия на CD44, CD73, CD90, CD29 и CD105, и (B) отрицателни за CD45 и CD34.



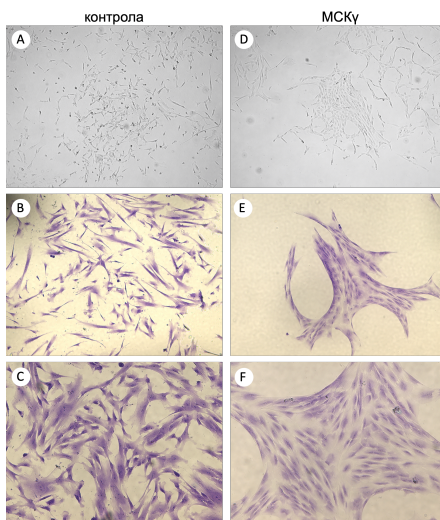
Фигура 5. Фенотипизиране на МСК от пълна връв на втори пасаж култивирани в присъствие на IFN γ . (A) Процент позитивно маркирани клетки за HLA-I и PD-L1 (** $p < 0.01$). (B) Средните аритметични стойности на флуоресцентния интензитет (MFI) за HLA-I и PD-L1 на третирани и контролни МСК (* $p < 0.05$). Резултатите са представени като средни аритметични стойности \pm SD.

Нашите резултати не разкриха експресия на нито един от посочените хемопоеични маркери, с което беше потвърдена високата степен на чистота на клетъчната култура и изключена възможността за контаминиращо присъствие на клетки, принадлежащи към хемопоеичния ред (Фигури 3 и 4B). По отношение на

характерния за МСК фенотипен комплекс от маркери CD73; CD90, CD29, CD105 и CD44, положителна реакция беше отчетена при анализираниите клетки (Фигури 3 и 4А), с което беше потвърдена съответно тяхната идентичност. Провъзпалителният цитокин IFN γ не промени експресията на хемопоеичните и характерните за МСК маркери, но повиши експресията на PD-L1 (процент клетки и MFI) и HLA-I (MFI) (Фигури 3 и 5).

4. Морфология на третираните с IFN γ МСК от пънна връв

След добавянето на IFN γ бяха наблюдавани промени в клетъчната морфология и начина на растеж на клетките. Третираните клетки образуваха плътни колонии с неправилна форма и структури подобни на мрежа (Фигура 6D, E, F), докато контролните клетки запазиха фибробластната си морфология и равномерно разпределение върху съда за клетъчно култивиране (Фигура 6А, В, С).



Фигура 6. Морфология на МСК третиран с IFN γ .

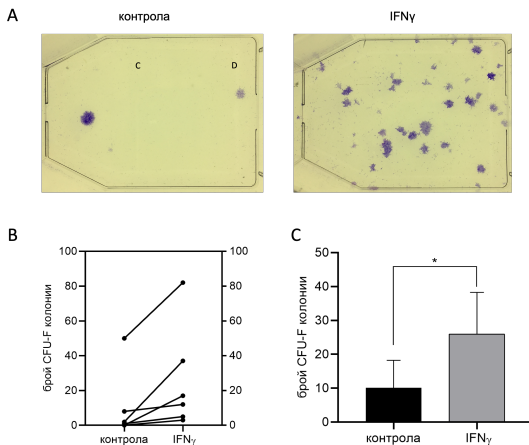
(A) Контролни МСК (увеличение, 50x). (B) Контролни клетки оцветени с Crystal violet (увеличение, 50x). (C) Контролни клетки оцветени с Crystal violet (увеличение, 100x). (D) Клетки третиран с IFN γ на ден 5 (увеличение, 50x). (E) МСК γ на ден 5 оцветени с Crystal (увеличение, 50x). (F) МСК γ на ден 5 оцветени с Crystal (увеличение, 100x).

Следователно нашите резултати показаха, че IFN γ води до промяна в морфологията и начина на растеж на култивираните в присъствие на провъзпалителния цитокин WJ-MCK.

5. Клоногенна ефективност на МСК от пъпна връв третиран с IFN γ

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

След като клетките бяха посяти в ниски концентрации, култивирани в продължение на две седмици и оцветени с Crystal violet, формираните колонии бяха макроскопски ясно видими (Фигура 7А). Резултатите от шестте експеримента показаха, че съществува ясна тенденция – третираните с IFN γ клетки притежават по-голям потенциал за клоногенен растеж спрямо контролните клетки (Фигура 7В). Резултатите от теста за клоногенна ефективност показаха, че когато образуват колонии (над 50 клетки) бяха преброени за всяка линия и представени като средни стойности \pm SD, контролните клетки образуват значително по-малко колонии спрямо третираните с IFN γ клетки (10.2 ± 8.0 срещу 26.0 ± 12.2 , респективно; $p < 0.05$) (Фигура 7С).



Фигура 7. Клоногенен растеж на контролни и третирани с IFN γ МСК от пънна връв. (А) Репрезентативен експеримент за определяне на броя CFU-F колонии образувани от контролни и третирани с IFN γ клетки, оцветени с Crystal violet след култивиране в продължение на 14 дни *in vitro*. (В) Сравнение на клоногенната ефективност между контролни и третирани с IFN γ клетки за всяка клетъчна линия. (С) Средни стойности \pm SD на CFU-F образуваните колонии (* $p < 0.05$).

Резултатите показваха, че IFN γ засилва клоногенната ефективност на WJ-MCK, като характерна особеност на колонията може да се посочи неправилната форма и наличието на плътен контакт между съставляващите ги клетки.

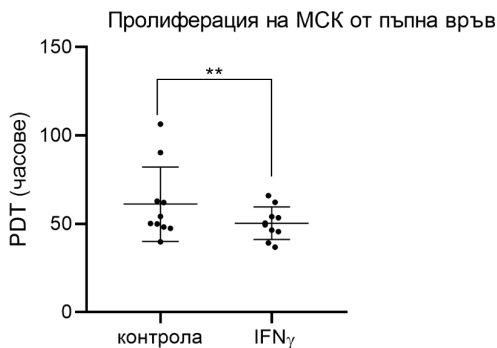
6. Растежна крива и генерационно време на клетъчните култури третирани с IFN γ

Една от основните характеристики на мезенхимните стволови клетки, показателна за недиференцирания им статус, е високата им *in vitro* пролиферативна активност. За оценка и съпоставка на пролиферативния потенциал на контролни и третирани с IFN γ МСК, беше приложен колориметричен тест (Alamar Blue assay), посредством който беше проследена динамиката на растеж на културите и определено времето на популационно удвояване. Стандартните криви, отразяващи зависимостта „брой клетки

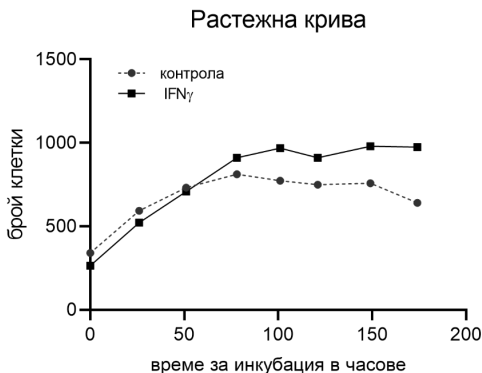
– абсорбция”, бяха построени на база спектрофотометричните показатели, отчетени за серия контролни култури, всяка от които е съставена от точно определен и предварително известен брой клетки.

