 Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**ім. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ**

**КИРИК ВІТАЛІЙ МИХАЙЛОВИЧ**

УДК 612.119.014.3-612.67.071.1

ОСОБЛИВОСТІ РОЗСЕЛЕННЯ І ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН РІЗНОГО СТУПЕНЯ ЗРІЛОСТІ ТА ЇХ ВПЛИВ НА ФУНКЦІЮ ІМУННОЇ СИСТЕМИ У МИШЕЙ РІЗНОГО ВІКУ

14.03.08 – імунологія та алергологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Київ – 2009

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Державній установі “Інститут геронтології АМН України”.

|  |  |
| --- | --- |
| Науковий керівник: | академік АМН України, член-кореспондент НАН України та Російської АМН,  доктор медичних наук, професор,  Бутенко Геннадій Михайлович  Державна установа “Інститут генетичної та регенеративної медицини АМН України”, м. Київ, директор, завідувач відділу клітинних та тканинних технологій |
| Офіційні опоненти: | доктор медичних наук, професор,  Бережна Нінель Михайлівна  Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України,  м. Київ,  завідуюча лабораторією імунології та алергології  доктор медичних наук, професор,  Чумак Анатолій Андрійович  Державна установа “Науковий центр радіаційної медицини АМН України”, м. Київ,  завідувач лабораторії молекулярної біології відділу клінічної імунології |

Захист відбудеться “\_\_\_\_”\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2009 р. о “\_\_\_\_\_” годині

на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.003.02 при Національному медичному університеті ім. О. О. Богомольця за адресою: 01023, м. Київ,   
вул. Шовковична, 39/1, Центральна міська клінічна лікарня, корпус 2.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця (03057, м. Київ, вул. Зоологічна, 1).

Автореферат розісланий “\_\_\_\_\_\_” листопада 2009 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

доктор медичних наук, професор Свирид С. Г.

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність проблеми.** Імунна система відіграє важливу роль в адаптації організму до впливу умов зовнішнього середовища та регулюванні його гомеостазу (Дранник Г. Н., 2006; Abbas A., 2004). Ця система постійно зазнає негативного впливу зовнішніх факторів та спричинених ними ендогенних порушень, що позначається на зниженні функціональних можливостей системи імунітету та організму в цілому (Ярилин А. А., 2003). Особливо чітко ці порушення простежуються з віком, коли накопичення змін в імунологічній реактивності призводить до стійкого зниження адаптаційних та репаративних можливостей організму (Бутенко Г. М., 1998; Pearce D. et al., 2007). Припускають, що відновлення вихідного стану імунної системи або корекція наявних порушень можуть бути досягнуті за рахунок заміщення втрачених або функціонально ослаблених імунокомпетентних клітин. Як відомо, їх попередниками є гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК), вміст в тканинах та функціональна активність яких з віком можуть зменшуватись   
(Rao M., 2001; Van Zant G., 2003).

Найважливіша властивість ГСК полягає в здатності підтримувати власну популяцію протягом тривалого часу і забезпечувати диференційовані клітини крові та імунної системи, які виконують в організмі специфічні функції. Біологічна значимість стовбурових клітин полягає в тому, що вони відіграють провідну роль в організації багатоклітинних організмів і є центральним елементом структурно-функціональних одиниць тканин і органів (Bryder D. et al., 2006; Chambers S. et al., 2007). Проліферативний потенціал ГСК дуже високий і тривалість життя їх популяції може значно перевищувати тривалість життя організму (Hellman S. et al., 1978). Це дозволяє ставити питання про вивчення геронтологічних аспектів застосування гемопоетичних стовбурових клітин (Liang Y. et al., 2005, Бутенко Г. M., 2008).

Необхідно враховувати, що власні ГСК здатні нормально виконувати свої функції в тісному взаємозв’язку з мікрооточенням (нішею), оскільки в організмі існує не лише кількісний, а й функціональний баланс стовбурових клітин та їхніх ніш (Suda T. et al., 2005). Фактори мікрооточення беруть активну участь у регуляції проліферації та диференціації стовбурових клітин, забезпечують самопідтримання популяції стовбурових клітин і тривале перебування їх в стані спокою. В той же час вільні стовбурові клітини можуть знаходити шлях у відповідну нішу завдяки хемотаксису (Adams G. et al., 2006). Тому при трансплантації додаткової кількості ГСК можуть виникнути питання про ймовірність конкурентної боротьби власних та донорських клітин за ніші, які вони заселяють. Ця проблема стає ще більш актуальною у віковому аспекті, коли з віком не лише зменшується кількість ГСК, а й порушуються регуляторні механізми на рівні мікрооточення в центральних органах імунної системи (Sidorenko A. et al., 1990; Conboy I. et al., 2007).

Тому дослідження, присвячені застосуванню стовбурових клітин з терапевтичною метою, займають провідні позиції в сучасній регенеративній медицині (Gurtner G. et al., 2007; Low W., 2008). За останні роки розроблено численні методики ізолювання, культивування, модифікації різних типів стовбурових клітин, що дозволило розвивати як фундаментальні наукові, так практичні дослідження. Трансплантація клітин перетворилася в новий спосіб вивчення раннього ембріо- і органогенезу, з’ясування долі спеціалізованих клонів клітин в ембріонах та фетальних тканинах, аналізу їх взаємодії в розвитку організму (Rafii S., 2003; Atkinson K. et al., 2004; Yamanaka S., 2007). Пересадження клітин, направлено диференційованих в певний спеціалізований тип, планується використовувати у вигляді замісної клітинної, тканинної або генної терапії у випадку фатальних імунодефіцитів, спадкових дефектів клітинного метаболізму, а також гострої функціональної недостатності органів, або втрати тканин (Yannas I., 2001; Carlson B., 2007; Greenberger J., 2008).

Розробка підходів до терапевтичного застосування стовбурових клітин має ґрунтуватись на розумінні їх клітинної біології, механізмів диференціювання і функціонування в нормі та в умовах патологічних змін в організмі. Тому актуальним завданням для сучасної науки стає глибоке вивчення фундаментальних властивостей стовбурових клітин, як відповідальний крок на шляху до їх клінічного застосування.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідної теми 40.07 лабораторії патофізіології та імунології Державної установи “Інститут геронтології АМН України“ “Регенераційні властивості стовбурових клітин кісткового мозку при пошкодженні тканин у мишей різного віку”, номер державної реєстрації 0107u002582, в якій дисертант приймав участь як виконавець окремих фрагментів.

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було оцінити вплив трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин на функцію імунної системи в молодому та старому організмі та виявити особливості їх розселення і диференціювання.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання:

1. Оцінити ефекти впливу гемопоетичних стовбурових клітин на кількісні та якісні показники функціонування імунної системи в умовах її пошкодження.
2. Вивчити зміни клітинних та функціональних показників органів імунної системи при трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин різного ступеня зрілості в нормальному молодому та старому організмі.
3. Порівняти показники імунологічної реактивності при введенні гемопоетичних стовбурових клітин залежно від ступеня їх зрілості та віку реципієнта.
4. Виявити особливості розселення та диференціювання трансплантованих гемопоетичних стовбурових клітин різного ступеня зрілості в кістковому мозку реципієнтів.

**Об’єкт дослідження.** Особливості функціонального стану імунної системи у мишей ліній СВА/Са та FVB різного віку після летального опромінення та без опромінення в умовах трансплантації ГСК кісткового мозку молодих донорів або ГСК фетальної печінки плодів мишей 13,5 дня гестаційного періоду.

