МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

Д-р Георги Христов Василев

ИМУНОРЕГУЛАТОРНО ДЕЙСТВИЕ НА МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ВЪРХУ Т-ЛИМФОЦИТИ НА ПАЦИЕНТИ С РЕВМАТОИДЕН АРТРИТ

АВТОРЕФЕРАТ
на дисертационен труд за присъждане
на образователната и научна степен
“ДОКТОР”

Научни ръководители:
проф. д-р Доброслав Станимиров Кюркчиев, дмн
доц. д-р Мариана Иванова Гойчева, дм

София, 2021

Дисертационният труд е написан на 189 страници. Съдържа 11 таблици и 31 фигури. Библиографията включва 359 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 при Медицинския университет – София; Лаборатория по клинична имунология на УМБАЛ "Св. Иван Рилски" – София; Клиника по ревматология на УМБАЛ "Св. Иван Рилски" – 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.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширен катедрен съвет на Катедрата по клинична имунология към Медицинския факултет при Медицинския университет – София, където докторантът работи като асистент.

Научно жури

Външни членове:

1. Проф. д-р Искра Петрова Алтънкова, дмн – външен член за МУ – София, Лаборатория по клинична имунология, УБ „Лозенец", Медицински факултет, СУ „Св. Климент Охридски"
2. Проф. д-р Мария Стоянова Панчовска-Мочева, дм – външен член за МУ – София, Катедра по пропедевтика на вътрешните болести, Медицински факултет, МУ – Пловдив,
3. Проф. Спаска Ангелова Станилова, дбн – външен член за МУ – София, Катедра по молекулярна биология, имунология и медицинска генетика, Медицински факултет, Тракийски университет – Стара Загора;

Вътрешни членове:

1. Проф. д-р Румен Малинов Стоилов, дм, Катедра по ревматология, Медицински факултет, МУ – София;
2. Доц. д-р Екатерина Иванова Иванова-Тодорова, дм, Катедра по клинична имунология, Медицински факултет, МУ – София

Резервни членове:

1. Доц. д-р Снежина Михайлова Михайлова-Кандиларова, дм, Катедра по клинична имунология, Медицински факултет, МУ – София;
2. Проф. Андрей Иванов Чорбанов, дб– външен член за МУ – София, Лаборатория по експериментална имунология, Институт по микробиология при БАН

Технически сътрудник: Д-р Екатерина Красимирова Куртева, д.м.

Публичната защита на дисертациония труд ще се състои на **18.02.2021 г.** от **13.00 часа** в Аулата на УМБАЛ "Св. Иван Рилски" ЕАД – София, бул. "Акад. Иван Евст. Гешов" № 15 А.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

На кирилица

ААт – Автоантитела

АНА – Антинуклеарни автоантитела

АТ-МСК – Мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан

МСК – Мезенхимни стволови клетки

ПКМК – Периферни кръвни мононуклеарни клетки

РА – Ревматоиден артрит

РФ – Ревматоиден фактор

На латиница

ACPA – Antibodies against Citrulinated Protein Antigens

Anti-CCP – Antibodies against Cyclic Citrulinated Protein

CRP – C Reactive Protein

IFN-γ – Interferon gamma

IL – Interleukin

sVEGF-A – soluble Vascular Endothelial Growth Factor

PGE_2 – Prostaglandin E_2

IDO – Indoleamine 2,3-dioxygenase

FoxP3 – Forkhead box Protein 3

RORc – Related Orphan Receptor C

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

TCR – T helper Cell Receptor

TGF-β – Transforming Growth Factor beta

Th cell – T helper cell

TNF-α – Tumor Necrosis Factor-α

Tregs – T regulatory cells

MHC – Major Histocompatibility Complex

СЪДЪРЖАНИЕ

1. ВЪВЕДЕНИЕ ..... - 7 -

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ ..... - 9 -

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ ..... - 11 -

3.1. Изследвани лица и биологичен материал ..... - 11 -

3.1.1. Подбор на пациенти с ревматоиден артрит ..... - 11 -

3.1.2. Информирано съгласие и вземане на биологичен материал от изследваните пациенти с РА ..... - 12 -

3.1.3. Източник на кондиционирани среди ..... - 13 -

3.2. Изолиране на мононуклеарни клетки от периферна венозна кръв и култивирането им в кондиционирани среди от АТ-МСК при пациенти с РА ..... - 13 -

3.2.1. Изолиране на мононуклеарни клетки от периферна венозна кръв от пациенти с РА ..... - 13 -

3.2.2. Култивиране на ПКМК с кондиционирани среди от АТ-МСК и с контролни среди за клетъчно култивиране ..... - 14 -

3.3. Флоуцитометрично изследване на Т17 и Tregs хелперни субпопулации след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК ..... - 15 -

3.3.1. Определяне на процент на Th17 хелперни лимфоцити след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК ..... - 15 -

3.3.2. Флоуцитометрично определяне на процент на Tregs след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК ..... - 16 -

3.4. Флоуцитометрично определяне на процента моноцитни клетки след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК ..... - 17 -

3.5. Имуноензимни методи за определяне на нивата на TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, L-6, IL-17, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO, CCL2, CCL5 и IL-8 в кондиционирани среди от АТ-МСК и TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, L-6, IL-17, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO и CCL2 в среди, получени след клетъчно култивиране на ПКМК в кондиционирани среди от АТ-МСК ..... - 17 -

4. РЕЗУЛТАТИ ..... - 19 -

4.1. Обобщение на демографските, клиничните и имунологичните характеристики на изследваните пациенти ..... - 19 -

4.2. Секреция на цитокини, хемокини и други разтворими молекули от АТ-МСК ..... - 20 -

4.3. Влияние на кондиционираните среди от АТ-МСК върху Th17 хелперните лимфоцити ..... - 21 -

4.4. Влияние на кондиционираните среди от АТ-МСК върху $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ ефекторни лимфоцити (Teff) ..... - 22 -

4.5. Промени в пула на Tregs лимфоцити под действието на среди от АТ-МСК ..... - 22 -

4.5.1. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ..... - 23 -

4.5.2. Влияние на кондиционираните среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+$ $CD25^-FoxP3^+$ ..... - 23 -

4.6. Ефект на секреторни фактори от АТ-МСК върху експресията на HLA-DR върху моноцитни клетки ..... - 24 -

4.7. Влияние на среда от АТ-МСК върху цитокиновата секреция от имунни клетки, изолирани от пациенти с ревматоиден артрит ..... - 25 -

4.7.1. Въздействие на разтворимите медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху секрецията на TGF-β ..... - 25 -

4.7.2. Влияние на секреторните медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на TNF-α ..... - 26 -

4.7.3. Ефекти на разтворимите фактори, секретирани от АТ-МСК, върху секрецията на IL-17 от ПКМК на пациенти с РА ..... - 27 -

4.7.4. Влияние на разтворимите фактори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на IL-21 от ПКМК на пациенти с РА ..... - 27 -

4.7.5. Разлики в секрецията на разтворим sVEGF-A ..... - 28 -

4.7.6. Ефекти на АТ-МСК върху продукцията на PGE_2 ..... - 28 -

4.8. Обобщение на получените резултати чрез мултивариатни статистически анализи ..... - 29 -

4.8.1 Обобщение посредством Heatmap ..... - 29 -

4.8.2. Корекция при проверка на множество хипотези ..... - 31 -

4.8.3. Факторен анализ между нивата на изследваните цитокини в културите на ПКМК от пациенти с РА ..... - 31 -

4.8.4. Многофакторни методи за анализ. Метод на опорните вектори. Дървета за класификация и регресия ..... - 33 -

4.8.5. Дървета за класификация и регресия (CART) ..... - 34 -

4.8.6. PLS – Дискриминантен анализ ..... - 35 -

5. ОБСЪЖДАНЕ ..... - 36 -

5.1. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху Th17 хелперните лимфоцити при пациенти с РА ..... - 36 -

5.2. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ ефекторните лимфоцити (Teff) при пациенти с РА ..... - 37 -

5.3. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ..... - 38 -

5.4. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ ..... - 40 -

5.5. Ефект на секреторни фактори от АТ-МСК върху експресията на HLA-DR върху моноцитни клетки при пациенти с РА ..... - 42 -

5.6. Влияние на средата от АТ-МСК върху цитокиновата секреция
от имунокомпетентни клетки, изолирани от пациенти с ревматоиден артрит ..... - 44 -

5.6.1. Въздействие на разтворимите медиатори, секретирани от АТ-МСК,
върху секрецията на TGF-β ..... - 44 -

5.6.2. Влияние на секреторни медиатори, секретирани от АТ-МСК,
върху нивата на TNF-α, IL-6, IL-17A, IL-21 ..... - 45 -

5.6.3. Влияние на секреторни медиатори, секретирани от АТ-МСК,
върху нивата на sVEGF-A и PGE2 ..... - 47 -

5.7. Заключение ..... - 48 -

6. ИЗВОДИ ..... - 49 -

7. ПРИНОСИ ..... - 50 -

7.1. Приноси с потвърдителен характер ..... - 50 -

7.2. Приноси с оригинален характер ..... - 50 -

8. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ ..... - 51 -

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Последните няколко десетилетия са белязани от значимо увеличаване на автоимунни заболявания, които, обобщено, включват голям брой състояния с разнолики клинични изяви и полиорганни поражения, но с една обща черта – имунна дисрегулация и автодеструкция. Това поражда нуждата от модерни и усъвършенствани терапевтични стратегии. На този фон добре се открояват и мезенхимните стволови клетки (МСК), които наред със способността си за самообновление, пролиферация и диференциация секретират редица разтворими фактори с имуносупресивна функция. МСК от години попадат в полезрението на учените и широко се дискутира потенциалното им приложение като средство за терапевтично повлияване при широк спектър заболявания. Терапевтичната полза от МСК при автоимунните възпалителни заболявания бихме могли да търсим в потенциала им да осъществяват имунна супресия и да регулират имунния отговор.

Откриването и успешното внедряване на нови терапевтични агенти е фасадата, но зад нея се крие строен фундамент от теоретична и експериментална дейност, чиято цел е да разшифрова ключовите аспекти и етапи на едно заболяване и да интерпретира податливостта на определени ключови „точки" към действието на потенциално приложими терапевтични агенти in vitro *и/или чрез клинични изпитвания. В този контекст, настоящият дисертационен труд заема междинно положение между фундаменталния научен подход и бъдещите практически терапевтични подходи. Той е ориентиран към* in vitro *изучаване влиянието на разтворими фактори, налични в среди на мезенхимни стволови клетки върху добре установени таргетни лимфоцитни субпопулации, играещи ключова роля в патогенезата на ревматоидния артрит, каквито са*

Treg и Th17 хелперните лимфоцити. Също така се проследява и промяната в секрецията на ключови цитокини като TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-17, IL-2, IL-23 и други медиатори при наличие на провежданата терапия.

В по-широк план, дисертационният труд представя и един „многоизмерен" поглед към комбинираното и адитивно паракринно действие на множество различни секреторни молекули върху множество от имунни клетки и ефекторни механизми в контекста на имунна дисрегулация, характерна за ревматоидния артрит.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е да се изследва имунорегулаторното действие на кондиционирани среди от мезенхимни стволови клетки от човешка адипозна тъкан върху Т-лимфоцити на пациенти с ревматоиден артрит. Основни лимфоцитни субпопулации, обект на настоящия дисертационен труд, бяха Th17 и Tregs хелперните лимфоцити.

За постигане на **целта** си поставихме **следните задачи**:

- **По отношение на пациентите с РА**

Проспективен подбор и охарактеризиране на подбраните пациенти с РА. Изследване на антитела срещу CCP, MCV, РФ от класове IgM, IgG и IgA и АНА.

- **По отношение на изследването на секреторни фактори, съдържащи се в средите от АТ-МСК**

Изследване на секреторния профил на кондиционираните среди от АТ-МСК: TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, L-6, IL-17A, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO, CCL2, CCL5 и IL-8.

- **По отношение на изследването на имунорегулаторното действие на среди от АТ-МСК върху Т-хелперни лимфоцити от пациенти с ревматоиден артрит**

1. Изолиране и култивиране на периферни кръвни мононуклеарни клетки (ПКМК) от пациентите с РА и култивирането им съгласно добре установени, описани и публикувани протоколи с кондиционирани среди от АТ-МСК и с контролни среди за клетъчно култивиране.

2. Изследване динамиката в процентното съдържание на Th17 и Tregs субпопулациите в клетъчните култури на ПКМК, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК, спрямо клетъчни култури на ПКМК, култивирани с контролни среди.

3. Изследване динамиката в процентното съдържание на активирани ефекторни Т-клетки в клетъчните култури на ПКМК, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК, спрямо клетъчни култури на ПКМК, култивирани с контролни среди.