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

Времето за популационно удвояване (population doubling time, PDT) на десет различни клетъчни линии беше изчислено и се установи, че МСК култивирани в присъствие на $IFN\gamma$ удвояват популацията си за по-кратко време спрямо контролните култури (50.345 ± 9.155 срещу 61.135 ± 21.110 , респективно; $p < 0.01$) (Фигура 8). Както е показано на репрезентативната растежна крива (Фигура 9), клетките влизат в \log фазата на културален растеж много бързо и растат експоненциално до ~ 78 h, когато достигат до плато, като клетките култивирани в присъствие на $IFN\gamma$ достигат до по-високи крайни концентрации.



Фигура 8. Време за популационно удвояване (PDT) на контролни и култивирани в присъствие на $IFN\gamma$ МСК, изчислено като се използва Alamar Blue assay (** $p < 0.01$).



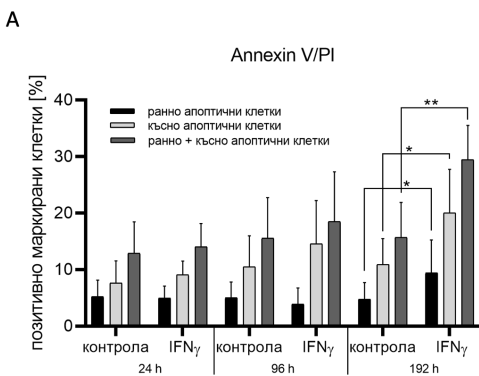
Фигура 9. Динамика на пролиферацията на МСК от пънна връв третирани с възпалителния цитокин IFN γ . Репрезентативна растежна крива.

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

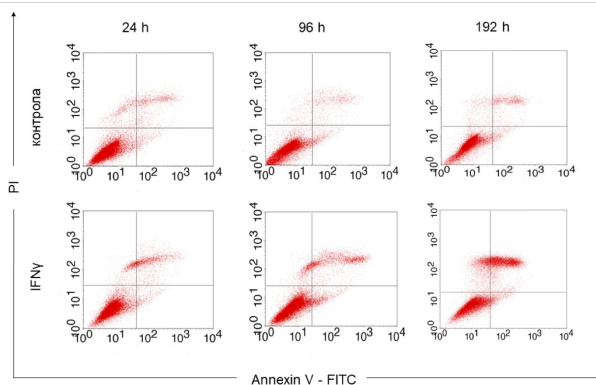
7. Тест за клетъчна апоптоза

Процентът апоптични клетки беше проследяван в продължение на осем дни ($n = 8$). Процентът клетки в ранна апоптоза (FITC Annexin V позитивни и PI негативни), късна апоптоза (FITC Annexin V позитивни и PI позитивни), и общият процент на клетки в апоптоза бяха измервани на три етапа. Контролните клетки бяха поддържани само в стандартна среда за клетъчно култивиране без IFN γ . Беше установено, че на осмия ден процентът клетки, които са третирани с IFN γ в ранна (9.418 ± 5.847) и късна апоптоза (20.052 ± 7.702) е по-голям в сравнение с процентът клетки в ранна (4.782 ± 2.951) и късна апоптоза (10.926 ± 4.565) при контролните клетки, култивирани само в среда ($p < 0.05$) (Фигура 10А). Същият резултат беше получен и по отношение на общия процент апоптични клетки. На ден осем сумарният процент клетки в апоптоза (Annexin V+/ Annexin V+ и PI+) култивирани в присъствие на IFN γ беше по-висок спрямо нетретираниите клетки (29.470 ± 6.59 спрямо 15.708 ± 6.190 , респективно; $p < 0.01$)

(Фигура 10А). Не беше открита статистически значима разлика между контролните и третираните с $IFN\gamma$ клетки на 24-ия и 96-ия час от стартирането на експеримента.



B

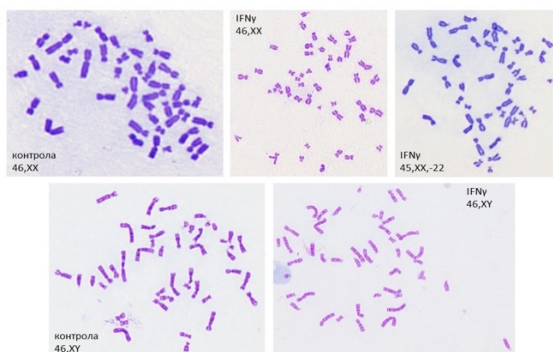


Фигура 10. Annexin V/PI флоуцитометричен анализ на процента МСК от пълна връв третиран с $IFN\gamma$ намиращи се в ранна и късна апоптоза, както и общия процент апоптични клетки. (А) Процент позитивно маркирани клетки измерен на три различни етапа. Резултатите са представени като среди аритметични стойности $\pm SD$ от 8 независими експеримента; (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). (В) Репрезентативни флоуцитометрични панели.

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

8. Цитогенетично изследване на клетки третиран с $IFN\gamma$ и контролната група нетретиран МСК

За да се изследва дали третирането на клетките с $IFN\gamma$ повлиява стабилността на клетъчния кариотип, от контролни и третиран с $IFN\gamma$ WJ-МСК бяха получени метафазни препарати. Бяха анализирани общо 67 метафази от контролни клетъчни култури и 56 от третиран с $IFN\gamma$ МСК. Всички кариотипи бяха изписани като нормални (Фигура 11). Установихме само една метафаза с липсваща хромозома 22 при третираните с $IFN\gamma$ клетки (кариотип: 45, XX, -22), която най-вероятно се дължи на лабораторните процедури по култивиране на клетките и получаване на метафазите и не е с достатъчна честота, за да се определи като клонална аберация според International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2013).



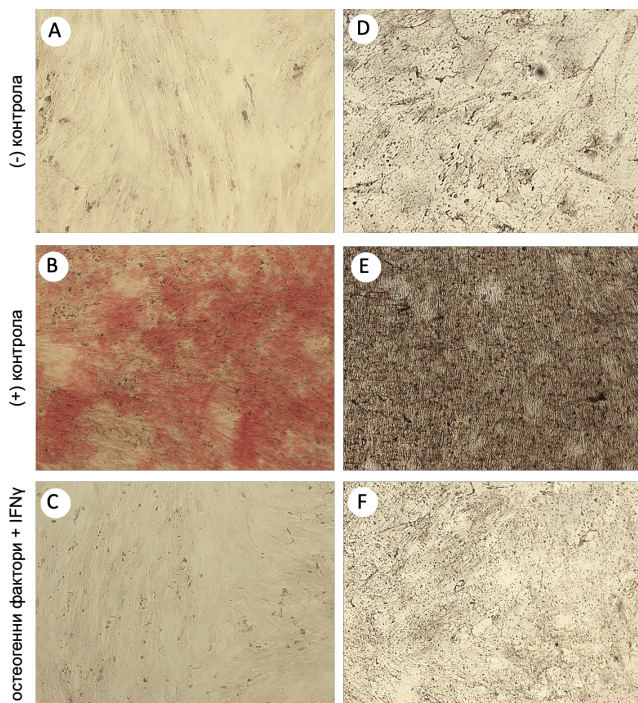
Фигура 11. Репрезентативни микроскопски снимки на метафази получени от контролни и третиран с $IFN\gamma$ клетъчни култури от WJ-МСК (увеличение $\times 1000$).