**Предмет дослідження.** Показники імунної відповіді, субпопуляції клітин кісткового мозку, тимуса, селезінки, клітини-попередники кісткового мозку, тимус, селезінка, сироватка крові мишей.

**Методи дослідження.** Визначення субпопуляцій клітин кісткового мозку, тимуса, селезінки і фетальної печінки з використанням моноклональних антитіл до поверхневих мембранних маркерів; дослідження здатності стовбурових клітин кісткового мозку утворювати in vitro колонії клітин-попередників гранулоцитів і макрофагів (КУК-ГМ) та колонії стромальних клітин-попередників фібробластів (КУК-Ф) за допомогою культурального методу; визначення проліферативної активності спленоцитів під впливом Т-клітинних (фітогемаглютинін - ФГА) та В-клітинних (ліпополісахарид E.coli - ЛПС) мітогенів в реакції бласттрансформації лімфоцитів; оцінка показників фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів в реакції поглинання латексу; визначення рівня аглютинінів та гемолізинів в сироватці крові мишей; визначення кількості антитілоутворюючих клітин (АУК) в селезінці; виявлення нащадків трансплантованих клітин в кістковому мозку реципієнтів ГСК по флуоресценції зеленого флуоресцентного білка (GFP) методом люмінесцентної мікроскопії та проточної цитометрії; виявлення трансплантованих ГСК в головному мозку імуногістохімічним методом з використанням моноклональних антитіл проти GFP за допомогою лазерної скануючої мікроскопії; визначення маси тіла, тимуса, селезінки та індексу маси тимуса і селезінки; визначення загальної кількості ядровмісних клітин кісткового мозку, тимуса, селезінки, перитонеального ексудату.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Показано особливості впливу ГСК кісткового мозку та фетальної печінки на імунологічні процеси в різні вікові періоди в умовах радіаційного пошкодження та в інтактному організмі. Визначені особливості відновлювальної дії ГСК, залежно від ступеня їх зрілості та віку реципієнта. Отримано докази розселення та диференціювання трансплантованих ГСК в організмі та показано здатність ГСК мігрувати в осередок ішемічного пошкодження гіпокампа в головному мозку. Отримані результати розкривають додаткові механізми функціонування стовбурових клітин, вивчення яких є основою розуміння ряду як фізіологічних, так і патологічних процесів для імунології, гематології та геронтології.

**Практичне значення отриманих результатів.** Одержані важливі дані, які є складовою для встановлення механізмів розвитку і старіння організму та дозволяють оцінити оптимальні варіанти та умови виділення і трансплантації ГСК з метою більш ефективного відновлювального або корегуючого впливу на імунну систему, що є одним з ключових завдань регенеративної медицини та трансплантології.

**Особистий внесок здобувача.** Автором особисто виконані дослідження та аналіз наукової інформації за темою дисертації, визначена мета та поставлені задачі дослідження, розроблено протоколи реєстрації результатів дослідження, проведений відбір тварин, відпрацьовано модель летального опромінення мишей, виділено ГСК різного ступеня зрілості та трансплантовано їх опроміненим і неопроміненим мишам, проведена статистична обробка, аналіз та інтерпретація результатів, сформульовані висновки, розроблено дизайн рукопису дисертації, а також підготовлені матеріали до друку.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи оприлюднені на: Х Українській науково-практичній конференції з актуальних питань клінічної та лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації, (Київ, 2008); V національному Конгресі патофізіологів України “Сучасні проблеми патофізіології: від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів” (Запоріжжя, 2008); науковій конференції молодих вчених з міжнародною участю “Актуальні проблеми геронтології та геріатрії”, присвяченій пам’яті академіка В. В. Фролькіса (Київ, 2009); XIII Всероссийском научном Форуме с международным участием имени академика В. И. Иоффе “Дни иммунологии в Санкт-Петербурге” (Санкт-Петербург, Российская Федерация, 2009); World Conference on Regenerative Medicine (Leipzig, Germany, 2009).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 13 наукових праць, з них - 4 журнальних статті у фахових наукових виданнях, затверджених ВАК України, 3 патенти на корисну модель, 6 тез доповідей.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертація викладена на 171 сторінці друкарського тексту та включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, 3 розділи власних досліджень, узагальнення одержаних результатів, висновки, список використаної літератури, який містить 275 джерел, з них 36 кирилицею та 239 латиницею. Робота ілюстрована 20 таблицями, 32 рисунками та 13 фотографіями.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**Матеріали та методи дослідження.** Для встановлення ролі ГСК в процесах регенерації імунної системи у мишей різного віку було використано модель радіаційного опромінення в летальній дозі. Проте, дані, отримані на такій моделі, не дозволяють в повній мірі оцінити весь комплекс впливів трансплантованих клітин на організм в умовах його нормального стану. Тому також було проведено трансплантацію ГСК різного ступеня зрілості неопроміненим тваринам, що дозволило оцінити вплив стовбурових клітин на функцію імунної системи в експерименті, наближеному до можливих умов застосування ГСК в регенеративній медицині. Крім того, трансплантація ГСК різного ступеня зрілості старим інтактним тваринам дозволяє оцінити потенційні ювенілізуючі ефекти на імунологічні показники в старому організмі.

Для оцінки здатності гемопоетичних стовбурових клітин до міграції та можливої трансдиференціації було використано модель ішемічного ураження гіпокампа шляхом 20-хвилинної оклюзії обох сонних артерій за методикою   
H. Nishimura (2000), яка виконувалась спільно з співробітниками відділу цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Роботу виконано на 312 мишах лінії СВА/Ca (самці та самки віком 3 та 20 місяців, масою 22-28 г) з розплідника Державної установи “Інститут геронтології АМН України”; а також на 53 мишах лінії FVB “дикого типу” і 29 трансгенних по гену GFP мишах лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J (самці та самки віком 3 місяці, масою 25-30 г), люб’язно наданих Європейською молекулярно-біологічною лабораторією (м. Монтеротондо, Італія).

Всі роботи з експериментальними тваринами проводились з дотриманням Закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження” (від   
21.02.2006 р.), “Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою” (Страсбург, 1986 р.), а також принципів біоетики та норм біологічної безпеки, що засвідчено висновком комісії з біоетики Державної установи “Інститут геронтології АМН України”. Всі методи досліджень виконували згідно стандартних операційних процедур, розроблених та адаптованих в лабораторії патофізіології та імунології Державної установи “Інститут геронтології АМН України” на основі рекомендованих загальноприйнятих протоколів   
(Стефанов О. В., 2001; Klug C., 2002). Нумерацію та ідентифікацію мишей в довготривалих експериментах проводили за розробленою нами методикою.

Донорами клітин для трансплантації виступали миші ліній СВА/Ca та FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J. Донорами ГСК кісткового мозку були тварини віком 3 місяці, донорами ГСК фетальної печінки – плоди мишей 13,5 дня гестаційного періоду. Самцям трансплантували ГСК кісткового мозку від самців, самкам – від самок. Для збільшення числа ембріонів проводили стимуляцію суперовуляції самок мишей за допомогою комбінації препаратів фолікулостимулюючого гормону та хоріонічного гонадотропіну за розробленою нами методикою.

Враховуючи дані літератури про певну стадійність проліферативної активності різних класів прогеніторних та стовбурових клітин при їх перенесенні в сингенний організм (Tokuda N. et al., 2000), та імуносупресивні ефекти мезенхімальних клітин кісткового мозку (Welniak L. et al., 2007), тварин брали для дослідження через 3, 4 та 12 тижнів після трансплантації ГСК. Отримані результати порівнювали з результатами в контрольних групах, до яких входили інтактні тварини відповідного віку.

