

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

**Катедра по клинична лаборатория и клинична  
имунология**

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

Периферна имунна супресия осъществявана от  
мезенхимни стволови клетки

# **Автореферат**

на дисертационен труд  
за присъждане на научна степен “Доктор на медицинските науки”

Шифър на специалността “Имунология”: 01.06.23

София 2015 г.

Дисертационният труд съдържа 365 страници, 84 фигури и 20 таблици. Използвани са 936 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден на научен съвет към Катедра по Клинична лаборатория и клинична имунология, МФ, МУ- София на 11.06.2015 г. и е насочен за официална защита пред научно жури в състав:

*Официални рецензенти:*

проф. д-р. Искра Петрова Алтънкова, д.м.н.

проф. д-р. Виктория Степан Сарафян, д.м.н.

проф. д-р. Рашо Колев Рашков, д.м.н.

*Становища:*

проф. д-р. Елисавета Йорданова Наумова - Григорова, д.м.н.

проф. д-р. Севдалин Славов Начев, д.м.н.

доц. д-р. Ирена Манолова Манолова- Василева, д.м.

доц. Андрей Иванов Чорбанов, д.б.

Материалите по защитата са на разположение в канцеларията на Катедра по Клинична лаборатория и клинична имунология.

**Официалната защита на дисертационния труд ще проведе на 27.10.2015 от 13.00 часа в аулата на УМБАЛ „Св. Иван Рилски”**

# СЪДЪРЖАНИЕ

<b>Използвани съкращения</b>	стр.4
<b>Въведение</b>	стр.7
<b>Цел и задачи</b>	стр.14
<b>Материали и методи</b>	стр.15
<b>Резултати и дискусия</b>	стр.18
I.Мезенхимни стволови клетки	стр.18
II.МСК и цитокиновата им секреция	стр.24
III.Въздействие на МСК върху Т, НК и В клетки	стр.32
IV.Въздействие на МСК върху Т регулаторните лимфоцити (Tregs)	стр.41
V.Въздействие на МСК върху моноцитните дендритни клетки	стр.48
VI.МСК, прогестерон и въздействието им върху имунните клетки в женския репродуктивен тракт	стр.62
VII.МСК изолирани и култивирани от GBM? Имунорегулаторно действие	стр.76
<b>Заклучение</b>	стр.91
<b>Приноси</b>	стр.95
<b>Публикации по темата</b>	стр.96

# ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

## Използвани съкращения на български език

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

## Използвани съкращения на английски език

APRIL – a proliferation inducing ligand  
BDNF – brain derived neurotrophic factor  
bFGF – basic fibroblast growth factor  
BLys – B lymphocyte stimulator  
BMP – bone morphogenic protein  
CFU-F – фибробласт- колонио-формираща единица  
СНАК – CC chemokine activated killers  
CNS – консервативни некодиращи секвенции  
ConA – конканавалин А  
СОХ - циклооксигеназа  
CTLA-4 – cytotoxic T- lymphocyte associated protein 4

DAMPs – damage associated molecular patterns  
 DMEM – Dulbecco’s minimum essential medium  
 ЕАЕ – експериментален автоимунен енцефаломиелит  
 EGF - epidermal growth factor  
 EP2 – (E prostanoid 2)  
 GDF – growth and differentiation factor  
 GFAP – glial fibrillary growth factor  
 GITR – glucocorticoid – induces tumor necrosis factor receptor  
 GM-CSF – granulocyte monocyte growth factor  
 GPI – глюкозофосфатидил инозитол  
 GVHD – graft versus host disease  
 HAT – hromatin histone acetyl transferase  
 HGF – hepatocyte growth factor  
 HIF2 $\alpha$  – hypoxia induced factor  
 HLA – human leukocyte antigen  
 HMBG1 – high mobility group box protein 1  
 HVEM – herpes virus entry mediator  
 IBD – inflammatory bowel disease  
 ICAM – intercellular adhesion molecule  
 ICOS – inducible T cell co- stimulator ligand  
 IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа  
 ILT – immunoglobulin- like transcript  
 INOS – азотно оксидна синтетаза  
 IPEx – X- свързана полиендокринопатия, вследствие на имунна дисрегулация  
 ISCT – International society of cell therapy  
 JAMs – junction adhesion molecules  
 KIR – killer Ig-like receptor  
 LFA-1 – lymphocyte function associated molecule  
 LIF – leukemia inhibitory factor  
 LPS – lipopolysaccarid (липополизахарид)  
 MHC-1 – мацрофаге 1 антиген  
 MAPCs - multipotent adult progenitor cells  
 MAPK – mitogen activated protein kinases  
 MCP – monocyte chemoattractant protein  
 MCP-1 – MCP- induced protein  
 MDSC - миелоидно произхождащи супресорни клетки  
 MFI – mean fluorescent intensity

MHC – major histocompatibility complex  
MIAMI - marrow isolated adult mutinies inducible cells  
MIP-1 – macrophage inflammatory protein  
MLR – mixed lymphocyte culture  
MOG – миелин олигодендроцит  
NF $\kappa$ B – nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells  
NOD – non obese diabetes  
OPD – O-фениленамин  
HSP – heat shock protein  
OD – оптична плътност  
OVA - овалбумин  
PAMPs – pathogen associated molecular patterns  
PAQR – прогестин и адипоQ рецептор  
PD-1- programmed death  
PD-1L - programmed death  
PDGF-BB – platelet derived growth factor BB  
PECAM – platelet/endothelial cell adhesion molecule  
PGE2 – простагландин E2  
PGRMC1- прогестеронов рецепторен и мембранен компонент  
PI3K – фосфоинозитол-3-киназа  
PIBF – progesterone induced blocking factor  
PIGF – placental growth factor  
PMA – phorbol miristate acetate  
PRAR $\gamma$  – peroxisome proleferator activated receptor  
PVR – poliovirus receptor  
PWM – pokeweed mitogen  
RANTES – regulated on activated normal T-cell expressed and secreted  
SCID – severe combine immunodeficiency  
SDF1 – stromal derived factor  
STAT – сигнален трансдюсер и активатор на транскрипцията  
TIM – T cell immunoglobulin domain and mucin domain  
TIPs – tension induced inhibited protein  
TLR – toll- like receptor  
TSDR – T reg cell specific demetylated region  
VCAM – vascular cell adhesion protein  
VEGF – vascular endothelial growth factor  
VLA-4 – very late antigen

## ВЪВЕДЕНИЕ

Едно от най-използваните определения за мезенхимни стволови клетки (МСК) е класическото определение на *Pittenger*: "Клетки адхериращи към пластмасова повърхност с фибробласто-подобна морфология, способност за самообновление и диференциация в мезенхимни линии". Историята на МСК започва в края на 60-те години, когато *Friedenstein* и неговия екип установяват, че след 4 часа култивиране на костен мозък от плъх върху пластмасова повърхност се наблюдават адхерентни, вретеновидни издължени клетки, които по късно оформят хомогенен слой, като *Friedenstein* е и първият, който въвежда понятието „фибробластна колонио-формираща единица" (CFU-F), за да опише клоногенния растеж на някои от наблюдаваните клетки. Мезенхимните стволови клетки биват различни видове по отношение на тъканите, в които се намират, като се отбелязват като костно-мозъчни (КМ-МСК), адипозно-тъканни (АТ-МСК), децидуални (Д-МСК), изолирани от стена от пълна връв и т.н. Въпреки, че категорично становище на този етап все още не може да бъде формулирано, в литературата няма данни за принципни различия между мезенхимните стволови клетки, изолирани от различни източници. Доколкото такива са описани, те касаят по скоро количествени, а не качествени параметри.

Относно местонахождението на МСК се счита, че те са локализирани в специфични ниши, като концепцията за „ниша" включва всички елементи, заобикалящи МСК: клетките, с които са в контакт, екстрацелуларния матрикс и секреторните молекули, като

основната функция на тези елементи е поддържане на МСК в недиференцирано състояние. МСК са локализирани в периваскуларните пространства, като „очертavat“ съдовете на микроциркулацията от външната страна. Тази локализация им дава възможност за достъп до на практика всички тъкани и следователно възможност за комуникация с множество клетъчни типове. При определени обстоятелства, вследствие на получени сигнали, МСК напускат своите ниши и извършват т.нар. homing към местата на тъканна увреда, осъществявайки регенеративни и имunosупресивни ефекти. Процесът на homing се осъществява под влиянието на хемокинов градиент, като при възпаление и увреда се повишава хемокиновата концентрация, което е основният сигнал за МСК, отправящи се по посока на високата концентрация. Следващият етап е трансендотелната миграция на МСК, процес твърде сходен с този на левкоцитите. Идеята за циркулацията на стволови клетки в кръвта, конкретно в случая с МСК е доста дискутабилна. Изнесени са множество данни в нейна подкрепа, но въпреки това твърде много са данните, които не откриват МСК в периферната кръв, като се счита, че миграцията на МСК се осъществява по скоро през тъканите, отколкото по кръвен път, като при тъканно увреждане към зоната се предвиждат локалните МСК от нишите си в периваскуларните пространства.

Изолирането на КМ- МСК се извършва от аспират от костен мозък взет от crista iliaca superior, тибията или фемора, както и от гръдния и лумбалния сегмент на гръбначния стълб. При изолиране на АТ-МСК, материалът, който се използва се получава при липосукция или при различни хирургични процедури, докато децидуалните МСК се

изолират след прекъсване на бременността по желание. Стандартната процедура е, след обработка на материала, клетките да бъдат разсяти за култивиране, като от основно значение е да се отстранят плуващите клетки, чрез смяна на средата и интензивно ресуспендиране докато останат само адхериралите. Получените моноклеарни клетки се култивират в стандартни среди с 10% фетален телешки серум (ФТС), като след първоначален хетерогенен вид се формират адхерентни, удължени вретеновидни клетки. След първоначална лаг фаза около 2 до 4 ден клетките започват да се делят интензивно, като първоначално растат на гнезда. Важно е да се обърне внимание на факта, че не всички клетки в културата са истински стволови клетки, някои от тях не са мултипотентни, а бипотентни или монопотентни, поради което множество автори предпочитат използването на понятието “стромални клетки”. Във всички случаи МСК са сравнително лесни за изолиране, притежават висок потенциал за експанзия и показват генетична стабилност и запазващи се качества след множество пасажи, като късните пасажи не показват хромозомни аномалии и имат запазена теломеразна активност. Някои автори използват допълнителни компоненти към културалните среди, с цел да повишат интензивността на клетъчното делене, като bFGF (basic fibroblast growth factor), под действието, на който се увеличава броя на клетките с удължени теломери и съответно интензивността на клетъчно делене. Наред с класическите методи за култивиране на МСК има опити за тяхното изолиране чрез магнитна сепарация и флоуцитометрия, като на този етап тези подходи отстъпват, поради недоизяснените маркери на МСК *in vivo*. Типът растеж на МСК след изолирането им като „адхерентни,

фибробластоподобни”, е важна характеристика, която ги определя като такива и влиза в изискванията на International society of cell therapy (ISCT) за доказване на МСК.

Способността на МСК да образуват клонове е израз на основното за стволовите клетки качество- самообновление (self-renewal). Тази способност е ключова характеристика, без която нито една клетка не може да се определи като „стволова”, поради което присъства в почти всички дефиниции на понятието. Самообновлението е процес на симетрично делене, при който се получават дъщерни клетки със същата характеристика като майчината и помежду си, или казано по друг начин способност на клетката да създава идентични на себе си копия чрез митотично делене, за дълъг период от време. Едно друго определение дефинира процеса на самообновление, като способност да се образуват клетки, идентични по фенотип и с потенциал да създадат клетъчна популация, поради задържан процес на диференциация. Тоест самообновлението и диференциацията са два донякъде противоположни процеса, като стопирането на процеса на диференциация е необходимо условие за интензивно самообновление (експанзия), характеризиращо стволовите клетки. Още пионерите в областта на мезенхимните стволовите клетки, акцентират върху способност за self-renewal, чрез понятието “CFU-F”, показващо произход на колония от една единствена клетка, като и до днес тази способност е „златен стандарт” за идентификация на МСК.

На този етап не са доказани уникални фенотипни маркери за мезенхимните стволови клетки, които ги определят като такива. Според препоръките на ISCT за минимални критерии за

характеризиране на една клетъчна популация като мезенхимна стволова е необходима експресия на CD105, CD73, CD90 в повече от 95% от клетките в културата и отрицателна експресия на CD45, CD34, CD14 (или CD11b), CD79a (или CD19), HLA-DR, които съответно да бъдат експресирани от по малко от 2% от клетките в културата.

Като „пластичност” на МСК се определя способността им за дедиференциация, както и способността им да дават начало на множество видове клетъчни прогенитори в рамките на същия зародишев пласт, докато с термина „трансдиференциация” се бележи екстремната форма на пластичност, определяща възможността да се даде начало на клетки с произход от различен зародишев пласт, в сравнение с този, от който произхожда стволовата клетка.

МСК са мултипотентни, като имат способност за диференциация в различни мезенхимни тъканни като кости, хрущял, мастна тъкан, сухожилия и мускули, като това определя тяхната пластичност, но МСК имат капацитет да се диференцират и в немезенхимни тъкани като епител и нервна тъкан, което ги прави способни за извършване на процеса трансдиференциация. Способността на МСК да се диференцират в остеогенна посока е първото им доказано качество, свързано с образуване на зрели клетки от мезенхимен произход. МСК, вследствие на асиметрично делене преминават през стадии на остеопрécurсори, остеопрóгенитори, преостеобласти, остеобласти докато се получат зрели остеоцити, като по пътя на тази диференциация са установени 914 гена, които засилват или съответно намаляват своята експресия. Диференциацията на МСК в хондрогенна посока е свързана с активацията е супресията на 52 гена, докато

активацията и супресията на 957 гена са необходими за процеса на адипогенна диференциация на МСК. Важно е да се отбележи, че съществуват множество гени, които са общи за различните пътища на диференциация на МСК. Така например съществуват 253 гена общи за адипогенната и остеогенната диференциация, 3 са общи за остеогенната и хондрогенната, а 10 за адипогенната и хондрогенната. Описани са 8 гена, които са общи за трите пътя и които се приемат за основните контролиращи гени. Те са ангажирани също така и в други процеси като клетъчна адхезия, организация на цитоскелета и протеиновите нагъвания. Индуцирането на миогенеза, тендогенеза и диференциация в ендотелни клетки от МСК също са многократно доказвани. За доказване на мезенхимни стволови клетки ISCT препоръчва извършване на диференциацията им в остеогенна, хондрогенна и адипогенна посока, визуализирани чрез специфични оцветявания.

Трансдиференциацията на МСК в епителни клетки е описана като способност на МСК да „се превръщат” в епителни ретинални пигментни клетки, кожни епителни клетки и тубуларни епителни клетки.

МСК експресират, както гени, така и протеини, нормално експресирани от невралните ектодермални тъкани, като множество изследвания с МСК при мишки, плъхове и хора претендират, че МСК са способни на неврална трансдиференциация. В подкрепа на тези данни служи фактът, че МСК инжектирани в мозъка на новородени мишки мигрират през тъканта и придобиват морфологични и фенотипни характеристики на астроцити и неврони. Интензивните изследвания по отношение

капацитета на МСК да се трансдиференцират в неврални клетки, водят до установяване на твърде голям брой агенти, които предизвикват невроно-подобна морфология на МСК и експресията на Nestin и glial fibrillary growth factor (GFAP). Огромното разнообразие на тези агенти, тяхното бързо действие и обратимостта на процеса повдигат въпроса доколко става дума за реална трансдиференциация. По скоро се осъществява процес на агент индуцирана цитоскелетна реорганизация, свързана с нарушени биохимични свойства на микротубулите и микрофиламентната мрежа, отколкото за процес на реална трансдиференциация. На базата на изследване на функционалните качества на получените от МСК в резултат на трансдиференциацията неврони, се установява слабата им мембранна деполяризация и непълноценна невротрансмисия. От казаното дотук, не следва да се отхвърля реалната възможност за пълноценна МСК трансдиференциация в неврална тъкан, но факт е обаче, че в тази сфера има още много въпроси, търсеци своя отговор, още повече, че в ЦНС съществува популацията на невралните стволови клетки, способни за диференциация в олигодендрцити, глия и неврони.

МСК експресират множество повърхностни молекули, които дават основание да се предполага взаимодействие с Т клетките: МНС- I, CD90, VCAM, ICAM, LFA-1 (lymphocyte function associated molecule), интегрини ( $\alpha$ 1,2,3,5,6,  $\beta$ 1,2,3) и много други. Въпреки, че контактът между клетките на имунната система и МСК безспорно съществува, този контакт не води до имунно отхвърляне на алогенните МСК. Една от причините за това, но вероятно не единствената е, че МСК не експресират В7 комплекса (CD80/CD86), CD40 и молекулите от МНС II

комплекса. За разлика от МНС II, които могат да се експресират под действието на IFN $\gamma$ , този процес не се осъществява по отношение на B7. Теоретично би могло да се предположи, че при стартиране на диференциацията си МСК би следвало да експресират МНС II и да бъдат мишена на имунно отхвърляне. Разработките на *LeBlanc* доказват, че МСК диференцирани *in vitro* не проявяват антигенни свойства. Като цяло, множество проучвания, както *in vitro*, така и на животински модели, недвусмислено показват, че МСК не са имуногенни.

## **ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **1. Цел**

Целта на настоящия дисертационен труд е изследване на механизмите на имunosупресия, осъществявани от мезенхимни стволови клетки, изолирани от различни източници, както върху ефекторните клетки на имунната система (Т и В лимфоцити), така и върху други имунорегулаторни клетки (дендритни клетки и Tregs).

Като допълнителна цел е поставена изследването на ролята на МСК в осъществяваната имунна супресия в репродуктивния тракт и при злокачествен тумор.

### **2. Задачи**

За постигането на целите бяха поставени следните задачи :

А.) Изолиране, характеризиране и доказване на МСК от различни източници (костен мозък, мастна тъкан, стена от пълна връв и децидуа)

Б.) Изследване на цитокиновата секреция на МСК изолирани от различни източници

- В.) Влияние на МСК върху цитокиновата секреция на Т лимфоцитите.
- Г.) Влияние на МСК върху имуноглобулиновата секреция на В лимфоцитите.
- Д.) Влияние на МСК върху формирането и цитокиновата секреция на Tregs.
- Е.) Влияние на МСК върху диференциацията, цитокиновата секреция и антигенното представяне от страна на моноцитните дендритни клетки.
- Ж.) Експресия на имуносупресивни фактори от МСК под влияние на прогестерон.
- З.) Изолиране, култивиране и доказване на мезенхимни стволови клетки от глиобластома мултиформе. Изследване влиянието им върху Т клетъчната активация.

## **МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

### **1. Материали**

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

Осем проби от човешка децидуа бяха използвани от здрави жени на възраст между 26 – 32 години след прекъсване на бременността по желание, между 8 и 10 гестационна седмица. Всички пациентки подписаха информирано съгласие, съгласно изискванията на Етичната

комисия към САГБАЛ „Д-р Щерев”, София. Всяка проба беше съхранявана в PBS рН 7.4 и в рамките на максимум 2 часа беше доставена в лабораторията.

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

Бяха използвани проби от 16 пациента с диагноза Glioblastoma multiforme (ГБМ), като тъканта беше взета след стандартна оперативна интервенция, извършена в Клиниката по неврохирургия на УМБАЛ „Св. Иван Рилски” София. Всеки пациент подписа информирано съгласие, съобразно изискванията на Болничния етичен комитет. Всички туморни проби бяха хистологично доказани като ГБМ.

За различните експерименти, свързани с имуномодулация, осъществявана от МСК бяха използвани 38 клетъчни култури получени от периферна кръв на здрави доброволци, като 4 от тях бяха използвани за култивиране на дендритни клетки

## **2. Методи**

- Изолиране и култивиране на мезенхимни стволови клетки и клетки, от ГБМ
- Изследване за клоногенен клетъчен растеж при МСК и клетки, изолирани и култивирани от ГБМ
- Остеогенна диференциация
- Адипогенна диференциация

- Дифференциация в ендотелни клетки
- Изолиране и култивиране на периферни кръвни мононуклеарни клетки (ПКМК)
- Клетъчно ко-култивиране между МСК и ПКМК, както и между МСК и моноцити/ дендритни клетки
- Магнитна сепарация на CD4+ Т лимфоцити
- Магнитна сепарация на моноцити
- Митогенна активация с фитохемаглутинин и pokeweed митоген
- Получаване на клетъчни кондиционирани среди от МСК, дендритни клетки и и клетки, изолирани и култивирани от ГБМ
- Диференциране и съзряване на моноцитни дендритни клетки
- Индиректна имунофлуоресценция
- Флоуцитометрия
- Имуноензимни методи (ELISA)
- Конфокална микроскопия
- Имунохистохимия
- Proteome profiler kit за определяне на цитокини
- RT- PCR
- Статистически методи
- Software-на обработка

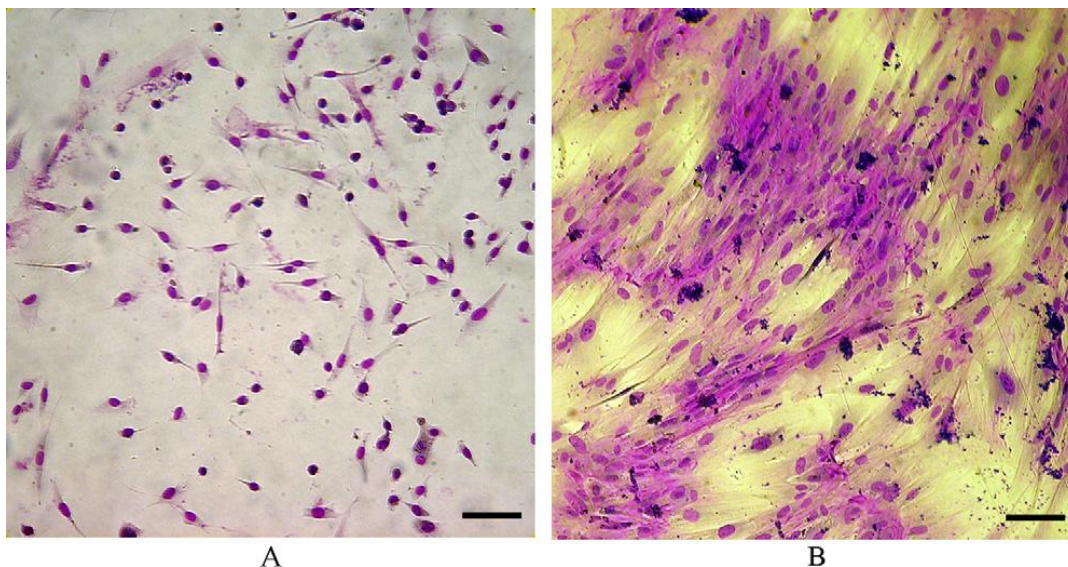
# РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

## ***1. Мезенхимни стволови клетки***

Изолирани, култивирани и доказани бяха мезенхимни стволови клетки от 4 източника – костен мозък (КМ-МСК), адипозна тъкан (АТ-МСК), децидуа (Д-МСК) и стена от пъпна връв.

### **1. Морфология**

Приблизително една седмица след изолирането си МСК образуваха колонии, като морфологично клетките се характеризираха с издължена, вретеновидна форма с централно разположено кръгло ядро, тоест обичайната фибробласто-подобна морфология на мезенхимни стволови клетки (**Фиг. 1А**). Клетките демонстрираха висок пролиферативен капацитет и приблизително към 12-тия ден формираха хомогенен адхерентен, клетъчен слой (**Фиг. 1В**). При серия от пасажи МСК запазиха своята морфология и пролиферативна способност, като не се установиха белези на остаряване на културата в течение на 6 месеца, в хода на 12-14 пасажа.