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

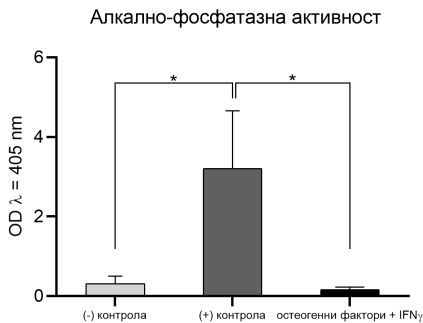
9. Остеогенна диференциация

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

След инкубиране на МСК с разтвор на AgNO_3 (оцветяване по von Kossa), при третираните в продължение на три седмици с диференциращи агенти МСК беше наблюдавано под инвертен микроскоп характерно черно оцветяване (Фигура 12Е), което е показател за наситеното присъствие на Ca_3PO_4 в екстрацелуларния матрикс. След фиксиране на клетките и оцветяване с багрило ализарин ред беше наблюдавано ярко червено оцветяване, с което беше потвърден успешно индуцирания процес на остеогенеза при изследваните клетки (Фигура 12В). При контролните култури от МСК (Фигура 12А и D), поддържани в среда без диференциращи фактори, не бяха детектирани минерални Ca^{2+} и при двата типа оцветяване. Клетките култивирани в присъствие на $\text{IFN}\gamma$ не се диференцираха *in vitro* и не се установи специфично оцветяване на Ca^{2+} кристали с Alizarin red и Von Kossa (Фигура 12С и F). Този резултат се потвърди и от данните за алкално-фосфатазната активност – при клетките третирани с $\text{IFN}\gamma$ се установиха 19.9- пъти по-ниски нива на активността на алкалната фосфатаза (0.161 ± 0.06) спрямо активността при клетки третирани само с фактори за остеогенна диференциация (позитивна контрола) (3.209 ± 1.44) ($p < 0.05$). Измерените стойности при третираните с $\text{IFN}\gamma$ клетки бяха близки до тези на клетките култивирани само в стандартна среда (0.314 ± 0.18) (Фигура 13).



Фигура 12. Ефект на $IFN\gamma$ върху способността за остеогенна диференциация на МСК от пъпа в *in vitro*. (A-F) Остеогенната диференциация беше потвърдена чрез специфични оцветявания - Alizarin red (A-C, A – контролни МСК, нетретирани с остеогенни фактори, B –успешно диференцирани клетки, C – клетки третирани с фактори за остеогенна диференциация и $IFN\gamma$); Von Kossa (D-F, D – контролни МСК, нетретирани с остеогенни фактори, E – успешно диференцирани клетки, F - клетки третирани с фактори за остеогенна диференциация и $IFN\gamma$)



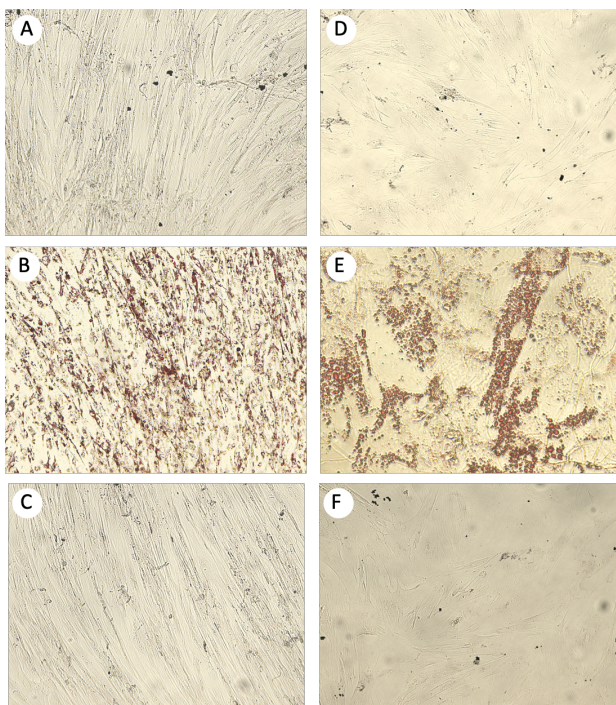
Фигура 13. Ефект на IFN γ върху способността за остеогенна диференциация на МСК от пънна връв *in vitro*. Количествено измерване на алкално-фосфатазната активност (резултатите представят средни аритметични стойности \pm SD от 8 независими експеримента; * $p < 0.05$).

Получените резултати показват, че в присъствие на IFN γ МСК от пънна връв губят способността си да се диференцират остеогенно.

10. Адипогенна диференциация

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

контроли) начин.



Фигура 14. Ефект на $IFN\gamma$ върху способността за адипогенна диференциация на МСК от пънна връв *in vitro*. (A-F) Оцветяване с Oil red O на натрупаните в клетките липидни вакуоли (A и D – контролни недиференцирани клетки, B и E – позитивна контрола на диференциация, C и F – клетки третирани с $IFN\gamma$ и адипогенни фактори); A, B и C- увеличение x 100, D, E и F- увеличение x 400.

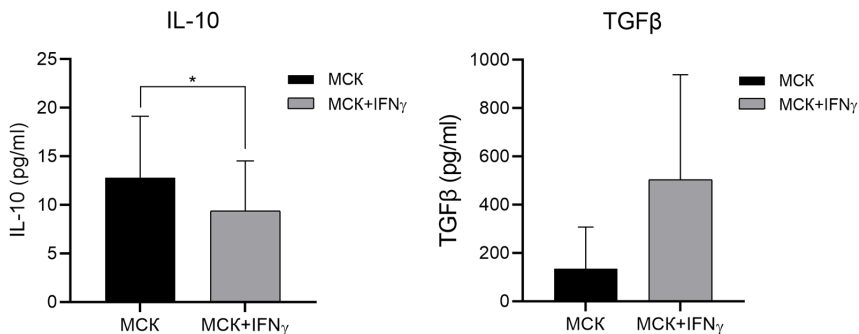
Нашите резултати показват, че под действието на $IFN\gamma$ МСК от пънна връв губят потенциала си за адипогенна диференциация.

11. Изследване на кондиционираните среди от човешки мезенхмни стволови клетки третиранни с IFN γ и контролната група нетретиранни МСК за наличието на IL-10, TGF β и IDO

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

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

Резултатите за IL-10 и TGF β 1 са представени като средни аритметични стойности \pm SD от измерванията на 8 неразредени проби, всяка в две повторения. Данните са представени като pg/ml. Резултатите показаха, че под влиянието на IFN γ , секретията на IL-10 от МСК намалява (12.808 ± 6.317 спрямо 9.414 ± 5.121 , респективно; $p < 0.05$) (Фигура 15). Обратно, при третираните с IFN γ МСК от пъпна връв се наблюдаваше тенденция за увеличаване на секретията на TGF β 1 спрямо контролните култури, въпреки, че резултатите нямаха статистическа значимост (135.729 ± 172.582 срещу 504.060 ± 434.329 , респективно; $p = ns$) (Фигура 15).



