ДемченкоДаріяЛеонідівнанауковийспівробітниклабораторіїімунологіївідділуклітиннихтатканиннихтехнологійДУІнститутгенетичноїтарегенеративноїНАМНУкраїниНазвадисертаціїМіжклітиннавзаємодіяякмеханізмвпливунаімунобіологічнутарегенеративнуактивністьгемопоетичнихімультипотентнихстромальнихклітинтимусаШифртаназваспеціальностіімунологіяСпецрадаДКиївськогонаціональногоуніверситетуіменіТарасаШевченка

Державнаустанова“Інститутгенетичноїтарегенеративноїмедицини

НАМНУкраїни”

НаціональнаакадеміямедичнихнаукУкраїни

КиївськийнаціональнийуніверситетіменіТарасаШевченка

МіністерствоосвітиінаукиУкраїни

Кваліфікаційнанаукова

працянаправахрукопису

ДЕМЧЕНКОДАРІЯЛЕОНІДІВНА

УДК

ДИСЕРТАЦІЯ

МІЖКЛІТИННАВЗАЄМОДІЯЯКМЕХАНІЗМВПЛИВУНА

ІМУНОБІОЛОГІЧНУТАРЕГЕНЕРАТИВНУАКТИВНІСТЬ

ГЕМОПОЕТИЧНИХІМУЛЬТИПОТЕНТНИХСТРОМАЛЬНИХКЛІТИН

ТИМУСА

–імунологія

Подаєтьсяназдобуттянауковогоступенякандидатабіологічнихнаук

ДисертаціяміститьрезультативласнихдослідженьВикористанняідей

результатівітекстівіншихавторівмаютьпосиланнянавідповіднеджерело

ДемченкоДЛ

НауковийкерівникНікольськийІгорСергійовичдоктормедичнихнаук

професор

Київ–

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІКУМОВНИХСКОРОЧЕНЬ

ВСТУП

РОЗДІЛОГЛЯДЛІТЕРАТУРИ

Гемопоетичністовбуровіклітини

Загальнахарактеристикагемопоетичнихстовбуровихклітин

Мікрооточеннягемопоетичнихстовбуровихклітин

Мультипотентністромальніклітини

Загальнахарактеристикамультипотентнихстромальнихклітин

Механізмирізнонаправленогодиференціюваннямультипотентних

стромальнихклітин

Імуномодуляторнівластивостімультипотентнихстромальнихклітинпри

взаємодіїзгемопоетичнимиклітинами

Характеристикациклофосфану

Механізмдіїциклофосфану

Впливциклофосфанунаімунітет

РОЗДІЛМАТЕРІАЛИІМЕТОДИДОСЛІДЖЕНЬ

Обладнання

Експериментальнітварини

Методи

Культивуваннямезенхімальнихклітинтимуса

Направленеостеогеннедиференціюванняклітиннихкультур

Направленеадипогеннедиференціюванняклітиннихкультур

Реакціяутворенняфібробластолімфоцитарнихрозеток



Дослідженняклітинностілімфоїднихорганів

Отриманняперитонеальнихмакрофагів

Визначеннягематологічнихпоказників

Визначеннякількостіантитілоутворювальнихклітинметодом

локальногогемолізувгелі

Реакціягіперчутливостісповільненоготипу

Визначенняфазклітинногоциклуцитофлуорометричнимметодом

ВизначенняпроліферативноїактивностілімфоцитівМТТметодом

Визначенняфункціональноїактивностіприроднихкілерів

цитофлуориметричнимметодом

ВизначенняфункціональноїактивностіприроднихкілерівМТТметодом

Визначенняспонтанногоапоптозуцитофлуориметричнимметодомз

додаваннямпропідіумайодиду

Визначенняпоглинальноїактивностіперитонеальнихмакрофагів

цитофлуориметричнимметодом

Визначеннябактерицидноїактивностіперитонеальнихмакрофагів

НСТметодом

Схемиекспериментів

ОстеогеннетаадипогеннедиференціюванняМСКтпісляконтактуз

гемопоетичнимиклітинами

Трансплантаціїрізнихклітиннихпрепаратівмишампісляодноразового