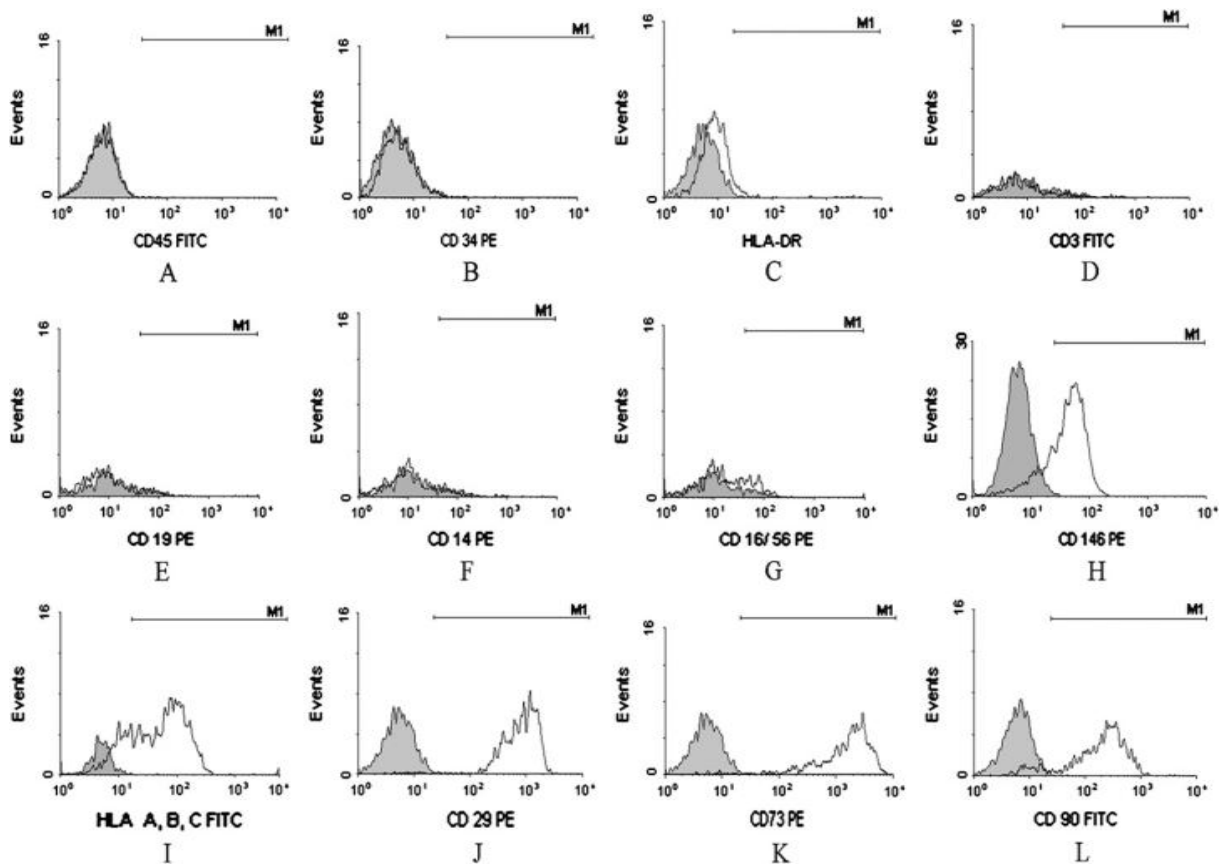


**Фиг. 1** Светлинно микроскопски морфологичен изглед на *in vitro* култивирани МСК. Издължена вретеновидна фибробластоподобна форма на индивидуалните клетки (А), които вследствие на интензивната си пролиферация преминават в адхерентен, хомогенен монослой (*Dimitrov et al. Fertility and Sterility 2010*)

Наблюдаваната морфология, дълготрайните пасаж и интензивния пролиферативен капацитет са класически характеристики на мезенхимните стволови клетки.

## **2. Имунофенотип**

МСК бяха изследвани за основните фенотипни маркери, които трябва, и съответно не трябва да експресират, като беше установено, че клетките са негативни по хемопоеичните и левкоцитните маркери (CD45, CD34, CD19, CD14, HLA-DR, CD16/56, CD3), докато типичните за МСК маркери CD73, CD90, CD146, CD29 и HLA-I се експресират върху почти 100% от Д-МСК (**Фиг. 2**)



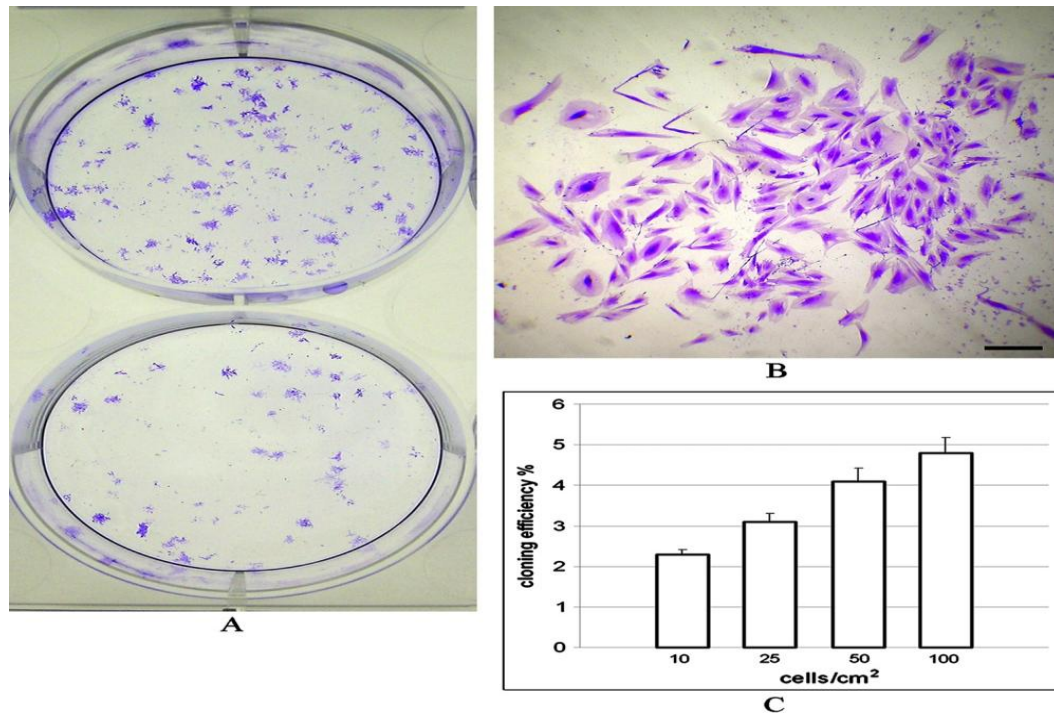
**Фиг.2** Експресия на повърхностни маркери от МСК. Клетките са негативни по CD45(A), CD34(B), CD3(D), CD19(E), CD14(F), CD16/56(G), HLA-DR положителна експресия се установява при 1.6 до 6.3% от клетките при различните експерименти(C). МСК демонстрират почти 100% положителна експресия на CD29(J), CD73(K) и CD90(L). Експресията на CD146 беше установено в средно 82,3% от клетките, докато тази на МНС клас I (A,B,C) беше отчетена на 75% (I) (Dimitrov et al. *Fertility and Sterility* 2010).

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

### 3. Клоногенност

Установяване на CFU-F е *conditio sine qua non* за доказване на способността на МСК за самообновление. С цел да изследваме

способността на МСК за самообновление, клетки на 4-ти пасаж бяха трипсинизирани и посяти в концентрация, съответно 10, 25, 50 и 100 клетки на  $\text{cm}^2$ , като на 15-тия ден бяха преброени отделните колонии, след оцветяването с Crystal violet (**Фиг. 3А, В**). При 10 клетки на  $\text{cm}^2$  колонии формираха 2.3%, 3.06% формираха колонии при засяване 25 клетки на  $\text{cm}^2$ , 4.1% при 50 клетки на  $\text{cm}^2$  и 4.8% при 100 клетки на  $\text{cm}^2$  (**Фиг.3 С**). Доказването на клоногенност, чрез използване на класическия CFU-F тест, още веднъж доказва „стволовата” природа на МСК.



**Фиг. 3** Колонио-формиращи единици – фибробласт тест (CFU-F) за МСК. Установяват се отделни колонии с произход от 1 клетка, оцветени с Crystal violet. Горна ямка - 100 клетки на  $\text{cm}^2$ , долна ямка - 50 клетки на  $\text{cm}^2$  (А). Единична колония (В). Количествени данни за клоногенна ефикасност при различна клетъчна плътност на засяване. Данните са средни от 8 експеримента (С) (*Dimitrov et al. Fertility and Sterility 2010*)

## **4. Диференциация**

### ***А.) Остеогенна диференциация***

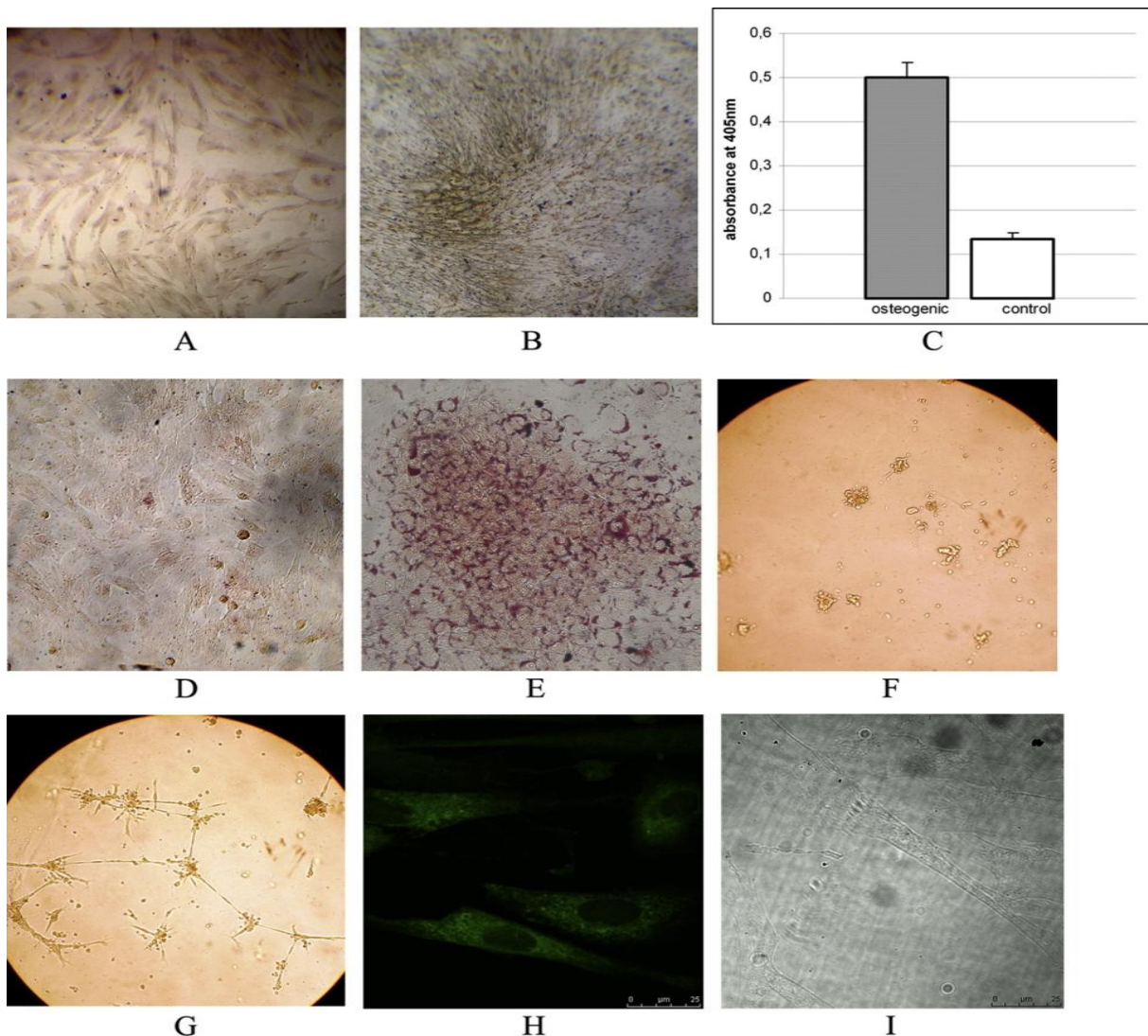
Култивирането на клетките в остеоиндуктивни среди води до това, че след около 18 дни се стига до промяна в тяхната морфология, като клетките стават широки и плоски, като показват значително по-засилена алкално фосфатазна активност (**Фиг.4 С**). Екстрацелуларният матрикс на диференциращите се МСК, показва минерална депозиция, която свидетелства за метаболитни промени и се доказва, чрез оцветяване по von Kossa (**Фиг. 4 В**)

### ***Б.) Адипогенна диференциация***

При култивирането на МСК в адипо-индуцираща среда, след 18 дни се установи наличието на вакуоли с липидно съдържание, които показаха специфично оцветяване с Oil red O (**Фиг. 4Е**), свидетелство за адипогенна диференциация.

### ***В.) Ендотелна диференциация***

Култивирането в специализирана среда на МСК доведе до установяване на първоначално разпръснати клетки, които след 12 часа започнаха да оформят малки и нарядко разположени клъстери свързани едни с други. След 24 часа култивиране клъстерите станаха по-големи, с тънки връзки помежду си и оформиха полигонални структури. Два дни по-късно връзките между клъстерите станаха все по-тънки и наподобяваха капиляроподобни тръбички (**Фиг.4 G**). След третиране с колагенеза, клетките бяха оставени да залепнат на стъкалца, покрити с желатин, като изследването им показва експресия на фактор на фон Вилебранд (**Фиг.4 H**).



**Фиг.4.** Мултилинейна диференциация на МСК. Установява се специфичното оцветяване по von Kossa за остеогенна диференциация (А- контрола, В- остеогенно диференцираща се клетка), както и повишена алкално-фосфатазна активност (С). Доказва се диференциация в адипогенна посока чрез специфично оцветяване с Oil red O (D- контрола, Е- адипогенно диференцираща се клетка, наблюдават се „мастни капки”). Диференциация в посока ендотелни клетки се доказва чрез образ на формирани структури с вид на тръбички (F- контролни клетки, G- клетки, диференциращи се в ендотелна посока), както и чрез специфичната експресия на фактор на фон Вилебранд (H) (*Dimitrov et al. Fertility and Sterility 2010*)

В заключение, беше доказано, че изолираните и култивирани клетки представляват мезенхимни стволови чрез тяхната морфология и растеж, фенотипни маркери, способност за самообновление

(установена чрез капацитет за клоногенност) и мулителинейна диференциация в три посоки. Подходът, който използвахме напълно покрива, а в някои случаи и надхвърля минималните изисквания за доказване на МСК, препоръчани от ISCT. На базата на това, ние започнахме изследването на имунорегулиращата им способност.

## **II. МСК и цитокиновата им секреция**

МСК секретират цитокини с предимно имуносупресивен ефект, като в литературата съществуват някои разлики по отношение на установените секреторни фактори. В настоящата работа ще се обърне внимание върху тези, които са недвусмислено доказани, както от литературните данни, така и от личния опит на автора (**Табл 1.**) Важно е да се отбележи, че МСК могат да секретират цитокини „спонтанно” или под индукция на други цитокини, като най-важните от последните се явяват IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$ .

**Табл 1.** Цитокини секретирани от мезенхимни стволови клетки и таргетни клетки на цитокиновото действие

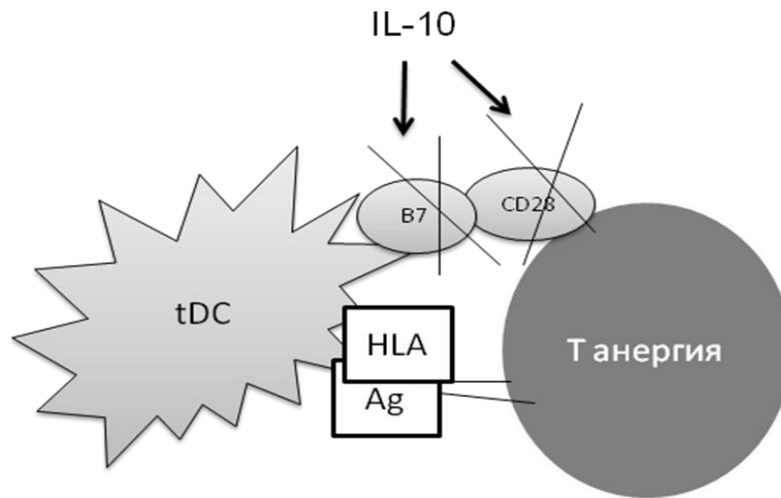
Цитокини секретирани от МСК	Таргетни клетки
IL-10	Mph, Neu, DCs, Th1, Tregs, Tr1, tumor cells
IL-6	Neu, Mo, DCs, B, Th2, Tregs, Th17, CD8+FoxP3+
TGFβ	Mph, NK, DCs, B, T, Tregs
Chemokines - CCL-2/ MCP-1 - CCL-5/RANTES	Neu, Mo, NK, Eo, Baso, DCs, Ly Mph, EC, PL, Th2, Th17 Neu, Mo, DCs, Th1, Tregs, CD8+FoxP3+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

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

### 1. Интерлевкин 10 (IL-10)

IL-10 е плейотропен цитокин, характеризиращ се с антиинфламаторно действие, което обуславя способността му да индуцира имуноен толеранс. Наред с много други, основният ефект на IL-10 в индукцията на имуноен толеранс е свързан с действието му върху антиген-представящите клетки и в частност върху дендритните клетки (ДК). IL-10 подтиска секрецията им на проинфламаторни цитокини като TNFα, IL-1, IL-12, IL-8, както и експресията им на ключовия за имунния отговор B7 (CD80/86) ко-стимулаторен комплекс. Успоредно на това, IL-10 подтиска и експресията на CD28 (партньорът на B7) на повърхността на Т лимфоцитите. По този начин се осъществява може

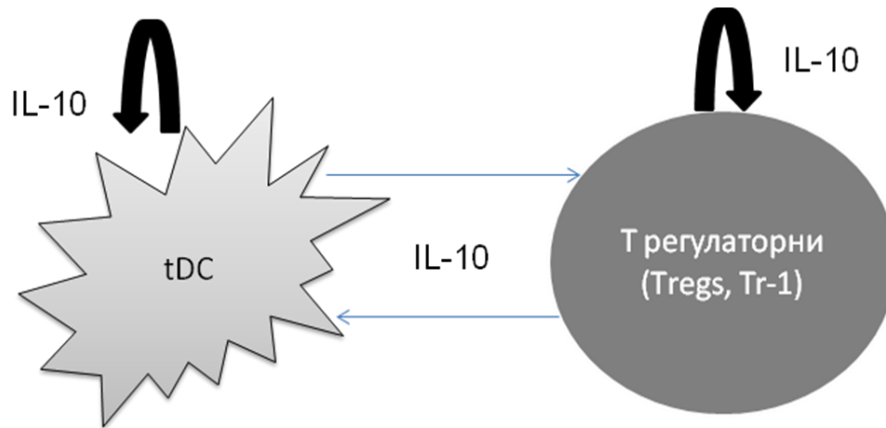
би най-важния имunosупресивен ефект осъществяван от IL-10 – индукция на толерогенни ДК с ниска експресия на B7 и едновременно подтискане на CD28 експресиран на повърхността на Т клетките (**Фиг 5.**) Тази двустранна супресия на т.нар. „втори сигнал”, който е безусловно необходим за активацията на Т лимфоцитите индуцира анергия в тях.



**Фиг 5.** IL-10 индуцира анергия в Т клетките като подтиска експресията, както на B7 от дендритните клетки, обуславяйки толерогенния им фенотип, така и на CD28 на повърхността на Т лимфоцитите.

Друг механизъм на имунен толеранс, осъществяван от IL-10 е индукцията на основните регулаторни Т лимфоцити – Tregs и Tr1. IL-10 се явява един от цитокините ангажиран в генерирането на Tregs, които от своя страна са способни да го секретират. Една особеност на IL-10, която се среща и при други цитокини е, че клетките, които го продуцират могат да бъдат, както източник, така и обект на действието му. Тази особеност е характерна основно за дендритните и Т регулаторните клетки. Като пример може да послужи фактът, че

толерогенните ДК секретират IL-10, който индуцира регулаторен Т клетъчен фенотип (Tregs и/или Tr1). Регулаторните клетки от своя страна секретират IL-10, който обуславя толерогенен тип ДК. От друга страна, всяка от изброените клетки, секретирайки IL-10 влияе сама на себе си по автокринен път (Фиг 6.)



**Фиг 6.** Толерогенните ДК и Т регулаторните субпопулации засилват имunosупресивните си свойства чрез секреция на IL-10

IL-10 е един от цитокините, широко дискутирани по отношение на имуномодулаторните свойства на МСК. Въпреки това, в научната литература не съществува единно мнение дали той се секретира от тях и резултатите са доста противоречиви.

## **2. Интерлевкин 6 (IL-6)**

При цялата относителност на разделението на цитокините на про- и анти-инфламаторни, традиционно IL-6 се представя като класически про-инфламаторен цитокин, като съществуват множество основания за това. Успоредно с несъмнената проинфламаторна функция, която IL-6 осъществява, много данни сочат редица негови действия в анти-

инфламаторна посока. За разлика от IL-10, в научната литература цари консенсус относно секрецията на IL-6 от МСК и всички изследвания потвърждават неговото наличие. На този етап все още не е съвсем сигурна връзката между секрецията на IL-6 от МСК и генерирането на Tregs (CD4+FoxP3+). МСК безспорно секретират фактори, които увеличават броя на Tregs, но няма сигурни доказателства, че точно IL-6 е ангажиран в този процес. Въпреки това, факта, че IL-6 води до образуването на CD8+FoxP3+ клетки, го прави твърде вероятен кандидат свързан с образуването и функцията на класическите Tregs.

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

IL-6 стимулира секрецията на IL-10 от множество видове клетки, като този ефект е несъмнено доказан, за разлика от обратното взаимодействие. Влиянието на секретирания от МСК IL-6 върху секрецията на IL-10 от моноцитите и дендритните клетки е от особено значение в процеса на имунорегулация. Съществуват данни, че секретиралите IL-6 МСК директно, или чрез предизвиканата автокринна секреция на IL-10 подтискат диференциацията на моноцитите в дендритни клетки. Също така двата цитокина подтискат антиген-представящата функция на дендритните клетки, като по този начин се формира популация от незрели толерогенни дендритни клетки, секретирани IL-10. Предизвиканата секреция на IL-10 от своя страна води до формиране на регулаторни Т клетки, също секретирани IL-10 и засилващи толерогенния фенотип на ДК. По този начин IL-6 стимулира секрецията на IL-10 и стартира системата на взаимно влияние между толерогенните дендритни клетки и Т регулаторните субпопулации, показана на **Фиг 6**.

#### 4. Хемокини

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

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

CCL2 е и един от факторите свързани с МСК предизвикания имунен толеранс. Секрецията на този хемокин от МСК води до засилена Fas-L зависима апоптоза на Т лимфоцитите. Апоптотичните Т клетки стимулират високи нива на секреция от макрофагите на TGF $\beta$ , цитокин свързан с формирането на Tregs. Доказана е и способността на CCL2 да медира автокринно миграцията на МСК и да ги насочва към местата на възпаление, исхемична увреда, травма или развиващ се малигнен процес, където да осъществят своя имуномодулиращ ефект. Съществуват данни, според които инхибиращият ефект на МСК върху имуноглобулиновата продукция на плазматичните клетки е резултат от ефекторното действие на секретирани от МСК хемокини CCL2 и CCL7. Описано е също така вероятно участие на CCL2 в предизвиканото от МСК *in vivo* потискане на проинфламаторните CD4+ Th17 клетки.