4. Изследване на фенотипните промени, засягащи пула на моноцитните клетки в клетъчните култури на ПКМК, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК, спрямо клетъчни култури на ПКМК култивирани с контролни среди – промяна в експресия на HLA-DR; промяна в експресията на CD80/CD86 комплекса; промяна в експресията на CD14 маркера.

5. Оценка на разликите в секрецията на TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, L-6, IL-17A, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO и CCL2 в клетъчните култури на ПКМК, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК, спрямо клетъчни култури на ПКМК, култивирани с контролни среди.

6. Статистическа обработка на получените резултати.

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1. Изследвани лица и биологичен материал

3.1.1. Подбор на пациенти с ревматоиден артрит

Подборът и клиничната оценка на пациентите бяха извършени в Клиниката по ревматология на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София. За периода от септември 2017 до септември 2018 г. последователно бяха анализирани 70 пациенти с диагноза ревматоиден артрит (РА). Бяха събрани и обобщени пълните анамнестични, клинични и наличните лабораторни и имунологични параметри на пациентите, като в допълнение на това всички пациенти бяха изследвани за автоантитела срещу CCP, MCV и RF от класове M, G и A, AHA, а също и CRP. Селектирането на подходящите пациенти, от които на следващ етап да бъдат добити периферни мононуклеарни клетки, беше базирано на *apriori* зададени включващи и изключващи критерии. Съобразно зададените критерии, 17 болни с РА бяха определени като подходящи и последователно включени в експерименталната постановка. **Лимитации**: Важно ограничение при провеждане на експерименталната дейност по изолирането и култивирането на периферни кръвни мононуклеарни клетки в кондиционирани среди от АТ-МСК беше времеемкостта на опитните постановки. Допълнително това беше съобразено и с друг лимитиращ фактор: ограничения брой налични към времето на селекция на пациентите кондиционирани среди от АТ-МСК (осигурени с любезното съдействие на Тъканна банка „Булген“, в съответствие с *Приложение 1-А към Договор за вземане и изследване и съхраняване на мезенхимни стволови клетки от мастна тъкан*).

Бяха включени 17 пациенти с умерено- и високоактивен РА, от които 16 жени и 1 мъж, на възраст над 18 г. (средна възраст 54 ± 10 години) и средна продължителност на заболяването Median (IQR): 6 години (1-11 години). Всички болни отговаряха на ревизираните класификационни критерии на ACR/EULAR 2010 за РА и нямаха извънставни прояви на болестта.

3.1.2. Информирано съгласие и вземане на биологичен материал от изследваните пациенти с РА

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

С цел изследване на супресивното действие на среди от АТ-МСК върху имунокомпетентни клетки от пациенти с РА, беше събиран биологичен материал –п ериферна венозна кръв и кръвен серум. След рутинна венепункция беше взета периферна венозна кръв с вакутейнери за пълна кръв, съдържащи фикол (BD Vaacutainer CPT, NC: 1.0 ml, FICOLL 2.0 mL) и за серум (BD Vacutainer®, CATREF 367955, 5 ml). Кръвните проби на всички лица бяха изследвани в Лабораторията по клинична имунология към УМБАЛ „Свети Иван Рилски“ – София. Серумите бяха отделени съобразно стандартната оперативна процедура в Лабораторията, описани и съхранявани на t -80°C, според изискванията за добра лабораторна практика и според инструкциите на търговските китове.

3.1.3. Източник на кондиционирани среди

Кондиционирани среди от АТ-МСК бяха получени с любезното съдействие на Тъканна банка „Булген“ и Клиниката по ортопедия и травматология, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, София. Мастна тъкан беше добита при рутинно ендопротезиране на тазобедрена става от здрави донори, съответстващи по възраст. Тъканната банка доказва АТ-МСК съгласно критериите на International sociaty of cell therapy (*Dominici et al., 2006*). Тези критерии се опират на способност на клетките за клоногенност, трилинейна диференциация и експресия на CD73, CD90, CD105, при липса на експресия на хематопоетични маркери. Кондиционираните среди са ни предоставени при рутинна смяна на среда при клетъчно култивиране на всеки 72 часа (*в съответствие с Приложение 1-А към Договор за вземане и изследване и съхраняване на мезенхимни стволови клетки от мастна тъкан*).

3.2. Изолиране на мононуклеарни клетки от периферна венозна кръв и култивирането им в кондиционирани среди от АТ-МСК при пациенти с РА

3.2.1. Изолиране на мононуклеарни клетки от периферна венозна кръв от пациенти с РА

С цел да изследваме влиянието на среди от АТ-МСК върху имунокомпетентни клетки, получени от пациенти с РА, от всеки пациент бяха изолирани периферни кръвни мононуклеарни клетки (ПКМК).

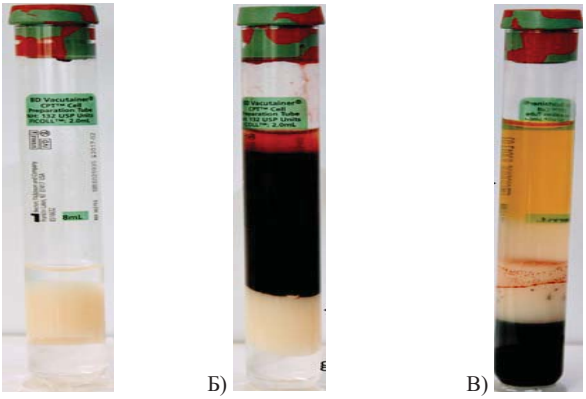
- **Използвани реактиви**: За отделяне на мононуклеарните клетки от цялостна кръв бяха използвани вакутейнери 8 ml BD Vacutainer^{R} CPT^{TM} (NC: 1.0 ml, FICOLL^{TM}: 2.0 mL; Becton, Dickinson and Company, Boston USA) Каталожен номер: REF 362761.

- **Изпълнение на метода:**

1) Беше взета 8 ml периферна венозна кръв.
2) Вакутейнерите бяха разклатени неколкоратно.

3) В рамките на 10 min от вземането на пробата, вакутейнирите бяха центруфугирани при 1500-1800 g (3000 оборота) за около 20 min в хладилна центруфуга (Haereus, Germany) при температура 15˚C.

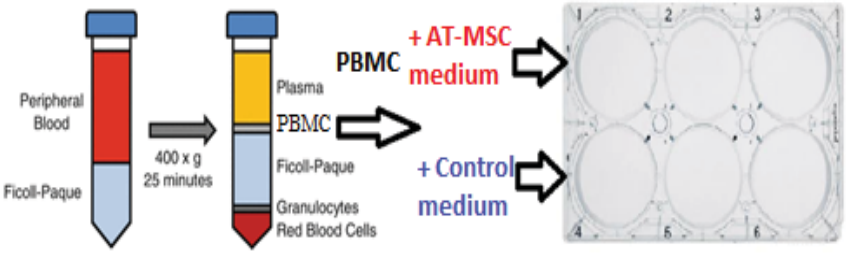
4) Периферните ПКМК бяха пипетирани с пастьорка (3 ml) или с пипетор.



А) Б) В)

Фигура 1. *Сепариране на ПКМК с BD Vascutainer CPT. Празен вакутейнер (А), вакутейнер преди центрофугиране (Б), сепарация на ПКМК от по-плътната фракция (В)*

3.2.2. Култивиране на ПКМК с кондиционирани среди от АТ-МСК и с контролни среди за клетъчно култивиране



Фигура 2*. Схема на култивиране върху плака. PBMC-ПКМК; AT-MSC medium – среди от АТ-МСК; control medium – контролни среди*

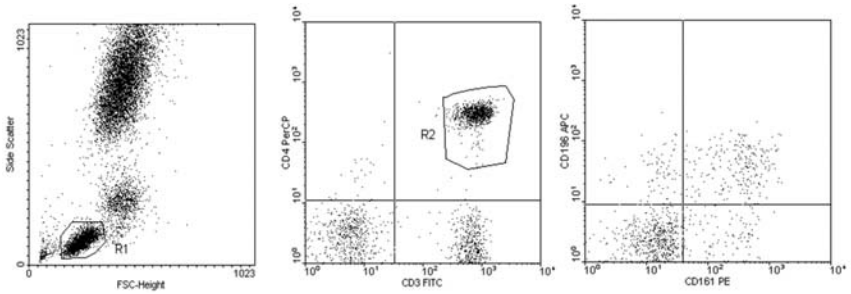
3.3. Флоуцитометрично изследване на T17 и Tregs хелперни субпопулации след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК

3.3.1. Определяне на процент на Th17 хелперни лимфоцити след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК

С цел да се изследва ефектът на разтворимите фактори, налични в кондиционираните среди на АТ-МСК, беше определен флоуцитометрично процентът на Th17 хелперните лимфоцити в клетъчните култури на ПКМК.

- **Материал за изследване**

Периферни мононуклеарни клетки, получени от включените в изследването пациенти с РА.



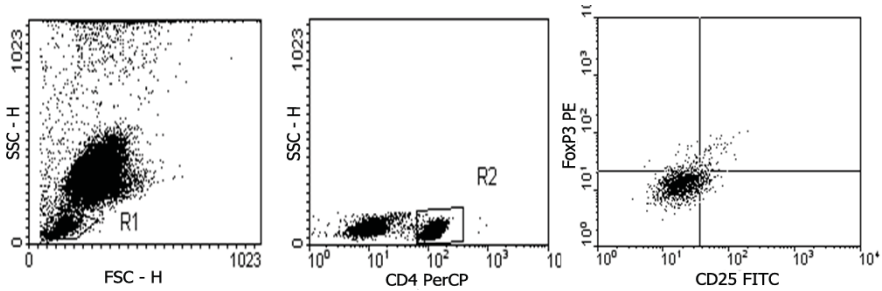
***Фигура 3**. Фенотипно определяне на Th17 лимфоцити субпопулации. На фигурата е представен флоуцитометричния подход при опрелянето на процента Th17 лимфоцити. Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри (ляв панел, R1). Вторият гейт се поставя върху $CD3^+CD4^+$ клетките (среден панел, R2). Т-хелперните клетки, които двойно експресират на повърхността си CD161 и CD196 (десен панел, горен десен квадрант), бяха определени като Th17 лимфоцити Показаният флоуцитометричен подход беше използван при определянето на Th17 за всички опитни постановки*

3.3.2. Флоуцитометрично определяне на процент на Tregs след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК

За изследване на имуносупресивното действие на средите от АТ-МСК от централно значение беше сравнението в динамиката на популацията на регулаторните Treg лимфоцити.

- **Материал за изследване**: периферни мононуклеарни клетки, получени от включените в изследването пациенти с РА.

`

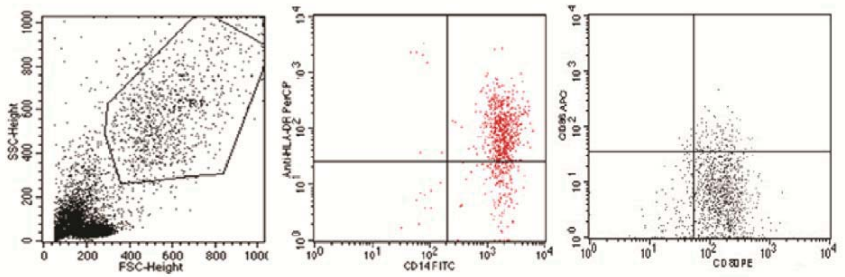


***Фигура 4**. Фенотипно определяне на $CD4^+CD25^{+/-}FoxP3^+$ Т-лимфоцити. Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри (R1, ляв панел). Вторият гейт се поставя върху $CD4^+$ клетките (R2, среден панел). Десният плот е гейтиран по логичен гейт, направен чрез комбинация между гейт едно и гейт две. Наблюдават се (десен панел) две субпопулации $CD4^+FoxP3^+$ клетки, като се счита, че класическите Tregs са с висока експресия на CD25 и FoxP3 (десен панел, горен десен квадрант). Беше определен и процентът на $CD4^+FoxP3^+$ клетки с ниска/липсваща експресия на повърхностния маркер $CD25^{low/-}$ (десен панел, горен ляв квадрант). Използваната гейтираща стратегия ни позволи също така да определим и процента на $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ Т-лимфоцитите (десен панел, долен десен квадрант). Посочената гейтираща стратегия беше използвана при фенетипното определяне на Treg и $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ Т-лимфоцитите при всички опитни постановки с ПКМК от 17 пациенти с РА.*

***Забележка**: Беше отчетен и процентът на PD-L1 положителни Tregs, като флоуцитометричният подход не е отразен.*

3.4. Флоуцитометрично определяне на процента моноцитни клетки след култивирането им с кондиционирани среди на АТ-МСК

Централно място в изследването на имуносупресивното действие на разтворимите фактори на АТ-МСК беше посветено и на изследването на динамиката на моноцитните клетки в културите на човешки ПКМК култивирани със среди от АТ-МСК.