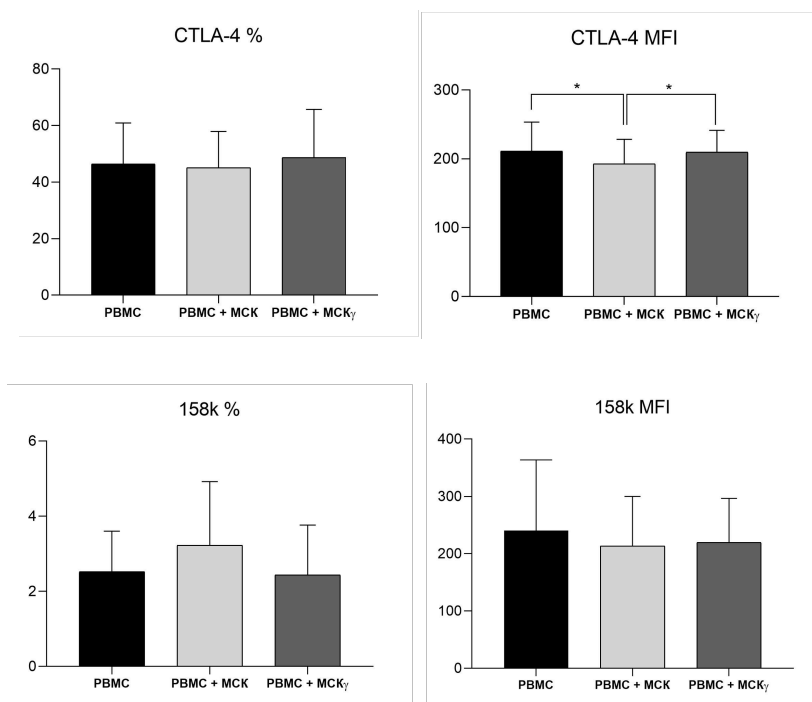
Фигура 15. Секреция на IL-10 и TGFβ1 от MCK, култивирани в присъствие на IFN γ (* $p < 0.05$).

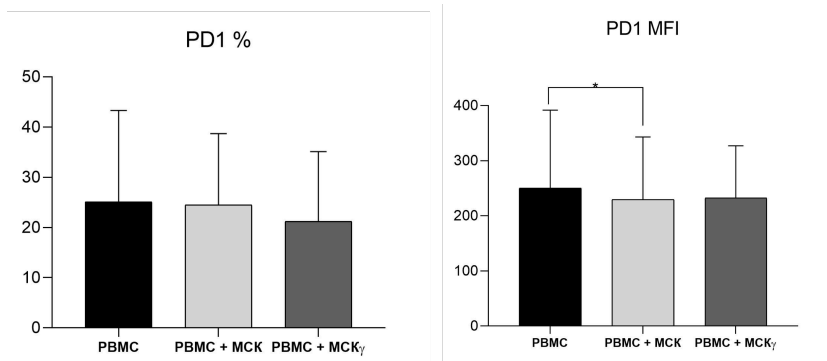
Следователно нашите резултати показаха, че под влиянието на IFN γ , секрецията на IL-10 от WJ-MCK намалява, докато тази на TGFβ има тенденция да се увеличава.

12. Определяне на маркери върху Т лимфоцити под влиянието на IFN γ

Влиянието на мезенхимни стволови клетки от пъпна връв, третирани с IFN γ , върху повърхностната експресия на Т лимфоцити беше изследвано в култури от човешки периферни мононуклеарни клетки (PBMC). В първия етап на опитната постановка изолираните MCK на първи пасаж бяха посявани и „праймирани“ с 100 IU/ml IFN γ в рамките на 4-5 дни, като свеж IFN γ беше добавян на всеки 48 часа. Паралелно бяха култивирани контролни MCK в стандартна среда. В следващия етап към MCK γ бяха добавяни 2×10^6 клетки/ямка PBMC. Отделно бяха посявани само PBMC (2×10^6 клетки/ямка) и култивирани в среда DMEM/F12 + 10% FBS с или без 100 IU/ml IFN γ (Фигура 18). PBMC бяха ко-култивирани с MCK γ за 48 часа, след което експресията на CD152 (CTLA4), CD273 (PD1) и KIR3DL2 (158k) от Т лимфоцити беше анализирана чрез флуоцитометричен анализ. Резултатите показаха, че под влиянието на MCK (култивирани в стандартна среда) средната интензивност на флуоресценция (median fluorescence intensity, MFI) на CTLA-4 намалява (192.714 ± 35.631) спрямо

култивираните само в среда PBMC (211.286 ± 42.106 , $p < 0.05$). Когато PBMC се ко-култивират с „праймирани“ MCK (MCK γ), интензивността на експресия на CTLA-4 отново се покачва (209.571 ± 31.68 , $p < 0.05$). Не се установиха статистически значими разлики в процента експресиращи CTLA-4 изследвани клетки: PBMC (46.4 ± 14.5), PBMC + MCK (45.1 ± 12.8), PBMC + MCK γ (48.7 ± 17), $p = ns$. По отношение на клетките експресиращи 158k, не се установиха статистически значими разлики както за процента експресиращи клетки, така и за интензитета на експресия ($p = ns$). Процентът Т лимфоцити експресиращи PD1 не се промени значимо след ко-култивирането им с MCK и MCK γ ($p = ns$). Въпреки това, при ко-култивиране на PBMC с MCK интензитетът на експресия (MFI) се намали значимо (250.0 ± 141.563 спрямо 229.125 ± 113.843 , респективно, $p < 0.05$) (Фигура 16).





Фигура 16. FACS анализ на PBMC ко-култивирани с MCK/MCK γ . Данните са представени като средни аритметични стойности \pm SD (* p <0.05).