Реципієнтів ГСК опромінювали за 3 год. до трансплантації у підтвердженій летальній дозі 9,0 Гр для старих та 9,6 Гр – для молодих тварин, з потужністю дози 0,85-1,0 Гр/хв. за допомогою рентгенологічного апарата РУМ-17 за методикою T. Randall (1998).

Фракцію мононуклеарних клітин кісткового мозку та фетальної печінки виділяли шляхом центрифугування протягом 15 хв. при 1500 об./хв. на градієнті щільності *Ficol-Paque* (*Sigma*, питома густина 1,077 г/см3) за методом C. Klug та M. Fero (2002), що забезпечує 10-кратне збільшення кількості ГСК.

Трансплантацію клітин (1∙107 виділених ядровмісних клітин кісткового мозку, або 0,8∙107 виділених ядровмісних клітин фетальної печінки, що відповідає 2∙104 відсортованих Lin-Sca-1+c-kit+ клітин) проводили в хвостову вену мишам в об’ємі 100 мкл середовища *RPMI*-1640 за допомогою розробленого нами пристрою. Опроміненим тваринам групи контролю летальної дози вводили лише 100 мкл поживного середовища *RPMI*-1640. Мишам лінії FVB “дикого” типу через 24 години після моделювання ішемії головного мозку трансплантували 2∙105 клітин фетальної печінки ембріонів 12,5 дня розвитку від трансгенних GFP-мишей.

У піддослідних тварин визначали масу тіла, тимуса та селезінки, кількість ядровмісних клітин кісткового мозку, тимуса, селезінки та перитонеального ексудату, кількість антитілоутворюючих клітин селезінки методом реакції локального гемолізу в гелі за Ерне, титр гемолізинів та гемаглютинінів в крові, поглинальну активність перитонеальних макрофагів.

Здатність клітин кісткового мозку утворювати in vitro колонії гранулоцитарно-макрофагального ряду та колонії стромальних клітин-попередників фібробластів оцінювали в напіврідких агарових та моношарових культурах кісткового мозку. Відповідно на 9-ту та 12-ту добу культивування підраховували кількість колоній, що складались не менше як з 50 клітин, та перераховували на загальну кількість ядровмісних клітин кісткового мозку стегнових кісток (Friedenstein A. et al., 1974).

Проліферативну активність спленоцитів визначали в реакції бласттрансформації лімфоцитів під впливом Т-клітинних (фітогемаглютинін) та В-клітинних (ліпополісахарид) мітогенів.

Субпопуляції Lin-, Lin-Sca-1+c-kit+, Lin-Sca-1+c-kit+flt+CD150-,Lin-Sca-1+c-kit+flt-CD150+ та Lin-Sca-1+c-kit+flt-CD150- ГСК кісткового мозку та фетальної печінки визначали методом проточної цитометрії за допомогою моноклональних антитіл, кон’югованих з флуорохромами (*Becton Dickinson,* США) в робочій концентрації 0,5 мкг на 106 клітин за рекомендаціями фірми-виробника. Субпопуляції CD3+, CD4-8- (подвійні негативні – double negative, DN), CD4+8+ (подвійні позитивні – double positive, DP), CD4+8- і CD4-8+ (одинарні позитивні – single positive, SP) тимоцитів та CD4+8-, CD4-8+, CD4+8+ Т-лімфоцитів в кістковому мозку та селезінці визначали методом проточної цитометрії за допомогою моноклональних антитіл, кон’югованих з флуорохромами (*Becton Dickinson,* США). В якості ізотип-контролю використовували IgG2b-каппа щура. Відсоток загиблих клітин визначали за рівнем проникнення в клітини з пошкодженою мембраною   
7-аміноактиноміцину D. Сортування популяції клітин Lin-Sca-1+c-kit+ проводили в асептичних умовах в поліпропіленові пробірки об’ємом 15 мл, що містили 3 мл поживного середовища *RPMI-1640* та 20% сироватки ембріонів корів при підтриманні температури 150С. Фенотипування та сортування клітин проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (*Becton Dickinson,* США) на базі Державної установи “Інститут генетичної та регенеративної медицини АМН України” за допомогою програми   
FACS Diva 6.1, аналізуючи одночасно 2 параметри світлорозсіювання та 5 параметрів флуоресценції. Для налаштування компенсації перекриття спектрів емісії флуорохромів при багатопараметричному аналізі використовували контрольні зразки клітин без внесення антитіл (unstained control), зразки з кожним з антитіл окремо (single stained control) та зразки з комбінацією кількох антитіл без одного (fluorescence minus one control).

Трансплантовані клітини від трансгенних GFP-мишей виявляли за допомогою імуногістохімічного методу, люмінесцентної та лазерної скануючої мікроскопії.

При плануванні дизайну експериментів використовувалась схема рандомізованих блоків. При статистичній обробці даних розраховували значення середніх арифметичних величин (М), їх середньоквадратичне відхилення (δ) і похибку середньої (m). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерії Стьюдента (t) та Вілкоксона-Манна-Уітні (U); для оцінки розподілу чисельностей тварин, які вижили в експериментальних групах – метод Пірсона в чотирьохпольному квадраті. Відмінності вважались достовірними при р<0,05.

**Результати дослідження і їх обговорення.** Експерименти було розпочато з оцінки відновлювального потенціалу ГСК в умовах пошкодження імунної системи на моделі летального опромінення.

У мишей гемопоетичні стовбурові клітини, які не експресують групу маркерів лінійності (Lin-, CD3, CD11b, CD45R/220, Ly6C/G, TER-119), експресують антиген стовбурових клітин (Sca-1+) та рецептор фактора росту стовбурових клітин (c-kit+), виділено в окрему групу LSK-клітин (Chena J. et al., 2008). Популяція цих клітин відповідальна за заміщення прогеніторних клітин при їх втраті та швидке відтворення диференційованих клітин імунної системи.

При фенотипуванні ГСК кісткового мозку для трансплантації за маркерами LSK-клітин та їх субпопуляцій було встановлено, що LSK-клітини становили біля 0,18% від усіх виділених ядровмісних клітин. Субпопуляції короткоживучих ГСК (short-term, ST-HSC) з лімфогенним потенціалом фенотипу Lin-Sca-1+c-kit+flt+CD150-, та з мієлогенним потенціалом   
Lin-Sca-1+c-kit+flt-CD150- становили 0,05% та 0,1% відповідно. В матеріалі з фетальної печінки LSK-клітини становили 0,22%, а їх субпопуляції   
Lin-Sca-1+c-kit+flt+CD150- і Lin-Sca-1+c-kit+flt-CD150- – 0,08% і 0,11% відповідно.

Через 3 тижні після трансплантації в кістковому мозку опромінених реципієнтів ГСК фетальної печінки кількість ядровмісних клітин була більшою не лише порівняно з реципієнтами ГСК кісткового мозку, а й з тваринами контрольної групи, що особливо виражено у старих тварин (р<0,05).

При цьому кількість лімфоїдних клітин різних субпопуляцій кісткового мозку змінювалась з характерними особливостями, що представлено в табл. 1. Відмічалось достовірне зростання відносного числа лімфоцитів субпопуляцій CD4+8- та CD4-8+ у всіх експериментальних групах опромінених тварин, яке було більше виражене у реципієнтів ГСК кісткового мозку. Проте, співвідношення CD4+/CD8+ клітин більше зросло у молодих та старих реципієнтів ГСК фетальної печінки (р<0,05). Така ж тенденція спостерігалась щодо зростання кількості CD3+-клітин (р<0,05).