введенняциклофосфаміду

Статистичнийаналіз

РОЗДІЛКОНТАКТНАВЗАЄМОДІЯГЕМОПОЕТИЧНИХІ

МУЛЬТИПОТЕНТНИХСТРОМАЛЬНИХКЛІТИН



Дослідженняздатностімультипотентнихстромальнихклітинтимусатаїх

диференційованихформдовзаємодіїзлімфоїднимиклітинамирізного

походження

Впливспівкультивуваннямультипотентнихстромальнихклітинтимусаз

гемопоетичнимиклітинаминадиференціювальннястромальнихклітин

Висновкидорозділу

РОЗДІЛОПТИМІЗАЦІЯМОДЕЛІЦИКЛОФОСФАНОВОГО

ІМУНОДЕФІЦИТУДЛЯВИВЧЕННЯКЛІТИННИХТРАНСПЛАНТАТІВ

Дослідженнядинамікизмінклітиннихпоказниківлімфоїднихорганів

мишейпіслядіїциклофосфану

Дослідженнядинамікизмінкількостілейкоцитівупериферичнійкрові

післядіїциклофосфану

Дослідженнядинамікизмінпоказниківеритропоезумишейпісля

застосуванняциклофосфану

Дослідженнядинамікизмінімунологічнихпоказниківмишейпісля

застосуванняциклофосфану

Висновокдорозділу

РОЗДІЛВПЛИВНАРЕГЕНЕРАЦІЮІМУННОЇСИСТЕМИМИШЕЙЩО

ОТРИМУВАЛИЦИКЛОФОСФАНТРАНСПЛАНТАЦІЇМУЛЬТПОТЕНТНИХ

СТРОМАЛЬНИХКЛІТИНТИМУСАКЛІТИНКІСТКОВОГОМОЗКУЇХ

КОТРАНСПЛАНТАЦІЇТАТРАНСПЛАНТАЦІЇКЛІТИНКІСТКОВОГО

МОЗКУАКТИВОВАНИХКОНТАКТОМЗМУЛЬТИПОТЕНТНИМИ

СТРОМАЛЬНИМИКЛІТИНАМИТИМУСА

Дослідженнявпливутрансплантаціїклітиннихпрепаратівнарегенерацію

клітиннихпоказникиорганівмишейпіслявведенняциклофосфану

Дослідженнявпливутрансплантаціїклітиннихпрепаратівнавідновлення

гематологічнихпоказниківмишейпіслявведенняциклофосфану



Дослідженнявпливутрансплантаціїклітиннихпрепаратівна

функціональнуактивністьімунноїсистемимишейпіслявведення

циклофосфану

Висновкидорозділу

АНАЛІЗТАУЗАГАЛЬНЕННЯРЕЗУЛЬТАТІВОшибкаЗакладкане

определена

ВИСНОВКИ

СПИСОКВИКОРИСТАНОЇЛІТЕРАТУРИ

ДОДАТОК



ПЕРЕЛІКУМОВНИХСКОРОЧЕНЬ

АДГНальдегіддегідрогенази

ККМаактивованіклітиникістковогомозку

АУКантитілоутворюючіклітини

АЦадипоцити

ГСКгемопоетичністовбуровіклітини

ДКдендритніклітини

ЕТСембріональнателячасироватка

ККМклітиникістковогомозку

КМкістковиймозок

КУОколонієутворюючіодиниці

МСКмультипотентністромальніклітини

МСКтмультипотентністромальніклітинитимуса

МФмакрофаги

НКнатуральнікілерніклітини

НСТнітросинійтетразолій

ОБостеобласти

ОЩоптичнащільність

РТПГреакціїтрансплантатпротигосподаря

ТрегрегуляторніТклітини

ФЛРфібробластолімфоцитарнихрозеток

ФПфетальнапечінка

ФСБфосфатносольовийбуфер

ЦФциклофосфан

віданглферментальдегіддегідрогеназа

відангл–кістковийморфогенетичнийбілок

віданглретикулярніклітинищо

продукують



віданглкластердиференціації

англхемокінпідсімейства

такожвідомийяк

англхемокіновийрецептор

типу

віданглфакторростуфібробластів

віданглголовнийкомплексгістосумістності

відангліндолеаміндіоксигеназа

віданглінтерферон

відангліінтерлейкін

віданглііндукованіплюрипотентністовбурові

клітини

ранняформагемопоетичнихстовбуровихклітинщохарактеризується

та

віданглтривалорепопулюючіГСК

віданглпростагландинЕ

віданглсигнальнамолекула

активаціїлімфрцитів

віданглклітини“бічноїпопуляції”