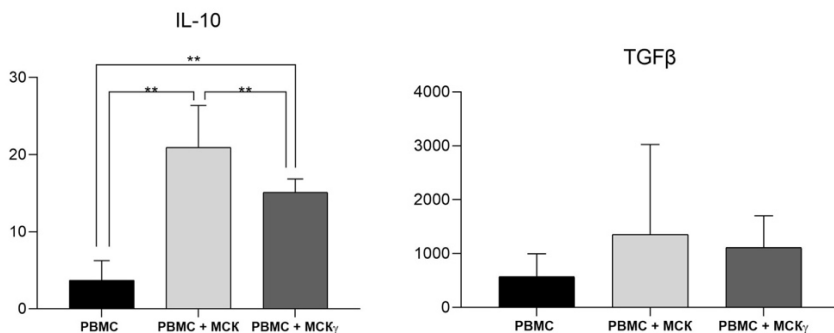
Нашите резултати показаха, че когато WJ-MCK се ко-култивират в присъствието на IFN γ , интензитетът на експресията от Т лимфоцитите CTLA-4 значително намалява, докато третираните с IFN γ WJ-MCK засилват обратно нивото на експресия на CTLA-4. Получените от нас данни сочат, че експресията на PD-1 от Т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

13. Изследване на кондиционираните среди от човешки PBMC ко-култивирани с MCK третирани с IFN γ за наличието на IL-10, TGF β и IDO

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

Резултатите за IL-10 и TGF β 1 са представени като средна стойност от измерванията на 10 неразредени проби, всяка в две повторения. Когато PBMC се ко-култивират с

контролни МСК (нетретирани с $IFN\gamma$) секрецията на IL-10 се повишава значително (** $p < 0.01$). Ако се използват МСК γ концентрацията на IL-10 намалява (** $p < 0.01$), но остава значително по-висока спрямо измерената при РВМС (** $p < 0.01$). Аналогична е тенденцията по отношение на TGF β 1, макар че резултатите нямаха статистическа значимост ($p = ns$) (Фигура 17).



Фигура 17. Графично представени данни за концентрациите на IL-10 и TGF β 1 измерени в кондиционирани среди от РВМС ко-култивирани с МСК/МСК γ , представени като средни аритметични стойности (pg/ml) \pm SD (** $p < 0.01$).

Следователно нашите резултати показаха, че концентрацията на IL-10 се увеличава когато РВМС се ко-култивират с WJ-МСК. Когато се използват МСК от пъпна връв третирани с $IFN\gamma$ се отчита намаляване на IL-10, но стойностите се запазват значително по-високи отколкото в кондиционирани среди само от РВМС. По отношение на TGF β 1 се наблюдава аналогична тенденция, но без статистическа значимост на резултатите.

ОБСЪЖДАНЕ

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

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

Добре известен факт е, че МСК от различни тъкани не притежават напълно еднакви характеристики. Това важи с особена сила за репродуктивните тъкани, където по време на бременност МСК са подложени на въздействието на огромно разнообразие

от цитокини, продуцирани от различните имунни клетки, които се откриват там (Hass et al., 2011).

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

McElreavey et al. за първи път съобщават за изолиране на фибробластоподобни клетки от Wharton's jelly на човешка пъпна връв през 1991 г. (McElreavey et al., 1991). Клетките, получени от пъпна връв, имат подобен повърхностен фенотип, прилепват върху съдове за клетъчно култивиране и притежават мултипотентност като тези на МСК, получени от други източници. В допълнение пъпната връв се счита за медицински отпадък и изолирането на МСК е неинвазивно и не е обременено с етични проблеми. Ето защо, ние избрахме в настоящия дисертационен труд да работим именно с МСК изолирани от човешка пъпна връв, като вземем предвид възможните вариации спрямо публикуваните от други автори резултати работещи с МСК от различни тъкани.

Представените в настоящия дисертационен труд резултати условно могат да бъдат разделени в две групи, като първата обхваща данни, получени от характеристика на изолирани, *in vitro* култивирани и третиращи с $IFN\gamma$ WJ-МСК по отношение на основни параметри като морфология, клоногенност, динамика на пролиферация, имунофенотип, ниво на апоптоза, хромозомна стабилност и потенциал за диференциация в остеогенна и адипогенна насока. Тази група изследвания имаше две основни направления. Първото от тях е свързано с необходимостта клетките да бъдат изчерпателно характеризирани и идентифицирани като МСК, съобразно критериите,

определени от Международната асоциация по клетъчна терапия (Dominici et al., 2006), които засягат някои от споменатите по-горе биологични (цитологични) показатели. Според минималните изисквания за дефиниране, МСК задължително: а) представляват адхезивна популация от клетки при стандартни условия за култивиране, които б) експресират повърхностните молекули CD73, CD90 и CD105, но не и хемопоеични маркери и в) проявяват мултипотентни свойства като се диференцират в остеоласти, адипоцити и/или хондроцити (Dominici et al., 2006). Второто направление беше паралелно да се проследи ефекта на IFN γ върху всички описани по-горе параметри. Другата група резултати представени в дисертационния труд се отнася за влиянието на IFN γ върху имуномодулиращата активност на WJ-МСК.

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

Принадлежността на култивираните от нас хомогенни популации WJ-МСК, както и функционалната им пълноценност, бяха категорично доказани след фенотипни и диференциационни анализи. С помощта на флуоцитометричен анализ беше изследвана експресията от страна на изолираните клетки на редица идентифициращи повърхностни протеини. Резултатите показаха, че клетките са отрицателни за ключовите повърхностни хемопоеични маркери CD34; CD45, но експресират типичните за мезенхимните стволови клетки CD29, CD44, CD73, CD90 и CD105. Установи се също така, че клетките се позитивират за Vimentin. Тези данни изключват възможността за отношение на изследваните от нас клетки към хемопоеичния ред, като същевременно потвърждават фенотипния им облик на мезенхимни стволови клетки.

Освен това, резултатите от проведените проучвания върху диференциационния потенциал показваха, че след третирането им с диференциращи агенти са налице всички признаци (екстрацелуларно отлагане на Ca^{2+} ; повишена алкално-фосфатазна активност; клетъчни включения от неутрални липиди), доказващи бипотентните им (остеогенни и адипогенни) свойства, което е сигурен показател за принадлежността им към мезенхимните стволови клетки.

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

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

1. Влияние на IFN γ върху природата и свойствата на МСК

Има много изследвания върху имуномодулаторния ефект на претретираните с IFN γ МСК, но няма достатъчно информация за това дали и как възпалителната среда влияе на природата и свойствата на мезенхимните стволови клетки. Както вече стана ясно, IFN γ е един от основните, но не е единственият цитокин във възпалителната среда, неговата концентрация може да варира в зависимост от конкретното заболяване или възпалително състояние. Това са фактори, които трябва да се вземат предвид при

интерпретацията на получените данни в контекста на възможно клинично приложение на МСКγ.

1.1. Ефект на IFNγ върху морфологията на МСК от пънна връв

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

1.2. Ефект на IFNγ върху фенотипа на МСК от пънна връв

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

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

1.3. Ефект на $IFN\gamma$ върху пролиферацията и клоногенността на МСК от пъпна връв

Нашите резултати показваха, че МСК γ имат по кратко време за популационно удвояване (PDT) спрямо контролните клетки, достигайки по-висока концентрация за седем дни. Тези резултати съответстват с данните ни за клоногенната ефективност на МСК от пъпна връв в условия на възпаление – не само, че клетките растяха по-бързо, но и се отчете по-голям брой CFU-F спрямо контролните култури. Справката ни в литературата намери данни, че възпалителната среда влияе върху динамиката на клетъчна пролиферация на МСК от мастна тъкан, но намереният ефект е противоположен: концентрацията на клетките намалява (Crop et al., 2010). КМ-МСК третиран с възпалителни цитокини също показват по-слаб пролиферативен потенциал спрямо нетретираните клетки (Croitoru-Lamoury et al., 2011; Prasanna et al., 2010). Авторите установили, че процесите свързани с клетъчната пролиферация се инхибират при МСК от костен мозък под действието на $IFN\gamma$, което е свързано с активацията на кинунериновия път и последващото изчерпване на триптофан (Croitoru-Lamoury et al., 2011). В допълнение, МСК от зъбна пулпа третиран с $IFN\gamma$ запазват пролиферативния си потенциал, но способността им за диференциация намалява значително (Strojny et al., 2015).