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

Подобно на CCL2, CCL5 автокринно стимулира способността за миграция на МСК до местата на увреда, като има данни, че различни тумори стимулират *de novo* секреция на CCL5 от МСК с цел,

използвайки имunosупресивните му функции да подпомагат метастазирането, инвазивността и подвижността си.

Получените резултати от различни автори показват, че действието на хемокините не може да се тълкува еднопосочно. Най-вероятно секретирани от МСК, те не само осъществяват привличане на различни типове имунни клетки с цел супресия, но и действат автокринно водейки до миграция на стволовите клетки до местата на увреда и в следствие, в зависимост от средата, подпомагат осъществяването на конкретните им имуномодулиращи свойства.

## **5. Собствени данни**

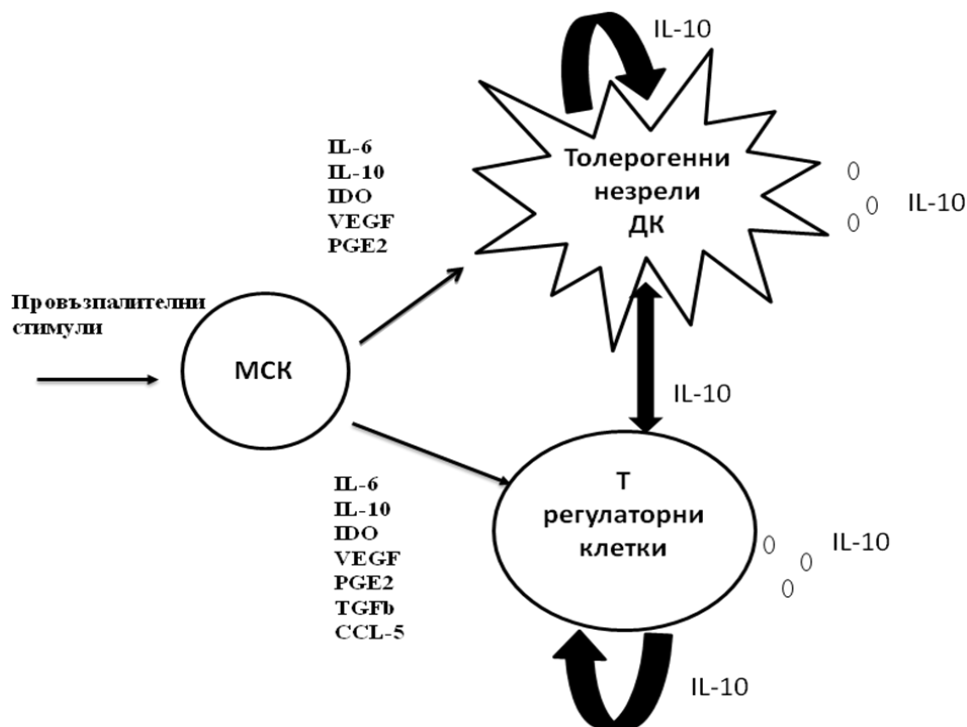
В нашите изследвания ние проследихме секрецията на 36 цитокина в супернатантите на КМ-МСК, АТ-МСК и мезенхимни стволови клетки, изолирани от стена от пъпна връв.

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

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

хемокини са силно ангажирани в привличането предимно на Т лимфоцити, което безспорно се явява включова стъпка в осъществяването на регулацията на имунния отговор. Наред с това CCL2 и CCL5 имат и имунорегулаторни свойства, осъществявани при секрецията си от МСК, които ще бъдат коментирани по-нататък.

Мезенхимните стволови клетки отделят редица други, неизследвани от нас секреторни фактори, които подтискат имунния отговор (PGE2,IDO, HGF). Това се осъществява чрез влияние както върху съдовия ендотел, трафика и ангиогенезата, така и чрез влияние върху имунните клетки. Някои от цитокините действат директно върху ефекторните имунокомпетентни клетки (IL-10, TGF $\beta$ , CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES,IDO, VEGF, PGE2), а други повлияват имунния отговор чрез индиректно действие, опосредствано предимно от ДК и Т регулаторните популации (IL-6, IL-10,IDO, VEGF, PGE2, TGF $\beta$ , CCL5/RANTES). Повечето цитокини оказват и директен и индиректен ефект в процеса на имунна супресия. Индиректният ефект обаче поставя МСК в централна роля като предимно негативен регулатор на инфламаторните процеси (Фиг.7). Бидейки изключително чувствителни на провъзпалителни стимули от обкръжението си МСК свързват факторите на вродения и придобит имунен отговор.



**Фиг 7.** МСК осъществяват имунорегулаторните си функция основно чрез влиянието си върху ДК и различните Т регулаторни субпопулации. При провъзпалителни стимули МСК секретират редица цитокини, под влияние на които, както и под влияние на автокринната секреция на IL-10 се формира незрял толерогенен фенотип ДК секретирани IL-10. Под негово въздействие се индуцира формирането на Т регулаторни клетки, също секретирани IL-10, които от своя страна индуцират формиране на толерогенни ДК. Секретирани от МСК цитокини могат да доведат и до директно формиране на Т регулаторни субпопулации. (Kyurkchiev et al. WJSC, 2014)

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

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

Имуносупресивните механизми на МСК са описани най-рано и до известна степен най-подробно по отношение на Т лимфоцитите. От началото на хилядолетието до настоящия момент са натрупани множество данни, които недвусмислено доказват, че МСК подтискат активацията и пролиферацията на Т клетките, като този процес засяга

както CD4+, така и CD8+ популациите. Наред с това, под въздействието на МСК, Т хелперните лимфоцити променят своя фенотип и цитокинова секреция. Специално по отношение на ефекта върху Т клетките се счита за основно наличието на „възпалителната среда”, която е необходима за придобиване на имунорегулаторни средства от страна на МСК. Въпреки това, твърде много данни сочат, че дори без „активирането” си МСК действат в супресивна посока върху Т лимфоцитите. Способността на МСК да подтискат пролиферацията на Т клетките е доказана както на няколко експериментални животински модела, така и при множество *in vitro* постановки. Факторите, осъществяващи този ефект биват: пряк междуклетъчен контакт (основно осъществяван от взаимодействието PD-1 / PD-L1) и секреторен път на инхибиция (осъществяван основно от IDO, PGE2, TGF $\beta$ , CCL2, HGF, IL-10 галектини 1 и 3, HLA-G5). Наред с прякото директно подтискане на Т клетъчната пролиферация от МСК, са описани и индиректни механизми, които се базират на наличието на „клетки посредници”, осъществяващи имунната супресия на Т лимфоцитите. Както е логично да се предположи, тази функция е описана за моноцитите и дендритните клетки.

Подтиснатата пролиферация на Т лимфоцитите би могла да е израз на три основни имунологични процеса: апоптоза, анергия или супресия, като анергията, осъществяване предимно от IDO и супресията осъществяваща се чрез генерирането на Tregs са най-важните процеси в това отношение.

Въздействието на МСК е най-категорично и недвусмислено доказано при Th1 субпопулацията на Т хелперните лимфоцити. Всички изнесени

дани са единодушни по въпроса, че МСК водят до подтисната секреция на основните Th1 определящи цитокини- TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ . Супресивно е действието на МСК и по отношение на Th17 и Т цитотоксичните клетки, докато спрямо Th2 цитокиновата секреция данните са противоречиви.

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

Поради факта, че за действието на МСК върху НК клетките липсват наши резултати, този въпрос няма да бъде разгледан автореферата.

## **3. Имунносупресивен ефект на МСК върху В клетки**

Едва ли има други имунокомпетентни клетки освен В лимфоцитите, действието върху които от страна на МСК да води до толкова противоречиви резултати, като противоречията обхващат, както *in vivo*, така и *in vitro* експерименталните данни. От една страна някои данни сочат като ефект на МСК подтиснато съзряване, пролиферация и секреция на имуноглобулини от В клетките, докато други - точно обратното. Тези разлики в резултатите на различните автори се свързват с различния тип В клетъчна стимулация при експерименталните постановки. Независимо какъв точно е ефекта и от какво зависи той, безспорен факт остава, че МСК модулират действието на В лимфоцитите, така че логично възниква въпросът за факторите от страна на МСК, които водят до това влияние. Предполага се роля на секреторните PGE2, IL-10, HGF, CCL2, TGF $\beta$ , IL-6 и IDO , както и на прекия контакт осъществяван по пътя на PD-1/ PD-1L.

## **4. Собствени данни**

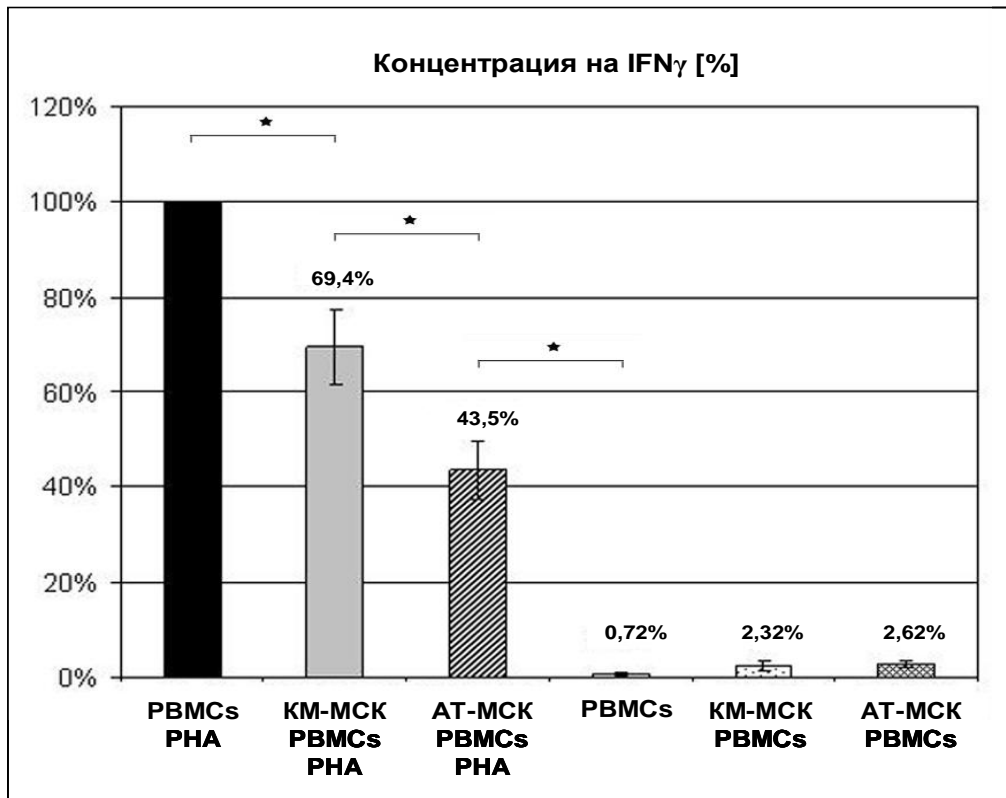
В нашите изследвания ние използвахме мезенхимни стволови клетки изолирани от два източника – костен мозък и мастна тъкан, като

проследихме в сравнителен аспект техния ефект върху цитокиновата секреция на Т лимфоцитите, имуноглобулиновата секреция на В клетките и активацията на двата вида лимфоцити (данните от последната не са показани в автореферата).

***А.) Промяна в Т клетъчната цитокинова секреция под въздействието на МСК***

Първата ни цел беше да установим дали въздействието на КМ-МСК и АТ-МСК води до промяна в цитокиновата секреция на Т хелперните лимфоцити, като за целта определихме за изследване двата базови цитокина-  $IFN\gamma$  и  $IL-4$ , дефиниращи съответно Th1 и Th2 субпопулацията. С цел да стимулираме Т лимфоцитите към секреция на цитокини, ние използвахме фитохемаглутинин (ФХА), който е растителен лектин изолиран от *Phaseolus vulgaris* и за който е известно, че е класически митоген, водещ до селективна неспецифична активация и пролиферация на Т лимфоцитите. Под действието на ПХА се установи секреция, както на  $IFN\gamma$ , така и на  $IL-4$ . В отделните опити, отчетената максимална концентрация за  $IFN\gamma$  в културална среда от третирани с ФХА ПКМК варираше в границите от 715 pg/ml до 873 pg/ml, при съответни базови стойности в контролните култури на ПКМК без съдържание на стимулиращ агент, непревишаващи 6,8 pg/ml. В хода на изследванията за  $IL-4$ , в различните експерименти бяха определени нива на този цитокин в рамките между 265 pg/ml и 268 pg/ml при ФХА-стимулирани ПКМК, срещу максимално измерени 12,6 pg/ml при неактивирани ПКМК. При ко-култивирането с МСК, както от костен мозък, така и от мастна тъкан секрецията, както на  $IFN\gamma$  (Фиг.8), така и на  $IL-4$  (Фиг.9), значително намаляваше, като разликите

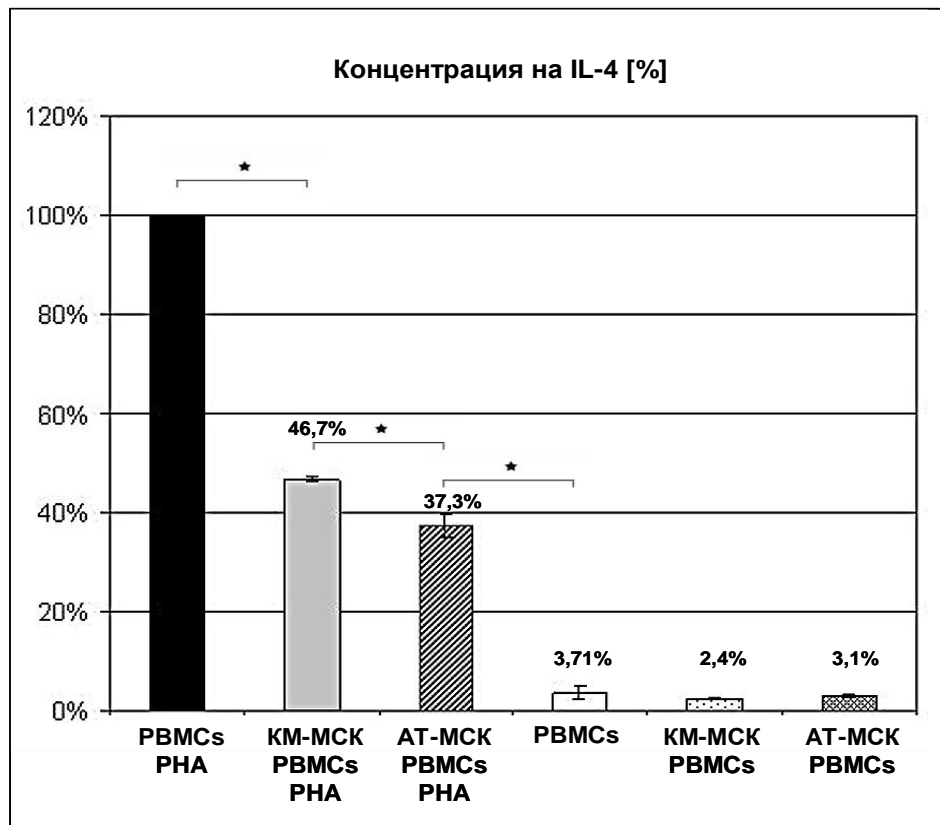
бяха статистически сигнификантни. Както може да се види на двете фигури ефектът на АТ-МСК е статистически значимо по отчетлив, в сравнение с този на КМ-МСК, като това се наблюдава, както за  $IFN\gamma$ , така и за IL-4.



**Фиг. 8** Секреция на  $IFN\gamma$  при ПКМК, активирани с ФХА и ко-култивирани с КМ-МСК и АТ-МСК. След ко-култивиране на митоген-активирани ПКМК с КМ-МСК концентрацията на  $IFN\gamma$  намалява до 69,4% а с АТ-МСК – до 43,5% от установената при контролните ПКМК+ФХА. Показани са осреднени стойности  $\pm$  SD от три независими експеримента (\* $P < 0.05$ ). Както може да се забележи нестимулираните с ФХА клетки не секретират  $IFN\gamma$  (Bochev et al. Comp. Rend. Bulg. Acad. Sci., 2009.) Фигурата е използвана с позволение на автора

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

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



**Фиг. 9** Секреция на IL-4 при ПКМК, инкубирани с ФХА и ко-култивирани с KM-MCK и AT-MCK. След ко-култивиране на митоген-активирани ПКМК с KM-MCK концентрацията на IL-4 намалява до 46,7% а с AT-MCK – до 37,3 % от установената при контролните ПКМК+ФХА. Показани са осреднени стойности  $\pm$  SD от три независими експеримента (\* $P < 0.05$ ). Както може да се забележи нестимулираните с ФХА клетки не секретират IL-4. (Bochev et al. *Comp. Rend. Bulg. Acad. Sci.*, 2009). Фигурата е използвана с позволение на автора

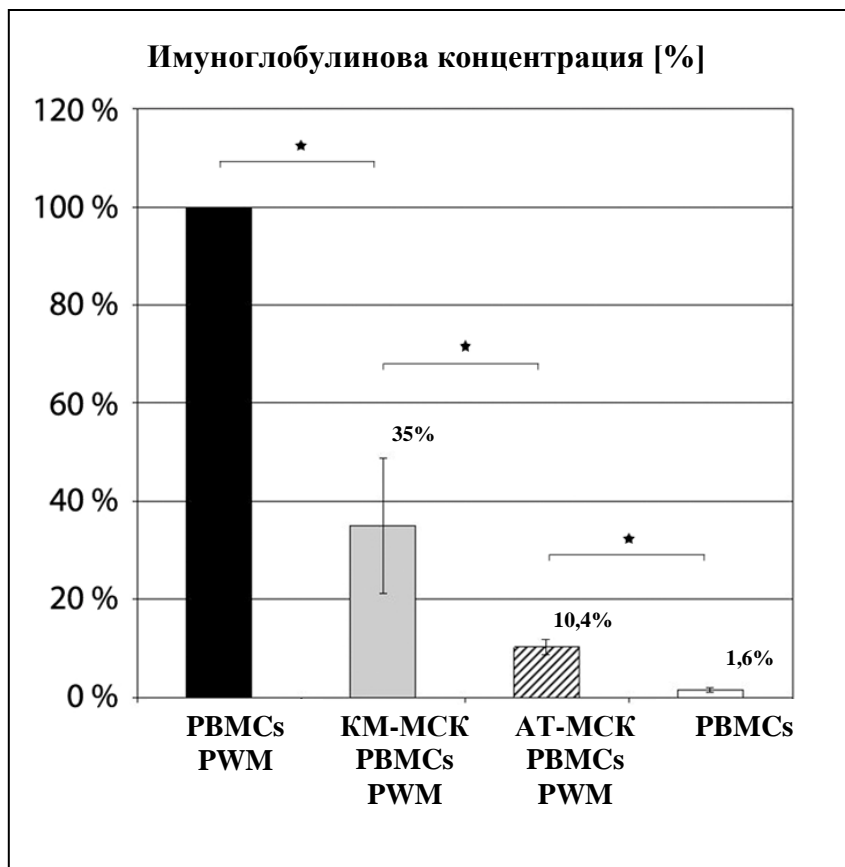
**Легенда:** РВМСs-периферни кръвни мононуклеарни клетки, РНА-фитохемаглутинин

Получените резултати относно подтиснатата секреция на IFN $\gamma$  от Th1 лимфоцитите под въздействието на МСК, са в съгласие с тези, получени от всички изследователи по темата. За разлика от това, по отношение на въздействието на МСК върху Th2 в литературата има алтернативни мнения.

***Б.) Промяна в В клетъчната секреция на имуноглобулини под въздействието на МСК***

Имуноглобулиновата секреция е основния ефекторен елемент на В лимфоцитите, еквивалентен на секрецията на различните цитокини от Т хелперните субпопулации. Поради тази причина, с цел да определим евентуалното имуномодулиращо действие върху В клетките ние изследвахме промените в секрецията на имуноглобулини под действието на МСК. За да стимулираме тази секреция, активирахме В лимфоцитите с растителен митоген, изолиран от *Phytolacca americana*, известен като pokeweed mitogen (PWM). Трябва да се отбележи, че за разлика от селективното действие на ПХА върху Т лимфоцитите, PWM, макар и доста по-ефективен върху В клетките, също така има способност да активира и Т лимфоцитите. Експерименталната постановка, която използвахме отново се базираше на ПКМК, като резултатите, които получихме демонстрират, че под влияние на МСК, изолирани както от костен мозък, така и от мастна тъкан, В лимфоцити намаляват секрецията си на имуноглобулини (**Фиг.10**). И тук, както при Т клетките ефектът на АТ-МСК е сигнификантно по изразен, в сравнение с този на КМ-МСК.

Имайки в предвид получените резултати за въздействието на МСК върху Т клетките, не може да се изключи възможността, получения ефект на подтисната имуноглобулинова секреция да е Т клетъчно зависим, тъй като резултатите ни относно Т лимфоцитите показват подтиснат Th2 имунен отговор, който от своя страна повлиява В клетките.



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

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

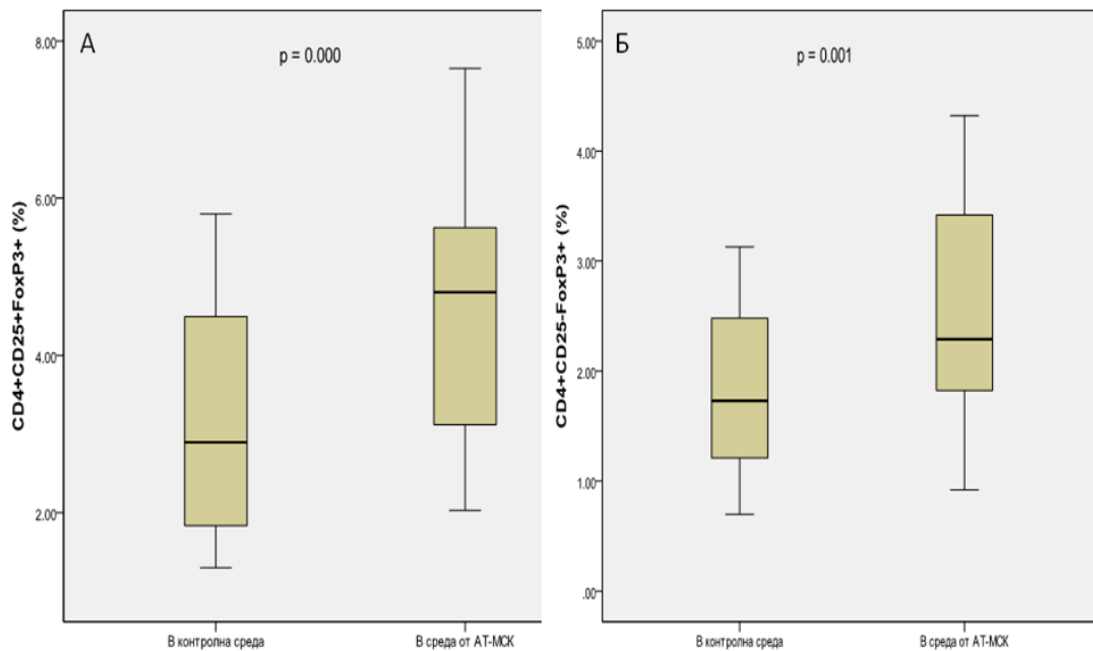
##### **1. Tregs**

Tregs (CD4+FoxP3+) са основната супресивна популация от пула на Т клетките, която осъществява своето действие, както по контактен път, така и чрез секрецията си на TGF $\beta$  и IL-10. Основната им характеристика е интрацелуларната експресия на транскрипционния фактор FoxP3, като експресията на CD25 е друга тяхна, макар и доста спорна особеност. Разделят се на „естествени” (nTregs), произхождащи от тимуса и „индуцируеми” (iTregs), образували се вследствие на антигенна стимулация в периферията.