віданглкороткорепопулюючіГСК

віданглтрансформуючийфакторросту

віданглподібнийрецептор

віданглфакторнекрозупухлини

відангл–глікопротеїниглікопротеїнисигнальногошляху



ВСТУП

АктуальністьтемиУсвітлісучаснихзнаньдослідженняімунобіологічної

тарегенеративноїактивностістовбуровихклітинтобтоїхролівстановленніі

функціонуванніімунноїсистемисформувалосяякактуальнийважливийдля

теоріїіпрактикимедицининауковийнапрямокОсновнаувагадослідників

частішезосередженанавивченніГСКїхнащадківрізногоступенязрілостііМСК

певногоорганногопоходженнязоглядунатещогемопоетичніклітинидають

початокусімклітинамімунноїсистемиаМСКстворюютьнеобхіднедля

нормальногофункціонуванняГСКоточеннявтимусііКМатакожймовірноів

периферичнихлімфоїднихорганахПрицьомупереважнабільшістьробіт

присвяченакістковомозковимМСКщоформуютьнайбільшзначущідля

функціонуваннягемопоетичнихклітинструктуриувиглядітакзваних

ніш

ЗначноменшеданихпророльМСКвтимусіХочавжевідомощопаренхіма

тимусапрактичнонеобхіднадляембріональногоморфогенезуоргану

Вважаєтьсящовтимусітакожєнішівкотрихзосередженікістковомозкові

клітинипопередникипредетермінованіпрямуватипоТлімфоїдномушляху

розвиткущопевноюміроюзабезпечуєтьсяМСКВдоляхтимусудобових

ембріонівмишейщомаютьгенетичнийдефектмезенхімидоволіпомітно

гальмуєтьсяформуваннятимоцитів



внаслідокблокування





стадіїрозвиткуОтжеМСКберутьучастьудозріваннітимоцитівТакожМСК

впливаютьнаміграціюТклітин

МСКдіютьнагемопоетичніклітиниінапериферіїпроявляючипершзавсе

імуносупресивнудіюповідношеннюдотрансплантаційногоімунітету

МСКпригнічуютьпроцесипов’язанізпроліферацієюТлімфоцитів

врізнихсистемахМіжтимМСКтстимулюютьантитілогенезі

ВідомощоМСКрізногопоходженнядоситьгетерогенніівідрізняютьсясвоєю

активністю–ймовірнозарахунокзвязківзмікрооточеннямТакимчином

сукупністьвластивостейсамеМСКтцентральногооргануімунітетуможе



відіграватиособливутаважливурольувідновленніімунноїсистемиВважається

щодіяМСКтможебутиопосередкованамембранноюспорідненістюз

гемопоетичнимиклітинамищопідтверджуєтьсяформуваннямФЛРТому

створенняконтактуміжгемопоетичнимистовбуровимиклітинамитаМСК

можемабутьсуттєвозмінитивластивостіклітинщообумовлюєперспективність

дослідженьвцьомунапрямкузметоюрозробкиновихпідходіввклітинній

терапії

Длявивченнявпливунарегенераціюімунноїсистемирізнихтипів

гемопоетичнихклітиніМСКтзручнимєвикористаннямоделіциклофосфанового

імунодефіцитущохарактеризуєтьсянелишеглибокимураженням

кровотворенняаймобілізацієюГСКізКМнапериферіющорозглядаєтьсяяк

необхіднийдлярегенераціїпроцес

ТакимчиномвивченняособливостейконтактноївзаємодіїМСКті

гемопоетичнихклітинєперспективнимтаактуальнимнапрямкомдослідженьз

метоюрозробкиновихпідходівдоїхтрансплантаціїдляприскореннярегенерації

органівімунноїсистемитавідновленняфункцій

Звязокроботизнауковимипрограмамипланамитемами

ДисертаційнароботавиконананабазіДУІнститутгенетичноїтарегенеративної