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

1.4. Ефект на IFN γ върху диференциацията на МСК от пълна връв

Данните за потенциала за остеогенна и адипогенна диференциация на МСК γ в литературата отново за много противоречиви. Нашите резултати категорично показваха, че МСК γ губят способността си да се диференцират остеогенно и адипогенно в *in vitro* условия. Важно е да се отбележи, че изборният от нас подход за остеогенна диференциация се основава не само на хистологично оцветяване, но и на приложението на високо чувствителен колориметричен тест за определяне нивата на алкално-фосфатазна активност, който позволява количествено отчитане с голяма точност на различия в степента на остеогенна диференциация при третираните с IFN γ WJ-МСК.

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

1.5. Ефект на IFN γ върху степента на апоптоза на МСК от пълна връв

Нашите данни показват, че повишеният пролиферативен потенциал на клетките върви паралелно с по-висок процент клетки намиращи се в ранна и късна апоптоза на ден осем от култивирането на МСК от пълна връв с IFN γ . Базирайки се както на собствените ни наблюдения, така и на изложената в специализираната литература информация, можем да твърдим, че възпалителната среда и в частност един от основните цитокини характерен за нея - IFN γ , засилва апоптозата на WJ-МСК γ в *in vitro* условия, като механизмите зад този ефект може да се различават при различните видове МСК и използваните експериментални постановки.

1.6. Влияние на IFN γ върху хромозомната стабилност на МСК от пълна връв

Потенциалът и възможното използване на мезенхимни стволови клетки в изследвания и терапевтични приложения разчитат на тяхната геномна стабилност. Клетките трябва да бъдат намножени *in vitro*, за да постигнат очаквания терапевтичен ефект. Заради противоречивата информация в литературата, ние сметнахме за необходимо да изследваме ефекта на IFN γ върху хромозомната стабилност на МСК от пълна връв в *in vitro* условия, особено като вземем предвид данните, които получихме за бързата пролиферация и по-големия процент апоптични клетки в условията на възпаление.

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

2. Ефект на IFN γ върху МСК и техните имуномодулиращи свойства

Възпалителната среда предшества способността на МСК да потискат имунните отговори. IFN γ , в комбинация с някои други провъзпалителни цитокини като TNF α , IL-1 α или IL-1 β , могат да стимулират МСК да секретират високи нива на имunosупресивни фактори. МСК могат да потискат Т клетките и чрез използване на

механизми, които се осъществяват при контакт клетка:клетка, сред които особено важни са PD-L1 / PD-1 пътя, отрицателната костимулаторна молекула B7-H4 и CD200/CD200R взаимодействието, toll-подобни рецептори (TLRs) и взаимодействието FasL/Fas (Augello et al., 2005).

2.1. Ефект на IFN γ върху експресията на МНС клас I и клас II

В литературата има множество данни, че IFN γ засилва експресията на МНС клас I молекули и отключва експресията на МНС клас II молекули, което предполага, че е възможно МСК да могат да придобиват свойства на антиген-представящи клетки (J. L. Chan et al., 2006; W. K. Chan et al., 2008; Crop et al., 2010). Нашите данни също показваха, че под действието на IFN γ МСК от пълна връв засилват експресията си на МНС клас I.

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

2.2. Ефект на IFN γ върху експресията на PD-L1

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

2.3. Ефект на $IFN\gamma$ върху цитокиновата секреция на МСК

2.3.1. Секреция на $IL-10$ и $TGF\beta 1$ от МСК γ

Един от цитокините, които са много дискутирани в литературата по отношение на имуномодулаторните свойства на МСК е $IL-10$. Въпреки това данните за неговата секреция от МСК са много противоречиви, като една част от авторите откриват секрецията му (Ben-Ami et al., 2011; Bernardo & Fibbe, 2013; Blaber et al., 2012; Gebler et al., 2012; Ma et al., 2014), а другата част – не (Ivanova-Todorova et al., 2012; Kilroy et al., 2007; Newman et al., 2009; Park et al., 2009).

Нашите данни показваха, че под влиянието на $IFN\gamma$ мезенхимни стволови клетки от пъпна връв намаляват секрецията си на $IL-10$ (статистически значимо) и увеличават секрецията на $TGF\beta 1$ (без статистическа значимост, но с ясна тенденция). Справката ни в литературата намери данни, че подобно на $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ може да потисне секрецията на $IL-10$, когато се използва в по-високи дози. Едно възможно обяснение на тези резултати е, че МСК бързо реагират на възпалителната среда и секретират $IL-10$ в големи количества само в началото. Németh et al. 2009 описват, че концентрацията на $IL-10$ е повишена на 6 и 12 час и след това намалява на 24 час от началото на възпалението (Németh et al., 2009). МСК се поляризират в имуносупресивен фенотип (МСК тип 2), като след силната секреция на $IL-10$ неговата концентрация намалява и МСК започват усилено да секретират други цитокини и/или растежни фактори, включително $TGF\beta$ (Németh et al., 2009). От друга страна, Prasanna et al. 2010 откриват, че секрецията на $IL-10$ от КМ-МСК се повишава, когато клетките са праймирани с $IFN\gamma$ (Prasanna et al., 2010). Нашите данни не проследяват секрецията на $IL-10$ и $TGF\beta$ във времето, но предвид получените резултати и противоречивата информация в литературата за секрецията на $IL-10$ от МСК, подобни изследвания ще са част от бъдещи наши проучвания.

2.3.2. МСК γ и IDO

Кинурениновият път (КР) на метаболизма на триптофана е свързан с антимикробни ефекти и модулиране на имунните отговори. МСК не експресират IDO

конститутивно, но неговата секреция се индуцира от IFN γ (Croitoru-Lamoury et al., 2011). Добре известно е, че потискащият ефект на МСК корелира със секрецията на IDO, която понижава пролиферацията на активирани Т клетки и NK клетки (Krampera et al., 2006).

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

2.4. Ефект на МСК γ върху Т лимфоцити

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

2.4.1. Ефект на МСК γ върху експресията на CTLA-4, CD158k и PD-1 от Т лимфоцити

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

След като нашите резултати показаха, че IFN γ засилва експресията на MHC I от WJ-MCK γ , логично беше да изследваме и експресията на CD158k от T лимфоцити в присъствие на „праймирани“ WJ-MCK. Справката ни в литературата не намери информация по темата, но на база на нашите данни бихме могли да заключим, че IFN γ не повлиява експресията на CD158k от T лимфоцити.