***Фигура 5**. Фенотипно определяне на моноцитни клетки. Моноцитни клетки бяха гейтирани по физични характеристики (R1, ляв панел), след което бяха определени процентът $CD14^+$ моноцити (среден панел, горен и долен десен квадрант) и процентът HLA-DR експресиращи $CD14^+$ моноцити (среден панел, горен десен квадрант). Беше установен процентът $CD80^+CD86^+$ двойноекспресиращи моноцити като процент от всички клетки, избрани в R1 (десен панел).*

***Забележка**: Беше определена и средната плътност (mean fluorescent intensity MFI) на експресията на описаните повърхностни молекули (подходът не е показан)*

3.5. Имуноензимни методи за определяне на нивата на TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, L-6, IL-17, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO, CCL2, CCL5 и IL-8 в кондиционирани среди от АТ-МСК и TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, L-6, IL-17, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO и CCL2 в среди, получени след клетъчно култивиране на ПКМК в кондиционирани среди от АТ-МСК

- **Материал за изследване**

1) Кондиционирани среди от АТ-МСК;

2) Среди, получени след клетъчно култивиране на ПКМК, добити от пациенти с ревматоиден артрит, в кондиционирани среди от АТ-МСК

- **Изпълнение на метода**

За всеки един от изследваните показатели използвахме работен протокол съобразно инструкциите на производителя, приложени в китовете. Всички китове бяха съхранявани при условията, указани от производителите и използвани преди изтичане на срока им на годност. Преди анализиране на TGF-β1, той беше активиран до имунореактивната му форма чрез ацидифициране и неутрализация. Оптичната плътност (OD) беше отчетена при дължина на вълната 450 nm с корекция за синия цвят на 650 nm с помощта на елайза рийдер (Microplate Photometer MPP-96, Biosan, USA). Минималната откриваемост е посочена от фирмите производители в упътването.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Обобщение на демографските, клиничните и имунологичните характеристики на изследваните пациенти

Съобразно зададените критерии, от 70 изследвани болни с РА, 17 бяха определени като подходящи и бяха последователно включени в експерименталните постановки. Таблица 1 представя обобщените демографски и лабораторни показатели на включените в изследването пациенти.

Таблица 1. Демографски, клинични, лабораторни и имунологични показатели на 17-те пациенти с РА, включени в опитните постановки на настоящия дисерационен труд

Характеристики	**РА (n = 17)**
Възраст (години)	54 ± 10*
Пол	
Мъже n (%)	1 (6)
Жени n (%)	16 (94)
Продължителност на заболяването (години)	6 (1-11)**
Продължителност на сутрешната скованост (min)	30 (10-90)**
VAS (mm)	70 (45-85)**
CRP (mg/l)	23 ± 15*
DAS28-CRP	5.3 ± 1.2*
Пациенти, положителни за антитела срещу CCP n (%)	15 (88.2)
Концентрация на антителата срещу CCP(UI/ml)	360 ± 260*
Пациенти, положителни за антитела срещу MCV n (%)	14 (87)
Концентрация на антителата срещу MCV (UI/ml)	432±283*
Пациенти, положителни за IgM RF n (%)	12 (70.6)
Концентрация на IgM RF (IU/ml)	214 ± 54*
Пациенти, положителни за IgG RF n (%)	11(65)
Концентрация на IgG RF (IU/ml)	150±46*
Пациенти, положителни за IgA RF n (%)	10 (58)
Концентрация на IgA RF (IU/ml)	126 ± 45*
Пациенти, положителни за АНА (титър ≥160) n (%)	14 (82)
Пациенти с АНА в титър ≥320 n (%)	6 (35)
Пациенти с АНА в титър ≥1:1280 n (%)	4 (24)
Най-често срещани типове имунофлуоресцентно светене***	
AC-1 n (%)	9 (64%)
AC-4 n (%)	9 (64%)

** Данните са представение посредством Mean ± SD. **Даните са представени посредством Median (IQR)*** Типове имунофлуоресцентно светене съгласно номенклатурата на ICAP (International Consensus of ANA Patterns): AC-1 – хомогенен, AC-4 -фино петнист.*

В Таблица 2 са показани индивидуалните стойности на изследваните имунологични параметри при всички участници в проучването.

Таблица 2. Индивидуални стойности на имунологичните показатели на пациентите с РА

Пациенти	DAS 28	MCV	CCP	RF IgM	IgG	IgA	IIF титър	Тип светене по ICAP
1	5,9	474,30	374,86	435,8	99,9	437,2	1:320	AC-1+AC-16
2	8,22	600	723,52	>500	>500	>500	1:160	AC-1
3	4,03	467,3	462,92	>500	122	69,2	1:160	AC-4+AC-18
4	5,25	31,40	3,74	2,6	39,6	4	1:80	AC-4+AC-16
5	5,82	1000	609,52	52,2	32,6	13,2	1:1280	AC-1 +AC-4
6	5,15	8	115,75	394,7	404,6	>500	1:160	AC-1+AC-4
7	3,91	969,5	562,94	33,7	16,8	3,3	1:80	AC-4+AC-16
8	5,43	>1000	153,58	16,7	10,5	12,3	1:160	AC-16+ AC-18
9	3,79	446,7	357,7	0,9	7,8	6	1:160	AC-1
10	4,73	79,8	357,87	>500	>500	39,0	1:80	AC-1
11	5,77	283,6	38,54	29,7	17,5	5,0	>1:1280	AC-1
12	5,09	14,1	357,18	>500	>500	273,5	1:160	AC-4
13	7,16	>1000	570,04	443,2	176,4	230,8	1:160	AC-4
14	6,4	269,38	715,54	64,2	28,7	19,7	1:320	AC-4
15	3,8	30	46,34	7,0	7,8	8,4	1:160	AC-4
16	5,31	18,6	1,59	0,2	5,3	5,4	1:1280	AC-1+AC-4
17	4,32	1000	594,74	172,7	95,6	20,1	1:1280	AC-1+AC-4

4.2. Секреция на цитокини, хемокини и други разтворими молекули от АТ-МСК

За целите на настоящия дисертационен труд кондиционирани среди от АТ-МСК, изолирани от 17 здрави донори, бяха изследвани посредством имуноензимен метод – enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) за наличието на различни цитокини, хемокини и други разтворими молекули с добре проучено действие върху имунокомпетентните клетки: TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-6, IL-17, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO, CCL2, CCL5 и IL-8. От тях TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-23, IDO не бяха открити в детектируеми количества в кондиционираните среди от АТ-МСК. IL-6, IL-21, sVEGF-A, PGE_2, CCL2, CCL5 и IL-8 установихме в сравнително висока концентрация, докато IL-17 беше наличен, но присъстваше в ниска концентрация. Описаните цитокини бяха налични във всички 17 проби от супернатанти на АТ-МСК. Данните са представени в обобщен вид в таблица 3.

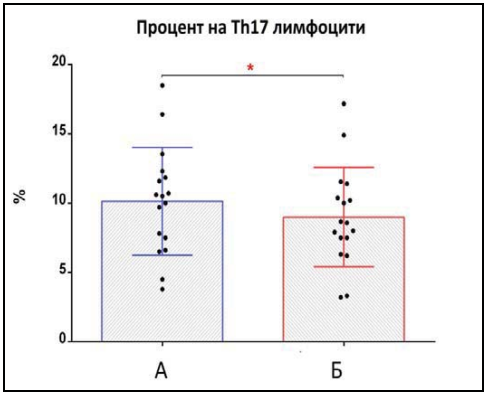
Таблица 3. Цитокиновата секреция на АТ-МСК

Цитокини, хемокини и разтворими молекули	pg/ml*
L-6	250 (210 - 290)
IL-8	550 (100 - 1000)
IL-17A	2 (2.1 - 2.9)
IL-21	50 (40 - 60)
CCL2 (MCP-1)	950 (790 - 1110)
CCL5 (RANTES)	> 1000**
sVEGF-A	3069 (2499 - 3639)
PGE_2	249 (200 - 298)

**Данните са представени посредством стойността на медианата, минимална и максимална стойност*

4.3. Влияние на кондиционираните среди от АТ-МСК върху Th17 хелперните лимфоцити

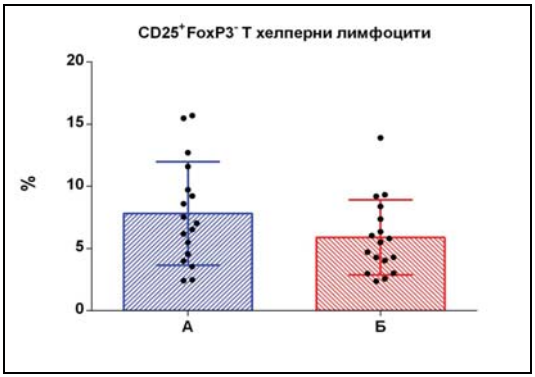
При култивирането на ПКМК с кондиционирани среди от АТ-МСК, процентът на Th17 хелперните лимфоцити беше намален спрямо ПКМК, култивирани с контролни среди. Намалението беше статистически значимо ($p = 0.02$, тест на Student. Процентът Th17 в културите на ПКМК, култивирани в контролна среда, беше средно 10.13 ± 3.88%, а в културите на ПКМК, култивирани всреди на АТ-МСК, беше средно 8.98 ± 3.58%.



***Фигура 6**. Разлика в процента на Th17 хелперните лимфоцити между ПКМК от пациенти с РА, култивирани в контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез средна аритметична стойност ± средно квадратично отклонение и са обобщаващи за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 пациенти с РА. *p < 0.05*

4.4. Влияние на кондиционираните среди от АТ-МСК върху $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ефекторни лимфоцити (Teff)

Беше отчетена и промяната в процента на $CD25^+FoxP3^-$ Т-хелперни клетки в клетъчните култури на ПКМК под действието на разтворими фактори в средите на АТ-МСК. Процентът на $CD25^+FoxP3^-$ Т-хелперните лимфоцити в културите на ПКМК, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК, беше статистически значимо по-малък от този в ПКМК, култивирани с контролни среди (5.9 ± 3 % vs. 7.81 ± 4.15 %, $p = 0.001$, тест на Student).



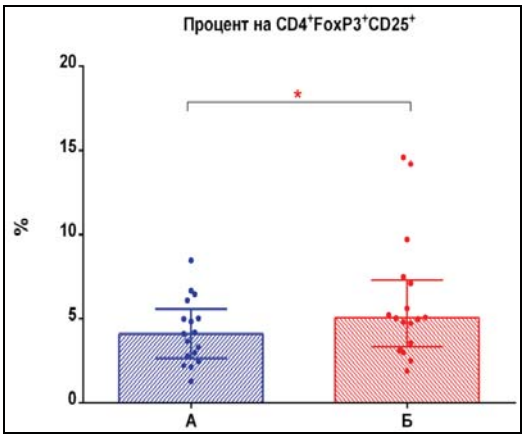
Фигура 7. *Разлика в процента на $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ Т-хелперните лимфоцити между ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез средна аритметична стойност ± средно квадратично отклонение и са обобщаващи за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 пациенти с РА. *p < 0.05*

4.5. Промени в пула на Tregs лимфоцити под действието на среди от АТ-МСК

Основна задача, залегнала в целите на настоящия дисертационен труд, беше да проучим механизмите на имуносупресия, осъществявани от АТ-МСК, посредством секретирани разтворими фактори, върху клетки на пациенти с РА. За целите на настоящия труд проследихме промените, настъпващи в пула на „класическите“ $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs, а също така и на $CD4^+CD25^{-/low}FoxP3^+$ лимфоцити с предполагаема имунорегулаторна функция.

4.5.1. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$

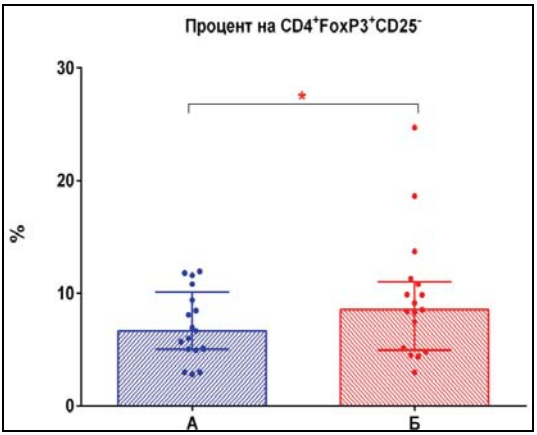
Сравнението на ефекта на разтворимите фактори, продуцирани от АТ-МСК, с контролните среди за клетъчно култивиране върху ПКМК от пациенти с РА показа статистически сигнификантно повишение на процента на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (6.0 ± 3.7% vs. 4.22 ± 2%, $p = 0.001$) в клетъчните култури, култивирани със среди от АТ- МСК.