*Таблиця 1*

**Субпопуляції клітин кісткового мозку у мишей через 3 тижні після опромінення та трансплантації ГСК (%, M±m).**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показник | Контрольна група | | Реципієнти ГСК кісткового мозку | | Реципієнти ГСК фетальної печінки | |
| молоді  (n = 9) | старі  (n = 9) | молоді  (n = 12) | старі  (n = 10) | молоді  (n= 11) | старі  (n = 9) |
| CD4+8- | 0,9±  0,1 | 0,7±  0,1\* | 4,7±  1,0# | 3,3±  0,7# | 2,3±  0,2# α | 2,9±  0,4# |
| CD4-8+ | 0,7±  0,1 | 0,7±  0,1 | 2,4±  0,4# | 1,9±  0,3# | 1,1±  0,2# α | 1,6±  0,5 |
| CD4+8+ | 0,6±  0,1 | 0,7±  0,2 | 1,6±  0,2# | 3,3±  0,8# | 1,1±  0,1# | 5,6±  1,7\* # |

Примітка. \* — *p*<0,05 порівняно з молодими тваринами, # — *p*<0,05 порівняно з інтактними тваринами відповідного віку, α — *p*<0,05 порівняно з молодими тваринами після трансплантації ГСК кісткового мозку.

Зростання кількості CD3+ клітин та їх субпопуляцій в кістковому мозку, найвірогідніше, обумовлено міграцією клітин з тимуса, оскільки саме він забезпечує дозрівання попередників Т-лімфоцитів в диференційовані лімфоїдні клітини. Підтвердженням цього є факт різкого зростання у всіх групах тварин числа незрілих CD4+8+ попередників лімфоцитів, які відповідають за фенотипом DP тимоцитам.

Більші значення числа CD4+8- та CD4-8+ лімфоцитів після трансплантації ГСК кісткового мозку, порівняно з реципієнтами ГСК фетальної печінки, можуть свідчити про більш високі темпи продукції зрілих клітин та більш активні міграційні процеси в організмі як молодих, так і старих тварин цієї групи. Тобто, ми припускаємо, що клітини кісткового мозку, серед яких більше прекомітованих попередників, ніж в матеріалі з фетальної печінки, в ранні періоди після опромінення та трансплантації швидше починають диференціюватись в спеціалізовані клітини, відповідно, швидше змінюють їх міграційну активність.

У старих опромінених тварин після трансплантації ГСК приріст числа CD4+8+ клітин в кістковому мозку значно переважав показники у молодих тварин відповідних груп (р<0,05). Особливо це було виражено у реципієнтів ГСК фетальної печінки. Якщо взяти до уваги, що у старих тварин після трансплантації ГСК фетальної печінки відмічалась тенденція до переважання відносного числа як CD3+, так і CD4+8- та CD4-8+ лімфоцитів над цими показниками у молодих реципієнтів відповідної групи, можна думати про певні особливості впливу фетальних клітин в старому опроміненому організмі. Хоча це може свідчити і про недостатній контроль над проліферацією фетальних клітин в ранні періоди після трансплантації, порівняно з молодими тваринами.

Як видно з рис. 1, в тимусі після опромінення та трансплантації ГСК виявлено зростання числа ранніх попередників тимоцитів (подвійних негативних DN-тимоцитів) та диференційованих одинарних позитивних SP-CD4 і SP-CD8 клітин при зниженні числа недиференційованих подвійних позитивних DP-тимоцитів (р<0,05). Можна вважати, що в тимусі прискорюється селекція лімфоїдних клітин, тому відносна кількість клітин на початкових та кінцевих етапах диференціації зростає, в той час як на проміжних, коли більша частина з них піддається апоптозу – знижується.

|  |
| --- |
| Молоді інтактні тварини |
| Молоді реципієнти ГСК  кісткового мозку |
| Молоді реципієнти ГСК  фетальної печінки |
| Старі інтактні тварини |
| Старі реципієнти ГСК  кісткового мозку |

Старі реципієнти ГСК фетальної печінки

Рис. 1. Субпопуляції тимоцитів у опромінених мишей лінії CBA/Ca після трансплантації ГСК.

Після трансплантації ГСК виявлено певні особливості в тимусі і у віковому аспекті. Так, зростання числа CD3+ клітин у молодих реципієнтів при зниженні їх відсотка у старих може вказувати на сповільнення темпів диференціації Т-лімфоцитів в старому організмі на пізніх етапах дозрівання клітин. Про це свідчать і більш високі цифри у старих тварин недиференційованих DN-тимоцитів, які переважно представлені CD3- клітинами.

Також показник кількості SP-CD4 клітин у старих мишей, зростає менш інтенсивно, порівняно з молодими тваринами. В той же час відносна кількість SP-CD8 тимоцитів має протилежну тенденцію і зростання її у старих тварин більш виражене. Це наглядно відображається на індексі CD4+/CD8+ клітин, який достовірно зростає у молодих реципієнтів ГСК та знижується у старих. При цьому не виявлено статистично значимих відмінностей у зміні субпопуляції дозріваючих SP тимоцитів, залежно від джерела трансплантованих клітин.

Достовірне виражене зростання кількості малодиференційованих CD4+8+ клітин в селезінці, як і в кістковому мозку, також вказує на активацію виходу незрілих клітин з тимуса на периферію у опромінених реципієнтів ГСК. В даному випадку більш високі значення показника спостерігались у молодих тварин, що отримали ГСК кісткового мозку (7,4±2,2% проти 1,9±0,7% у тварин контрольної групи), порівняно з молодими реципієнтами ГСК фетальної печінки (4,6±0,6%). Тобто селезінка, як периферичний орган імунної системи, дещо по іншому реагує на трансплантацію ГСК різного ступеня зрілості, ніж тимус та кістковий мозок.

Через 3 тижні після опромінення число перитонеальних макрофагів також ще не відновилось до вихідного рівня. При цьому, як видно з табл. 2, виявлено зростання показників фагоцитарної активності, що підтверджує дані літератури (Friesecke I., 1999) і свідчить про активацію компенсаторних механізмів фагоцитарної ланки імунітету в умовах пошкодження, які забезпечуються трансплантованими ГСК. Оскільки фагоцитоз здійснюється вже диференційованими клітинами макрофагального ряду, які є нащадками трансплантованих ГСК, його показники опосередковано характеризують і функціональну ефективність диференціації цих клітин.

*Таблиця 2*

**Показники поглинальної здатності перитонеальних макрофагів у мишей через 3 тижні після опромінення та трансплантації ГСК, (M±m).**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показник | Контрольна група, інтактні тварини | | Реципієнти ГСК кісткового мозку | | Реципієнти ГСК фетальної печінки | |
| молоді  (n = 8) | старі  (n = 8) | молоді  (n = 12) | старі  (n = 10) | молоді  (n = 11) | старі  (n = 9) |
| % клітин, які здійснюють фагоцитоз | 76,9±  2,3 | 62,8±  1,1\* | 86,2±  0,6# | 83,7±  1,3# | 85,6±  3,4# | 86±  1,3# |
| Фагоцитарне число, од | 5,5±  0,5 | 4,1±  0,2\* | 7,1±  0,1# | 5,4±  0,2\*# | 7,6±  0,3# | 5,9±  0,1\*# |

Примітка. \* — *p*<0,05 порівняно з молодими тваринами, # — *p*<0,05 порівняно з інтактними тваринами відповідного віку.