Третият повърхностен протеин, чиято експресия върху T лимфоцити изследвахме в присъствие на WJ-MCK γ беше PD-1. Молекулата на имунологичната контролна точка PD-L1 е решаващ регулатор на T-клетъчния имунен отговор. Свързването на PD-L1 с PD-1 рецептора върху T клетките потиска тяхната пролиферация и води до апоптоза. Известно е, че възпалителният цитокин IFN γ води до увеличаване на повърхностната експресия и секреция на PD-L1 (Strauch et al., 2020). Нашите резултати показаха, че когато MCK от пълна връв се ко-култивират с PBMC, експресията на PD-1 върху T клетките намалява значително. Този резултат може да се дължи на потискането на T-клетъчния имунен отговор и последващата апоптоза на T клетките (функционален ефект) или наличие на секретиремата форма на PD-L1 в средата, която да се свързва с PD-1 върху T лимфоцитите и технически да замаскира неговата експресия.

2.4.2. *Ефект на MCK γ върху секрецията на IL-10, TGF β 1 и IDO*

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

Когато измерихме концентрацията на IL-10 и TGF β 1 в културалните среди събрани след ко-култивиране на РВМС с МСК в присъствие на IFN γ установихме, че когато РВМС се култивират с непраймирани МСК, концентрацията на IL-10 се покачва значително. В присъствието на IFN γ , обаче, концентрацията на IL-10 значително намалява. Аналогичен ефект върху секрецията на IL-10 е описан от Lotfinia et al., но КМ-МСК не са третирани с провъзпалителни цитокини, а са предварително култивирани в условия на хипоксия за различен период от време. Авторите публикуват, че кондиционираната среда от хипоксичните КМ-МСК потиска секрецията на IL-10 от РВМС (Lotfinia et al., 2017).

Неочаквано, секрецията на противовъзпалителният цитокин IL-10 намалява, когато РВМС са ко-култивирани с МСК третирани с IFN γ , което обаче не влиза в противоречие с имunosупресивната роля на МСК в контекста на множеството литературни данни за плейотропно и често дори провъзпалително действие на IL-10. В допълнение, както вече беше споменато, има данни, че секрецията на IL-10 в условия на възпаление е първоначално силна, но сравнително краткотрайна като намалява на 24 час от началото на възпалението (Németh et al., 2009). Нашите данни показаха, че по време на ко-култивиране с РВМС, МСК не засилват секрецията на TGF β в присъствие на IFN γ , което може да намери своето обяснение в сложните и многостранни взаимодействия между имунните клетки и МСК.

Описаните от нас резултати за експресията на PD-L1 и HLA-I от WJ-МСК γ , както и тази на PD-1 и CTLA-4 от Т лимфоцити, в комбинация с данните ни за IL-10 и TGF β потвърждават идеята, че МСК се активират от провъзпалителния цитокин IFN γ и придобиват имunosупресивен фенотип. В контекста на получените данни, е важно да се вземат предвид сложните и многостранни взаимодействия между МСК и имунните клетки, като бихме могли да обобщим, че в зависимост от условията на средата, вида и концентрацията на цитокините в нея, МСК могат да стимулират или потискат имунния отговор.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

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

Дълги години МСК бяха разглеждани и изучавани именно в този контекст – като субект, който активно действа и супресира клетките на имунната система. Множество по-нови данни, обаче обръщат внимание на факта, че *in vivo*, мезенхимните стволови клетки се явяват и обект на действие от страна на множество клетки, осъществяващи преки контакти с тях и особено от страна на множество цитокини,

основно свързани с тъканно възпаление. Именно „двустранный разговор“ в много голяма степен определя и дуалистичната природа на МСК в процеса на възпаление и неговия контрол.

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

БИБЛИОГРАФИЯ

- Augello, A., Tasso, R., Negrini, S., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., & Pennesi, G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European Journal of Immunology*, 35(5), 1482–1490. <https://doi.org/10.1002/eji.200425405>
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A., & Hoffman, R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*, 30(1), 42–48. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(01\)00769-X](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(01)00769-X)
- Ben-Ami, E., Berrih-Aknin, S., & Miller, A. (2011). Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 10(7), 410–415. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.01.005>
- Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell*, 13(4), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>
- Blaber, S. P., Webster, R. A., Hill, C. J., Breen, E. J., Kuah, D., Vesey, G., & Herbert, B. R. (2012). Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 172. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-172>
- Chan, J. L., Tang, K. C., Patel, A. P., Bonilla, L. M., Pierobon, N., Ponzio, N. M., & Rameshwar, P. (2006). Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon- γ . *Blood*, 107(12), 4817–4824. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-0057>
- Chan, W. K., Lau, A. S.-Y., Li, J. C.-B., Law, H. K.-W., Lau, Y. L., & Chan, G. C.-F. (2008). MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN- γ challenge. *Experimental Hematology*, 36(11), 1545–1555. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.06.008>
- Croitoru-Lamoury, J., Lamoury, F. M. J., Caristo, M., Suzuki, K., Walker, D., Takikawa, O., Taylor, R., & Brew, B. J. (2011). Interferon- γ Regulates the Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells via Activation of Indoleamine 2,3 Dioxygenase (IDO). *PLoS ONE*, 6(2), e14698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014698>
- Crop, M. J., Baan, C. C., Korevaar, S. S., IJzermans, J. N. M., Pescatori, M., Stubbs, A. P., Van IJcken, W. F. J., Dahlke, M. H., Eggenhofer, E., Weimar, W., & Hoogduijn, M. J. (2010). Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Effect of inflammatory conditions on ASC. *Clinical & Experimental Immunology*, 162(3), 474–486. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04256.x>
- Dang, S., Yu, Z., Zhang, C., Zheng, J., Li, K., Wu, Y., Qian, L., Yang, Z., Li, X., Zhang, Y., & Wang, R. (2015). Autophagy promotes apoptosis of mesenchymal stem cells under inflammatory microenvironment. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 247. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0245-4>
- Doi, H., Kitajima, Y., Luo, L., Yan, C., Tateishi, S., Ono, Y., Urata, Y., Goto, S., Mori, R., Masuzaki, H., Shimokawa, I., Hirano, A., & Li, T.-S. (2016). Potency of umbilical cord blood- and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for scarless wound healing. *Scientific Reports*, 6(1), 18844. <https://doi.org/10.1038/srep18844>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Moreno, B. H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G. A., Zaretsky, J. M., Sun, L., Hugo, W., Wang, X., Parisi, G., Saus, C. P., Torrejon, D. Y., Graeber, T. G., Comin-Anduix, B., Hu-Lieskovan, S., Damoiseaux, R., Lo, R. S., & Ribas, A. (2017).

- Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Reports*, 19(6), 1189–1201. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.031>
- Gebler, A., Zabel, O., & Seliger, B. (2012). The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends in Molecular Medicine*, 18(2), 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.10.004>
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, 9(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
- Ivanova-Todorova, E., Bochev, I., Dimitrov, R., Belemezova, K., Mourdjeva, M., Kyurkchiev, S., Kinov, P., Altankova, I., & Kyurkchiev, D. (2012). Conditioned Medium from Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induces CD4+FOXP3+ Cells and Increases IL-10 Secretion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/295167>
- Kilroy, G. E., Foster, S. J., Wu, X., Ruiz, J., Sherwood, S., Heifetz, A., Ludlow, J. W., Stricker, D. M., Potiny, S., Green, P., Halvorsen, Y.-D. C., Cheatham, B., Storms, R. W., & Gimble, J. M. (2007). Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: Expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *Journal of Cellular Physiology*, 212(3), 702–709. <https://doi.org/10.1002/jcp.21068>
- Kim, D. S., Jang, I. K., Lee, M. W., Ko, Y. J., Lee, D.-H., Lee, J. W., Sung, K. W., Koo, H. H., & Yoo, K. H. (2018). Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- γ . *EBioMedicine*, 28, 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.01.002>
- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., & Annunziato, F. (2006). Role for Interferon- γ in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 24(2), 386–398. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0008>
- Laranjeira, P., Pedrosa, M., Pedreiro, S., Gomes, J., Martinho, A., Antunes, B., Ribeiro, T., Santos, F., Trindade, H., & Paiva, A. (2015). Effect of human bone marrow mesenchymal stromal cells on cytokine production by peripheral blood naive, memory, and effector T cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 3. <https://doi.org/10.1186/srct57>
- Liang, C., Jiang, E., Yao, J., Wang, M., Chen, S., Zhou, Z., Zhai, W., Ma, Q., Feng, S., & Han, M. (2018). Interferon- γ mediates the immunosuppression of bone marrow mesenchymal stem cells on T-lymphocytes *in vitro*. *Hematology*, 23(1), 44–49. <https://doi.org/10.1080/10245332.2017.1333245>
- Liu, Y., Wang, L., Kikuri, T., Akiyama, K., Chen, C., Xu, X., Yang, R., Chen, W., Wang, S., & Shi, S. (2011). Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- γ and TNF- α . *Nature Medicine*, 17(12), 1594–1601. <https://doi.org/10.1038/nm.2542>
- Lotfinia, M., Lak, S., Mohammadi Ghahhari, N., Johari, B., Maghsood, F., Parsania, S., Sadegh Tabrizi, B., & Kadivar, M. (2017). Hypoxia Pre-Conditioned Embryonic Mesenchymal Stem Cell Secretome Reduces IL-10 Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Iranian Biomedical Journal*, 21(1), 24–31.
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., & Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death & Differentiation*, 21(2), 216–225. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.158>
- Markov, V., Kusumi, K., Tadesse, M. G., William, D. A., Hall, D. M., Lounev, V., Carlton, A., Leonard, J., Cohen, R. I., Rappaport, E. F., & Saitta, B. (2007). Identification of Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem/stromal Cell Populations with Distinct Growth Kinetics, Differentiation Potentials, and Gene Expression Profiles. *Stem Cells and Development*, 16(1), 53–74. <https://doi.org/10.1089/scd.2006.0660>

- McElreavey, K. D., Irvine, A. I., Ennis, K. T., & McLean, W. H. (1991). Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochemical Society Transactions*, 19(1), 29S. <https://doi.org/10.1042/bst019029s>
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., & Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*, 103(12), 4619–4621. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3909>
- Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S. T., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P. G., Leelahavanichkul, K., Koller, B. H., Brown, J. M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R. A., & Mezey, É. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Medicine*, 15(1), 42–49. <https://doi.org/10.1038/nm.1905>
- Newman, R., Yoo, D., LeRoux, M., & Danilkovitch-Miagkova, A. (2009). Treatment of Inflammatory Diseases with Mesenchymal Stem Cells. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 8(2), 110–123. <https://doi.org/10.2174/187152809788462635>
- Park, C. W., Kim, K.-S., Bae, S., Son, H. K., Myung, P.-K., Hong, H. J., & Kim, H. (2009). Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *International Journal of Stem Cells*, 2(1), 59–68. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2009.2.1.59>
- Prasanna, S. J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S. R., & Vasandan, A. B. (2010). Pro-Inflammatory Cytokines, IFN γ and TNF α , Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells Differentially. *PLoS ONE*, 5(2), e9016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009016>
- Ryan, J. M., Barry, F., Murphy, J. M., & Mahon, B. P. (2007). Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 149(2), 353–363. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03422.x>
- Sheng, H., Wang, Y., Jin, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, L., Shen, B., Yin, S., Liu, W., Cui, L., & Li, N. (2008). A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Research*, 18(8), 846–857. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.80>
- Strauch, V., Saul, D., Berisha, M., Mackensen, A., Mougiakakos, D., & Jitschin, R. (2020). N-glycosylation controls inflammatory licensing-triggered PD-L1 upregulation in human mesenchymal stromal cells: N-GLYCOSYLATION CONTROLS PD-L1 IN MSC s. *STEM CELLS*, 38(8), 986–993. <https://doi.org/10.1002/stem.3190>
- Strojny, C., Boyle, M., Bartholomew, A., Sundivakkam, P., & Alapati, S. (2015). Interferon Gamma-treated Dental Pulp Stem Cells Promote Human Mesenchymal Stem Cell Migration In Vitro. *Journal of Endodontics*, 41(8), 1259–1264. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.02.018>
- Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), 726–736. <https://doi.org/10.1038/nri2395>

ИЗВОДИ

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

ПРИНОСИ

I. Приноси с оригинален характер

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

II. Приноси с потвърдителен характер

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

III. Приноси с дискусативен характер

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

ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ

1. Публикации във връзка с дисертационния труд

- **K. Belezova, D. Kyurkchiev;** Interferon-gamma effect on mesenchymal stem cells. Bulgarian Journal of Clinical Immunology 13 (1):43-52. 2020.
- **K. Belezova, I. Dimova, D. Kyurkchiev;** Effect of interfereferon-gamma on chromosomal stability of human umbilical cord mesenchymal stem cells. Bulgarian Journal of Clinical Immunology 13 (2). 2020.
- **Belezova K, Bochev I, Ivanova-Todorova E, et al.** A study of the transformation of umbilical cord mesenchymal stem cells by interferon-gamma. Iran J Basic Med Sci, 2021; 24(9): 1203-1210.

(IF₂₀₂₁ – 2.699)

2. Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд

- **K. Белемезова, Н. Магунска, Т. Тимева, Д. Кюркчиев, Е. Тодорова-Иванова, С. Кюркчиев.** Изолиране и характеризиране на мезенхимни стволови клетки от менструална кръв при синдром на Ашерман. Плевенски дни на репродуктивната медицина 2017; 28 – 30 Април, 2017, Плевен
(Спечелена първа награда за най-добър постер)
- **K. Belezova, D. Kyurkchiev, E. Todorova-Ivanova, T. Timeva, I. Bochev, S. Kyurkchiev.** Mesenchymal stem-like cells isolated from human menstrual blood. 4th Black Sea International Immunology School (BSIIS); 20 - 22 October 2017, Starosel
(Спечелена първа награда)
- **K. Belezova, Ivan Bochev, Ekaterina Todorova-Ivanova, Stanimir Kyurkchiev, Dobroslav Kyurkchiev.** Interferon- γ Effect on Mesenchymal Stem Cells; Immunological days in Pleven 2019; “Autoimmunity in 2019: The good and the bad news”; 10-11 April 2019 – Pleven, Bulgaria.

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

3. Участия в научни проекти по темата на дисертационния труд

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

Договор No: Д-82/24.06.2020 г.