***Фигура 8**. Разлика в процента на „класическите“ Tregs ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) в култури на ПКМК, настъпваща под действието на секреторните молекули от АТ-МСК. Данните са представени чрез Mean ± SD и са обобщаващи за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА, съответно култивирани с контролни среди (А) и кондиционирани среди от АТ-МСК (Б). *$p < 0.05$*

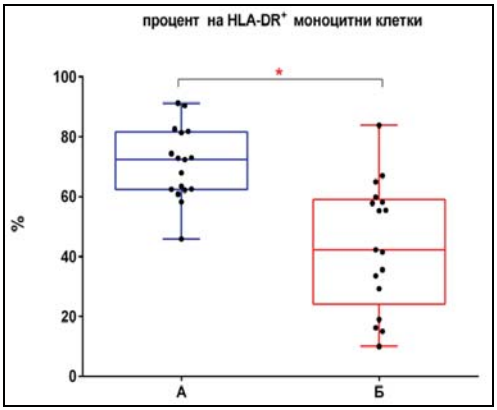
4.5.2. Влияние на кондиционираните среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+$ $CD25^-FoxP3^+$

Паралелно отчетохме и промяната в процента на $CD4^+FoxP3^+$ Tregs**,** характеризиращи се с ниска експресия на повърхностния маркер CD25. Намерихме статистически сигнификантно по-висок процент на $CD4^+CD25^{-/low}FoxP3^+$ в клетъчните култури на ПКМК, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК, спрямо тези с контролни среди за клетъчно култивиране (9.56 ± 5.4% vs. 7.13 ± 3.12%, $p = 0.004$).

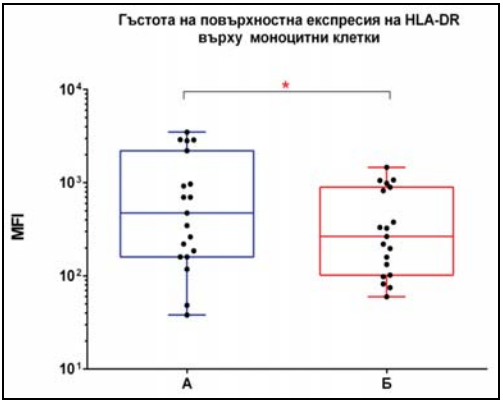


***Фигура 9**. Разликата в процента на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ в култури на ПКМК, настъпваща под действието на секреторните молекули от АТ-МСК. Данните са представени чрез Median [IQR] и са обобщаващи за всички 17 независими опитни постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА, съответно култивирани с контролни среди (А) и кондиционирани среди от АТ-МСК (Б). *p < 0.05*

4.6. Ефект на секреторни фактори от АТ-МСК върху експресията на HLA-DR върху моноцитни клетки



***Фигура 10**. Разлика в процента на HLA-DR положителни моноцитни клетки в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез Median (IQR) и са обобщаващи за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациента с РА. *p < 0.05*



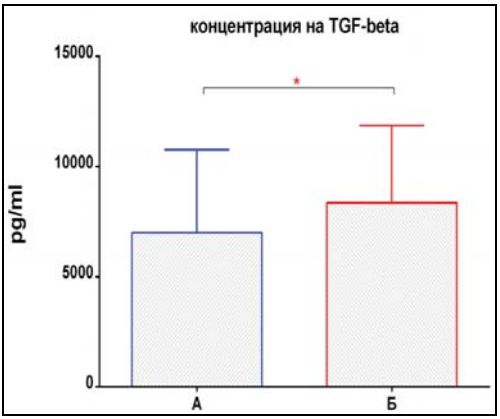
***Фигура 11**. Разлика в плътността на експресията на HLA-DR върху моноцитни клетки в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез Median (IQR) и са обобщаващи за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациента с РА. *$p < 0.05$*

4.7. Влияние на среда от АТ-МСК върху цитокиновата секреция от имунни клетки, изолирани от пациенти с ревматоиден артрит

Определянето на фенотипните изменения в пула на изследваните Т-хелперни и моноцитни популации, намиращи се под влияние на секреторни фактори от АТ-МСК, беше концептуално обвързано и с изследване на промяната в нивата на секреция на цитокини, заемащи централно място в осъществяването и организирането на имунен отговор. В настоящата дисертация беше заложено изследването на общо 10 цитокина и разтворими фактори: TGF-β, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-6, IL-17, IL-21, IL-23, sVEGF-A, PGE_2, IDO и CCL2.

4.7.1. Въздействие на разтворимите медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху секрецията на TGF-β

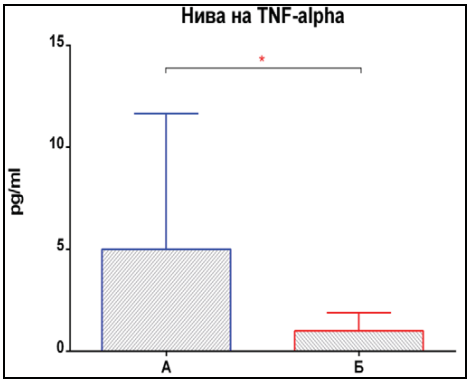
В условията на култивиране със среди на АТ-МСК, беше отчетена чувствителна промяна в нивата на TGF-β. Под действие на средите от АТ-МСК върху ПКМК от пациенти с РА, концентрацията на TGF-β беше увеличена сигнификантно ($p = 0.013$), като нивата на TGF-β в културите на ПКМК, култивирани с контролните среди, бяха median (IQR) 6227 pg/ml; (1681–10.148), а със средите от АТ-МСК – 8318.2 pg/ml (6327–11.686).



***Фигура 12**. Разлика в секрецията на TGF-β в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез Median (IQR) и са обобщаващи за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА. *p < 0.05*

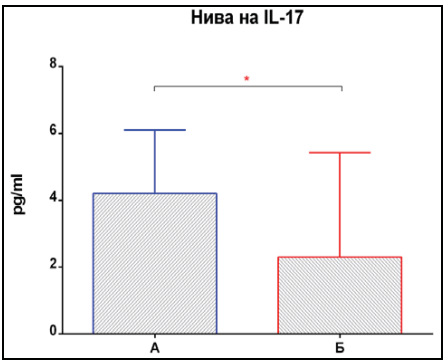
4.7.2. Влияние на секреторните медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на TNF-α

Обобщението от опитните постановки за всички 17 пациенти с РА показа статистически сигнификантно по-ниски нива на секреция на TNF-α в културите на ПКМК, култивирани със среди на АТ-МСК спрямо контролните среди – median [IQR] (1 pg/ml [0.7 - 1.9] vs. 5 pg/ml [1.75 - 11.65], *p = 0.001*) (фиг. 13).



***Фигура 13**. Разлика в продукцията на TNF-α в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез Median (IQR). Фиг. 13 е обобщаваща за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА, *p < 0.05*

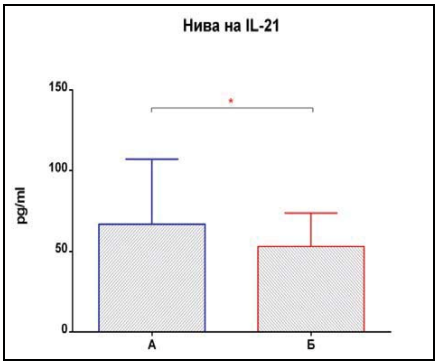
4.7.3. Ефекти на разтворимите фактори, секретирани от АТ-МСК, върху секрецията на IL-17 от ПКМК на пациенти с РА



***Фигура 14**. Разлика в нивата на IL-17 в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез Median (IQR). Фиг. 14 е обобщаваща за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА,*p < 0.05*

4.7.4. Влияние на разтворимите фактори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на IL-21 от ПКМК на пациенти с РА

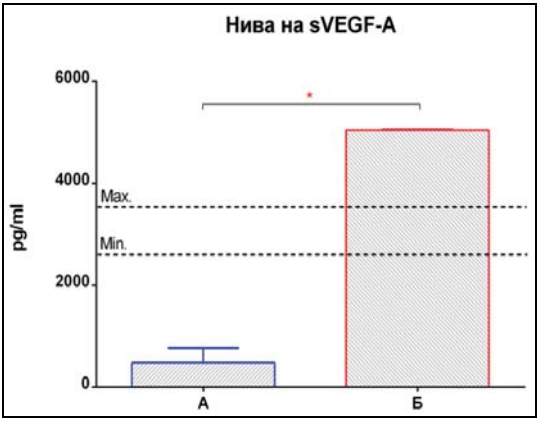
В условията на кокултивиране със среди на АТ-МСК беше описана чувствителна промяна в нивата на IL-21. Под действие на средите от АТ-МСК върху ПКМК от пациенти с РА, сигнификантно беше намалена концентрацията на IL-21, като нивата на този цитокин в културите на ПКМК, култивирани с контролните среди бяха median (IQR) 66.9 pg/ml (40.6-107.2), докато при култивиране със средите от АТ-МСК бяха 53 pg/ml (22-73), *p = 0.022.*



***Фигура 15**. Разлика в нивата на IL-21 в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Фиг. 15 е обобщаваща за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА. Данните са представени чрез Median (IQR), *p < 0.05*

4.7.5. Разлики в секрецията на разтворим sVEGF-A

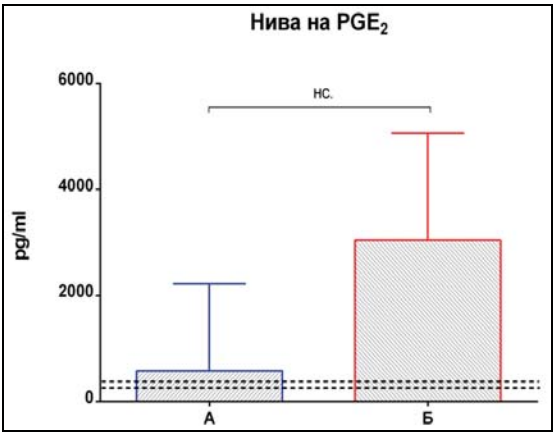
Нивата на sVEGF-A в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК бяха сигификантно по-високи спрямо нивата му в ПКМК, култивирани с контролни среди, median [IQR] (5012 pg/ml [2516-5054] vs. 561 pg/ml [288-699], $p = 0.001$.



***Фигура 16**. Разлика в нивата на sVEGF в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Прекъснатите линии изобразяват обхвата на концентрацията на sVEGF в средите на АТ-МСК. Данните са представени чрез медианна стойност и интерквартилен обхват. Фиг 16 е обобщаваща за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА, *p < 0.05*

4.7.6. Ефекти на АТ-МСК върху продукцията на PGE_2

Промените, настъпващи в концентрацията на разтворимия фактор простагландин E_2 (PGE_2) под паракринното влияние на АТ-МСК, представляваха особен интерес. PGE_2 беше открит в среди от АТ-МСК, median (IQR) 249 pg/ml (200-298). Концентрацията на PGE_2 в културите на ПКМК от пациенти с РА и култивирани с контролни среди и кондиционирани среди от АТ-МСК бяха съответно 587 pg/ml (89.83-2222) и 3043.13 pg/ml (46.22-5060), $p = 0.064$, което би могло да се приеме за тенденция към сигнификантност.