медициниНАМНУкраїнивлабораторіїімунологіївідділуклітиннихта

тканиннихтехнологійврамкахнауководосліднихтемВивчитимеханізми

імунокорекціїприспільномузастосуваннігемопоетичнихстовбуровихі

мультипотентнихстромальнихклітинрр№дрвякій

авторбуласпіввиконавцемтаВивченняпроцесуіндукованоїмобілізаціїклітин

кістковогомозкуврегенераціїімунноїсистемирр№др

вякійдисертантбралаучастьяквиконавецьокремихрозділівНДР

МетаізавданнядослідженняМетоюроботибулодослідитивплив

міжклітинноївзаємодіїнаімунобіологічнутарегенеративнуактивність

гемопоетичнихтамультипотентнихстромальнихклітинтимуса

Длядосягненняметибулипоставленінаступнізавдання



ВизначитиособливостіконтактноївзаємодіїМСКттаїх

диференційованихформзгемопоетичнимиклітинамирізногопоходження

ВивчитивпливконтактноївзаємодіїМСКтзгемопоетичнимиклітинами

налінійнийдиференціювальнийпотенціалстромальнихклітин

Оптимізуватимодельпостциклофосфановогоімунодефіцитуумишейдля

вивченнярегенеративноїактивностіклітиннихпрепаратів

ДослідитивпливтрансплантаціїклітинкістковогомозкуККМна

постциклофосфановурегенераціюорганівтавідновленняфункційімунної

системи

Провестипорівняльнуоцінкувідновленняімунноїсистемипісля

ураженняЦФтрансплантацієюККМактивованихконтактомзМСКту

порівняннізнеактивованими

Вивчитиінтенсивністьрегенераціїклітинногоскладуорганівімунної

системифункціональноїактивностіадаптивногоіприродногоімунітетупісля

введенняциклофосфануврезультатітрансплантаціїМСКт

Визначитиможливістьрегенераціїімунноїсистемипри

циклофосфановомуімунодефіцитікотрансплантацієюМСКттаККМ

Об’єктдослідженняконтактнавзаємодіягемопоетичнихклітиніМСКтта

їївпливнаімунобіологічнуірегенеративнуактивністьтрансплантованихклітин

ПредметдослідженняМСКтігемопоетичніклітиниімуннасистема

мишей

Методидослідженняімунологічніімунізаціятваринвизначення

кількостіантитілоутворювальнихклітинАУКметодомлокальногогемолізув

геліреакціягіперчутливостісповільненоготипуРГСТвизначення

проліферативноїактивностілімфоцитіввреакціїбласттрансформаціїлімфоцитів

РБТЛтафункціональноїактивностіприроднихкілерівМТТметодом

бактерицидноїактивностіперитонеальнихмакрофагівНСТметодомреакція

утворенняФЛРкультуральнікультивуванняМСКткокультивування

мезенхімальнихтагемопоетичнихклітиннаправленеостеогеннетаадипогенне

диференціюванняклітиннихкультурбіохімічніспектрофотометричні



цитофлуориметричнівизначенняспонтанногоапоптозупоглинальноїактивності

перитонеальнихмакрофагівфункціональноїактивностіприроднихкілеріві

статистичніметоди

НауковановизнаодержанихрезультатівВпершевстановленомембранну

спорідненістьМСКттадиференційованихзнихостеобластівіадипоцитівз

лімфоїднимиклітинамирізногопоходженнязформуваннямасоціаційувигляді

ФЛРУпоєднанніостеобласти–тимоцитиутворюєтьсянайбільшакількість

асоціаційапривзаємодіїадипоцити–клітиникістковогомозкуККМ

найменшащосвідчитьпрорізнуступіньмембранноїспорідненостіупевних

клітиніщоможевідзначатисянарезультатахдиференціюваннястромальних