Якщо відсоток клітин, які здійснюють фагоцитоз, у старих реципієнтів ГСК підвищився до рівня молодих, і суттєво не відрізнявся залежно від джерела трансплантованих клітин, то показник фагоцитарного числа зростав більш інтенсивно у молодих тварин. Тобто в молодому організмі індивідуальна активність роботи окремо взятого макрофага (за здатністю поглинати більшу кількість часточок латексу) була вищою, ніж в старому (р<0,05).

Оцінка гуморальної ланки імунітету показала загальну тенденцію до більш швидкого відновлення значень показників у старих тварин, порівняно з молодими. Це стосується і кількості АУК в селезінці, і титрів гемаглютинінів та гемолізинів (р<0,05). А досягнення числа АУК у старих реципієнтів ГСК фетальної печінки (122±10,2 на 106 спленоцитів) рівня молодих реципієнтів (118,0±6,3 на 106 спленоцитів) ще раз вказує на особливості поведінки трансплантованих фетальних клітин в старому організмі в ранні періоди та їх можливі стимулюючі ефекти. Ми припускаємо, що у молодих опромінених мишей для відновлення вихідного, вищого, порівняно з старими тваринами, рівня активності гуморальних механізмів необхідно більше часу.

Таким чином, через 3 тижні після опромінення та трансплантації ГСК різного ступеня зрілості виявлено певні особливості у відновленні клітинних та гуморальних показників імунної системи залежно від джерела клітин та віку реципієнта. Але при оцінці цих змін в динаміці через 12 тижнів показано, що зростання в ранні періоди кількості ядровмісних клітин кісткового мозку у молодих та старих реципієнтів ГСК фетальної печінки, маси тимуса і селезінки у молодих опромінених тварин, зменшення кількості ядровмісних клітин селезінки у всіх експериментальних групах було тимчасовим. Це саме стосується і кількості автоантитілоутворюючих клітин селезінки, титрів гемаглютинінів та гемолізинів крові. Через 12 тижнів вказані показники практично повернулись до вихідного рівня у інтактних тварин відповідних вікових груп. Щодо відновлення знижених показників, це може вказувати на адекватність роботи компенсаторних механізмів як самого організму, так і трансплантованих клітин, а нормалізація підвищених показників – підтверджує складність регуляції гомеостазу на рівні імунної системи.

Також було виявлено і деякі відстрочені стимулюючі ефекти трансплантації ГСК. Так, знижена на 3-му тижні маса тимуса та тимічний індекс у старих опромінених реципієнтів через 12 тижнів зросли до вихідного рівня молодих тварин, при цьому відмічалось і зростання числа ядровмісних клітин тимуса. Також зросла кількість ядровмісних клітин селезінки у молодих реципієнтів ГСК кісткового мозку та кількість АУК селезінки у старих тварин обох експериментальних груп.

Але в комплексі вказані зміни не дозволяють говорити про стійкі стимулюючі ефекти трансплантації ГСК різного ступеня зрілості, оскільки опромінення в летальній дозі є надзвичайно агресивним травмуючим фактором на організм, спричинюючи пошкодження усіх тканин та органів. Трансплантація ГСК має на меті в першу чергу замістити втрачені імунокомпетентні клітини та компенсувати їх функції. Оскільки пошкодження зазнають і клітини мікрооточення, в якому будуть заселятись донорські ГСК, звільнені ніші не є повноцінними для нормального приживлення та функціонування трансплантату. Якщо в ранні періоди, коли в роботу тільки включаються ST-HSC, відмічається активація міграційних та проліферативних процесів, то з часом потенціал клітин виснажується, а адекватно підтримувати його на достатньому рівні – як відомо, за рахунок секреції цитокінів та ростових факторів - пошкоджене мікрооточення не може.

Через 12 тижнів після експерименту у молодих та старих тварин зменшилась кількість ядровмісних клітин кісткового мозку, який є основним місцем приживлення ГСК, причому як у порівнянні з інтактними, так і з тваринами через 3 тижні після опромінення. Це підтверджує дані літератури, які пояснюють можливість вказаного ефекту виснаженням ростків донорських стовбурових клітин в організмі реципієнта у віддалені строки після трансплантації, як наслідок дисбалансу між стимулами проліферації та диференціації (Roccanova L. et al., 2003).

Таким чином, на моделі летального опромінення тварин різного віку з наступною трансплантацією ГСК кісткового мозку або фетальної печінки вдалося оцінити особливості відновлювального потенціалу стовбурових клітин на окремі показники імунної системи. Було показано, що в ранні періоди після опромінення та трансплантації ГСК в центральних органах імунної системи відбуваються процеси перерозподілу субпопуляцій лімфоїдних клітин, обумовлені, ймовірно, заселенням вільних ніш, а у віддалені періоди після трансплантації більшість показників повертаються до вихідних значень.

Також показано ряд особливостей гуморальної ланки імунітету після опромінення залежно від віку реципієнтів. Проте, при порівнянні відновлювального потенціалу ГСК різного ступня зрілості не вдалося виявити статистично значиму різницю між реципієнтами ГСК кісткового мозку та ГСК фетальної печінки по показнику виживання реципієнтів.

В другій частині роботи трансплантація ГСК різного ступеня зрілості молодим та старим інтактним тваринам дозволила оцінити зміни імунологічних показників, спричинених взаємодією між донорськими та власними клітинами різного походження та віку.

Кількість CD3+ клітин в кістковому мозку достовірно зросла у молодих та старих тварин після трансплантації як ГСК кісткового мозку, так і ГСК фетальної печінки, причому у молодих це зростання було більш виражене. Аналогічні зміни стосувались і відносного вмісту CD4+8- клітин, які володіють вираженими імунорегулюючими властивостями. Щодо популяції CD4-8+ лімфоцитів, виявлено факт достовірного зростання їх кількості у молодих реципієнтів ГСК фетальної печінки, на відміну від молодих реципієнтів ГСК кісткового мозку.

Як і у опромінених реципієнтів ГСК, було виявлено виражене достовірне зростання числа малодиференційованих попередників Т-лімфоцитів з фенотипом CD4+8+. Але в даному випадку приріст показника виявився більш вираженим у молодих тварин, ніж у старих. На відміну від опромінених мишей, відмічалась тенденція до переважання приросту числа CD3+, CD4+8- та CD4+8+ клітин у реципієнтів ГСК фетальної печінки, порівняно з реципієнтами ГСК кісткового мозку.

Це може свідчити про особливості взаємодії трансплантованих ГСК різного ступеня зрілості з власними клітинами хазяїна, залежно від їх функціонального стану. Якщо в опроміненому організмі донорські клітини кісткового мозку швидше заселяють звільнені ніші і починають активно проліферувати, завдяки більшій кількості прекомітованих попередників, то клітини фетальної печінки на ранніх етапах впливають менш інтенсивно. В неопроміненому ж організмі створюються умови конкуренції за ніші між власними та донорськими клітинами, і ГСК кісткового мозку виявляють меншу стимулюючу дію, ніж фетальні. Вважається, що фетальний матеріал продукує більшу кількість регуляторних цитокінів (Christensen J. et al, 2004), які в умовах опроміненого організму не мають достатньої кількості клітин-мішеней для стимуляції, а в інтактному – можуть впливати на власні стовбурові клітини. Тому в молодому організмі відповідь на ці сигнали буде більш вираженою, ніж в старому.