***Фиура 17**. Разлика в нивата на PGE_2 в култури на ПКМК от пациенти с РА, култивирани с контролни среди за клетъчно култивиране (А) и среди от АТ-МСК (Б). Данните са представени чрез медианна стойност, минимална и максимална стойност. Представена е и концентрацията на PGE_2 в средите на АТ-МСК. Прекъснатите линии изобразяват минималната и максималната стойност на концентрацията на PGE_2. Фиг. 17 е обобщаваща за всички 17 експериментални постановки, проведени с ПКМК, добити от 17 различни пациенти с РА, $*p < 0.05$*

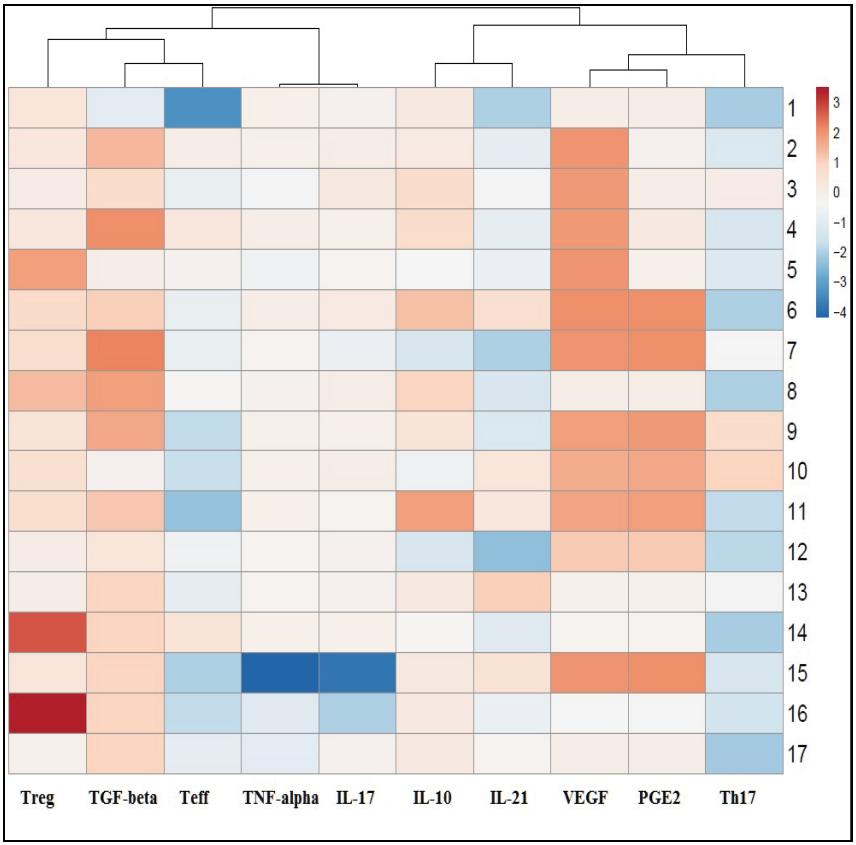
4.8. Обобщение на получените резултати чрез мултивариатни статистически анализи

4.8.1 Обобщение посредством Heatmap

Подходящ визуализиращ подход, чрез който да представим данните за промяната на изследваните цитокини и флоуцитометрични показатели за всички опитни постановки с ПКМК от 17 пациенти с ревматоиден артрит, беше heatmap графиката (фиг. 18).

Дендрограмата в горната част на графиката представя резултата от клъстерен анализ, изследващ сходството между изследваните променливи. Клъстерният анализ е проведен по метода на Ward, а като мярка за сходство е използван коефицентът на корелация на Spearman. Променливите могат да бъдат групирани в 2 клъстера, състоящи се от 2 подклъстера, съот-

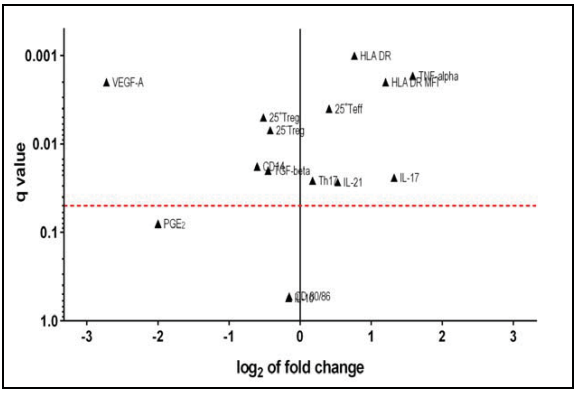
ветно TGF-β, Teff и Tregs, които формират собствен подклъстер, а IL-17и TNF-α формират отделен подклъстер. Въз основа на сходството помежду си sVEGF-A, PGE2 и Th17 могат да бъдат групирани в отделен клъстер, както и IL-10 и IL-21.



***Фигура 18**. Heatmap, обобщаващ данните по отношение на промените в изследваните показатели при всички 17 опитни постановки*

4.8.2. Корекция при проверка на множество хипотези

На фигура 19 в обобщен вид са представени резултатите от разликите в 17 различни променливи между ПКМК от пациенти с РА, получени при култивирането с контролни среди и среди от АТ-МСК. На абсцисата е изобразена големината на промяната (fold change) в логаритмична скала. Променливите, които намаляваха вследствие на култивирането със среди от АТ-МСК, имаха положителни стойности върху Х оста, а тези, които се увеличаваха, имаха отрицателни стойности. На оста Y (ординатата) бяха изобразени коригираните стойности на p (q) съгласно метода на Benjamini-Hochberg. Статистически значимите промени се разполагаха по ординатната ос апикално спрямо пунктираната линия.



Фигура 19*. Резултати от 17 изследвани променливи при култивиране на ПКМК от пациенти с РА с контролни среди и кондиционирани среди от АТ-МСК, въведена е корекция за множество тествания*

4.8.3. Факторен анализ между нивата на изследваните цитокини в културите на ПКМК от пациенти с РА

С цел да изследваме и обобщим взаимоотношенията/корелациите между промените на цитокините в условията на въздействие на разтворими медиатори от АТ-МСК, проведохме факторен анализ на цитокините в културите на ПКМК, култивирани с контролни среди и с кондиционирани

среди от АТ-МСК. Факторният анализ е техника за мултивариантен анализ, базирана на идеята за намаляване на броя на променливите с цел улесняване на визуализацията и разбирането на структурата на данните

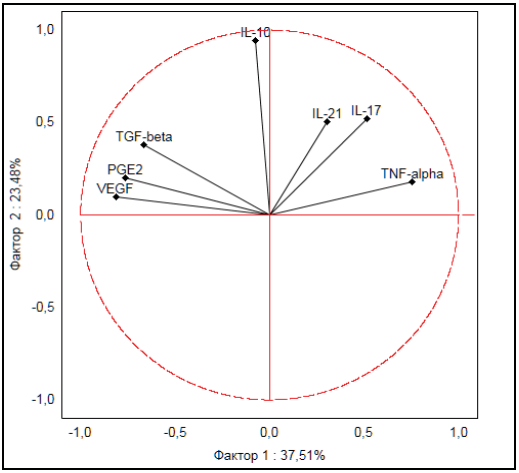
Таблица 4. Стойности на Eigenvalue, проценти от общата дисперсия в цитокиновите променливи, обяснявани от 3-те фактора

	Eigenvalue	**% от общата дисперсията**	**% кумулативна дисперсия**
Фактор 1	2.63	37.51	37.51
Фактор 2	1.64	23.48	61
Фактор 3	1.25	17.79	78.89

Таблица 5. Корелационна зависимост (факторно тегло) между променливите и принципалните компоненти (фактори)

	Фактор 1	**Фактор 2**	**Фактор 3**
IL-17A	0.51	0.52	0.52
TNF-α	0.76	0.18	0.20
IL-21	0.31	0.50	-0.67
sVEGF-A	-0.81	0.10	0.32
PGE_2	-0.76	0.20	0.35
IL-10	-0.01	0.94	0.12
TGF-β	-0.67	0.38	-0.49

Силна положителна корелация съществуваше между TNF-α и IL-17, от една страна, и фактор 1 – от друга. Силна отрицателна корелация беше установена между фактор 1 и sVEGF-A, PGE_2 и TGF-β. IL-10 корелираше най-силно с фактор 2. По-слаба корелация определихме между фактор 2 с IL-17, IL-21 и TGF-β1 (табл. 5).



***Фигура 20**. Корелация между изследваните цитокини в културите на ПКМК от пациенти с РА. Представени са проекциите на изследваните променливи върху фактор 1 и фактор 2*

В допълнение, корелационната зависимост беше оценена и с теста на Spearman: между TGF-β и PGE_2 ($R = 0.50$, $p < 0.05$); sVEGF-A и PGE2 ($R = 0.76$, $p < 0.05$); между IL-17 и TNF-α ($R = 0.63$, $p < 0.05$), между IL-21 и TNF-α също беше наблюдавана положителна корелация ($R = 0.776$, $p < 0.001$). В допълнение, положителна корелация посредством теста на Spearman беше намерена между TNF-α и IL-10 ($R = 0.45$, $p < 0.05$), и отрицателна корелация между TNF-α и TGF-β ($R = -0.43$, $p < 0.05$).

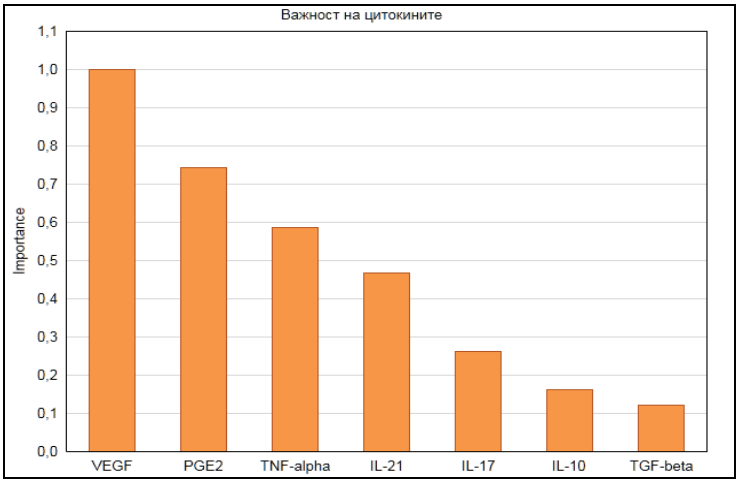
4.8.4. Многофакторни методи за анализ. Метод на опорните вектори. Дървета за класификация и регресия

На първо място, параметричният тест на Hotteling (Multivariate paired Hotteling's T-Squared**)** за сравнение на две свързани многовариантни разпределения би могъл да покаже наличието на сигнификантна разлика между културите на ПКМК, култивирани с контролни среди, спрямо тези, култивирани със среди от АТ-МСК, въз основа на стойностите на всички измерени цитокини (*За да бъде приложен параметричният тест на Hotteling, всички променливи бяха трансформирани до нормално разпределение*.) Неговата стойност беше сигнификантна, $p < 0.05$, т. е. показа статистическа значима разлика.

Един от възможните подходи, чрез който бихме могли да измерим колко силно две групи се различават по множеството променливи, които ги описват, е да сравним колко точно алгоритъмът за класификация може да класифицира опитните постановки като "култивирани с АТ-МСК" или "контролни среди" въз основа на отделните цитокинови профили. Ако две групи имат много различни цитокинови стойности, тогава пробите от всяка група ще бъдат лесно класифицирани или определени в правилната група. И обратно, ако цитокиновите профили на две групи са много сходни (или идентични, т. е. няма промяна под въздействието на АТ-МСК), алгоритъмът за класификация ще може да класифицира правилно само малка част от пробите (или изобщо никакви) (*Azizeh et al., 2018*).

4.8.5. Дървета за класификация и регресия (CART)

Анализът позволи да се изследва важността на цитокините, т.е кои цитокини имат най-голяма тежест за разграничаване на двата цитокинови профила.

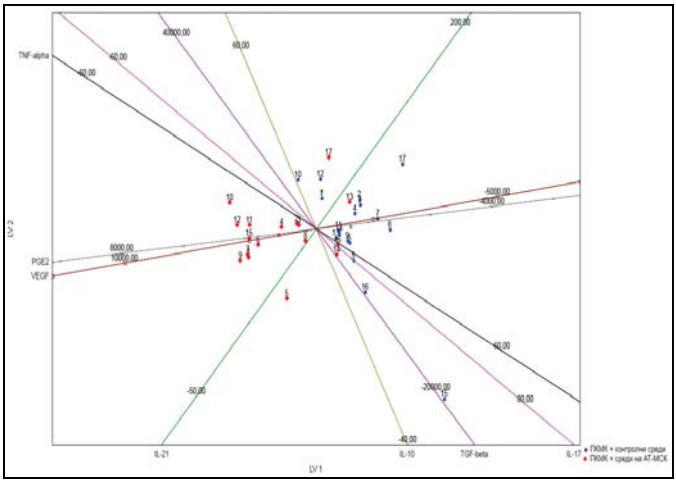


Фигура 21. *Важността на отделните цитокини, представени като релативна стойност, по отношение на разграничаването на цитокиновите профили на ПКМК, култивирани с контролни среди и среди от АТ-МСК*

Тук „важност“ (Importance) е релативна величина и представя средното тегло на всяка променлива, като приема стойност от 1 до 0 (фиг. 21). Променливата с най-голяма важност приема стойност 1, а всички останали променливи приемат стойност < 1 в зависимост от относителната им важност спрямо най-важната променлива.

4.8.6. PLS – Дискриминантен анализ

Изборът ни на визуализираща техника за представяне на сигнификантните различия в цитокиновите нива, получени вследствие на култивиране на ПКМК от 17 пациенти с РА с контролни и кондиционирани среди от АТ-МСК, се спря върху стандартизиран биплот, представящ резултатите от проведен Partial Least squares (PLS) анализ за класификация. Фигура 22 представя стандартизирания биплот. Той демонстрира проекциите на двете групи цитокинови профили, изобразени посредством червени ромбове (културите на ПКМК, култивирани със среди от АТ-МСК) и сини точки (културите на ПКМК, култивирани с контролни среди) върху новите променливи (LV1 и LV2), както и ориентацията и корелацията на цитокиновите променливи спрямо LV1 и LV2 (цветните линии).