##### **2. Собствени данни**

Основната идея в експериментите ни засягащи МСК и CD4+FoxP3+ клетките (Tregs), беше че мезенхимните стволови клетки осъществяват имунорегулаторното си действие не само директно върху ефекторните клетки на имунния отговор, но и по „индиректен” път, повлияващи други имуносупресори. В нашата експериментална постановка, използвахме супернатанти от МСК, изолирани от мастна тъка и култивирани, като клетките във всички експерименти бяха на еднакъв пасаж, образували монослой на дъното на плаката, а супернатантата беше взета в еднакви количества, след като не беше сменяна 48 часа. В сравнителен план бяха използвано контролни среди, в които не бяха култивирани МСК. В така получените кондиционирани среди от МСК бяха култивирани CD4+Т лимфоцити, получени чрез двойна (отрицателна спрямо CD14 и положителна спрямо CD4), магнитна

сепарация, в резултат на която се установи наличие на хомогенна популация от CD4+T лимфоцити. Култивирането на CD4+T лимфоцитите в среда от АТ-МСК доведе до увеличаване на фракцията на CD4+FoxP3+ клетките, в сравнение с постановката, при която CD4+T лимфоцитите бяха култивирани в контролна среда. Тази зависимост се наблюдаваше във всички 12 независими експеримента, както за CD4+CD25+FoxP3+ , така и за CD4+CD25-FoxP3+ клетките (Фиг.11). Следователно става ясно, че секреторен фактор/и в средите от МСК води до увеличаване на броя CD4+ Т клетки експресиращи FoxP3.

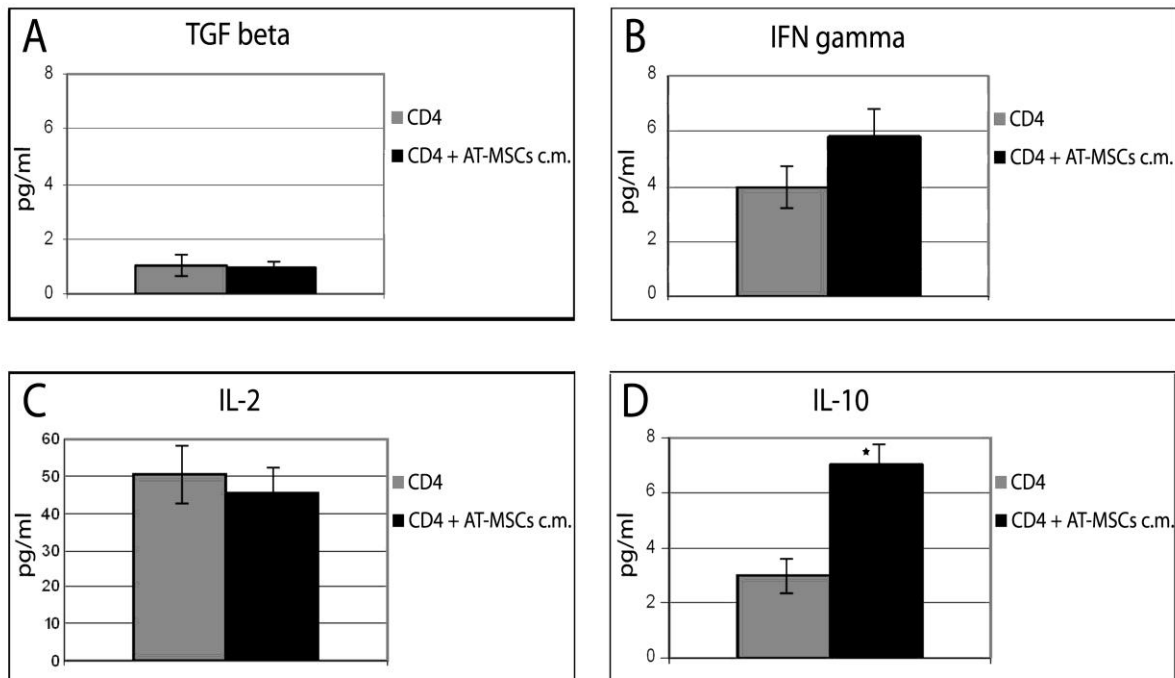


**Фиг.11** Статистическа сигнификантност на разликите между процента CD4+CD25+FoxP3+ (А) и CD4+CD25-FoxP3+(Б) при клетки, култивирани в контролни среди и среди от АТ-МСК. Посочените стойности са средни от 12 независими експреиментални постановка. Student's T- test, p< 0.05

Отговор на въпроса дали получените под влияние на средата от МСК Tregs са de novo генерирани (iTregs) или се засилва пролиферацията на налични nTregs не може да бъде даден с категоричност от нашата експериментална постановка. Въпреки това, наличните в литературата две проучвания по този въпрос са в консенсус, че под влияние на МСК става въпрос за новогенерирани iTregs. На базата на това, без да е категорично доказано, може да се приеме, че при нашите условия под въздействието на среда на АТ-МСК се формират нови iTregs.

Като индиректно доказателство за това може да служи и увеличения процент CD4+CD25 - FoxP3+, които представляват резервоар, от който се формират класическите CD4+CD25+ FoxP3+.

За да се изследва възможността увеличените CD4+FoxP+ Т лимфоцити да са iTregs, ние изследвахме културалните среди на CD4+Т клетките, култивирани със среда от АТ-МСК, както и тези на контролните клетки, за секреция на основните цитокини секретирани от Tregs- IL-10 и TGFβ (Фиг.12 D, A). Трябва да се отбележи, че при тестиране, нито средата на АТ-МСК, нито контролната среда в които бяха култивирани CD4+Т лимфоцитите не показаха секреция на IL-2, IFNγ, TGFβ и IL-10.



**Фиг. 12** Изследване на цитокини секретирани от CD4+Т лимфоцити, под влияние на среда от АТ-МСК (черни стълбчета), в сравнение с цитокини секретирани от CD4+Т лимфоцити, култивирани в контролни среди (сиви стълбчета). Наблюдава се статистически сигнификантно увеличение на IL-10, докато другите, изследвани цитокини не показаха статистически значими разлики (*Ivanova- Todorova et al. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012*).

CD4+ Т лимфоцитите под влияние на среда от АТ-МСК не показаха секреция на TGFβ в сравнение с контролите, каквато би следвало да се очаква на базата на формиралите се iTregs, но показаха статистически увеличена секреция на IL-10. Липсата на секреторен TGFβ, далеч не отхвърля тезата за новообразувани Tregs, тъй като е добре известно, че при тези клетки TGFβ може да бъде мембранно свързан, а не секретирани, и така да осъществява имunosупресорните си функции. Наличието на IL-10, секретирани от CD4+Т лимфоцитите под влияние на среда от АТ-МСК, не ни дава категорично отговори да твърдим, че именно iTregs, са източниците на този цитокин, въпреки, че тази

възможност е най-вероятна. Алтернативно, новогенерираните iTregs биха могли да индуцират секреция на IL-10 от ефекторните CD4+T лимфоцити, превръщайки ги в Tr1 (вид имунорегулаторни клетки, секретирани IL-10) механизъм описан при Tregs и известен като „инфекциозен толеранс”. Съществува и трета възможност, свързана с независимо индуциране на Tregs и Tr1, като и едните и другите клетки да секретират IL-10. Във всички случаи имайки предвид увеличаване брой iTregs и увеличената секреция на IL-10, който е типичен техен секреторен цитокин, възможността секреторен фактор/и отделен от АТ-МСК да генерира CD4+FoxP3+ клетки, секретирани IL-10 е значително по-вероятна от другите две.

Получените резултати доказват, че под влияние на секреторен/ и фактори, отделени от МСК се генерират iTregs, които най-вероятно секретират IL-10, обуславящ имуно толеранс. Получените резултати дават логичното основание да се повдигне въпросът кой е факторът/ите, отделени от АТ-МСК, които водят до индукция на CD4+FoxP3+ iTregs. Самият факт, че МСК водят до индукция на Tregs е добре известен и доказан, както на животински модели, така и при хора. Основните фактори, спрегани в литературата, свързани със de novo генерирането на iTregs от МСК са следните: пряк контакт между клетките (основно PD1/PD-L1), както и секреторните TGF $\beta$ , sHLA-G5, PGE2, IDO. В търсене на отговор на въпроса за фактора/ите ангажирани в индукцията на Tregs ние използвахме „изчистена” експериментална постановка, като в системата имаше само двама „участници”: среда от АТ-МСК и пречистени CD4+T лимфоцити. Това ни даде основание да игнорираме редица фактори, свързани с

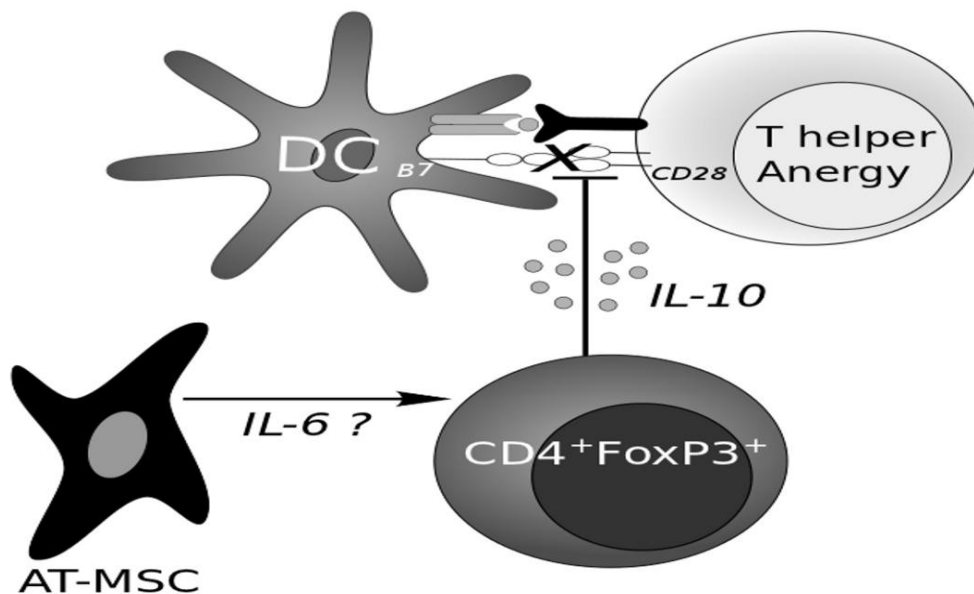
формирането на Tregs, описани в научната литература. В нашата постановка липсва междуклетъчен контакт, така че остава ролята на секреторните фактори. Не се установиха в супернатантите на АТ-МСК и наличието на „обичайните заподозрени“ TGF $\beta$ , IL-10, IL-2. Секреция на IDO не беше изследвана, но имайки предвид нейната роля при „активирани“ МСК, в нашият модел едва ли би се открила, още повече, че другата подобна молекула, експресирана при същите условия (I-309) не беше установена. Друг ключов фактор, секретирани от МСК и повлияващ формирането на Tregs е PGE<sub>2</sub>, който често е зависим от TGF $\beta$  и е възможен участник в процес, но неизследван от нас. Резултатите ни показаха наличие на CXCL-1/Gro $\alpha$ , IL-8, Serpin E, CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1, MIF, CXCL12/SDF-1 и IL-6 в супернатантите на АТ-МСК. Както е добре известно Gro $\alpha$ , IL-8, Serpin E, RANTES и SDF-1 са хемокини и от тази гледна точка може да се спекулира, че *in vivo* са важни за привличането на Т ефекторни клетки с последващата индукция на iTregs от тях. Единственият сред установените от нас, секретирани от МСК хемокини, с описано действие върху формирането на iTregs е CCL2/MCP-1.

Цитокин с несъмнено имунорегулаторно действие, който установихме в супернатантите на МСК беше IL-6. Няколко факта, наред с установяването му в среди на АТ-МСК ни дават основание да го свържем с генерирането на Tregs:

- При СЛЕ, в периферна кръв, CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> са увеличени, наред с увеличеното ниво на IL-6.

- IL-6 заедно с IL-1, водят до „събуждане” на iTregs от състоянието на анергия и ги правят стават чувствителни към регулаторни сигнали
- IL-6 и PGE2 се секретират от МСК и действайки автокринно, взаимно потенцират действието си, като PGE2 категорично се свързва с генерирането на Tregs от МСК. На базата на това се прави спекулация, че IL-6 е ангажиран с създаването на Tregs.
- Съществуват данни за CD8+FoxP3+ клетки, позивно регулирани под действието на IL-6

В заключение нашите резултати показват, че под действието на секреторен/и фактори, отделяни от МСК се увеличава броя на CD4+FoxP3+T регулаторните клетки и се увеличава секрецията на IL-10, като най-вероятно именно генерираните iTregs са източник на тази секреция. При анализът на секретиранияте цитокини от неактивирани МСК, ние считаме че роля за създаването на iTregs има секретирания от АТ-МСК IL-6 (**Фиг. 13**), който би могъл да действа заедно с PGE2 и CCL2/ MCP-1.



**Фиг. 13.** Теоретичен модел на имуномодулация, осъществявана от секреторни фактори, отделяни от АТ-МСК. Предполагаме, че секретирания ИЛ-6 (вероятно заедно с PGE2 и CCL2), индуцира Tregs, секретирани ИЛ-10. От своя страна ИЛ-10 обуславя толерогенен тип дендритни клетки, които допълнително участват в процеса на имunosупресия, чрез липсата на В7 експресията си (*Ivanova-Todorova et al. 2012*).

## **V. Въздействие на МСК върху моноцитните дендритни клетки**

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

### **1. Дендритни клетки**

Дендритните клетки (ДК) са може би най-разнообразните клетки на имунната система. Описани през 1973 година от *Steinman and Cohn*, ДК са най-мощните антиген-представящи клетки и са хетерогенна група, която се различава по своя произход и функция. Моноцитните ДК,

наричани още „конвенционални дендритни” са предмет на нашия интерес по отношение на комуникацията си с МСК в хода на имунната супресия и под понятието „дендритни клетки” в настоящата работа се имат предвид именно те. В зависимост от функцията си ДК са в състояние да осъществяват два противоположни ефекта – индукция на имуен отговор, функция, която определя ДК, като „имуногенни” и индукция на имуен толеранс, което ги определя като толерогенни. Незрелите ДК са ангажирани в индукция на толеранс, предимно чрез секреция на IL-10, докато съзряването води до индуциране на имуен отговор, предимно чрез IL-12. ДК влизат в сложни отношения и с други имуномодулаторни клетки като Tregs.

## **2. Толерогенни дендритни клетки**

Дендритните клетки имат основна роля в предотвратяването на автореактивните състояния и в индукцията на толеранс, като тези свойства са характерни за дендритните клетки, които са се диференцирали от моноцитите, но не са съзрели. Те се характеризират с висока способност за фагоцитоза и ниска експресия на ко-стимулаторни молекули, което им дава възможност да поглъщат и представят антигени без наличието на ко-стимулация. Това от своя страна предизвиква индуциране на анергия в Т клетките. Основните фактори, свързани с образуването на толерогенни ДК са IL-10, TGF $\beta$ , PGE2, апоптотични материи, IL-6, Tregs. От своя страна толерогенните ДК също са ангажирани в генерирането на Tregs, както и в подтискането на Т ефекторните клетки, като може би най-важният механизъм за последното е липсата на класическия втори сигнал B7/CD28. Както вече беше коментирано този сигнал е дефинитивно

условие за активация на Т лимфоцитите и липсата му води до състояние на анергия в тях, характеризираща се е драматичен срив на продукцията на IL-2 и други ефекторни цитокини, при наличие на стимулация на ТКР (първи сигнал) Това е и основният механизъм, чрез който ДК осъществяват толеранс представяйки „свое“ /„неопасно“. Незрелите дендритни клетки, представят собствени антигени и експресират ниски нива на CD80/ CD86, като по този начин не представят втори сигнал на Т лимфоцитите, което води до тяхната анергия и впоследствие, регулация на пропуснатите от тимуса автореактивни клонове.

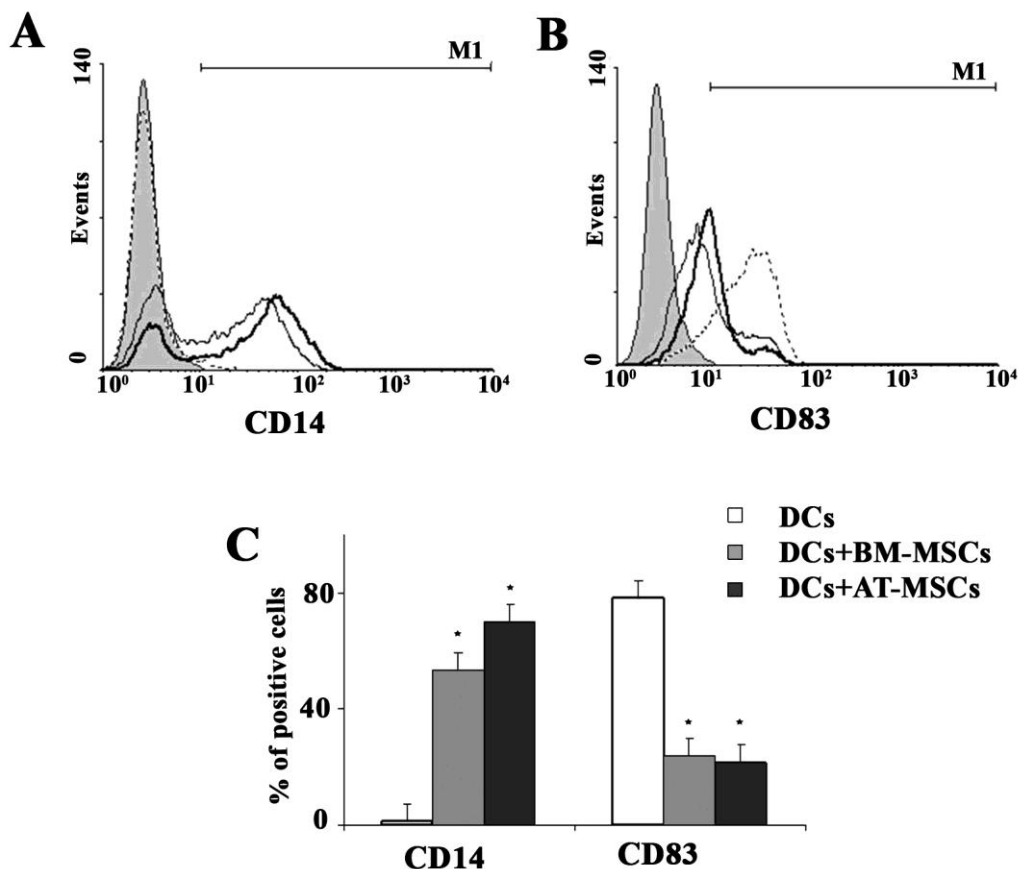
### **3. Собствени данни**

В нашите изследвания за влиянието на МСК върху ДК, използвахме магнитно сепарирани моноцити, които бяха култивирани с основните фактори, които ги диференцират в дендритни клетки – гранулоцит-моноцит колонио образуващ фактор (GM-CSF) и IL-4, като в единия случай клетките бяха култивирани в присъствие на МСК (изолирани от мастна тъкан или от костен мозък), а в другия самостоятелно. И в двата случая на 6-тия ден от култивирането на ДК беше добавен липополизахарис (LPS) с цел индуциране на тяхното съзряване.

Основната част (80-99,6%) от самостоятелно култивираните моноцити след 11 дни експресираща специфичните за зрели дендритни клетки маркери като CD80 (99,6%), CD86 (99,8%), HLA-DR (99,8%), CD83 (76%), като само много малък процент от клетките (1,3%) останаха CD14 позитивни. Тези резултати показват, че при описаните експериментални условия, хомогенната моноцитна култура успешно се

диференцира и в последствие съзрява, като се образуват зрели дендритни клетки.

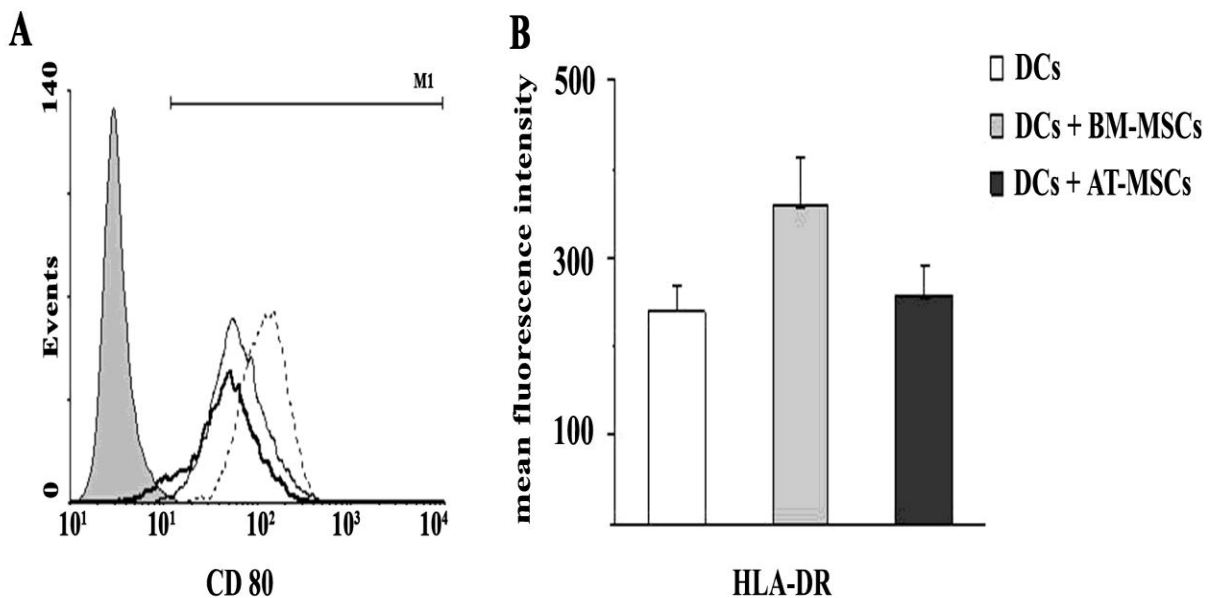
В условията на ко-култивиране с МСК, обаче се наблюдава чувствителна промяна в експресията на дендритно-клетъчните фенотипни маркери. Независимо дали се използват КМ-МСК или АТ-МСК за ко-култивиране с моноцити в условия за диференцирането и съзряването им в ДК, процентът клетки, експресиращи CD14 остава значително по-висок, отколкото при самостоятелното култивиране на ДК. При ко-култивиране с КМ-МСК процентът е 53,2%, докато при използването на АТ-МСК той достига до 69,8%, като резултатите бяха статистически сигнификантни (**Фиг.14А**). Обратно, клетките експресиращи CD83, класическият маркер за зрели ДК, значително намаляват в условията на ко-култивация, като при използването на КМ-МСК процентът им спада до 23,6%, а при използването на АТ-МСК до 21,5% (**Фиг.14 В**). Тези резултати показват, че МСК подтискат диференциацията на моноцитите в дендритни клетки, като АТ-МСК показват по силен ефект (**Фиг. 14 С**)



**Фиг. 14** Експресия на CD14 (A) и CD83 (B) от дендритни клетки, култивирани самостоятелно или ко-култивирани с КМ-МСК и АТ-МСК. Запълнената линия е отрицателна контрола, точковидната линия показва експресията при самостоятелно култивирани ДК, тънката линия показва ДК ко-култивирани с КМ-МСК, а дебелият ко-култивирани с АТ-МСК. На панел С се вижда сравнението на средния процент положителни клетки при 4 независими експеримента ( $p < 0,001$ , MW статистика) (Ivanova-Todorova et al. Immunology letters, 2009)