клітинякемаєвеликезначеннявпроцесахкровотворенняіфункціонуванні

імунноїсистеми

ОтриманоновіданістосовнопотенціювальноговпливуекспозиціїМСКтз

тимоцитаминаідукціюїхдиференціюваннязаостеогеннимнапрямкому

відповіднихсередовищахщоможебутинаслідкомформуванняміжклітинних

синапсівзумовленихмембранноюрецепторноюспорідненістюзреципрокним

сигналінгомЦевизначаєперспективнийнапрямокдослідженняпроцесівякі

проходятьзаучастюконтактноївзаємодіїМСКтігемопоетичнихклітин

РозширеноіснуючіуявленнястосовноімуномодуляторноговпливуМСКт

таГСКПродемонстровановираженийстимулюючийефектМСКтна

імунологічніреакціїтавідновленнялімфоїднихорганівтодіякККМбільшою

міроювпливалинарегенераціюеритропоезу

УпершепоказанощопопереднєспівкультивуванняККМзМСКтвносить

зміниупроявефектуцихклітинпритрансплантаціїімунодефіцитниммишам

спрямовуючиїхактивністьвнапрямокдіїнафункціонуванняімунноїсистеми

ОтриманоновіданістосовновпливуспівтрансплантаціїМСКттаККМі

встановленощовідбуваєтьсянепростасумаціяефективностіцихклітинаїх

взаємодіянадаєновихвластивостейтакомуклітинномутрансплантату

ПрактичнезначенняодержанихрезультатівЗарезультатамироботи

розробленоспосібпотенціюванняіндукціїостеогенногодиференціюванняМСКт



попереднімконтактомзтимоцитамиВінможебутивикористанийвлабораторіях

клітинноготатканинногокультивуваннятавмайбутньомуприлікуванні

пошкодженьізахворюваньопорноруховогоапаратущосупроводжуються

порушеннямостеорепараціїабоформуваннямдефектівкістковоїтканини

Отриманіданіпоефективностіклітиннихпрепаратівекспериментально

обґрунтовуютьможливістьїхзастосуванняприрізнійімунопатологіїтаможуть

будутикориснимиурозробціновихпідходівтрансплантаціїГСКтаМСКтз

метоюклінічноговикористання

ОсобистийвнесокздобувачаСпільнознауковимкерівникомрозроблено

концепціюдисертаційноїроботисформульованометутазавдання

дисертаційногодослідженняпроведеноплануваннясхемекспериментівта

розробкаметодичнихпідходівдовиконаннякомплексулабораторнихдосліджень

обговоренняотриманихрезультатівформулюваннявисновківАвтором

самостійнопроведенийінформаційнийпошуканалізтастатистичнеопрацювання

результатівдослідженняДисертантомвиконаніекспериментальнідослідження

таСамостійнозібранілітературніданінаосновіякихпроаналізовані

власнірезультати

Авторщировдячнийусімспівробітникамлабораторіїімунологіївідділу

клітиннихтатканиннихтехнологійДУІнститутгенетичноїтарегенеративної

медицинизаконсультаціїтадопомогувроботі

АпробаціярезультатівдисертаціїРезультатидисертаційноїроботибули

представленінанауковопракичнійконференціїзміжнародноюучастю

ІноваційнінапрямкивгенетичнійтарегенеративніймедициниКиїв–

листопадаювілейномуміжнародномумедичномуконгресі

Впровадженнясучаснихдосягненьмедичноїнаукиупрактикуохорониздоров’я

УкраїниКиївІІіміжнароднихнауковихконференціях

студентівіаспірантівМолодьіпоступбіологіїЛьвівміжнародномуконгресіСовременныепроблемыиммунологииаллергологиии