Подібну тенденцію ми спостерігали не лише серед лімфоїдних клітин кісткового мозку, а й щодо мієлоїдного та мезенхімального ростка. При культивуванні *in vitro* клітин кісткового мозку реципієнтів ГСК відмічено достовірне зростання відносної кількості колоній КУК-ГМ у всіх експериментальних групах (р<0,05) з тенденцією до більших значень у тварин, яким трансплантували фетальний матеріал. Зростання числа КУК-Ф було статистично значимим лише у старих реципієнтів ГСК фетальної печінки, а у молодих мишей, що отримали ГСК кісткового мозку цей показник знизився (табл. 3). Крім того, співвідношення КУК-Ф/КУК-ГМ знизилось у всіх експериментальних групах, в порівнянні з тваринами контрольної групи відповідного віку, що вказує на вікові особливості перерозподілу диференційного потенціалу стовбурових клітин. Достовірної різниці між реципієнтами ГСК кісткового мозку або ГСК фетальної печінки щодо цього показника виявлено не було.

*Таблиця 3*

**Відносна кількість КУК-ГМ та КУК-Ф кісткового мозку у неопромінених мишей-реципієнтів ГСК (M±m)**.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показник | Контрольна група | | Реципієнти ГСК кісткового мозку | | Реципієнти ГСК фетальної печінки | |
| молоді  (n = 8) | старі  (n = 9) | молоді  (n = 10) | старі  (n = 10) | молоді  (n = 9) | старі  (n = 9) |
| Кількість КУК-ГМ, на 106 клітин | 48,6±  4,8 | 21,8±  4,0\* | 66,1±  8,8# | 33,2±  4,5\*# | 68,3±  9,0# | 32,6±  3,0\*# |
| Кількість КУК-Ф, на 106 клітин | 34,1±  2,9 | 14,0±  2,5\* | 28,2±  2,2# | 15,0±  2,0\* | 35,9±  2,2α | 17,0±  1,3\* |
| Співвідношення КУК-Ф до КУК-ГМ | 0,66±  0,04 | 0,57±  0,02\* | 0,41±  0,04# | 0,45±  0,02# | 0,55±  0,03α | 0,45±  0,04\*# |

Примітка. \* — *p*<0,05 порівняно з молодими тваринами, # — *p*<0,05 порівняно з інтактними тваринами відповідного віку, α — *p*<0,05 порівняно з молодими тваринами після трансплантації ГСК кісткового мозку.

Провівши аналіз субпопуляцій тимоцитів неопромінених реципієнтів ГСК, можна припустити, що виявлені зміни маси тимуса та кількості ядровмісних клітин в ньому пов’язані з посиленням процесів міграції та диференціації. Як і у опромінених тварин спостерігався перерозподіл субпопуляцій в бік зростання ранніх недиференційованих TN і DN тимоцитів разом з диференційованими SP клітинами, при відносному зниженні числа проміжних малодиференційованих DP тимоцитів (табл. 4). Також відмічено зростання числа CD3+ тимоцитів, що вказує на посилення продукції дозрілих лімфоцитів.

*Таблиця 4*

**Субпопуляції клітин тимуса у неопромінених мишей після трансплантації ГСК кісткового мозку або фетальної печінки (%, M±m).**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показник | Контрольна група | | Реципієнти ГСК кісткового мозку | | Реципієнти ГСК фетальної печінки | |
| молоді  (n = 8) | старі  (n = 8) | молоді  (n =12) | старі  (n = 9) | молоді  (n=10) | старі  (n = 9) |
| DN тимоцити CD4-8- | 6,6±  0,5 | 7,0±  0,9 | 18,6±  3,1# | 12,9±  1,2# | 15,6±  1,2# | 12,1±  0,4# |
| DP тимоцити CD4+8+ | 82,0±  1,6 | 78,1±  1,6 | 65,7±  2,8# | 67,8±  2,5# | 64,7±  0,9# | 72,3±  1,6#,\*, β |
| SP тимоцити CD4+8- | 6,3±  0,6 | 8,8±  0,7\* | 11,7±  1,2# | 11,7±  1,4# | 13,4±  1,2# | 10,4±  0,6 |
| SP тимоцити CD4-8+ | 2,6±  0,3 | 2,1±  0,2 | 2,8±  0,3 | 6,3±  0,8# | 4,7±  0,8#,α | 4,3±  0,5# |

Примітка. \* — *p*<0,05 порівняно з молодими тваринами, # — *p*<0,05 порівняно з інтактними тваринами відповідного віку, α — *p*<0,05 порівняно з молодими тваринами після трансплантації ГСК кісткового мозку, β — *p*<0,05 порівняно з старими тваринами після трансплантації ГСК кісткового мозку.

При загальному зростанні числа SP CD4+ та SP CD8+ тимоцитів у всіх експериментальних групах, порівняно з контрольними, їх співвідношення суттєво відрізнялись у мишей різного віку. Так, відносно високі значення   
SP CD4+ клітин у старих інтактних тварин нівелювались після трансплантації ГСК за рахунок більш інтенсивного зростання числа SP CD8+ тимоцитів. Відповідно, достовірно знизився індекс CD4+/CD8+. У молодих тварин тенденція була протилежною: приріст SP CD4+ переважав над приростом SP CD8+ і вказаний індекс зростав. Це свідчить, що в молодому організмі трансплантація ГСК викликає більш активну стимуляцію продукції в тимусі клітин з регуляторними властивостями (CD4+), кількість яких зростає і в кістковому мозку, а у старих тварин ці зміни не виражені.

При порівнянні показників, залежно від джерела трансплантату, достовірно більше зростання відмічено лише щодо SP CD8+ у молодих реципієнтів ГСК фетальної печінки, порівняно з реципієнтами ГСК кісткового мозку, хоча приріст SP CD4+ у них також був більшим. У старих тварин навпаки – ці значення були дещо вищими у реципієнтів ГСК кісткового мозку. Тобто, отримані дані не дозволяють з впевненістю говорити про суттєві відмінності впливу ГСК різного ступеня зрілості на клітинні показники тимуса, хоча у віковому аспекті деякі особливості були показані.

В селезінці виявлено зниження відносного вмісту CD3+4+8- та CD3+4-8+ спленоцитіву всіх експериментальних групах, але їх співвідношення, як і в кістковому мозку, достовірно зросло (р<0,05). В той же час, виражене зростання числа малодиференційованих CD4+8+ попередників Т-лімфоцитів у молодих реципієнтів ГСК фетальної печінки, яке ми спостерігали і в кістковому мозку, ще раз підтверджує припущення, що в молодому неопроміненому організмі трансплантація фетального матеріалу викликає більш виражену проліферацію та міграцію клітин, ніж в старому.

При оцінці проліферативної активності спленоцитів у відповідь на мітогени також показано достовірне зростання їх потенціалу до бласттрансформації у молодих реципієнтів ГСК фетальної печінки як під дією Т-клітинного мітогену (ФГА), так і В-клітинного (ЛПС). У молодих реципієнтів ГСК кісткового мозку ці показники навпаки знизились. У старих тварин реакція клітин на стимуляцію проявилась по іншому. Взагалі, у старих інтактних тварин спленоцити менш інтенсивно реагують на мітогени, але під дією ФГА індекс бласттрансформації зріс у реципієнтів ГСК фетальної печінки до рівня молодих мишей контрольної групи, а під дією ЛПС – знизився. Тобто, в старому організмі трансплантація ГСК різного ступеня зрілості по різному впливає на проліферативний потенціал Т- та В-клітинної ланки спленоцитів.