При анализирането на молекулите HLA-DR и основния ко-стимулаторен комплекс B7 (CD80 и CD86), експресирани от ДК, сметнахме за по важно резултатите да бъдат представени не като процент клетки, които експресират или не експресират тези молекули, а като сила на специфична експресия (mean fluorescent intensity- MFI) . Този подход е по- адекватен от гледна точка на B7 и HLA комплекса,

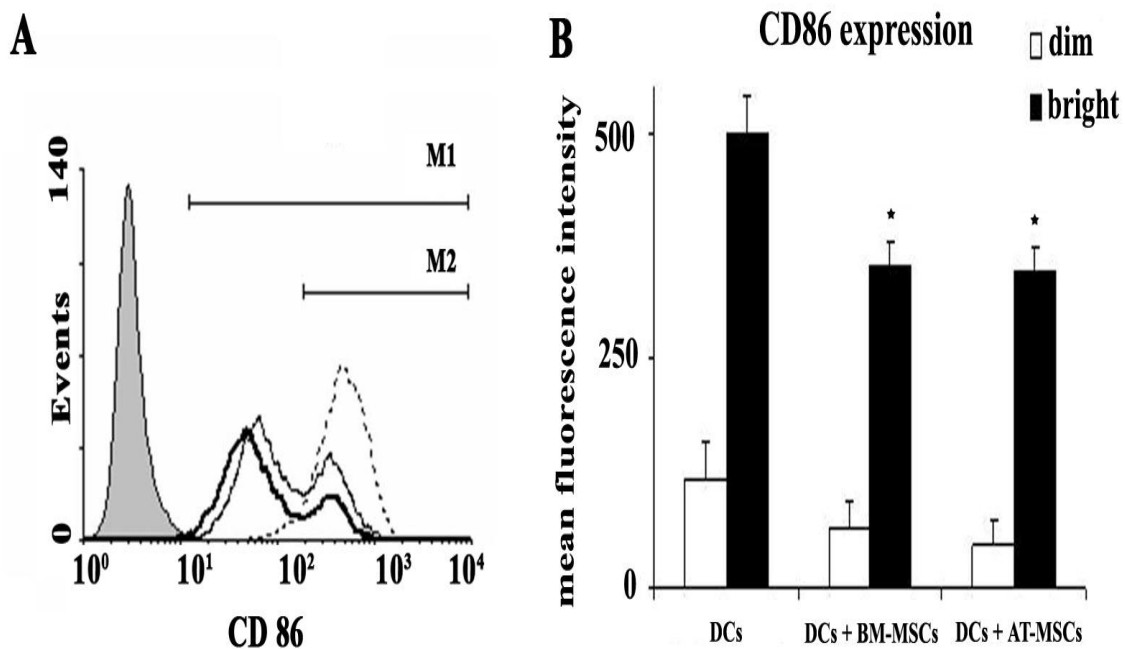
като се има в предвид ролята им в ангажирането в процеса на антигенно представяне. При условия на ко-култивиране, се установи намаляване на специфичната флуоресценция за CD80 от MFI=120,7 при самостоятелно култивираните ДК, на 61,5 при ко-култивиране с КМ-МСК и съответно на 51,8 при ко-култивиране с АТ-МСК (**Фиг.15А**), като резултатите бяха статистически сигнификантни. При изследване на HLA-DR не се установиха статистически значими разлики (**Фиг. 15 В**)



**Фиг. 15** Експресия на CD80 (А) и HLA-DR (В), от ДК култивирани самостоятелно или ко-култивирани с КМ-МСК и АТ-МСК. Запълнената линия е отрицателна контрола, точковидната линия показва експресията на самостоятелно култивираните ДК, тънката линия показва ДК ко-култивирани с КМ-МСК, а дебелата ко-култивирани с АТ-МСК. (*Ivanova-Todorova et al. Immunology letters, 2009*)

При изследване на другата молекула от В7 комплекса – CD86, на флуоцитометричните хистограми се установи, че при ко-култивирането

на ДК с МСК се виждат два пика, като първия изобразява клетките експресиращи ниска степен на CD86 ( $CD86^{dim}$ ), докато втория изобразява тези с висока експресия на маркера ( $CD86^{bright}$ ) (Фиг. 16). Отново под влияние на МСК силата на експресията на CD86 значително намалява като от MFI 482,6 при самостоятелно култивираните ДК, става на 102,7 при ко-култивирането с КМ-МСК и съответно на 61,5 при ко-култивирането с АТ-МСК. Под влияние на МСК се променя не само тоталната експресия на CD86, но и  $CD86^{dim}$  и  $CD86^{bright}$  поотделно, като в случая със  $CD86^{bright}$  се установява статистическа сигнификантност (Фиг.16 В)

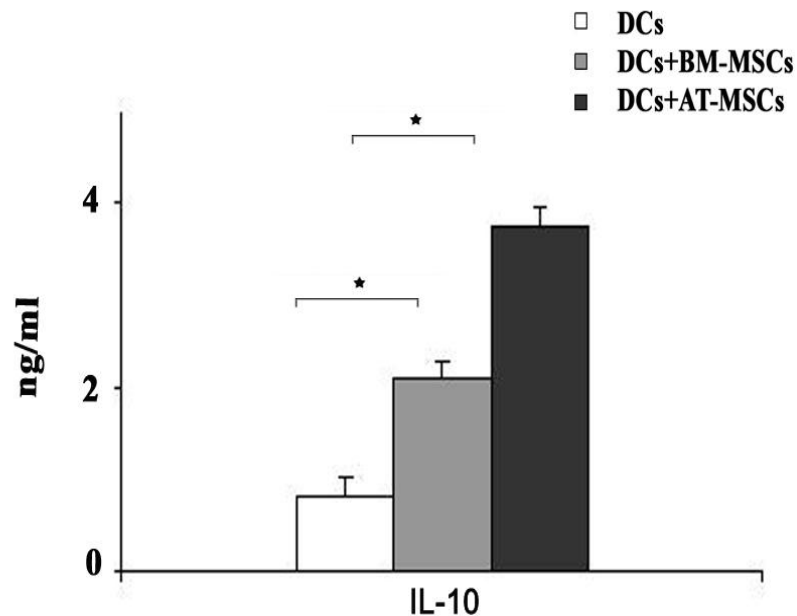


**Фиг. 16.** Експресия на CD86 (А). При ко-култивиране с МСК се установяват два пика на експресия на CD86. Запълнената линия е отрицателна контрола, точковидната линия показва експресията на самостоятелно култивираните ДК, тънката линия показва ДК ко-култивирани с КМ-МСК, а дебелата ко-култивирани с АТ-МСК. Панел (В) показва клетките с висока експресия на маркера (черни

колони) и тези с ниска експресия (бели колони). Стойностите са средни за 4 независими експеримента, като за CD86<sup>bright</sup> показват статистическа сигнификантност ( $p < 0,05$  MW статистика) (Ivanova-Todorova et al. *Immunology letters*, 2009)

Данните от тези експерименти доказват, че МСК не само инхибират диференциацията на моноцитите в дендритни клетки, но и подтискат експресията на основните ко-стимулаторни молекули, безусловно необходими за процеса на антигенно представяне.

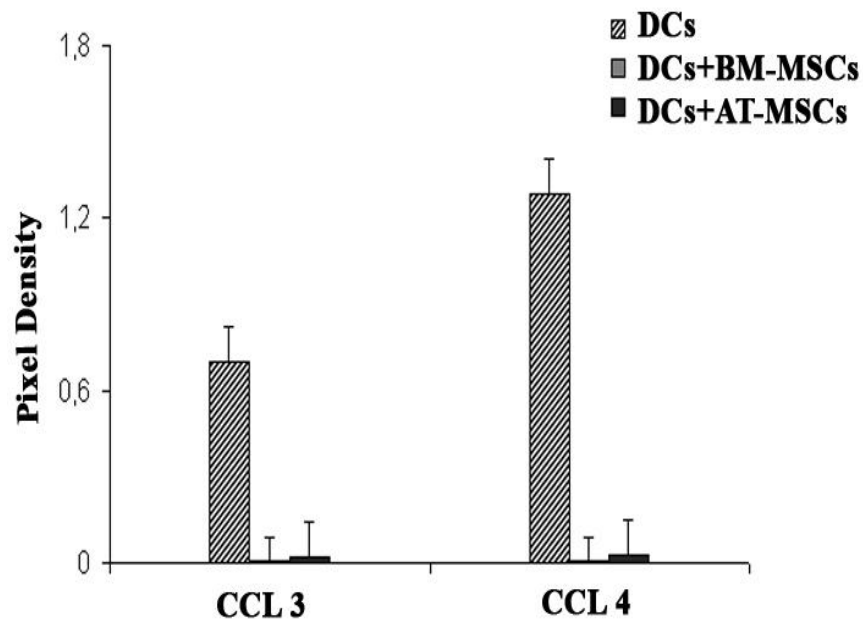
Следващата цел на нашите изследвания беше да изследваме концентрацията на IL-10 в супернатанти на ДК и на ДК ко-култивирани с МСК, като резултатите показаха значително увеличение на IL-10 в супернатантите на ко-култивираните клетки. Отново ефектът беше по-изразен при използване на АТ-МСК (Фиг. 17)



**Фиг. 17** Концентрация на IL-10 в супернатанти на: ДК култивирани самостоятелно (бели колонки), ДК ко-култивирани с КМ-МСК (сиви колонки), ДК ко-култивирани с АТ-МСК (черни колонки) Увеличението на IL-10 е статистически значимо (MW,  $p < 0,05$ ), като показаните резултати са средни за 4 независими експеримента (Ivanova- Todorova et al. *Immunology letters*, 2009)

Разбира се, тъй като изследванията на супернатантите са направени след ко-култивиране, трябваше да се изключи теоретичната възможност IL-10 да е с произход от МСК. Дали МСК секретират IL-10 е въпрос, който е доста противоречив в научната литература. Нашите многократни изследвания върху супернатанти на МСК от различен произход не установяват наличие на IL-10. Разбира се съществува и възможността контактът с дендритните клетки да активира МСК, тъй като е известно, че активираните МСК променят цитокиновата се секрция. За да изключим тази възможност ние стимулирахме култури от КМ-МСК и АТ-МСК с РМА и йономицин, след което ги тестирахме за IL-10 секрция, която отново не беше установена (данните не са показани). Вследствие на това ние правим извода, че секретията на IL-10 в системата се осъществява от дендритните клетки, още повече, че ДК секретират IL-10 и при самостоятелното си култивиране.

Наред с IL-10, супернатантите на самостоятелно култивирани ДК, както и тези на ко-култивирани с МСК бяха изследвани за още 35 цитокини, като резултатите показаха, че под въздействието на МСК, два хемокина, които се секретират от ДК култивирани самостоятелно, на практика изчезват от супернатантите при ко-култивирани клетки (Фиг.18)



**Фиг. 18** Концентрация на CCL3 и CCL4, измерена като pixel density. Двата хемокина се секретират в супернатантите на ДК култивирани самостоятелно (раирани колонки) и изчезват от супернатантите на ДК ко- култивирани с КМ-МСК (сиви колонки) и АТ-МСК (черни колонки). Показаните резултати са средни за 4 независими експеримента (*Ivanova- Todorova et al. Immunology letters, 2009*)

CCL3 и CCL4 са описани като секретирани от ДК със способност да привличат Т лимфоцити, НК клетки, еозинофили и макрофаги в огнищата на възпалителния процес. Твърде възможно е блокирането на тези хемокини да представлява още един механизъм на супресия от страна на МСК върху дендритните клетки, осъществяван чрез ограничаване на способността им да привличат имунокомпетентни клетки. От всички фактори, които секретират МСК, в литература, на миши модел е описан единствено ефекта на екзогенния PGE2, който подтиска експресията на CCL3 и CCL4 от ДК.

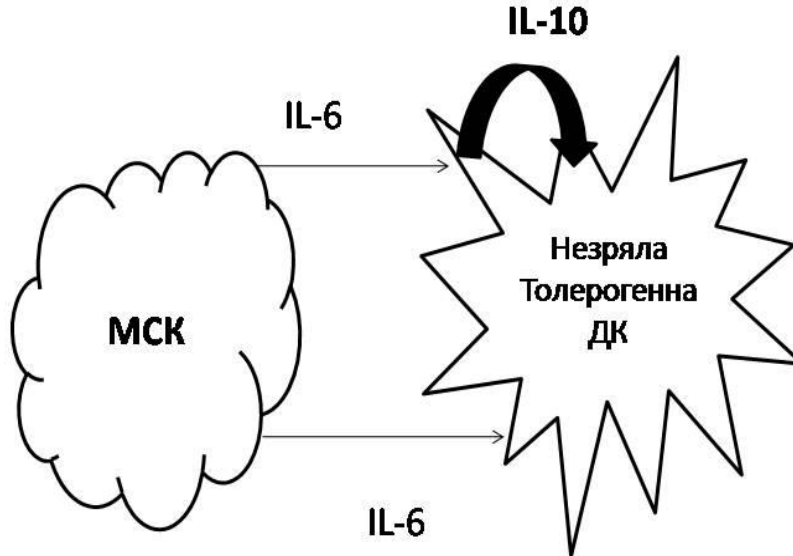
Получените резултати показват, че под въздействието на МСК, изолирани както от костен мозък, така и от мастна тъкан, моноцитите подтискат диференциацията си в дендритни клетки, като запазват своя маркер CD14, който при нормалното им развитие в посока ДК, изчезва под действието на IL-4, използван за диференциацията *in vitro*. Обратно на това, броят клетки, експресиращи CD83, типичният маркер, характеризиращ популацията на зрелите дендритни клетки значително намалява. Успоредно на този процес значително намалява експресията на B7 комплекса и докато при CD80 това е предимно количествен процес, при CD86 под въздействието на МСК се наблюдават два пика на експресия - ниска и висока. CD86, както беше казано и по-горе, е ангажиран с „втория сигнал” и има два основни лиганда - CD28 и CTLA-4. Той се експресиращ на повърхността на моноцитите, още на ден 0 от култивирането, за разлика от CD80, който се експресиращ на по-късен етап от моноцитната диференциация (ден 3-4). И двата маркера засилват своята експресия при съзряването на ДК под действието на LPS. На базата на това може да се спекулира, че първият пик (CD86<sup>dim</sup>) представляват клетките с блокирана диференциация още на ниво моноцити и/или незрели ДК, докато вторият пик (CD86<sup>bright</sup>) представляват зрелите дендритни клетки със супресирана CD86 експресия.

Нашият екип не може да се ангажира с категоричен отговор, на какво точно ниво се осъществява супресията на диференциацията в дендритни клетки. Пътят моноцити - незрели ДК- зрели ДК, не се характеризира с ясно отличими етапи, които да характеризират точното ниво на диференциация и съзряване на всеки етап.

Основен въпрос се явява кои са факторите водещи до описаните промени в диференциацията/съзряването на дендритните клетки. Едната възможност е прекият контакт между МСК и ДК предшествениците, да води до инхибиция и промени в последните. Макар тази възможност да не се отхвърля и се споменава в теоретичен аспект, на този етап липсват каквито и да е доказателства за нея. Обратно, в полза на идеята, че МСК повлияват дендритно клетъчната диференциация чрез секреторни фактори има редица доказателства. Изследването ни на супернатанти от различни видове МСК установяват наличие на IL-6. В литературата се дискутира ролята на IL-6, като един от цитокините, секретирани от МСК, под чието действие се осъществява инхибицията на дендритно клетъчната диференциация, както и качествените промени в ДК в толерогенна насока.

Другият цитокин с безспорно доказано действие, коментирано по-горе, върху диференциацията на ДК е IL-10, като се дискутират неговите паракринни и аутокринни ефекти. Според някои автори МСК секретират IL-10, който повлиява на ДК като ги прави, секретирани от своя страна IL-10. Този цитокин, също като IL-6 въздейства чрез JAK1/ STAT3 системата и води до формиране на незрял толерогенен фенотип. Авторите спекулират, че взаимоотношенията МСК/ ДК силно наподобяват взаимоотношения Treg/ ДК, като се установява положителна обратна връзка чрез IL-10. Този модел залага на идеята, че МСК секретират IL-10, която не е еднозначно приета от изследователите. Нашите данни не показват такава секреция, поради което моделът който ние предлагаме е следния:

Вследствие секрецията на IL-6 от МСК, ДК придобиват незрял толерогенен фенотип, характеризиращ се със секреция на IL-10. От своя страна автокринно действащия IL-10 също води до формиране на незрял толероген фенотип ДК (**Фиг.19**). Предимството на този модел е съчетанието на безспорните свойства на двата цитокина в супресията на ДК диференциацията и избягване на спорното наличие на секреция на IL-10 от МСК.



**Фиг. 19.** Вследствие секрецията на IL-6 се наблюдават двоен ефект върху дендритната клетка. Първо IL-6 директно обуслава незрял/толерогенен фенотип и второ IL-6 води до автокринна секреция на IL-10, имаща като следствие същия ефект

Наред с описаните цитокини съществуват данни и за други такива, които се секретират от МСК и водят до подтисната диференциация на ДК и тяхната секреция на IL-10, като например PGE2, TGF $\beta$  и VEGF. Съществуват сведения за ролята на хемокина CCL2, под чието действие се увеличава IL-10 секрецията от страна на толерогенните ДК, като при нашите изследвания ние установихме наличието на този хемокин в кондиционирани среди от АТ-МСК и КМ-МСК.

Най-нови данни доказват, че под влияние на секреторни фактори от МСК, дендритно клетъчните предшественици променят посоката на диференциацията си от ДК към MDSC, секретирани IL-10. Според авторите причина за това са т.нар. Gro (growth regulated oncogene) хемокини, принадлежащи към IL-8 фамилията, за които е доказана способността им да медираат арест в клетъчния цикъл на моноцитите. На базата на нашите резултати от изследваните цитокини в супернатантите на МСК ние считаме, че ефектът свързан с формиране на секретирани IL-10 незрели/ толерогенни ДК може да се дължи на секрецията на:

- IL-6, който действа пряко в тази насока, както и индуцира автокринна секреция на IL-10 от ДК (**Фиг.19**). IL-6 може да се секретира и автокринно от ДК под действието на HLA-G експресиран от МСК и свързващ ILT-4 на повърхността на ДК
- CCL2, който засилва IL-10 секрецията от ДК.
- CXCL1/Gro $\alpha$ , установен в МСК средата и водещ до формиране на MDSC секретирани IL-10

Независимо от конкретните цитокини, индуциращи толерогенни ДК, генерирането на последните е ключово в осъществяването на

имуносупресивните действия на МСК. Имайки в предвид ролята на ДК като организатори на имунния отговор или съответно неговата супресия, намесата на това ниво е може би от най-съществено значение. Формират се толерогенни ДК, които обуславят анергия в Т клетките, чрез липсата на „втори” сигнал и секрецията си на IL-10. Те също така участват в създаването на iTregs, с които взаимно потенцират действието си отново чрез IL-10, и като вследствие на тези два механизма са налице почти всички условия необходими за имуносупресивно състояние.

## **VI. МСК, прогестерон и въздействието им върху имунните клетки в женския репродуктивния тракт**

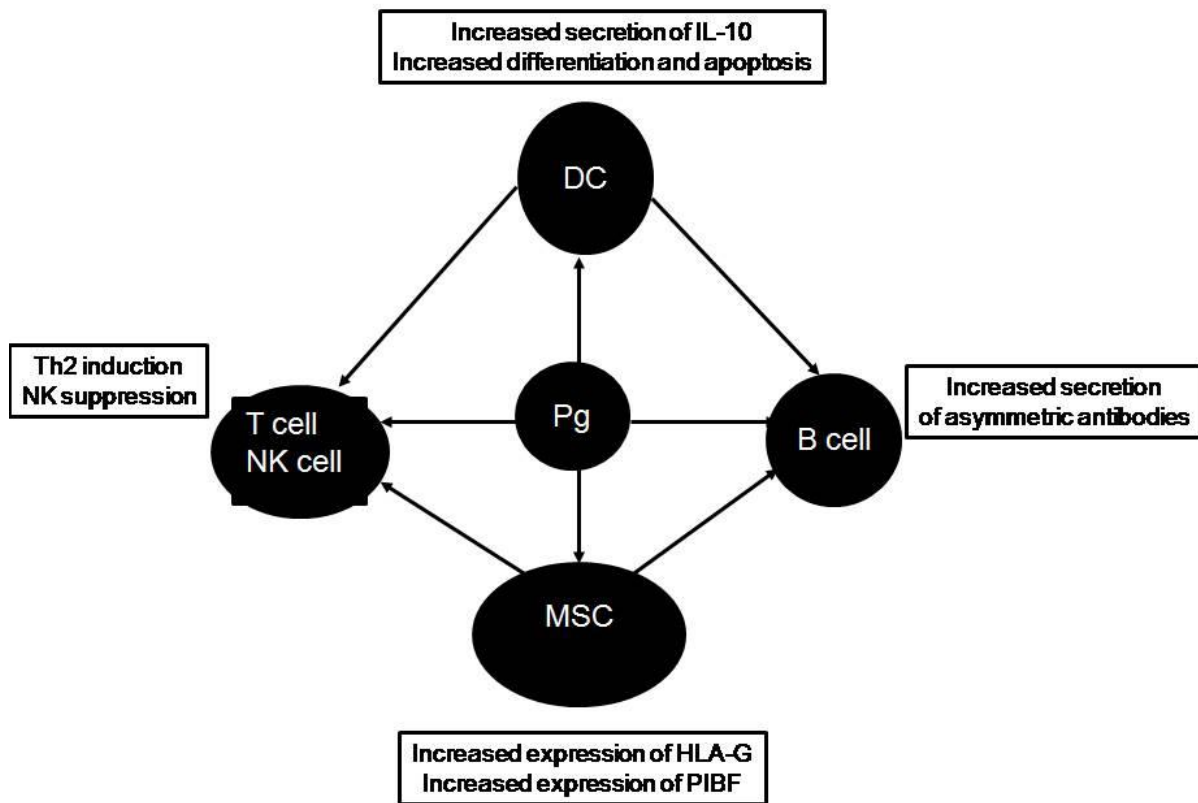
### **1. МСК в децидуа**

Поради факта, че в женския репродуктивен тракт се реализират механизми обуславящи имунна супресия, изглежда логично наличието на клетки, с такова действие. Както е известно, бременността е свързана с изменения в ендометриума, водещи до формирането на децидуа – високо специализирана структура, която се развива от диференциацията на ендометриалните стромални клетки, под влияние предимно на прогестерон (Пг). В децидуата се намират всички клетки, ангажирани в имунните реакции, както и имунорегулаторния хормон Пг, който би могъл да им влияе. Налице са всички потенциални участници, както за индуциране на имунен отговор, така и за действие на имунната система по посока индукция на толеранс.

През 2009 нашият екип за първи път доказва, че стромални клетки, изолирани от децидуа в първия триместър на бременността покриват всички необходими критерии, за да бъдат формулирани като децидуални мезенхимни стволови клетки (Д-МСК). Доказването на МСК в децидуата, логично повдига въпросът за тяхното действие по посока индукция на толеранс- условие ключово необходимо за запазването на ембриона, а локализацията им на място богато на Пг повдига въпроса за взаимодействието им с този хормон.

## **2. Прогестерон**

Прогестеронът има множество и разнообразни действия върху клетките на имунната система, на базата на които ще се разгледат и действията му върху МСК. Както се вижда от **Фиг.20**, Пг въздейства в имуносупресивна посока върху множество клетки на имунната система. Наличието на Д-МСК и Пг в децидуата ни даде основание да изследваме влиянието на хормона върху мезенхимните стволови клетки. По конкретно, целта на нашите изследвания в този аспект беше да се определи въздействието на Пг върху МСК, с оглед на индукция на определени молекули от тях, обуславящи имунна супресия. Изследванията ни показаха, че под влияние на Пг мезенхимните стволови клетки експресират два специфични протеина, тясно ангажирани в процеса на супресия на имунния отговор: PIBF и HLA-G.