***Фигура 22**. Стандартизиран биплот, представящ цитокиновите профили от 34 клетъчни култури от 17 експериментални постановки с ПКМК от 17 пациенти. С цифра е означен съответният пациент с РА, донор на ПКМК*

5. ОБСЪЖДАНЕ

5.1. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху Th17 хелперните лимфоцити при пациенти с РА

Съвременното разбиране за имунопатогенезата на РА определя Th17 субпопулцията като основен организатор на проинфламаторните и деструктивните прояви, характерни за това заболяване, поради което голяма част от навлизащите в терапевтичната практика нови, по-ефективни подходи за лечение са насочени именно към неутрализиране на обвързания с Th17 цитокинов профил. Пример за внедряване на такива стратегии са моноклоналните препарати, насочени срещу IL-6, IL-17 и GM-CSF, и таргетните синтетични селективни и неселективни JAK-STAT инхибитори, целящи едновременен блокаж на сигнално-трансдукционни пътища на множество цитокинови медиатори. Основен аспект в нашата работа, трасиращ посоката на теоретичното проучване на потенциалните ползи на МСК-базираните терапевтични подходи за повлияване на болните от РА, беше проследяването на динамиката на пула от Th17, свързано както с бройни, така и с функционални изменения.

Нашите резултати показаха сигнификантно по-нисък процент на Th17 лимфоцитите в културите на ПКМК от пациенти с РА, култивирани със среди от АТ-МСК спрямо тези, култивирани с контролни среди (фиг. 6). Резултатите, получени от екипа ни, издържаха направената по-строга статистическа проверка по метода на Benjamini-Hochberg, което придава допълнителна тежест по отношение на „истинността" на наблюдаваното понижение на броя на Th17. Нашите резултати съответстваха на наличните в литературата данни за паракринното действие на среди от МСК от адипозна тъкан (*Gonzalez-Rey et al., 2009; Ghannam et al., 2010; Baharlou et al., 2017)* при РА (*Wang et al., 2012*) и здрави контроли (*Pianta et al., 2014*), като при справка в литературата не бяха открити данни за обратния ефект или за липса на ефект. Важен аспект от направените от нас наблюдения по отношение на по-ниския процент Th17 под действие разтворимите медиатори, продуцирани от АТ-МСК, беше да „измерим" големината на фактическата значимост или на прекия биологичент ефект от имуносупресивното действие на МСК. Големината на ефекта отразява магнитуда на промяната в изследваната субопулация и „корелира" положително с евентуалната практическа полза. От тази гледна точка този показател е важна отправна точка в сравнителен план при съпоставяне на действието на АТ-МСК с

други кандидати за терапевтични стратегии при ревматоиден артрит. Наблюдаваната в нашите *in vitro* постановки големина на ефекта беше определена като по-голяма от типичната (*Rice and Harris, 2005*). В проучанията на други екипи, описващи действието на МСК върху Th17 от пациенти с РА, не е съобщаван параметърът "големина на ефекта".

Съгласно проведената от нас опитна постановка, процентът на Th17 беше изследван в 3-дневни култури на човешки ПКМК. Наблюдаваните промени в компартмента на Th17 биха могли да бъдат обяснени посредством няколко основни механизъма, застъпени в литературата: 1) конверсия на Th17 в други субтипове, сред които и $CD4^+FoxP3^+$ Tregs и други имунорегулаторни фенотипове; 2) инхибиция пролиферацията на Th17; 3) потискане на Т-клетъчната пролиферация чрез индуциране на анергия или имуносупресия; 4) апоптотична смърт и „загуба" на Th17 в тридневните култури.

5.2. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ефекторните лимфоцити (Teff) при пациенти с РА

Централно място в нашите експериментални постановки заемаше и изследването на активираните $CD4^+CD25^+$ Т-хелперни лимфоцити. CD25 е активационен маркер, експресиран от активираните Т-хелперни лимфоцити, но също така може да бъде и перманентно експресиран от $FoxP3^+$ Т-регулаторни лимфоцити. С цел да не допуснем припокриване между популациите, отчетохме ефекта на средите от АТ-МСК върху $CD4^+CD25^+$ лимфоцити, които н експресират транскрипционния фактор FoxP3. Съгласно получените от нас резултати процентът на $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ лимфоцитите (Teff) беше сигнификантно по-нисък в рамките на 3-дневно култивиране под действието на среди от АТ-МСК. Сигнификантността на тази находка остава и след приложената корекция по метода н Benjamini-Hochberg. Големината на ефекта и тук беше по-голяма от типичната. Този резултат е в съответствие с данните на Gonzalez-Rey и сътрудници за въздействието на МСК върху Tregs при болни с РА, където също се установява понижение на Teff (*Gonzalez-Rey et al., 2009*).

Наблюдаваните промени в пула на $CD4^+CD25^+$ клетки потвърждават един от най-важните механизми, чрез който МСК потискат пролиферацията на Т-хелперните лимфоцити. Посредством модулация на експресията на повърхностния високоафинитетен рецептор за IL-2 се повлиява клонална-

та експанзия и пролиферация на активирани Т-хелперни лимфоцити след фазата на антиген-зависимата активация.

Съгласно нашите резултати, намалението на Teff клетки корелира в най-висока степен с повишението на TGF-β и процента на FoxP3^{+}Tregs, тези промени бяха обединени в един клъстер заедно с промените, настъпващи между TNF-α и IL-17.

Установените корелационни зависимости, посредством йерархичен клъстерен анализ ни дадоха основание да предложим описания механизъм и причинно-следствени връзки, засягащи инхибицията на Т-хелперната пролиферация, с функционалната и бройна активация на Tregs, съпроводени от намалената секреция на TNF-α, IL-17 и повишена продукция на TGF-β.

5.3. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}

В концептуален план дългият път, извървян от началото на 90-те години на XX в., с идентифицирането на имуносупресивните CD25+ Т-хелперни лимфоцити до откриването на ролята на транскрипциония маркер FoxP3 в началото на XXI век, ражда модерното разбиране за ролята на CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}Tregs в процеса на имунната хомеостаза и процесите на „здраве и болест". Сега Tregs се определят като клетъчна популация, която е основен „принципал" на процесите на поддържане на периферен автотолеранс. Главната им роля е свързана с прояви на висока степен на хетерогенност и пластичност. Tregs, едновременно с експресията на своя мастър-регулатор FoxP3, могат да експресират и транскрипционите фактори GATA-3, Rorγt, T-bet, характерни за Th2, Th17, Th1 поляризираните хелперни лимфоцити. Опитите за разграничаване на същинските имунорегулаторни клетки от активираните хелперни лимфоцити водят до отграничаване на три основни популации, базирани на експресията на FoxP3, CD25 и CD45RA, а именно CD45RA^{-}CD25^{high}FoxP3^{high} активирани или често наричани ефекторни Tregs; CD45RA^{+}CD25^{-}FoxP3^{+}, определяни в литературата като неактивирани Tregs; CD45RA^{-}CD25^{low}FoxP3^{low} активирани ефекторни Т-хелперни лимфоцити, транзиторно увеличаващи ескпресията на FoxP3 и CD25 след активация. Tregs са хетерогенни и по своя произход по-голямата част от циркулиращите в периферията са с директен тимусен произход nTregs, докато други са продукт на диференциация в периферните лимфни възли на наивни хелпери или активирани ефекторни лимфоцити.

Нашето проучване по недвусмислен начин показва способността на разтворимите фактори, съдържащи се в среди от АТ-МСК, да повлияват $CD4^+FoxP3^+CD25^+$ регулаторните лимфоцити в насока увеличаване на техния процент в клетъчни култури на ПКМК от пациенти с РА. Резултатите, получени от екипа ни, издържаха статистически строгата проверка, направена посредством метода на Benjamini-Hochberg. В подкрепа на „биологичната значимост" на нашите резултати е „големината на ефекта", отразяваща силата на промените в изследваната от нас популация, която беше определена като „по-голяма от типичната". Получените от нас резултати бяха в съответствие с данните от експериментални проучвания, изучаващи паракриното действие на среди от МСК върху ПКМК от здрави донори (*Ivanova-Todorova et al., 2012*), ревматоиден артрит, лупус (*Chen et al., 2017*) и също така и *in vivo* действие на МСК-утилизиращи подходи към пациентите с РА (*Gonzalez-Ray et al., 2007*). Големината на ефекта би могла да послужи като важна отправна точка при съпоставяне на получените от нас резултати, описващи действието на АТ-МСК върху Tregs компартмента при пациентите с РА *in vitro,* с резултатите от други проучвания върху РА, а също и при други заболявания, и да намери приложение като теоретична база на Tregs-ориентираните терапевтични стратегии.

Увеличаването на процента на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs в 3-дневните култури на ПКМК бихме могли да отдадем на следните възможни механизми: 1) активиране и пролиферация на наличните в култивираните ПКМК Tregs; 2) конверсия на активираните ефекторни Т-лимфоцити, Th17 или наивни Т-хелперни лимфоцити в $CD25^+$ Tregs; 3) релативно увеличение на процентното съдържание на Tregs поради апоптична смърт на Т-хелперните лимфоцити; 4) увеличена експресия на FoxP3 като белег за ранна активация. Дискутирайки тези възможни механизми, е важно да отбележим факта, че $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ се характеризират с висок пролиферативен потенциал (*Walker, 2004*). Основни разтворими фактори, продуцирани от МСК с потенциращ $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs потенциал и открити в нашите експериментални постановки, бяха sVEGF-A и PGE_2 (табл. 3).

Наблюдаваните от нас бройни промени в компартмента на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ също биха могли да се дължат до някаква степен и на разтворими медиатори, за които средите на АТ-МСК не бяха тествани от нашия екип, но по отношение на секрецията им има ясно установен консенсус. Добре описани са потенциращото действие върху Tregs на хемок-

сигенза, NO, HGF, Galectin-1, LIF, TSG-6, sHLA-G5, както и механизмите на микровезикуларен транспорт (*Nasef et al., 2008; Fainardi et al., 2010; Zhang et al., 2014).*

Заслужава да бъде разгледана и алтернативната възможност, отнасяща се до клетките, експресиращи FoxP3 под въздействие на фактор или фактори, секретирани от МСК. Активираните Т-хелперни лимфоцити в началните фази на своята активация могат да увеличат експресията си на FoxP3, тоест наблюдавните от нас $FoxP3^{+}CD25^{+}$ лимфоцити биха могли всъщност да са активирани ефекторни клетки, а не същински Tregs. Това твърдение е в противоречие с увеличената секреция на супресивните TGF-β, PGE_2 и sVEGF-A, от една страна, и намаления процент Th17 с изместено Th17/Tregs съотношение и кореспондиращо потистната секреция на Th17 асоциираните IL-17, IL-21 и TNF-α – от друга. Също така при нашето изследване флоуцитометричният подход беше свързан с определяне на Tregs на базата на висока експресия на FoxP3, докато транзиторно експресиращите FoxP3 ефекторни лимфоцити имат ниска експресия на FoxP3. Също така можем да се позовем и на добре описаните ефекти на АТ-МСК да индуцират iTregs в клетъчни култури от здрави донори и при миши модели (*Engela et al., 2012; Ivanova-Todorova et al., 2012).* Тези iTregs имат характерен профил на метилация в TSDR локуса на FoxP3, но наред с това проявяват ниска експресия на Helos и Nrp1 – маркери, експресирани от nTregs. В нашата постановка нямаше как да разграничим nTregs от iTregs, за да диференцираме дали пролиферацията на наличните nTregs или конверсията в iTregs е преобладаващият процес в културите на ПКМК от пациенти с РА.

5.4. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^{+}CD25^{-}FoxP3^{+}$

Някои автори предполагат асоциация на тази все още недобре изучена субпопулация на потенциално имуносупресивни лимфоцити с автоимунните заболявания (*Ferreira et al., 2017*). В тази връзка $CD4^{+}CD25^{-}FoxP3^{+}$ бяха избрани и като обект в нашето проучване на имуносупресивното действие на АТ-МСК.