На увагу заслуговує факт зниження числа перитонеальних макрофагів у молодих реципієнтів ГСК, при достовірному його зростанні у старих (р<0,05). При цьому показники їх активності були достовірно вищими у всіх експериментальних групах, а у старих тварин перевищували навіть рівень молодих контрольної групи. Це свідчить про посилення неспецифічної реактивності організму, більш виражене у старих реципієнтів. Статистично значимих відмінностей між групами тварин, що отримали клітини різного походження, виявлено не було.

Провівши трансплантацію ГСК, мічених GFP, ми показали, що в неопроміненому організмі відбувається розселення трансплантованих клітин в кістковому мозку, але кількість їх нащадків в ранні терміни після введення знижується, порівняно з числом введених клітин. Це підтверджує дані літератури про конкуренцію між власними та донорськими клітинами за ніші (Suda T., 2005), коли трансплантовані клітини не завжди можуть приживатись в організмі реципієнта. Відносна кількість GFP-позитивних клітин з проліферативним потенціалом в бік продукції клітин гранулоцитарно-макрофагального ряду в кістковому мозку молодих реципієнтів виявилась більшою, ніж відносна кількість їх нащадків, порівняно з загальною популяцією клітин кісткового мозку. Це може свідчити про те, що більшість власних стовбурових клітин в кістковому мозку реципієнта перебуває в неактивному стані, тому відносна кількість клітин, які володіють високим потенціалом проліферації та диференціації, в донорському матеріалі є вищою і при розселенні саме такі клітини з більшою ймовірністю можуть зайняти вільні ніші. Але при цьому продукція диференційованих нащадків донорських клітин підпорядковується загальному функціональному стану організму реципієнта, який визначається зокрема і віком, тому її інтенсивність є менш вираженою, ніж дозволяє потенціал клітин. Потрібно враховувати, що в саме в ранні періоди (3-4 тиждень) починають диференціюватись ST-HSC, тому і окремі ефекти трансплантації клітин на функціональні показники імунної системи були достатньо вираженими в цей період.

Трансплантація сортованих LSK-клітин показала можливість цілеспрямованого перенесення заданої популяції ГСК із необхідними фенотипічними та функціональними характеристиками в організм, з метою впливу на окремі ланки гемопоезу. Було підтверджено, що трансплантовані сортовані LSK клітини дають початок колоніям гранулоцитарно-макрофагального ряду, але не колоніям фібробластоподібних клітин.

Субокципітальна інтравентрикулярна трансплантація мічених ГСК фетальної печінки тваринам з моделлю ішемічного інсульту не показала здатності цих клітин трансдиференціюватися в нейрональні та гліальні клітини в ранні терміни після введення, проте підтвердила наші припущення про можливість їх міграції в зону пошкодження, що також описано в літературі (Vermeulen M. et al., 1998; D’Ambrosio D. et al., 2006).

Дослідження здатності гемопоетичних та мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку впливати на відновлювальні процеси при ішемічному ураженні головного мозку та міокарду продовжуються.

**ВИСНОВКИ**

В дисертаційній роботі здійснено теоретичне узагальнення та наведено вирішення наукового завдання щодо виявлення впливу трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин різного ступеня зрілості на функцію імунної системи в нормі та при її пошкодженні в молодому і старому віці. Показано, що зміни більшості імунологічних показників у мишей-реципієнтів гемопоетичних стовбурових клітин в основному визначаються віком реципієнта та пов’язаними з ним особливостями диференціювання трансплантованих клітин, і в меншій мірі - ступенем їх зрілості та походженням.

1. Трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку та фетальної печінки дозволяє компенсувати пошкодження імунної системи та впливає на перебудову імунної відповіді у молодих та старих мишей.
2. У опромінених та неопромінених мишей в ранні терміни після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку або фетальної печінки субпопуляції клітин в тимусі перерозподіляються в бік зростання ранніх недиференційованих CD4-8- тимоцитів та диференційованих CD4+8- і CD4-8+ клітин, при відносному зниженні кількості проміжних малодиференційованих CD4+8+ тимоцитів, що вказує на прискорення дозрівання цих клітин в тимусі.
3. Виявлено збільшення кількості CD4+8+ клітин в кістковому мозку та селезінці після опромінення та трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки у старих мишей, а у молодих – після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку. Трансплантація фетальних клітин в старому опроміненому організмі сприяє міграції недиференційованих попередників лімфоцитів з тимуса в кістковий мозок та селезінку в ранні періоди після опромінення більш виражено, ніж трансплантація кістково-мозкових клітин.
4. В ранні терміни після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку або фетальної печінки у опромінених молодих та старих мишей зростають показники фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів, при зменшенні їх загального числа, що свідчить про стимуляцію захисних механізмів на фоні дисфункції адаптивної імунної системи.
5. Через 3 тижні після опромінення виявлено зростання числа ядровмісних клітин кісткового мозку у молодих та старих мишей-реципієнтів гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки; зростання маси тимуса і селезінки у молодих тварин обох груп, зменшення кількості ядровмісних клітин селезінки; зростання титрів гемаглютинінів та гемолізинів у всіх експериментальних групах. Ці зміни виявились тимчасовими і на 12-му тижні вказані показники повернулись до вихідних значень у інтактних тварин.
6. При трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку та фетальної печінки у неопромінених молодих та старих мишей співвідношення в кістковому мозку стромальних клітин-попередників до гемопоетичних попередників зменшується, що вказує на перерозподіл основних класів стовбурових клітин на рівні мікрооточення.
7. У молодих неопромінених реципієнтів гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки зростає здатність спленоцитів до бласттрансформації як під дією Т-клітинних, так і В-клітинних мітогенів. В молодому неопроміненому організмі трансплантація фетального матеріалу викликає більш виражену проліферацію та міграцію клітин, ніж в старому.
8. В ранні терміни після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин в кістковому мозку молодих неопромінених мишей відносна кількість нащадків трансплантованих клітин з потенціалом утворення колоній гранулоцитарно-макрофагального ряду є більшою, ніж відносна кількість усіх нащадків трансплантованих клітин. Трансплантовані стовбурові клітини та клітини-прогенітори кісткового мозку і фетальної печінки мають вищу проліферативну активність, ніж прогенітори кісткового мозку реципієнта.
9. Гемопоетичні стовбурові клітини фетальної печінки здатні мігрувати в осередок ішемічного пошкодження головного мозку миші при їх субокципітальному інтравентрикулярному введенні та зберігати свою життєздатність в перші 14 діб після трансплантації.