**Фиг.20.** Комплексни взаимоотношения между клетките на имунната система и прогестерон. Ефектът на Пг върху имунокомпетентните клетки води до множество взаимодействия, които подпомагат процесът на имуен толеранс и предимно хуморален имуен отговор (Kyurchiev et al. *Advances in Neuroimmune biology*, 2011)

### 3. Прогестерон индуциран блокиращ фактор (PIBF)

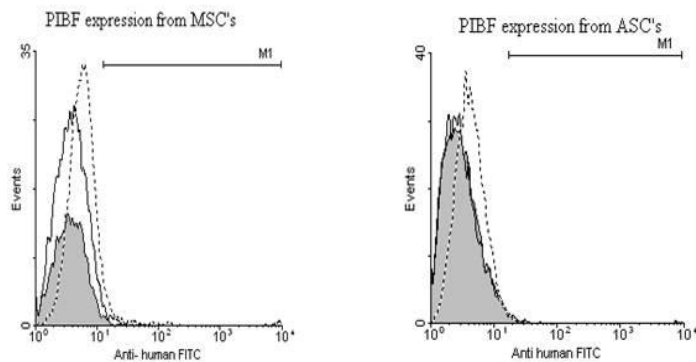
PIBF е описан от *Szekerez-Bartho* като 34kD протеин, секретиран *de novo* под прогестеронова индукция по време на бременност, с активна роля в регулацията на имунния отговор. Същата група доказва способността му да инхибира лимфоцитната цитотоксичност, цитотоксичността на NK клетките и простагландиновата секреция. Като основен негов източник се сочат Т лимфоцитите с  $\gamma\delta$  рецептор, както и децидуалните NK клетки. Множество данни описват

локализацията на иРНК за PIBF, или съответно експресирания протеин, не само в Т лимфоцитите, но и в други клетки, характеризиращи се с интензивна пролиферация, като човешки трофобласт, туморни клетъчни линии и ендометриални клетки. Общото между всички тях е, че те са недиференцирани клетки, което ни даде основание да изследваме експресията на PIBF при мезенхимни стволови клетки, изолирани от различни източници.

#### ***A.) Собствени данни***

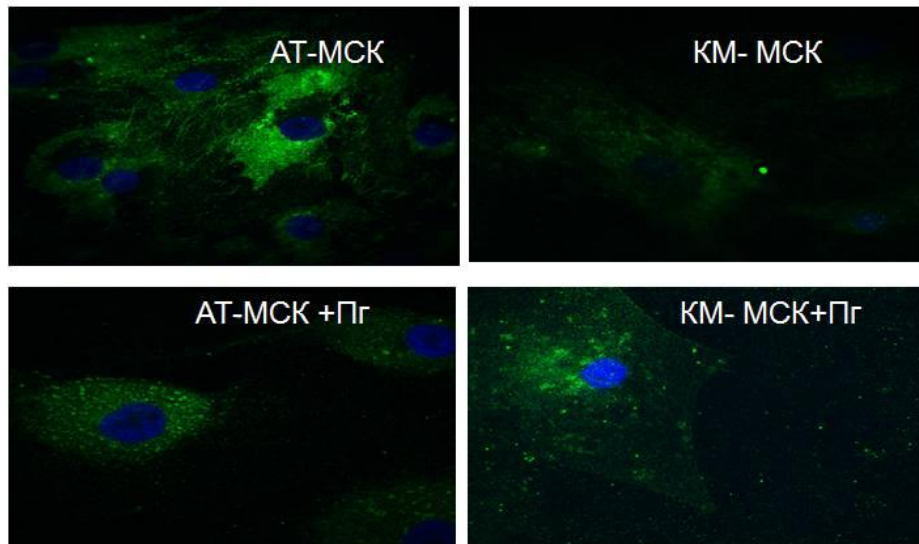
Абсолютно необходимо условия за изследването на PIBF в различни видове МСК беше наличието на анти-PIBF моноклонално антитяло, което беше създадено, характеризирано и описано от нашия екип. Glutathione S transferase-PIBF fusion протеин беше изолиран от щамове E.coli трансформирани с GST- PIBF вектор, любезно предоставен ни от prof. Szekeres-Bartho (Pecs University Medical School, Pecs, Hungary). На базата на това, използвайки класическата хибридомна техника беше създадено моноклонално антитяло, наименовано от нас 3А6.

При флоуцитометричните изследвания върху АТ-МСК и КМ-МСК установихме слаба до липсваща експресия на повърхностен PIBF, като култивирането на клетките с Пг, не води до увеличаване на процент експресиращи PIBF клетки (**Фиг. 21**).



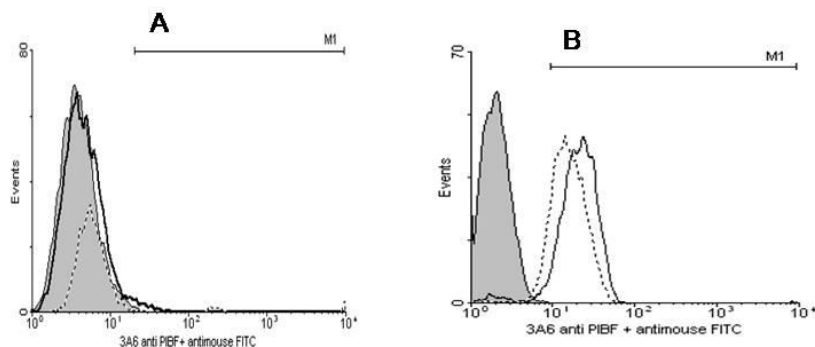
**Фиг. 21** Повърхностна експресия на PIBF от КМ-МСК (вляво) и АТ-МСК (вдясно). Запълнената линия изобразява отрицателната контрола, плътната черна линия – МСК, а точковидна линия МСК култивирани с Пг. Установява се минимална до липсваща PIBF повърхностна експресия, независимо от наличието на Пг.  
**Легенда:** MSCs – КМ-МСК, ASCs- АТ-МСК

При изследване с конфокална микроскопия на двата вида клетки, обаче се установи специфично перинуклеарно грануларно цитоплазмено светене, като култивирането с Пг не променя съществено характера и интензивността му. Прави впечатление, че АТ-МСК се характеризират с по голяма експресия на PIBF (**Фиг. 22**).



**Фиг. 22** Специфично перинуклеарно грануларно цитоплазмено светене за P1BF, установено с конфокална микроскопия.

Флуоцитометричното изследване на Д-МСК показва около 2.4% специфична повърхностна експресия на P1BF, която както и при другите видове МСК не се повлиява от култивирането на клетките с Пг (**Фиг. 23А**), докато при изследването на интрацелуларната P1BF експресия се установи, че 90% от Д-МСК експресират специфично P1BF. Култивирането с прогестерон, намали на пръв поглед парадоксално този процент на 72% (**Фиг. 23В**).

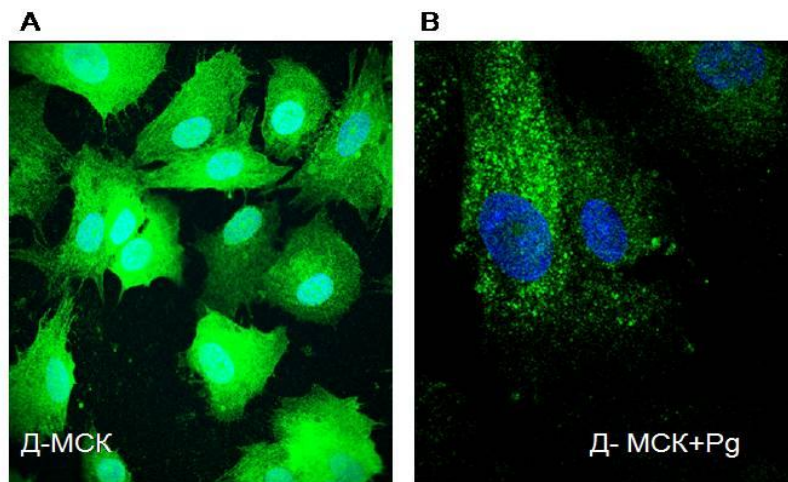


**Фиг.23** Експресия на PIBF от Д-МСК. А- повърхностна експресия, В- интрацелуларна експресия (запълнена графика – отрицателна контрола, пълтна черна линия –Д-МСК, точковидна линия Д-МСК култивирани с Пг) (*Ivanova-Todorova et al. Compt. Rend. Acad. Bulg.Sci 2009*)

Този резултат се потвърди и при изследването чрез конфокална микроскопия, където почти всички Д-МСК показаха интензивно хомогенно интрацелуларно оцветяване (**Фиг. 24 А**), както в ядрото, така и в цитоплазмата, а култивирането с Пг доведе до по-слабата му интензивност и променен характер. Под прогестероново влияние, клетките демонстрираха перинуклеарно цитоплазмено гранулирано оцветяване (**Фиг. 24 В**).

Наличието на интрацелуларан PIBF във почти всички Д-МСК некултивирани с Пг, ни дава пълното основание да спекулираме, че

вероятно  $\gamma\delta$  Т клетките далеч не са основния източник на РІВF, по време на ранната бременност, тъй като са сравнително малка популация в ранната човешка децидуа, за сметка на Д-МСК, които са основен клетъчен тип там. Ние считаме, че Д-МСК са алтернативен източник на РІВF, като допускаме, че те представляват депо за този протеин.



**Фиг. 24** Д-МСК демонстрират интензивно хомогенно интрацелуларно оцветяване в ядрото и цитоплазмата (А), а култивирането с Пг доведе до по-слабо интензивно перинуклеарно цитоплазмено гранулирано оцветяване (В) (*Ivanova-Todorova et al. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci 2009*)

Установяването на РІВF експресия в клетъчните ядра на Д-МСК, ни дава също така основание да допуснем, че РІВF е свързан с клетъчния цикъл на Д-МСК, като в съгласие на това са данните, че иРНК на РІВF е свръхекспресирана при силно пролифериращи клетки (като Д-МСК),

независимо от наличието им на прогестеронови рецептори. Фактът, че РІВF изчезва от ядрото и намалява в цитоплазмата при култивиране на Д-МСК с Пг, би могъл да е вследствие на това, че под въздействие на прогестерон Д-МСК секретират „складирания” РІВF. Това твърдение е твърде логично, като се има в предвид факта, че прогестеронови рецептори са описани при МСК.

Ролята на РІВF се свързва и с действието му като ядрен фактор, който може директно да свърже промотора на гена на ІL-6 и да бъде един от факторите, осигуряващи секрецията на цитокина, а както стана ясно ІL-6 е класически цитокин, секретирани от МСК.

В заключение нашият екип за първи път описва интрацелуларна РІВF експресия в МСК, като в Д-МСК се установява, че тя намалява под прогестеронова индукция, вероятно поради секретиранието на РІВF от тези клетки.

#### **4. HLA-G**

В края на 80-те години за първи път е описан нов член на фамилията на човешките левкоцитни антигени клас Іb (HLA-Іb), който е означен като HLA-G. Установено е, че той се характеризира с ниска степен на полиморфизъм и рестриктирано тъканно разпространение. Полиморфизмът на HLA-G се свежда до 4 мембранни изоформи (HLA-G1 – HLA-G-4) и три разтворими (HLA-G5- HLA-G7).

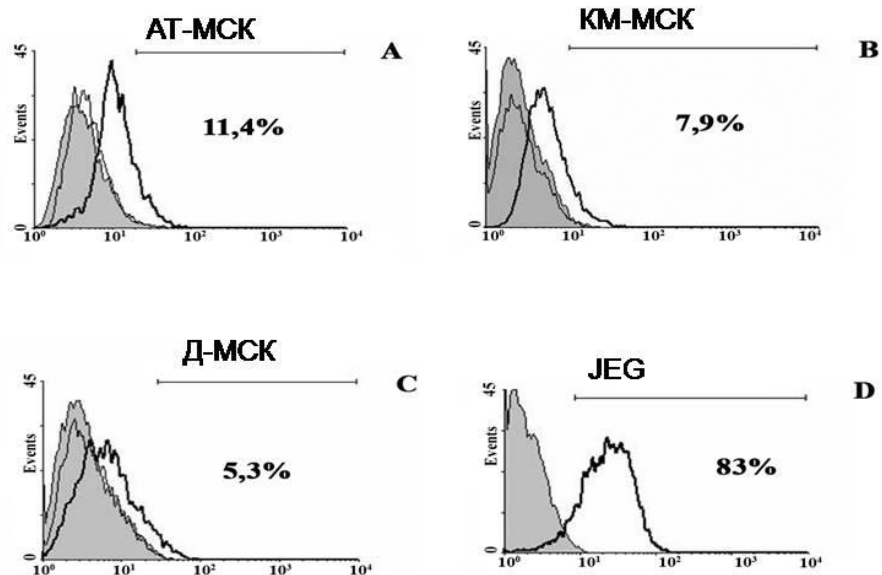
Въпреки първоначалните мнения, че разпространението на HLA-G е ограничено до клетките и тъканите в репродуктивния тракт, множество данни сочат, че това далеч не е така. HLA-G безспорно е фактор, който е въввлечен в преодотвратяването на отхвърлянето на семи-алогенния плод, като по този протектира бременността. Многобройни са

механизми, чрез които той действа в тази насока, като се повлияват множество типове имунни клетки, както чрез директен междуклетъчен контакт, където роля играят мембранните форми на HLA-G, така и чрез индукция на цитокинова секреция от други клетки и/или формиране на имунорегулаторни субпопулации. Основните мишени за имunosупресивните функции на HLA-G са Т лимфоцитите, НК клетките и антиген-представящите клетки, като прогестеронът категорично е един от основните фактори, регулиращи експресията и секрецията на HLA-G.

#### ***А.) Собствени данни***

Данните относно експресията на HLA-G от множество клетъчни типове (включително и МСК), както и описаната способност тази експресия да се влияе от множество фактори (включително прогестерон) ни дадоха основание да изследваме връзката Пг/МСК от гледна точка на HLA-G.

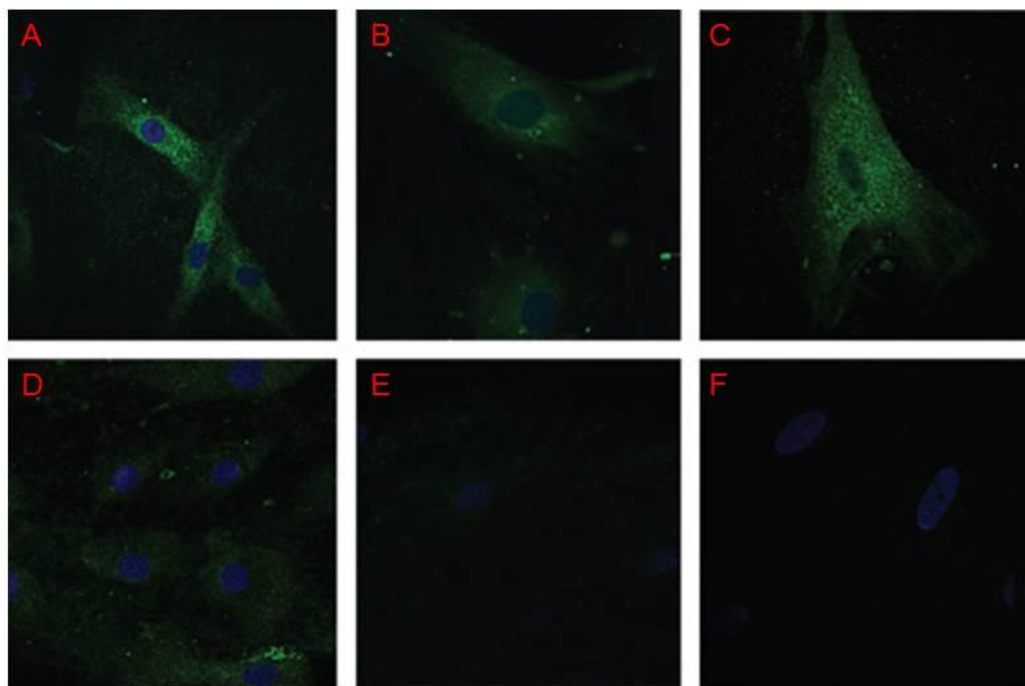
За целта използвахме МСК изолирани от мастна тъкан (АТ-МСК), костен мозък (КМ-МСК), и децидуа (Д-МСК), които бяха култивирани с Пг. При флоуцитометричното изследване ние не установихме повърхностна експресия на HLA-G, нито при АТ-МСК, нито при КМ-МСК, нито при Д-МСК култивирани самостоятелно. Култивирането с Пг, обаче доведе до повърхностна експресия на HLA-G и при трите вида клетки, съответно АТ-МСК -11.4%, КМ-МСК 7.9% и Д-МСК 5.3% (**Фиг. 25**).



**Фиг. 25** Експресия на HLA-G под влияние на Пг при АТ-МСК (А), КМ-МСК (В) и Д-МСК (С). Експресия на HLA-G от JEG клетки, за които е известно, че експресират HLA-G и служат за положителна контрола (D)

Запълнена линия – отрицателна контрола, тънка линия – клетки култивирани без Пг, дебела линия- клетки култивирани с Пг. (*Ivanova-Todorova et al. Am. J. Reprod. Immunol. 2009 с модификации*)

При изследването с конфокална микроскопия също не се установи нито повърхностна, нито интрацелуларна експресия на HLA-G при трите вида МСК (Фиг 26 d, e, f). Добавянето на Пг обаче доведе до наличието на специфично за HLA-G перинуклеарно оцветяване и при трите вида МСК, като най-интензивно беше за Д-МСК (Фиг 26 a,b, c).



**Фиг. 26.** Конфокално изображение на експресията на HLA-G от три вида МСК култивирани с Пг АТ-МСК (А), КМ-МСК (В) и Д-МСК (С). D, E, F показват съответните клетки, култивирани без Пг. (*Ivanova-Todorova et al. Am. J. Reprod. Immunol. 2009 с модификации*)

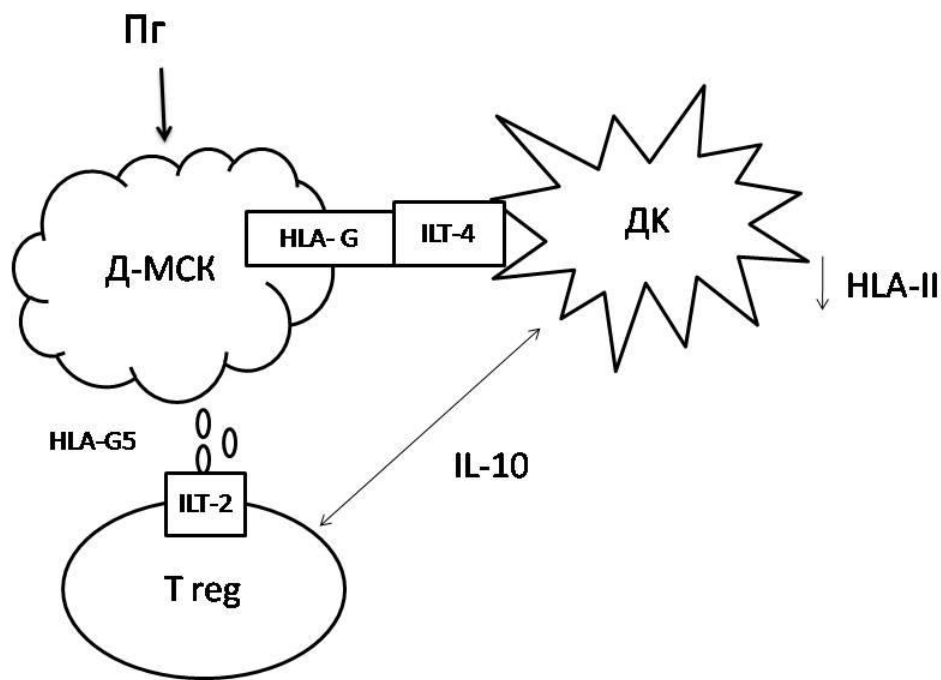
В нашите експерименти ние не можахме да докажем секреторни форми на HLA-G в супернатантите, нито на клетките третирани с Пг, нито на контролните клетки, като това се отнася за всички изследвани видове МСК. Причините за това са свързани с липса на достатъчно качествен и достоверен търговски ELISA кит (поне по времето на нашите изследвания)

Резултатите, които получихме ни дават основание да твърдим, че под въздействието на прогестерон HLA-G протеина се експресира

интрацелуларно, като най-значителната му експресия се наблюдава при Д-МСК, вероятно поради факта, че мястото, от което произхождат е с висока концентрация на Пг. Под прогестеронова индукция се наблюдава и повърхностна експресия на HLA-G и от трите вида МСК. Значението на експресията и евентуалната секреция на HLA-G под прогестеронова индукция би могло да се приеме като ключово в регулацията на имунния отговор в женския репродуктивен тракт по време на бременност. Под Пг действие, експресията на HLA-G върху Д-МСК вероятно е важен фактор в индукцията на толерогенни ДК в децидуата. Формирането на толерогенни ДК под HLA-G индукцията се осъществява, като HLA-G се свързва за ILT-4 на повърхността на дендритните клетки, връзка, която активира тирозин фосфатазите SHP-1 и SHP-2. Впоследствие, чрез транслокацията на NKкВ се секретира IL-6, който автокринно, чрез активация на STAT3 води до увеличени нива на катепсин S и в последствие инхибиция на HLA-II експресията от ДК. Разбира се, МСК сами по себе си секретират IL-6 могат да доведат до тези процеси и по паракринен механизъм, без посредничеството на HLA-G. Описаният механизъм демонстрира как под Пг индукция се реализира един типично контактен механизъм, чрез който МСК могат да доведат до развитие на толерогенни дендритни клетки, със всички последствия от това.

От друга страна секреторния HLA-G5 (за който нямаме директни данни, че се секретира под индукция на Пг, но това е твърде възможно, имайки в предвид интрацелуларното му намаляване след третиране на МСК с Пг) се свързва за ILT-2 на повърхността на T клетките, което води до формирането на Tregs, като процесът е силно зависим от IL-10.

Както вече беше казано Tregs и толерогенните дендритни клетки чрез двупосочната си секреция на IL-10, засилват взаимно имunosупресивния си фенотип. Следователно под влияние на прогестерон, експресията/ секрецията на HLA-G от Д-МСК води до формиране на имунорегулаторна верига с участници: самите МСК, Tregs и толерогенните дендритни клетки (Фиг.27).



**Фиг.27** Под въздействието на прогестерон, Д-МСК експресират (и вероятно секретират) HLA-G, имунорегулаторна молекула индуцираща толерогенни дендритни клетки, както и Tregs. Двата вида клетки взаимно засилват качествата си чрез секреция на IL-10.

В заключение може да се обобщи, че протестронът засилва експресията на PIBF и HLA-G от страна на МСК, две от основните регулаторни молекули, контролиращи имунния баланс между майката

и плода по време на развиващата се бременност. Така МСК се включват в групата на имунорегулаторните клетки, които под хормонален контрол контролират необходимите условия на имуен толеранс, при ситуация при която той е безусловно необходим.