Сравняването на процента на $CD4^{+}CD25^{-}FoxP3^{+}$ популацията в ПКМК, култивирани с кондиционирани среди на АТ-МСК спрямо тези, култивирани с контролни среди, показа по недвусмислен начин сигнифаканто повишение на процента на тази популация с ниска до липсваща екс-

пресия на CD25. В нашите експериментални постановки повишението на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ корелираше в голяма степен с увеличаването на "класическите" $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs. Големината на ефекта, наблюдаван за $CD4^+CD25^-FoxP3^+$, и коригираната сигнификантност "q value" бяха сходни с тези при промяната в „класическите" Tregs (фиг. 19). Въпреки недвусмисленото сходство в динамиката на пула от $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ с тази при $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs под паракринното влияние на средите от AT-МСК, получените от нас резултати продължават да носят повече въпроси, отколкото отговори. Предложените в научната литература и отчасти разнопосочни концепции относно природата на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ Tregs биха могли да бъдат систематизирани в следните твърдения:

1. $CD4^+CD25^{low/-}FoxP3^+$ Tregs са междинна клетъчна популация, транзиторно появяваща се при конверсията на $CD25^-$ наивни Т-хелперни лимфоцити в „класически" CD25 силно експресиращи Tregs. В контекста на тази хипотеза, появата на повърхностна експресия на CD25 не е ранен маркер за Т-клетъчна активация, защото клетките не са праймирани с антиген и активирани съгласно трисигналния механизъм за Т-клетъчна активация. Това е късна изява на епигенетични промени, свързана с хипометилация на TSDR региона на FoxP3, стабилизиране на експресията на FoxP3 и придобиване на характерния за Tregs профил (*Bianchini et al., 2011*).

2. $CD4^+CD25^{low/-}FoxP3^+$ Tregs може да са пълноценни имуносупресивни Tregs, транзиторно понижили експресията си на CD25. Това може да е свързазно с блокиране на mTORC сигналния път, необходимо условие за навлизане на Tregs в G1 фазата на дележния цикъл (*Procaccini and Matarese, 2012*).

3. Загубата и намалената мембранна експресия на CD25 може да са свързани с отделените металопротеинази, чието протеолитично действие по отношение на „отрязване" на мембраноекспресираните CD25 е добре описано в литературата (*Ding et al., 2009*).

4. $CD4^+CD25^{low}FoxP3^+$ Tregs може да са пълноценни имуносупресивни клетки и да са отделен субтип на Tregs, които да са независими от действието на IL-2 *(Nakamura et al., 2007*).

5. $CD4^+CD25^{low}FoxP3^+$ Tregs са дисфункционални и не могат да осъществяват необходимата имуносупресивна функция, за да потиснат дисрегулирания имунен отговор. Появата им е свързана с поява на автоимунни състояния (*Horwitz, 2010*).

6. $CD4^{+}CD25^{low}FoxP3^{+}$ Tregs може да са краен етап от диференциацията на класическите Tregs (*Ferreira et al., 2017*).

В заключение, на базата на увеличения брой Т-регулаторни популации и характерните им цитокини, редукцията на Th17 и Teff и техните характерни цитокини под влияние на среди от МСК, както и липсата на увеличаване на процеса на апоптозата за Т-хелперните клетки, можем да изкажем твърдението, че под взаимно допълващото се действие на разтворимите медиатори, налични в средите от МСК, се осъществява пълноценен процес на „инфекциозен толеранс", при който проинфламаторен Т-хелперен фенотип се „замества" с толерогенен такъв, без да настъпва ексцесивна апоптотична смърт. Това е в подкрепа на препрограмирането на взаимно свързаната мрежа от имунокомпетентни клетки на базата на пластичност между функционално антагонистично поляризираните Th17 и Treg лимфоцитни субпопулации.

5.5. Ефект на секреторни фактори от АТ-МСК върху експресията на HLA-DR върху моноцитни клетки при пациенти с РА

Освен директното инхибиторно действие на редица от откритите от други автори, както и описани от нашия колектив (*Rozenberg et al., 2016*; *Vasilev et al., 2019,*) секреторни фактори, МСК могат да осъществяват инхибиторен ефект върху Т-хелперните лимфоцити и по индиректен начин, модулирайки функцията на клетките от миелоидния ред. Такива са клетките със способност за фагоцитоза и антигенно представяне като кръвните моноцитни клетки, поляризираните макрофаги и дендритните клетки. Поради тази причина изследването на бройните и функционалните промени, настъпващи в пула на Th17 и Tregs, беше обвързано и с мониториране на основни параметри на миелоидните клетки, ангажирани в механизма на антигенно представяне, а именно експресията на HLA-DR и костимулаторния комплекс B7, формиран от CD80 и CD86. Някои опити за класификация на разтворимите фактори, продуцирани от АТ-МСК, са довели до условното им разделяне на разтворими медиатори, влияещи директно върху ефекторните Т-лимфоцити, каквито са IDO, NO, sPD-L1, Galectin-1, TGF-β, и такива, действащи в посока индуциране на моноцити/макрофаги с толерогенен фенотип: IL-6, PGE_2, HGF, IL1-RA.

Моноцитните клетки играят важна роля в имунопатогенезата на РА, служейки като източник на зрели АПК. В присъствие на проинфламаторни цитокини те се диференцират в зрели дендритни клетки (ДК), в М1 поляризирани макрофаги (често определяни като възпалителни), характеризиращи се с висока степен на експресия на HLA-DR, както и в остеокласти, играещи основна роля в костното ремоделиране (*Jakubzick et al., 2017*). Зрелите ДК се считат за главните двигатели на диференциацията и поляризацията на $CD4^+$ Т-хелперните субпопулации, но наред с това са натрупани доказателства, че моноцитите/макрофагите, съставлявайки най-разпространения клетъчен тип в ревматоидния синовиум, също могат да играят централна роля в този процес.

Получените експериментални данни демонстрираха сигнификантно понижение както в броя, така и в плътността (mean fluorescent intensity, MFI), на експресия на HLA-DR върху кръвни моницитни клетки, настъпващо под действие на разтворимите фактори, налични в нашите среди от АТ-МСК. Големината на ефекта на промяната в експресията на HLA-DR беше много по-изразена от типичната, съгласно изработена от Cohen, номенклатура. В този смисъл намаляването на експресията на HLA-DR беше един от най-силно повлияните параметри от всички наблюдавани промени в нашата експериментална постановка. Намалението на експресията на HLA-DR както като процент експресиращи клетки, така и като плътност на ниво отделна клетка под действие на АТ-МСК, е добре описано и установено явление (*Ivanova-Todorova et al., 2009*). В нашите опитни постановки експресията на HLA-DR беше изследвана върху кръвни моноцити. Обичайно, човешките кръвни моноцити са „лоши“ антиген-представящи клетки, въпреки че те експресират HLA клас II антигени, костимулираторен комплекс B7 и различни молекули от интегриновото семейство. При провъзпалителни състояния те увеличават експресията на повърхностните си маркери, както и производството на цитокини и в съответствие с установения трисигнален модел на Т-клетъчно активиране, също могат да активират и поляризират Т-клетките (*Corthay, 2006*). От тази гледна точка ние считаме, че описаните ефекти на средите от МСК върху повърхностната експресия на HLA-DR от кръвните моноцити на пациенти с РА са изключително важни и съставляват значим и желан аспект в множеството от имуносупресивни ефекти и механизми, трасиращи пътя към терапевтичното приложение на МСК-базираните подходи.

5.6. Влияние на средата от АТ-МСК върху цитокиновата секреция от имунокомпетентни клетки, изолирани от пациенти с ревматоиден артрит

Паралелно с промените в процентното съдържание на изследваните Т-хелперни субпопулации и моноцитни клетки под действие на кондиционираните среди от АТ-МСК, ние изследвахме и разликата в концентрацията на имуносупресивните TGF-β, IL-10 и следните проинфламаторни цитокини – TNF-α, IL-6, IL-17A, IL-21 и IL-23.

В концептуален план това беше направено, за да свържем фенотипните промени, базирани на флоуцитометричното изследване, с функционалните, свързани с промяна в цитокиновата секреция. Корелационните зависимости между фенотипните промени и тези в цитокиновата секреция изследвахме посредством йерархичен клъстерен анализ с мярка за сходство с корелациония коефицент на Spearman. За изследване на корелационите зависимости между промените в цитокиновите нива беше приложен факторен анализ. Силата на корелационната зависимост между изследваните променливи беше приложена съобразно критериите, формулрани от Bradford Hill (Bradforf Hill Criteria) за изследване на причино-следствената връзка между дадени параметри (*Fedak et al., 2015*).

5.6.1. Въздействие на разтворимите медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху секрецията на TGF-β

TGF-β може да бъде определен като ключов цитокин с двойнствено влияние върху равновесието между Th17/Tregs. Наличието на сигнификантна разлика в нивата на TGF-β в клетъчните култури на ПКМК, култивирани с кондиционирани среди от АТ-МСК спрямо контролните среди, е важна отправна точка при интерпретацията на изместването на Th17/Tregs в посока потенциране на Tregs и намаляване процента на Teff. Демонстрирано беше сигнификантно увеличение в нивата на TGF-β, провокирано от паракринното действие на средите от АТ-МСК. Големината на ефекта на описаната промяна беше по-голяма от типичната**.** Повишението, настъпващо в нивата на TGF-β, показа силна корелация с повишението на sVEGF-A и PGE2 и отрицателна с повишението на TNF-α и IL-17 според факторния анализ и теста на Spearman (фиг. 20). Освен това, проведеният клъстерен анализ на изследваните цитокини и флоуциметрично определе-

ните променливи демонстрира, че увеличението в нивата на TGF-β корелира положително в най-голяма степен с понижението на процента на Teff и увеличението на FoxP3 положителните Tregs, поради което те бяха обединени в един клъстер. Ако приложим първия принцип от критериите на Bradford Hill, то въз основа на най-силната корелационна зависимост можем да заключим, че промяната в увеличението на нивата на TGF-β е причинно-следствена и е най-тясно свързана с намаляване на броя на Teff и увеличаване на Tregs (*Schunemann et al., 2010*). Вземайки предвид силното анти-пролиферативно действие на TGF-β, осъществяващо се посредством блокиране на циклин-зависимите кинази C-myc, cyclin D2, CDK2 и cyclin E (*Hannon and Beach, 1994)*, то нашите резултатите са в съответствие с добре описания механизъм на аферентно действие на TGF-β върху Teff. Разгадаването на причинно-следствената връзка между промените в TGF-β и Tregs е далеч по-сложно, защото Tregs са едни от основните източници на този растежен фактор, но също така TGF-β е необходим за генериране на iTregs, тоест TGF-β е един от основните разтворими медиатори в процеса на инфекциозен толеранс. Освен това TGF-β медиираната фаза на свиване на активираните ефектори влияе и върху наличността на IL-2. В този смисъл липсата на изследване на нивата на IL-2 е едно от ограниченията на настоящия дисертационен труд. TGF-β1 и IL-2 са двата цитокина, необходими за генерирането на iTregs, които действат чрез взаимна координация. TGF-β може да индуцира транскрипцията на FoxP3, посредством взаимодействие с транскрипционните фактори STAT3 и NFAT (*Josefowicz and Rudensky, 2009*), които се свързват към CNS1 енхансър и стимулират FoxP3 индукцията (*Tone et al., 2008*).

5.6.2. Влияние на секреторни медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на TNF-α, IL-6, IL-17A, IL-21

При подбора на цитокините, които да изследваме, се спряхме на проинфламаторни цитокини с ключово значение в етиопатогенезата на РА, като TNF-α, IL-6, IL-17A, IL-21 и IL-23. Характерно за всички тези цитокини е завишеното им серумно ниво при пациенти с РА в сравнение със здравите контроли (*Noack and Miossec, 2017*). IL-17A, IL-21, TNF-α и IL-6 са основните цитокини, продуцирани от Th17 хелперните лимфоцити (*Brockmann et al., 2017*). IL-6 в кобинация с TGF-β се смята за ключов цитокин, необходим за насочване на диференциацията на наивните Т-

хелпери в посока Th17 *(Zhou et al. 2013)*, а IL-23 е важен за стабилизиране на Th17 *(Jain et al., 2016)*. Наред с това доказателство, демонстриращо важността на TNF-α, IL-6 и IL-17 по отношение на болестния процес при РА, е терапевтичната ефикасност и способността за индуциране на ремисия при приложение на новонавлезлите биологични средства, блокиращи поединично TNF-α, IL-6 и IL-17A, както и тези блокиращи селективно и неселективно JAK/STAT системата.

Нашите резултатите показаха сигнификантно понижение в нивата на TNF-α, IL-17 и IL-21 в културите на ПКМК под действие на разтворимите фактори, налични в кондиционираните среди от АТ-МСК. По отношение на големината на наблюдавания ефект, намалението в нивата на TNF-α и IL-17 беше определено като много по-голямо от типичното, а понижението на IL-21 беше по-голямо от типичното. От проведения тест за корелационни зависимости по метода на Spearman беше открита силна положителна корелация на TNF-α с IL-17 и с IL-21 и отрицателна корелационна зависимост на TNF-α с TGF-β. От проведения факторен анализ, еквидистантните линии на IL-17 и IL-21 бяха с приблизително еднаква дължина и ориентация върху корелационния плот, което е визуализиращ метод, представящ силната положителна корелация между тях.