иммунофармакологииМоскваміжнародномуфорумі“Клиническая



иммуноогияиаллергология–междисциплинарныепроблемы”Казань

ЕвразійскомуконгресіТранслантациястволовыхклетокМінск

ПублікаціїЗаматеріаламидисертаціїопублікованоробітзнихстатей

уфаховихнауковихвиданняхзних–увиданняхщовходятьдоміжнародної

базиданих–увиданняхщовходятьдоміжнародноїбазиданих

–патентнакориснумодельтезуматеріалахміжнароднихта

вітчизнянихконгресівіконференцій

СтруктураіобсягдисертаціїДисертаційнароботаскладаєтьсязівступу

оглядулітературиописуматеріалівтаметодівдослідженнятрьохрозділів

результатівдослідженнятаїхобговореннявисновківспискувикористаних

літературнихджерелЗагальнийобсягдисертаціїскладаєсторінокРобота

ілюстрованатаблицямитарисункомПереліквикористанихлітературних

джерелвключаєнайменуваньзнихкирилицею–латиницею–

ВИСНОВКИ

Удисертаційнійроботіпредставленовирішенняважливогонаукового

питанняучастіМСКтіККМупостциклофосфановійрегенераціїімунноїсистеми

ВстановленощопопередняконтактнавзаємодіяМСКттаККМнадаєклітинним

трансплантатамновихімунорегенеративнихтаімунокорегуючихвластивостей

Встановленощонайбільшукількістьасоціаційстромальнихі

лімфоїднихклітинувиглядіФЛРформуютьтимоцитинайменшу–ККМ

КількістьФЛРтимоцитівзадипоцитамибулавразивищаніжККМз

адипоцитамиазМСКттимоцитиформуваливразівбільшеФЛРніжККМ

ПоказанощоконтактнаекспозиціяМСКтзтимоцитамиаленеККМ

протягомгодинпосилюєдиференціюваннястромальнихклітинзаостеогенним

напрямкомна

Оптимізованомодельциклофосфаніндукованоїімуносупресіїдля

дослідженнярегенеративноїактивностіклітиннихпрепаратівПоказанощо

одноразовевведенняЦФвдозімгкгмаситілавикликаєглибокеураження

лімфоїднихорганівтакістковогомозкудодняпіслязастосуванняз

поступовимвідновленнямнаденьдослідженнятадостовірноюнормалізацією

практичновсіхдосліджуванихпоказниківнадень

ВстановленощотрансплантаціяККМпризводитьдорегенерації

еритроїдногокровотвореннязнормалізацієюзниженогопоказникагематокриту

концентраціїгемоглобінутазбільшеннямкількостіретикулоцитівукровів

разиНормалізуєклітинністьселезінкидорівняконтрольнихтваринта

бактерициднуактивністьперитонеальнихмакрофагівщобулапідвищенав

разипридіїЦФ

ПоказанощонавідмінувідККМтрансплантаціяККМактивованих

контактноювзаємодієюзМСКттваринамзімуносупресієюспричиняє

нормалізаціюкількостіклітинукістковомумозкуселезінціілімфатичнихвузлах

Викликаєпідвищенняпроліферативноїактивностіклітинлімфатичнихвузлівв

разивфазахпорівнянозконтролемНормалізуєпідвищенуврази



придіїЦФбактерициднуактивністьперитонеальнихмакрофагівЗнижує

природнуцитотоксичністьспленоцитіввразитарівеньРБТЛспленоцитівв

разипорівнянозконтролем

ТрансплантаціяМСКттваринамзімуносупресієюсупроводжується

відновленнямкількостіклітинкістковогомозкутимусаселезінкиілімфатичних

вузлівзбільшеннямпроліферативноїактивностіклітинлімфовузліввразив

фазахпорівнянозконтролемзниженннямрівняретикулоцитівврази

нормалізацієюпідвищеноївразибактерицидноїактивностіперитонеальних

макрофагівпосиленнямнормальноїфагоцитарноїактивностіперитонеальних

макрофагіввразитацитотоксичноїактивностіспленоцитівврази

стимуляцієюформуванняАУКвселезінцідонормальногорівнящобувзнижений

вразипіслядіїЦФ

КотрансплантаціяККМіМСКтасоційованазвідновленнямкількості

клітинкістковогомозкутимусаселезінкиілімфатичнихвузлівзпідвищенням

індексупроліфераціїклітинлімфатичнихвузліввразипорівнянозконтролем

НормалізуєзниженуконцентраціюгемоглобінутагематокритувкровіякіККМ

ПодібнодіїККМазнижуєрівеньРБТЛспленоцитіввразипорівняноз

контролемНавідмінувідтрансплантаціїіншихклітиннихпрепаратів

застосуванняККМсуміснозМСКтвикликаєпосиленняТклітинноїімунної

відповідіприформуванніРГСТвразипорівнянозконтролем