## **VII. МСК изолирани и култивирани от ГБМ?** **Имунорегулаторно действие**

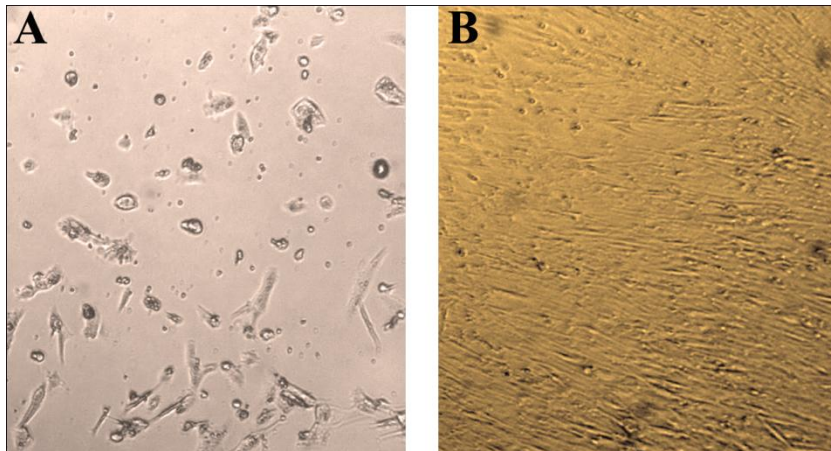
Когато става въпрос за имуносупресивната функция на мезенхимните стволови клетки, трудно би могло да се избегне темата за ролята им в туморната имунология, тъй като подтискането на имунната система (собено локалното) е основен проблем при злокачествените тумори. Един от базисните прийоми, които туморът използва за „имуно изплъзване” е манипулирането на имунната система и по конкретно на имуносупресивните клетъчни популации. От друга страна, напредъкът в изучаването на стволовите клетки, установяването на тяхната екстремна недиференцираност, пластичност и способност за самообновление, даде основания за нова концепция относно туморогенезата. Тази част ще акцентурира върху описанието на клетки изолирани от глиобластома мултиформе (ГБМ), които показват качества на класически мезенхимни стволови клетки, като ще бъдат дискутирани и някои техни имуносупресивни действия.

### **1. Собствени данни**

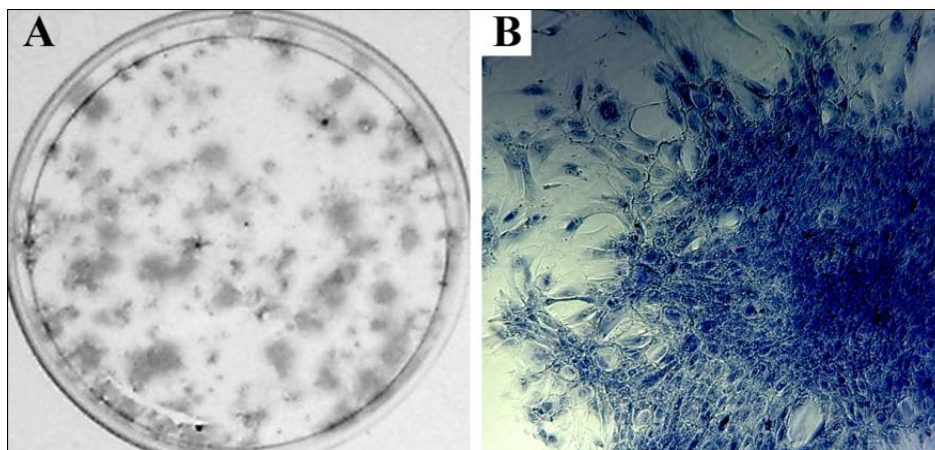
#### ***A.) Култивиране на клетки изолирани от ГБМ***

При култивирането на клетки, изолирани от ГБМ съществуват две основни концепции: модел невросфери (НС), които се получават при

култивиране на изолираните клетки в безсерумна среда (вместо серум средата съдържа B27 суплемент), при наличие на EGF и bFGF и модел адхерентни клетки (АК), които се получават, когато изолираните клетки от ГБМ се култивират в отсъствие на EGF и FGF, но при наличието на 10% ФТС. В нашите изследвания ние използвахме класическите модели на НС и АК но и разработихме свой собствен „междинен модел”, резултатите от който ще бъдат обект на следващите страници. При използвания модел, изолираните от ГБМ клетки бяха култивирани в среда съдържаща, както EGF и FGF, така и 10% фетален серум. При тези условия нашите клетки след първоначален хетерогенен вид (**Фиг.28А**) демонстрираха адхерентен растеж (**Фиг.28В**). Изследването на способността на клетките за самообновление беше извършено чрез тестове за клоногенност, като всички тествани култури показаха клоногенен растеж средно за около 2% от култивираните клетки (**Фиг. 29**).



**Фиг.28** Морфология на клетки изолирани и култивирани в среда съдържаща, както FGF и bFGF, така и 10% ФТС. На 3-ти ден от култивирането си клетките демонстрират хетерогенен вид (А), който по-късно се заменя с хомогенен адхерентен растеж (В) (*Кюркчиев и сътр.2014*)



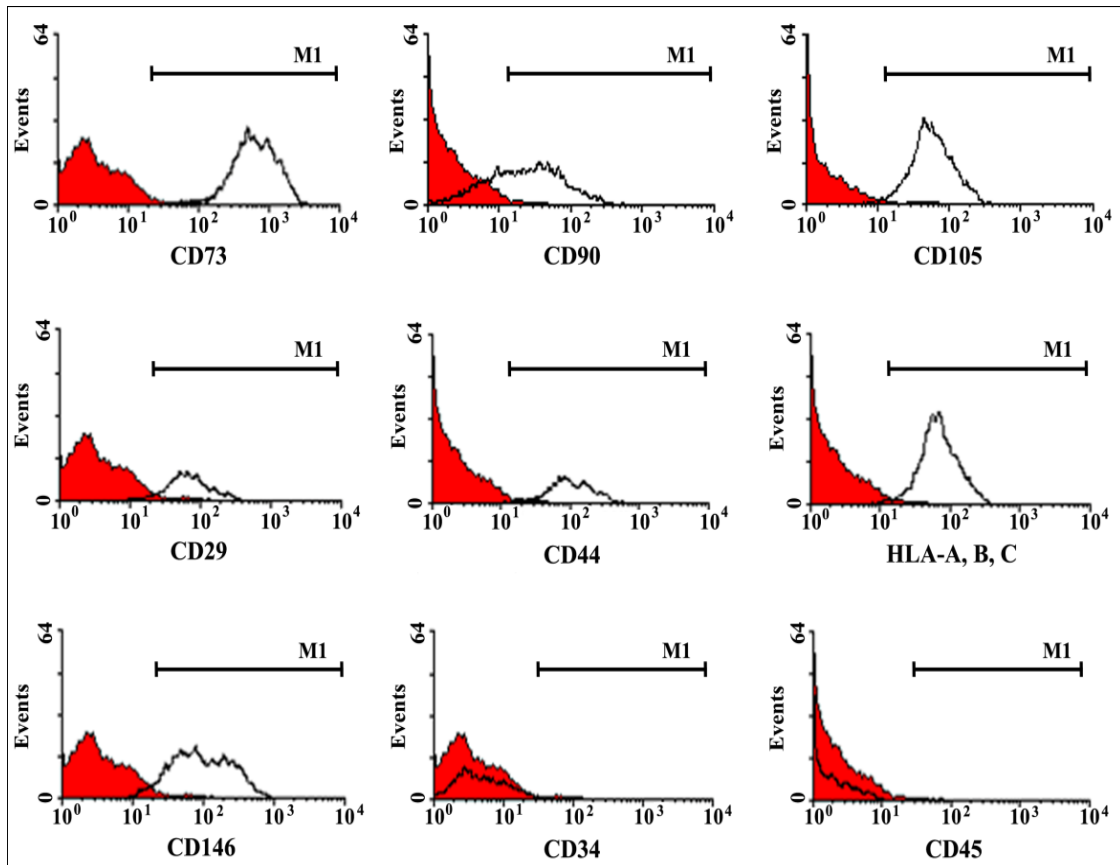
**Фиг.29** Клоногенен растеж на клетки изолирани от ГБМ и култивирани в среди с EGF, FGF и ФТС (А) Оцветяване с Crystal violet (В) (Белемезова и сътр.2014)

**Б.) Прилики между клетки изолирани и култивирани от ГБМ и мезенхимни стволови клетки**

Морфологията, клоногенността, както и някои доказателства за „стволовост” на култивираните клетки (неописани тук) ни дадоха основание да сравним ГБМ клетките, характеризирани от нас с мезенхимните стволови клетки.

Клетките, изолирани от ГБМ и култивирани в среда, съдържаща EGF, FGF и ФТС, показаха типичен растеж подобен на МСК, характеризиращ се първоначално с хетерогенност (**Фиг.28А**), която след около 15-18 дни придоби типичния вид за МСК – фибробластоподобни клетки, залепнали на дъното на плаката и образували монослой (**Фиг.28В**). При изследване на глиобластомните култури се установи, че те експресират същите маркери, които характеризират МСК – CD90, CD73, CD105, CD29, CD146, като подобно на МСК са отрицателни за експресията на CD45 и CD34 (**Фиг.30**). По отношение на положителните маркери, експресията им

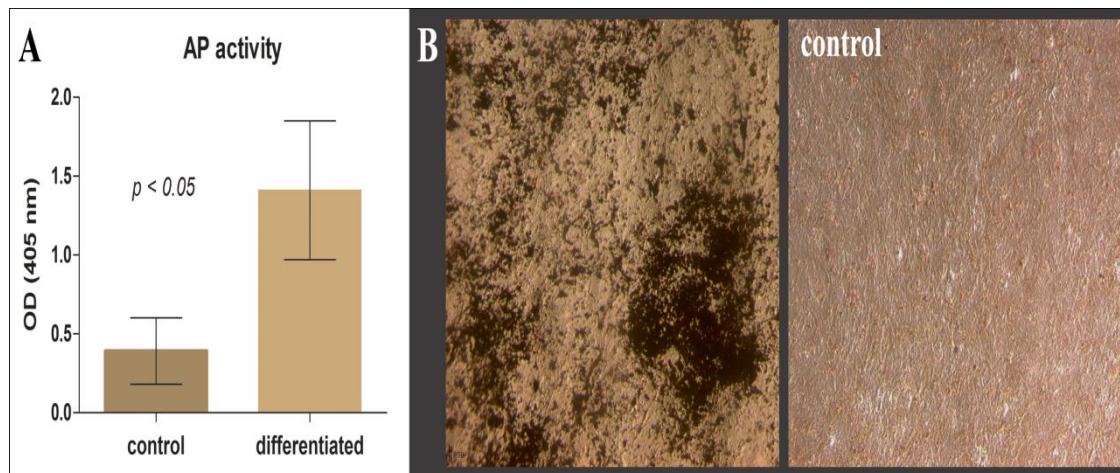
беше установена във всички клетъчни култури, култивирани по описания начин, като по правило процентът клетки едновременно експресиращи CD90, CD73, CD105, CD29, CD44, HLA-I (A,B,C) и CD146 надхвърляше 90 %. Експресия на споменатите маркери не беше установена при глиобластомите, култивирани като невросфери (данните не са показани). Това повдига въпроса, доколко под влияние на серума се формира „мезенхимен фенотип“ на култивираните клетки, който би могъл да е свързана с известната им диференциация, въпрос, който ще бъде разгледан по нататък.



**Фиг.30** Експресия на маркери, типични за МСК от клетъчни култури, изолирани от ГБМ (Кюркчиев и сътр.)

Както беше казано, при съответните условия, около 1-2% от клетките изолирани и култивирани от ГБМ проявяваха потенциал за самообновление, доказан чрез тестове за клоногенност, като по този начин проявяват още едно сходство с МСК (Фиг. 29)

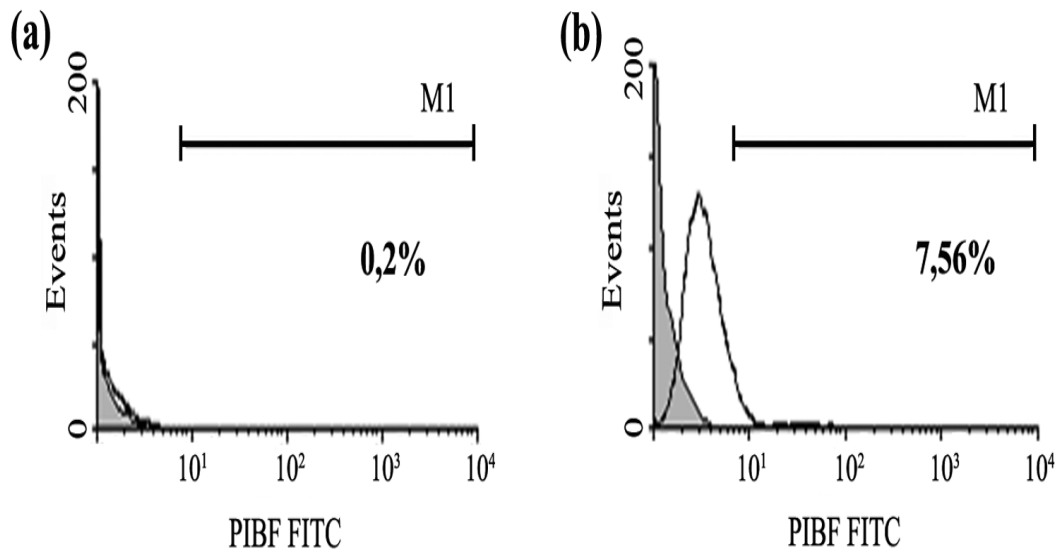
Типично свойство за мезенхимните стволови клетки е тяхната способност да се диференцират в клетки от остеогенния, адипогения и хондрогенния ред. Експериментите ни с клетъчни култури от ГБМ, култивирани с EGF, FGF и ФТС, показаха тяхната способност за остеогенна диференциация, при култивирането им в остеоиндуктивна среда. Тази диференциация беше доказана чрез способността на клетките да експресират интрацелуларно алкална фосфатаза (Фиг.31А), както и да се оцветяват специфично по Von Kossa (Фиг.31В) – свойства характерно за клетки от остеогенния ред.



**Фиг.31** Експресия на алкална фосфатаза от клетки от ГБМ култури под въздействието на остеоиндуктивна среда. Резултатите са средни за 6 независими експеримента (А). Специфично за остеогенни клетки оцветяване по Von Kossa (В). (Белемезова и сътр.) Легенда : AP – алкална фосфатаза (Белемезова и сътр.)

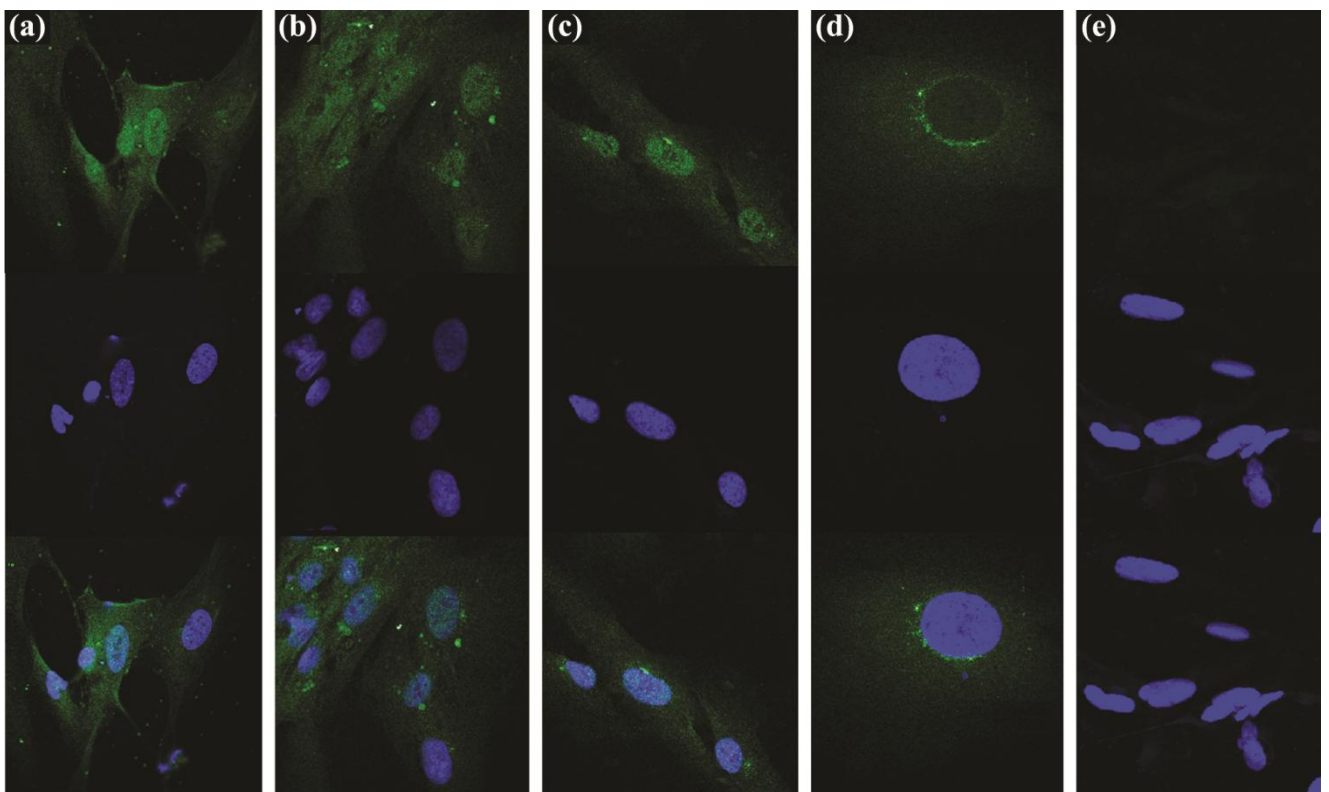
Опитите ни да получим адипогенна диференциация на ГБМ клетъчни култури не бяха успешни, като клетките запазиха своята виталност в адипо-индуктивна среда, но не се установиха характерните при диференциацията мастни капки (резултатите не са показани).

Както беше подробно описано PIBF е фактор, който обуславя част от имуносупресивните качества на МСК. Следвайки логиката, която се налага от приликата между МСК и ГБМ клетъчните култури, ние изследвахме неговата експресия при последните. Използвайки 3 различни метода: флоуцитометрия (**Фиг.32**), конфокална микроскопия (**Фиг.33**) и RT-PCR експресията на PIBF беше установена във всички изследвани култури (6 на брой). При флоуцитометричните изследвания, не се установи експресия на PIBF на повърхността на клетките, като процентът позитивни клетки беше около 0.2%, близък до негативната контрола (**Фиг. 32a**). За сметка на това при интрацелуларното изследване PIBF положителни клетки бяха около 7%. (**Фиг.32b**).



**Фиг. 32.** Експресия на РІВF установена чрез флоуцитометрия. Не се установява наличие на РІВF при изследване на мембраните на клетките (а), докато такава е налична (в случая 7,56% от клетките) при интрацелуларното им изследване (b). Запълнените графики показват отрицателните контроли (*Kyurkchiev et al. Cell Mol Neurobiol. 2014*).

При изследването чрез конфокална микроскопия се наблюдаваше експресия на РІВF при част от клетките при всички изследвани проби, като се установиха, както нуклеарно, така и интрацитоплазмено светения ( **Фиг.33**)



**Фиг. 33** Конфокално изследване на РІВF в клетъчни култури от ГБМ  
а) Хомогенна цитоплазмена депозиция на РІВF (увеличение 400x). б) Грануларна цитоплазмена и точковидна перинуклеарна депозиция (увеличение 400x). с) Грануларна ядрена депозиция (увеличение 400x). d) Перинуклеарна депозиция (увеличение 630x). е) контролни клетки, към които не е добавено моноклонално антияло срещу РІВF (увеличение 400x). Специфичната флоуресценция се вижда в зелено, поради второто анти-мише антияло белязано с Alexa Fluor 488. Ядрата са оцветени със Hoechst 33258 и се вижат в синьо (*Kyurkchiev et al. Cell Mol Neurobiol. 2014*).

Различните видове светения, свидетелстват за различна локализация на РІВF при ГБМ културите, което ни дава основания за някои спекулации. Така например, перинуклеарната локализация би могла да е свързана с взаимодействие на РІВF с клетъчните органели, разположени около ядрото, като апарата на Голджи и микротубуларните структури. Друга възможност е тази локализация да е израз на наличие на гранули, които складират РІВF като резерв за бъдеща секреция. Както е известно РІВF има няколко изоформи, като откриването му в ядрото дава основания да се смята, че там се намира пълната му изоформа, която участва в синтеза и секрецията на ІІ-6, установена при ГБМ културите, както ще стане дума по нататък. Друг ефект на РІВF при ГБМ клетките, би могъл да е свързан с подтискането на имунния отговор, за което отговарят по-малките му изоформи локализиращи в цитоплазмата и израз на алтернативен сплайсинг. Също така, наличието на различна локализация на РІВF при клетки, култивирани от ГБМ би могло да е белег на дисрегулация на споменатия алтернативен сплайсинг при ГБМ. На този етап от нашите проучвания, ние не можем да твърдим със сигурност кои изоформи на РІВF се експресират от ГБМ клетките, култивирани от нас и възможните му/им функции в развитието на тумора.

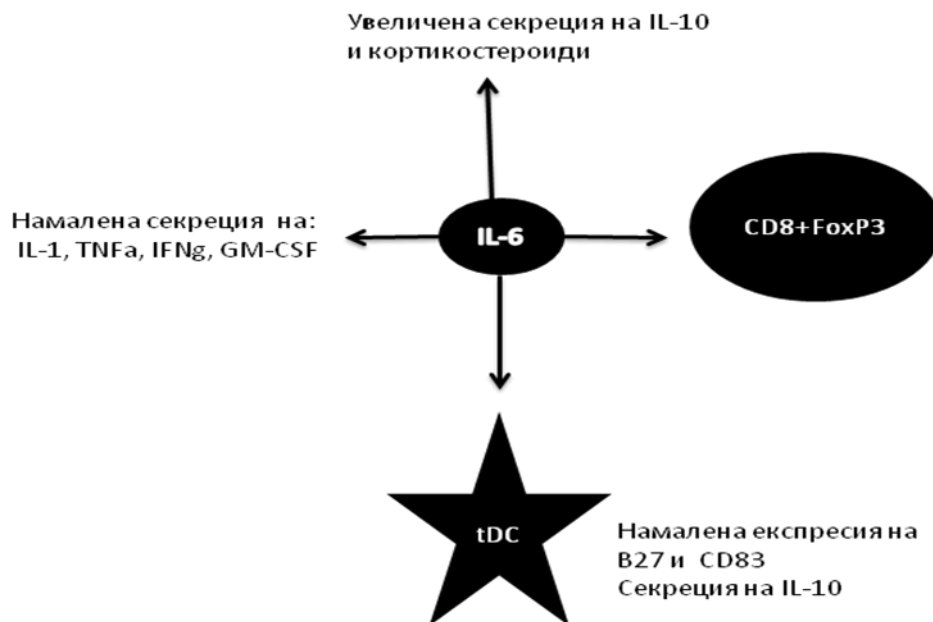
Наличието на РІВF клетки изолирани от тумор е нов научен факт, по отношение на ГБМ, но не е такъв за туморната имунология, като експресията му е описана при множество солидни злокачествени тумори и туморни линии.

Клетките изолирани от ГБМ и култивирани в среда съдържаща EGF, FGF и ФТС бяха изследвани за секрецията на 12 основни

имунорегулаторни цитокини, като беше установена същата секреция, каквато имат и мезенхимните стволови клетки (**Табл. 2**). От гледна точка на имунорегулаторното действие на цитокините, прави впечатление интензивната секреция на IL-6, установена във всички изследвани супернатанти. Както беше обсъдено, концепцията за проинфламаторното действие на IL-6 търпи множество критики, поради установените му свойства в обратната насока. IL-6 е способен да участва във формирането на CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> клетки с подозирана имunosупресивна функция, води до намалена секреция на IL-1, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и GM-CSF, а увеличава секрецията на кортикостероиди и IL-10 (**Фиг. 34**).