Получените от нас резултати за понижаване на TNF-α, IL-17 и IL-21 под действие на АТ-МСК съвпадат с наблюденията на други изследователи (*Zhou et al., 2011; Liu et al., 2014; Baharlou et al., 2017*). Основните източници на IL-17 и IL-21 в нашите опитни постановки могат да бъдат предимно диференцираните Th17 лимфоцити, докато TNF-α може да бъде секретиран от широк кръг имунни клетки: Th1 и Th17 от лимфоцитния компартмент, както и от миелоидни клетки. Понижението на Th17-асоциираните IL-17 и IL-21 заедно с намаляването на процента Th17 под действието на АТ-МСК е доказателство в подкрепа на тезата, че АТ-МСК водят и до функционално потискане на Th17. От гледна точка на евентуално терапевтично внедряване на подходи, базирани на МСК, потискането на функционалната активност на Th17 и конкретно на секретираните от тях IL-17 и IL-21 е от съществено значение. IL-17 е основен стимулатор на пролиферацията на синовиални фибробластни клетки и усилва неутрофилната инфилтрация в синовиума (*Van Hamburg et al., 2010*). IL-17 също повлиява и костната резорбция чрез увеличаване на експресията на RANKL на повърхността на остеокастите (*Kotake et al., 1999*). Нивата му

корелират със ставното засягане и болестната активност (*Li et al., 2005*). В-лимфоцитите имат висока степен на експресия на рецептора за IL-17 и комбинацията на IL-17 с IL-21 има силно активиращо действие върху тях. Според редица автори това е механизъм, участващ в пречупването на В-клетъчния толеранс и подпомагащ продукцията на автоантитела (*Bai et al., 2008; Hsu et al., 2008*). Синергизмът между IL-17 и TNF-α води до потенциране на действието на IL-17 по отношение деструктивното му въздействие. Също така IL-21 има добре описано въздействие върху стимулирането на секрецията на TNF-α както от синовиални, така и от хелперни лимфоцити от периферна кръв. Този механизъм може да обясни откритата от нас силна корелация между нивата на TNF-α и IL-21. IL-21 също има установено остеокластогенно действие (*Kwok et al., 2012*) и може да индуцира отделянето на металопротеинази 1 и 3 (*Lebre et al., 2016*). Всичко, описано до тук, демонстрира способността на АТ-МСК да потискат едновременно секрецията на TNF-α, IL-17 и IL-21 от имунни клетки, добити от периферна кръв. Значението на IL-17A, IL-21 и тяхната основна роля в патогенезата на ставното увреждане при РА повдига въпроса дали МСК-базираните стратегии, посредством влиянието им върху Th17 и Th17-асоциираните IL-17 и IL-21, биха могли да бъдат допълнителна терапевтична възможност.

5.6.3. Влияние на секреторни медиатори, секретирани от АТ-МСК, върху нивата на sVEGF-A и PGE2

Нашите изследвания показаха, че под действие на средите от АТ-МСК се установява сигнификантно по-висока секреция на PGE2 в културите на ПКМК, което може да бъде обяснено с амплификацията по механизма на положителната обратна връзка. Този механизъм на автокринна регулация по типа на положителна обратна връзка може да бъде потенциран допълнително и от секретирания от МСК IL-6 (Maggini et al., 2010). IL-6, води до продукция на PGE_2 и възможността на средите от МСК да блокират сигнално-трансдукционното действие на IL-6 посредством активиране на SOCS3 (Liu, 2017). Действието на PGE_2 е описано подробно в точка 6.6.2. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$.

sVEGF-A може да се охарактеризира като ендотелноклетъчен митоген и наред с ключовата му роля в процесите на ангиогенеза и неоваскуларизация за него са характерни и редица имуносупресивни свойства. При

ПКМК единствен източник на sVEGF-A са миелоидните клетки и в нашите опитни постановки установихме сигнификантно по-високи нива на sVEGF-A под влияние на фактори, секретирани от АТ-МСК, които биха могли да се тълкуват в подкрепа на индукцията на толерогенни миелоидни клетки. Действието на sVEGF-A и PGE_2 са описани подробно в точка 6.6.2. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$. Действието на sVEGF-A е описано подробно в точка 6.6.2. Влияние на кондиционирани среди от АТ-МСК върху субпопулацията на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$.

5.7. Заключение

Получените от нас резултати ясно демонстрират, че под паракринното действие на разтворимите фактори, съдържащи се в кондиционирани среди от АТ-МСК, настъпват бройни и функционални промени в клетъчните популации, изолирани от периферна кръв, при пациенти със средна и висока активност на ревматоиден артрит. Основно тези промени са свързани с редукция на процента на Th17 и активираните ефекторни Т-хелперни лимфоцити и увеличение на регулаторните $FoxP3^+$Т-хелперни клетки; потискане на експресията на HLA-DR върху кръвни моноцитни клетки, а също така и матуцарионен стоп в диференциацията им; потискане на продукцията на TNF-α, IL-17 и IL-21 и увеличаване на секрецията на TGF-β, VEGF-A и PGE_2. С помощта на обобщението на базата на мултифакторните статистически методи за анализ можем да допълним, че наблюдаваните фенотипни и функционални промени в секрецията на изследваните цитокони са взаимносвързани и групирани, като сумарният ефект от това бихме могли да определим като осъществяване на имуносупресия. Клетъчните популации и цитокинови пътища, които бяха изследвани, бяха подбрани така, че да са от централно значение в имунопатогенезата на ревматоидния артрит. Получените от нас резултати недвусмислено показват, че разтворимите фактори, съдържащи се в кондиционираните среди от АТ-МСК, успешно потискат цитокинови пътиша и клетъчни субпопулации с централно значение в патогенезата на РА. По този начин получените от нас резултати трасират един от най-важните аспекти от евентуалното внедряване на МСК като терапевтично средство, а именно способността да въздействат на дисрегулирания имунен отговор при РА едновременно на множество нива.

6. ИЗВОДИ

1. Мезенхимните стволови клетки от адипозна тъкан (АТ-МСК) секретират IL-6, sVEGF-A, PGE2, IL-8, CCL2 и CCL5, но не продуцират TGF-β и IL-10.

2. При култивиране на ПКМК от пациенти с ревматоиден артрит с кондиционирани среди от АТ-МСК настъпва увеличаване процента на CD25+FoxP3+ Tregs и също така на популацията на CD4+CD25-FoxP3+ хелперните лимфоцити.

3. Култивирането на ПКМК от пациенти с ревматоиден артрит с кондиционирани среди от АТ-МСК води до намаляване процентното съдържание на Th17 хелперните лимфоцити и CD4+CD25+FoxP3- активираните ефекторни Т-хелперни лимфоцити.

4. При култивиране на ПКМК от пациенти с ревматоиден артрит с кондиционирани среди от АТ-МСК се потиска експресията на HLA-DR върху моноцитни клетки.

5. При култивиране на ПКМК от пациенти с ревматоиден артрит с кондиционирани среди от АТ-МСК се наблюдава увеличение на процента CD14+ моноцитни клетки.

6. Под действие на разтворимите фактори, налични в средите на АТ-МСК, промените в цитокиновите нива са групирани и действат паралелно в една посока: увеличава се секрецията на TGF-β, VEGF-A, PGE2 и се понижават нивата на TNF-α, IL-17 и IL-21 в култури на ПКМК добити от пациенти с РА.

7. ПРИНОСИ

7.1. Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена беше секрецията на IL-6, sVEGF-A, PGE_2, IL-8, CCL2 и CCL5 от мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан (АТ-МСК).

2. По отношение на секрецията на TGF-β и IL-10, резултатите ни бяха в съгласие с резултатите на екипи, които не откриват TGF-β и IL-10 в среди на АТ-МСК.

7.2. Приноси с оригинален характер

1. Установена беше способността на разтворими фактори от АТ-МСК да потискат Th17 хелперни лимфоцити в култури на ПКМК от пациенти с активен ревматоиден артрит.

2. Установена беше способността на разтворими фактори от АТ-МСК да увеличават процента $CD25^+FoxP3^+$ Tregs и $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ хелперни лимфоцити в култури на ПКМК от пациенти с активен ревматоиден артрит

3. Установена беше способността на разтворими фактори от АТ-МСК да предизвикват намаляване на повърхностната експресия на HLA-DR върху моноцитни клетки в култури на ПКМК от пациенти с активен ревматоиден артрит.

4. Установена беше способността на разтворими фактори от АТ-МСК да увеличават секрецията на TGF-β, sVEGF-A, PGE_2 и да предизвикват понижаване в нивата на TNF-α, IL-17 и IL-21 култури на ПКМК от пациенти с ревматоиден артрит със средна и висока болестна активност.

5. За пръв път бяха приложени мултивариантни методи за статистически анализ с висока доказателствена стойност на получените резултати – Метод на опорните вектори (SVM), Дървета за класификация и регресия (CART Decision Trees) и PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis), Факторен и клъстерен анализ при анализиране на действието на среди от АТ-МСК върху клетки от болни с ревматоиден артрит.

8. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ

- **Публикации във връзка с дисертационния труд:**

1. **Георги Василев**, Мариана Иванова, Румен Стоилов, Доброслав Кюркчиев. Мезенхимни стволови клетки в патогенезата на ревматоидния артрит. Ревматология, (Bulgaria), 2017, 25(2-3):8-19.

2. **Георги Василев**, Екатерина Красимирова, Мариана Иванова, Екатерина Иванова-Тодорова, Калина Тумангелова-Юзеир, Рада Ганчева, Румен Стоилов и Доброслав Кюркчиев. Ефекти на човешки мезенхимни стволови клетки върху моноцити от пациенти с ревматоиден артрит и прогресивна системна склероза. Ревматология, (Bulgaria), 2019, 27 (3): 44-54, https://doi:10.35465/27.3.2019.pp44-54.

3. **Georgi Vasilev**, Mariana Ivanova, Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, Ekaterina Krasimirova, Rumen Stoilov, and Dobroslav Kyurkchiev. Secretory Factors Produced By Adipose Mesenchymal Stem Cells Downregulate Th17 And Increase Treg Cells In Peripheral Blood Mononuclear Cells From Rheumatoid Arthritis Patients. Rheumatology Int, 2019, 39 (5): 819-826. https://doi:10.1007/s00296-019-04296-7 **(IF2019 – 2.2 Q2)**

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

1. **Георги Василев**, Люба Митева, Мариана Иванова, Румен Стоилов, Ирена Манолова. Системен цитокинов профил при пациенти с ревматоиден артрит. XII Национална конференция по медицинска биология, Цигов Чарк 08 – 10 септември 2017.

2. **Georgi Vasilev**, Mariana Ivanova, Ekaterina Ivanova- Todorova, Rada Gancheva, Ekaterina Krasimirova, Dobroslav Kyurkchiev. Mesenchymal Stem Cells From Adipose Tissue Secrete Factors Which Decrease Th17 And Increase Treg Percentage In Pbmcs Derived From Rheumatoid Arthritis Patients. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, Portugal, 16-20 May 2018.

3. **Георги Василев**, Миариана Иванова, Екатерина Иванова-Тодорова, Калина Тумангелова-Юзеир, Екатерина Красимирова, Румен Стоилов, Доброслав Кюркчиев. Влияние на мезенхимни стволови клетки от мастна

тъкан върху Th17 И Trerg, добити от пациенти с ревматоиден артрит. Национален конгрес по ревматология, 31май-3 юни 2018, Правец.

4. **Georgi Vasilev**, Mariana Ivanova, Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, E. Krassimirova, R. Stoilov, D. Kyurkchiev. Immunosuppressive Effect of Mesenchymal Stem Cells On Monocytes Derived from Patients with Rheumatoid Arthritis. Annual European Congress of Rheumatology, EULAR 2020, Amsterdam, Netherlands, 12-16 June 2018.

5. **Georgi Vasilev**, Mariana Ivanova Goycheva, Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, Ekaterina Kurteva, Rumen Stoilov, Dobroslav Kyurkchiev. Conditioned Medium from Adipose Mesenchymal Stem Cell Exert Immunosuppressive Effect on Th17/Treg Axis in Rheumatoid Arthritis in Vitro. Annual European Congress of Rheumatology, EULAR 2019, Madrid, Spain 12-15 June 2019.

- **Участия в научни проекти по темата на дисертационния труд:**

1. ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТ към Медицински факултет, МУ – София, Конкурс „Млад изследовател – 2018“ 7679/22.11.2017 г. Отчетен проект, свързан с темата на дисертационния труд, от Конкурс „Млад изследовател – 2018“ на МУ – София, ДОГОВОР № Д-128/2018 г., ПРОЕКТ с вх. № 7679/21.11.18 г. на тема: “Имуномодулаторен ефект на секретирани от човешки мезенхимни стволови клетки разтворими фактори, осъществяван върху Т-хелперни лимфоцити, добити от периферна венозна кръв от пациенти с ревматоиден артрит“.