**Табл. 2** Сравнение между цитокиновата секреция на клетки изолирани от ГБМ и култивирани с EGF, bFGF, ФТС и мезенхимни стволови клетки

<b>Цитокини</b>	<b>ГБМ култивирани (EGF, FGF, ФТС)</b>	<b>МСК</b>
IL-10	-	-
IL-12	-	-
IL-4	-	-
TNF $\alpha$	-	-
TGF $\beta$	-	-
IL-18	-	-
IL-23	-	-
IL-17A	-	-
sPECAM	-	-
sICAM	-	-
IL-8	+++	+++
IL-6	+++	+++



**Фиг. 34.** Имунорегулаторно действие на IL-6.

Може би най-значимият ефект по отношение на имунната супресия, осъществяван от IL-6 е формирането на незрял, толерогенен фенотип дендритни клетки, характеризиращи се с намален експресия на B7 ко-стимулаторния си комплекс, които са в състояние да секретират IL-10. Наши изследвания върху имунокомпетентни клетки, инфилтриращи глиобластомите, показаха, че дендритните клетки в централните и в периферните отдели на тумора са със силно редуцирана, а в някои случаи и липсваща експресия на ко-стимулаторния комплекс B7, което обуславя толерогенен фенотип ДК (резултатите не са показани). Такъв вид дендритни клетки, инфилтриращи ГБМ се описани и от други

изследователски групи като се счита, че те са формирани от действието на тумора, чрез секрецията на множество фактори, сред които е и IL-6. По отношение на наблюдаваната секреция на IL-8, секретирани от култивираните от нас клетки, би могло да се спекулира, че ролята му е свързана с хемоатрактантно действие на различни клетъчни субпопулции с предимно супресивен фенотип, каквито е описано, че ГБМ привлича, осъществявайки по този начин още един механизъм на подтискане на имунния отговор.

Изследванията ни върху клетки изолирани от ГБМ и култивирани в среда с EGF, FGF и ФТС показаха, че споменатите клетки делят множество характеристики с МСК. Подобно на МСК те имат адхерентен растеж, фенотипни маркери на МСК, потенциал за самообновление и диференциация в остеогенна посока, еднаква цитокинова секреция (поне по отношение на изследваните цитокини), както и експресия на P1BF (Табл.3).

**Табл. 3** Сравнение между МСК и клетки изолирани от ГБМ и култивирани в среда с EGF, FGF и ФТС

	МСК	Клетки от ГБМ култивирани в среда с EGF, FGF, ФТС
Морфология	адхерентни клетки	адхерентни клетки
МСК маркери	да	да
Клоногенност	да	да
Диференциация -остеогенна -адипогенна	да да	да <b>неуспешна</b>
Интрацелуларен P1BF	да	да
От 12 изследвани	да	да

цитокини експресират само IL-6 и IL-8		
---	--	--

Характеристики на МСК при клетки , изолирани от ГБМ са описани и от няколко други автори, като най- близки до нашите резултати описва групата на *Nakahata*, които изследвайки синтезираната човешка ГБМ клетъчна линия U87MG, установяват мезенхимен фенотип, експресия на CD44, CD73, CD90, CD105 и CD29, както и способност за диференциация в адипогенна, остеогенна и хондрогенна посока. За тази клетъчна линия е доказана и способността ѝ да предизвикава ГБМ при имунокомпетентни плъхове.

Опирайки се на класическото определение за мезенхимни стволови клетки като: „клетки, прилепващи към пласмаса, които са фибробласто-подобни с потенциал за самообновление и диференциация в мезенхимни линии”, описаните от нас ГБМ клетки реално представляват МСК, още повече, че експресират същите маркери, P1BF и имат същата цитокинова секреция, поне що се отнася до изследваните цитокини.

***В.) Имуномодулаторно действие на клетки изолирани от ГБМ и култивирани в среди с EGF, FGF и ФТС***

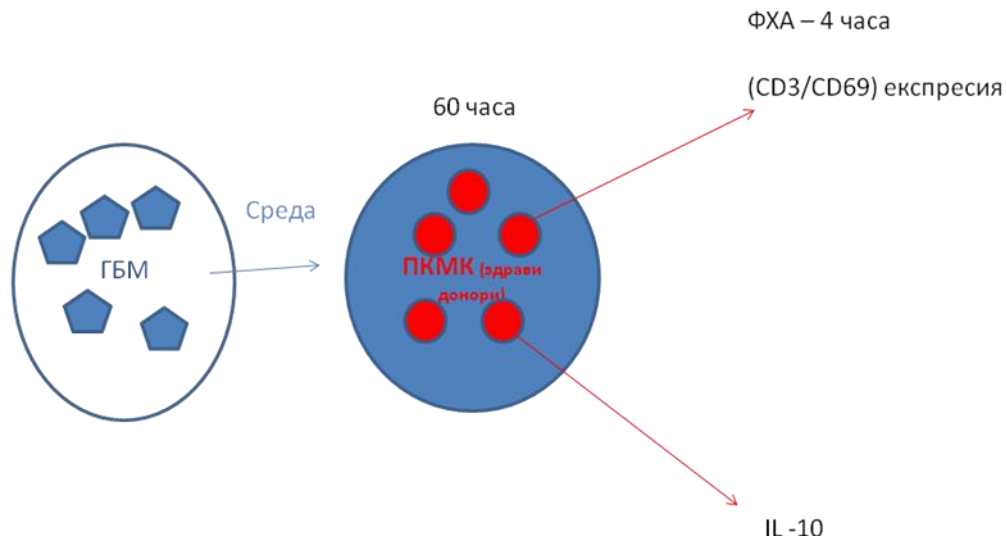
С оглед на по-натъшното сравнение между МСК и клетките, изолирани и култивирани от ГБМ, ние изследвахме възможността за имуносупресивно действие на последните.

За целта бяха проведени следните експерименти: от здрави донори от периферна кръв бяха изолирани ПКМК, които бяха преброени и

поставени в концентрация по  $3 \times 10^6$  на ямка в 2 ямки в 6 ямкова плака. От всеки донор се изследваха две проби:

- а) ПКМК култивирани в контролна среда с EGF, FGF и ФТС.
- б) ПКМК култивирани в същата среда, но в която са се развивали клетки от ГБМ.

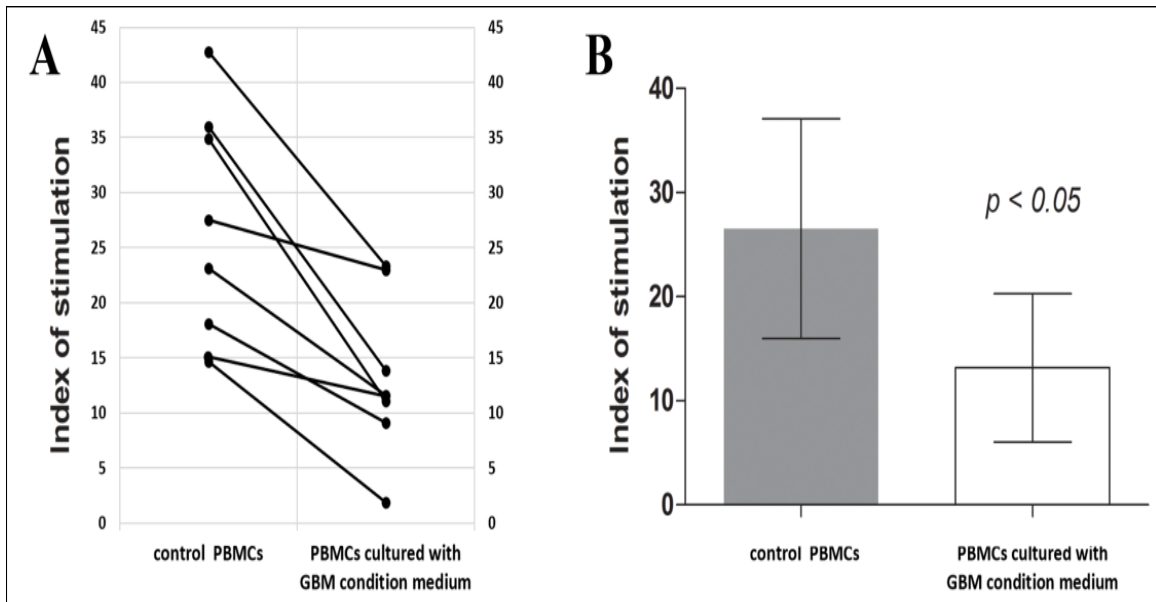
След 60 часа култивиране, ПКМК са промиваха и активираха с ФХА, който действа митогенно на Т лимфоцитите. След 4 часа на култивиране беше изследвана експресията на CD69 – маркер за ранна активация на Т лимфоцитите. Супернатантата съответно беше изследвана за наличие на IL-10 (Фиг.35)



**Фиг. 35** Експериментална постановка за изследване на имуномодулиращо действие на секреторни фактори от ГБМ изолирани и култивирани клетки

Получените резултати показаха, че под влияние на фактори секретирани от ГБМ клетките, Т лимфоцитите значително намаляват

способността си за активация в сравнение с Т лимфоцитите, култивирани в контролната среда. (Фиг. 36)



**Фиг. 36.** Процентът Т клетки, способни да се активират намалява, при култивирането им в среда от ГБМ клетки, в сравнение с процента Т клетки култивирани в контролната среда. Фигурата дава средните аритметични стойности от 8 независими експеримента (В), като резултатите са статистически сигнификатни (MW анализ)

Легенда: PBMС- периферни кръвни мононуклеарни клетки (ПКМК), GBM- ГБМ

И при 8- те проведени по този начин експеримента, винаги се получаваше намален индекс на стимулация при периферните кръвни мононуклеарни клетки, култивирани в среда, където са култивирани клетки от ГБМ (Фиг. 36А)

Тези резултати дават основание да се направи категоричния извод, че фактори секретирани от ГБМ клетките подтискат Т клетъчната способност за активация. Секреторните фактори, които ние установихме в супернатантите на ГБМ клетките (IL-6, и IL-8) нямат

описан подобен ефект. Естествено, в нашите експреименти са изследвани само 12 цитокина, което далеч не покрива целия потенциален спектър на секреторните фактори, способни да осъществят това действие. Чисто спекулативно, ако приемем, че ГБМ клетките секретират същите цитокини като МСК, ефектът би могъл да се осъществи от CCL-2/ MCP-1, IDO, VEGF, PGE2, като за всеки от тях е описана способност за подтискане на Т клетъчния имунен отговор. Разбира се, напълно възможно би било ГБМ клетките да секретират и друг вид фактори неописани при МСК, въпреки че големите сходства между двата вида клетки правят тази възможност по-малко вероятна.

Както беше споменато, един от основните механизми, който МСК използват в процеса на имуномодулация е да индуцират формиране на имунорегулаторни клетки (в постановката с ПКМК, това биха били моноцити и лимфоцити), секретирани IL-10. Това ни даде основание, търсейки прилики между МСК и ГБМ клетките, да тестираме IL-10 секрецията на ПКМК, култивирани в среда от ГБМ клетки. Нашите резултати не показаха статистически разлики в концентриите на IL-10 между супернатантите на ПКМК култивирани в среди от ГБМ клетки и тези култивирани в контролни среди (данните не са показани).

Резултатите ни дават основание да коментираме една от функционалните разлики между МСК и ГБМ клетките, култивирани в нашите условия. Докато в първия случай предизвикването на секрецията на IL-10 от имунорегулаторни клетки е основен механизъм за индуциране на имунен толеранс, при ГБМ клетките той очевидно не се осъществява точно по този начин. Разбира се, горното твърдение важи за CD4+FoxP3+ клетките и за моноцитите (които евентуално се

срещат в пула на ПКМК), докато все още тази възможност не е тествана за дендритни клетки.

В заключение би могло да се обобщи, че клетките изолирани от ГБМ и култивирани в среда с EGF, FGF и ФТС показват изключително близки фенотипни прилики с МСК, което води до сериозното подозрение, че става въпрос за един и същи тип клетки. Въпреки това съществуват и някои разлики, които все още не ни дават достатъчно основание да направим този категоричен извод.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Стволовите клетки, и в частност мезенхимните стволови клетки, все още се намират в зоната между дълбокото непознаване и евтината сензация. Както обществото, така и голяма част от клиничните специалисти имат най-обща, повърхностна и често неверна представа, които варират между „несериозни неща” и „панацея”. Разбира се, нито едното, нито другото е вярно. Вероятната причина за тези крайни позиции, е че откритието на стволовите клетки предизвиква революция в базисни постулати на биологичните науки, основно догмата за линейна предопределеност на клетките.

Както всяко средство в медицината, така и стволовите клетки имат своето място, което все още не е намерено в нашата страна. За това разбира, се има много причини, основна, от които е комерсиалния интерес на фармацевтичните фирми. От друга страна, съществува и тенденцията за готовност на поголовното им прилагане, без да бъдат познавани, отново с оглед на комерсиален интерес. Настоящата

дисертация няма идеята да дава отговори, а само да осветли един аспект на МСК, свързан с действието им върху клетките на имунната система. Дори повърхностният преглед на този въпрос показва, че използването на МСК следва да се прилага при автоимунни заболявания само след съответната сериозна преценка, извършена от имунологи и клинични специалисти. Много наивно би било да се каже, че мезенхимните стволови клетки „подтискат автоимунния отговор”, въпреки, че в известен смисъл, това е точно така. Действието им далеч не може да бъде определено единствено по този начин и една от целите на тази дисертация е именно да очертае цялата сложност на проблема. Първо, МСК не са само супресори, в определени ситуации, те имат активиращо действие върху някои клетки и в този случай ефектът, който би се постигнал от прилагането им, по скоро би бил нежелан. Второ, имунният отговор е мрежа от многопосочни взаимоотношения, все още недокрай изяснена. МСК се намесват в тази мрежа, като при супресивното си действие подтискат пряко ефекторните клетки, но и активират клетките, които сами по себе си са супресорни. Намесата в тази сложна и многостранна междуклетъчна комуникация е деликатен момент, който в никакъв случай не е еднозначен. Трето, множество проучвания показват, че „активираните” МСК имат по-силен инхибиращ ефект върху клетките на имунната система, като основния активиращ фактор е  $IFN\gamma$ . Изследванията по темата НЕ препоръчват предварителни активиране на МСК преди приложението им, поради множество неизвестности при този подход. Четвърто, концепцията, че МСК при прилагането си следват хемокинов градиент и се „заселват” в зоната на увреда, все още не е категорично изяснена. Пето,

мезенхимните стволови клетки са способни на мултилинейна диференциация и трансдиференциация, като особено вторият процес се свързва с потенциална опасност от злокачествена трансформация.

Въпреки описаните ограничения, които следва да се знаят и имат в предвид, мезенхимните стволови клетки се използват с добър ефект при редица аутоимунни заболявания, което за съжаление все още не се случва в нашата страна. Основният „успокояващ“ момент за използването им е тяхната неимуногенност, което дава възможност както за автоложна, така и за алогенната им трансплантация.

Един все още непълно изяснен въпрос, неразгледан в настоящия труд, е този за разликите между мезенхимните стволови клетки, изолирани от различни източници. Като цяло се счита, че по-отношение на модулацията на имунния отговор, независимо от източника си на изолиране, мезенхимните стволови клетки не показват принципни различия. Факт е обаче, че съществуват сериозни данни относно количествени разлики по отношение на силата на имунна супресия, осъществявана от различните видове МСК. В нашите резултати ние установяваме, по-силно супресивно действие на МСК, изолирани от мастна тъкан, в сравнение с тези, изолирани от костен мозък, по отношение на почти всички изследвани аспекти – въздействие върху дендритните клетки, въздействие върху Т и В клетките и въздействие върху експресията на HLA-G. Тези убедителни резултати, показващи количествени разлики, доведоха до покана за написване на глава от книга, като главата акцентираше именно върху този проблем. В сборник озаглавен “Stem cells and cancer stem cells” 2013, нашата част с име „Differences between adipose tissue derived mesenchymal stem cells

and bone marrow derived mesenchymal stem cells as regulator of the immune response”, изтъкваше именно количествените разлики в полза на по-силното имуносупресивно действие на АТ-МСК. Едно е, обаче да опишеш феномен, а друго е да намериш неговото обяснение. На този етап ние нямаме такова и такова не е описано в научната литература, ето защо авторът не акцентира върху тези количествени разлики в настоящия труд, въпреки че ги споменава там, където те са налични.

В заключение, мезенхимните стволови клетки, наред с многопосочните си действия се явяват мултифункционални супресори на различни клетки на имунната система, както и стимулатори на основни имунорегулаторни клетки. Доброто теоретично познаване на техните действия в тази насока са важно и безусловно условие, с цел прилагането им за терапия при автоимунни заболявания.

## ПРИНОСИ

1. Изолиране характеризирани и доказване на МСК от костен мозък, мастна тъкан и стена от пълна връв
2. Изолиране характеризирани и доказване на МСК от човешка децидуа.
3. Установяване на цитокинова секреция на МС.
4. Установяване на инхибиторен ефект на МСК върху цитокиновата секреция на Т лимфоцитите.
5. Установяване на инхибиторен ефект на МСК върху имуноглобулиновата секреция на В лимфоцитите.
6. Установяване на стимулиращ ефект на кондиционирана среда от МСК върху формирането на Tregs.
7. Установяване на имunosупресивен ефект на МСК върху дендритни клетки.
8. Установяване на влиянието на прогестерон върху имunosупресивни молекули, експресирани от МСК
9. Разработване на нов метод за култивиране на изолирани от ГБМ клетки и доказване на маркерите им за cancer stem cells.
10. Установяване експресия на PIBF от клетки изолирани и култивирани от ГБМ.
11. Установяване на сходства между МСК и клетки изолирани и култивирани от ГБМ.
12. Кондиционирана среда от клетки изолирани и култивирани от ГБМ подтискат активацията на Т лимфоцитите

# ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА

## Български списания

1. Kestendjieva S, Mourdjeva M, Kyurkchiev D, Mehandjiev Tz, Nickolova A, Kyurkchiev S. Isolation and characterization of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci.* 2006; 59:775-780
2. Bochev I, Kyurkchiev D, Tivchev P, Tzvetanov L, Kyurkchiev S. Isolation and immunomodulatory activity of bone marrow mesenchymal stem cells. *Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci.* 2006; 59:775-780
3. Кюркчиев Д, Пачаманов А. Стволови клетки- надежда за спасение или смъртен грях. *Правен свят* 2007; 3:116-119
4. Кестенджиева С, Кюркчиев Д, Цветкова Г, Механджиев Ц, Димитров А, Николов А, Кюркчиев С. Изследване на потенциала за диференциация на мезенхимни стволови клетки, изолирани от стената на пъпна вена. *Съвременна Медицина* 2008; 1:20-28
5. Бочев И, Кюркчиев Д, Цветанов Л, Алтънкова И, Тивчев П, Кюркчиев С. Характеристика на човешки мезенхимни стволови клетки, изолирани от мастна тъкан. *Съвременна Медицина* 2008;1:29-36
6. Бочев И, Кюркчиев Д, Иванова Годорова Е, Тивчев П, Алтънкова И, Кюркчиев С. Мезенхимни стволови клетки, изолирани от костен мозък, повлияват експресията на CD69 от моноцити. *Съвременна Медицина* 2009; 1-2:44-49

7. Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev D, Mourdjeva M, Dimitreov R, Stoyanova E, Timeva T, Yunakova M, Shterev A, Kyurkchiev S. Pre-decidual multipotent stromal cells (PreDMSC) constitutively express progesterone induced blocking factor (PIBF) *Comp. Rend. Bulg. Acad. Sci.* 2009; 62(12):1567-1570
8. Mourdjeva M, Ivanova Todorova E, Kyurkchiev D, Bochev I, Stoyanova E, Dimitrov R, Kyurkchiev S. Progesterone enhances the HLA-G expression in mesenchymal stem cells. *Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci.* 2009; 62(12):1567-1570
9. Иванова-Тодорова Е, Алтънкова И, Кюркчиев Д. Мезенхимните стволови клетки секретират фактори, увеличаващи експресията на FoxP3 и секрецията на IL-10 от Т- хелперните лимфоцити. *Годишник на БАКИ 2010*; 71-79
10. Тумангелова- Юзеир К, Найденов Е, Иванова- Тодорова Е, Младенова Ц, Начев С, Мурджева М, Кюркчиев Д. Клетки изолирани и култивирани от глиобластома мултиформе имат прилики с мезенхимни стволови клетки. *Български медицински журнал 2013*; VII (3):56- 60
11. Tumangelova-Yuzeir K, Ivanova-Todorova E, Nachev S, Velikova Ts, Naydenov E, Kyurkchiev D. Missing B7 in a part of antigen-presenting cells infiltrating glioblastoma multiforme *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 2014; 67(7): 1005-1010
12. Тумангелова-Юзеир К, Иванова- Тодорова Е, Великова Ц, Найденов Е, Начев С, Кюркчиев Д. Периферни клръвни мононуклеарни клетки, изолирани от здрави хора, показват намалена способност за активация след култивиране със среда от

клетъчни култури получени от глиобластома мултиформе.

Годишник БАКИ 2014; 2015:58-70

### **Чуждестранни списания**

1. Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P, Kyurkchiev S. Mesenchymal stem cells from human bone-marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. Cell Biology International 2008; 32:384-393
2. Dimitrov R, Timeva T, Kyurkchiev D, Stamenova M, Shterev A, Kostova P, Zlatkov V, Kehayov I, Kyurkchiev S. Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. Reproduction 2008; 135:551-558
3. Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, Mehandjiev T, Dimitrov A, Nikolov A, Kyurkchiev S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. Cell Biology International 2008; 32:724-732
4. Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Kyurkchiev D, Bochev I, Stoyanova E, Dimitrov R, Timeva T, Yunakova M, Bukarev D, Shterev A, Tivchev P, Kyurkchiev S. HLA-G expression is up-regulated by progesterone in mesenchymal stem cells. American journal of reproductive immunology 2009; 62:25-33
5. Ivanova- Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, Tivchev P, Alrtankova I, Kyurkchiev D. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of

- dendritic cells differentiation compared with bone-marrow derived mesenchymal stem cells *Immunology Letters* 2009; 126:37-42
6. Dimitrov R, Kyurkchiev D, Timeva T, Yunakova M, Stamenova D, Shterev A, Kyurkchiev S. First-trimester deciduas contain a population of mesenchymal stem cells. *Fertility and Sterility* 2010; 93:210-219
  7. Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev S. New target cells of the immunomodulatory effects of progesterone *Reproductive BioMedicine Online* 2010; 21:304-311
  8. Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Murdjeva M, Kyurkchiev S. Immunoregulation by progesterone: effects on immune cells and mesenchymal stem cells *Advances in Neuroimmune Biology* 2011; 1:105-123
  9. Ivanova – Todorova E, Bochev I, Dimitrov R, Belemezova K, Murdjeva M, Kyurkchiev S, Kinov P, Altankova I, Kyurkchiev D. Conditioned medium from adipose tissue derived mesenchymal stem cells induces CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells and increases IL-10 secretion. *Journal of Biomedicine and biotechnology*. “Toward personalized cell therapies using stem cells” Volume 2012, Article ID 295167
  10. Kyurkchiev D, Naydenov E, Tumangelova-Yuzeir K, Ivanova-Todorova E, Belemezova K, Bochev I, Minkin K., Murdjeva M, Velikova Ts., Nachev S, Kyurkchiev S. Cells isolated from human glioblastoma multiforme express Progesterone induced blocking factor (PIBF). *Cell Mol Neurobiol* 2014; 34:479-489

11. Kyurkchiev D. Cancer stem cells from glioblastoma multiforme – culturing and phenotype. *OA Stem cells* 2014; 10;2(1):3
12. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belemezova K, Kyurkchiev S. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014; 6(5):552-570

#### **Глави от книги**

1. Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev S. Effect of progesterone on human mesenchymal stem cells. In Gerald Litwack, editor: 2011 *Vitamins and hormones*, Vol 87: Burlington: Academic press, 2011, pp. 217-234
2. Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Kyurkchiev S. Differences between adipose tissue derived mesenchymal stem cells and bone marrow derived mesenchymal stem cells as regulator of the immune response. In M.A. Hayat editor: 2013. *Stem cells and cancer stem cells*, vol.10. Springer, pp 71-84