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Кирик В. М. Вплив трансплантації клітин кісткового мозку молодих донорів на функцію імунної системи у мишей різного віку в різні терміни після опромінення / В. М. Кирик // “Пробл. старения и долголетия”. — 2008. — Т. 17,   
   № 3. — С. 271—278.
2. Кирик В. М. Регенераторний потенціал гемопоетичних стовбурових клітин різного ступеня зрілості в ранні терміни після опромінення у молодих та старих мишей лінії СВА/Са / В. М. Кирик // “Пробл. старения и долголетия”. — 2009. — Т. 18, № 1. — С. 87—96.
3. Кирик В.М. Вікові особливості впливу трансплантації гемопоетичних клітин кісткового мозку та фетальної печінки на клітинні показники органів імунної системи мишей / В. М. Кирик, А. Є. Родніченко // Журнал АМН України. — 2009. — Т. 15, № 2. — С. 355—365. (Дисертант самостійно зробив огляд літератури, експериментальні дослідження з трансплантації клітин і проточної цитометрії та обробку отриманих результатів).
4. В. М. Кирик Проліферативний потенціал клітин кісткового мозку у мишей різного віку при трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин /   
   В. М. Кирик, А. Є. Родніченко, Г. М. Бутенко // Буковинський медичний   
   вісник. — 2009. — Т. 13, № 4. — с. 129—132. (Дисертант самостійно зробив огляд літератури, виділення і трансплантацію клітин, підрахунок колоній клітин кісткового мозку та обробку отриманих результатів)
5. Пат. 35624 Україна, МПК A61D 99/00. Спосіб нумерування лабораторних тварин для ідентифікації їх в експерименті / Кирик В. М.,   
   Немтінов П. І.; заявник та власник патенту Державна установа “Інститут генетичної та регенеративної медицини АМН України”. — № u 2008 05977 ; заявл. 07.05.2008; опубл. 25.09.2008, Бюл. № 18. (Дисертантом була розроблена методика нумерування мишей, збір та аналіз літературних джерел, оформлені матеріали патенту).
6. Пат. 35625 Україна, МПК A61D 3/00. Пристрій для фіксації лабораторних тварин / Кирик В. М.; заявник та власник патенту Державна установа “Інститут генетичної та регенеративної медицини АМН України”. —   
   № u 2008 05978; заявл. 07.05.2008 ; опубл. 25.09.2008, Бюл. № 18. (Дисертантом був розроблений прототип пристрою, збір та аналіз літературних джерел, оформлені матеріали патенту).
7. Пат. 35626 Україна, МПК A61К 38/24. Спосіб стимуляції суперовуляції у лабораторних мишей лінії СВА/Са для виділення ембріонів на ранніх стадіях ембріогенезу / Кирик В. М., Немтінов П. І., Лабунець І. Ф., Бутенко Г. М.; заявник та власник патенту Державна установа “Інститут генетичної та регенеративної медицини АМН України”. — № u 2008 05979; заявл. 07.05.2008; опубл. 25.09.2008, Бюл. № 18. (Дисертант проводив підбір дози та часу введення препаратів, провів аналіз літературних джерел, оцінив ефективність стимуляції суперовуляції та оформив матеріали патенту).
8. Кирик В.М. Вивчення впливу трансплантації фетальних та гемопоетичних стовбурових клітин дорослого організму на відновлення імунної системи опромінених молодих та старих мишей лінії   
   СВА/Са / Кирик В. М. // Х Українська науково-практична конференція з актуальних питань клінічної та лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації, 22-23 квітня 2008 р., Київ: тези доповідей. — Імунологія та алергологія. **—** 2008. — № 1. — С. 71.
9. Кирик В. М. Оцінка впливу трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку на імунологічні показники в молодому та старому організмі в різні терміни після опромінення / В. М. Кирик, А. Є. Родніченко // Сучасні проблеми патофізіології: від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів: V національний Конгрес патофізіологів України, 17-19 вересня 2008 р., Запоріжжя: тези доповідей. — Патологія. – 2008. — Т. 5,   
   № 3. — С. 39. (Дисертант самостійно провів експериментальні дослідження з виділення і трансплантації клітин та статистичну обробку результатів).
10. Кирик В. М. Вплив трансплантації дорослих та фетальних гемопоетичних стовбурових клітин на субпопуляції тимоцитів у мишей різного віку / В. М. Кирик // Актуальні питання геронтології та геріатрії: наукова конференція молодих вчених з міжнародною участю, 27 січня 2009 р.: тези доповідей. — Київ, 2009. — С. 44—45.
11. Кирик В. М. Застосування фетальних стовбурових клітин при експериментальній ішемії головного мозку / О. М. Цупиков, А. О. Поддубна,   
    В. М. Кирик, О. В. Кучук // Актуальні питання геронтології та геріатрії: наукова конференція молодих вчених з міжнародною участю, 27 січня 2009 р.: тези доповідей. — Київ, 2009. — С. 122—123. (Дисертанту належать результати по трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки).
12. Кирик В. М. Возрастные особенности влияния трансплантации клеток костного мозга и фетальной печени на субпопуляционный состав клеток тимуса у мышей / Кирик В. М., Новикова С. Н. // Дни иммунологии в Санкт-Петербурге: Материалы XIII Всероссийского научного Форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе, 8-11 июня 2009 г. — Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 4-5. — С. 319. (Дисертант провів експериментальні дослідження з трансплантації клітин та обробку результатів проточної цитометрії).
13. V. M. Kyryk Effects of transplantation of bone marrow and fetal liver cells on cell subpopulations in murine thymus / V. M. Kyryk, G. M. Butenko // World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, October 29-31, 2009. — Regenerative Medicine. — 2009. — November 4 (6), Suppl. 2. — P. 4—5. (Дисертант провів експериментальні дослідження з трансплантації клітин та обробку результатів проточної цитометрії).

## АНОТАЦІЯ

Кирик В. М. Особливості розселення і диференціювання гемопоетичних стовбурових клітин різного ступеня зрілості та їх вплив на функцію імунної системи у мишей різного віку. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.08 – імунологія та алергологія. – Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ, 2009.

В дисертації наведені результати вивчення впливу трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) кісткового мозку та фетальної печінки на показники імунної системи у опромінених та неопромінених молодих (3 місяці) і старих (20 місяців) мишей ліній СВА/Са та FVB.

Показано, що через 3-4 тижні після трансплантації ГСК субпопуляції клітин в тимусі перерозподіляються в бік зростання ранніх недиференційованих CD4-8- та диференційованих CD4+8- і CD4-8+ тимоцитів, поряд із збільшенням кількості CD4+8+ клітин в кістковому мозку та селезінці. У неопромінених реципієнтів ГСК зменшується співвідношення стромальних клітин-попередників до гемопоетичних в кістковому мозку та зростають показники бласттрансформації спленоцитів під дією Т- і В-клітинних мітогенів. Трансплантовані ГСК фетальної печінки здатні мігрувати в осередок ішемічного пошкодження гіпокампа.

Встановлено, що трансплантація ГСК викликає зміни імунологічних показників у мишей, ступінь яких в більшій мірі визначається віком реципієнта, ніж походженням клітин.

**Ключові слова:** гемопоетичні стовбурові клітини, кістковий мозок, фетальна печінка, Т-лімфоцити, тимус.

**АННОТАЦИЯ**

**Кирик В. М. Особенности расселения и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток разной степени зрелости и их влияние на функцию иммунной системы у мышей разного возраста. - Рукопись.**

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.08 - иммунология и аллергология. - Национальный медицинский университет им. О. О. Богомольца, Киев, 2009.

В диссертации приведены результаты изучения влияния трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга и фетальной печени на показатели иммунной системы облученных и необлученных молодых (3 месяца) и старых (20 месяцев) мышей линий СВА/Са и FVB.

Показано, что у облученных и необлученных мышей через 3-4 недели после трансплантации ГСК субпопуляции клеток в тимусе перераспределяются в сторону возрастания количества ранних недифференцированных CD4-8- тимоцитов и дифференцированных CD4+8- и CD-8+ клеток, при относительном снижении числа промежуточных малодифференцированных CD4+8+ тимоцитов (р<0,05). Это, наряду с увеличением количества CD4+8+ клеток в костном мозге и селезенке после облучения и трансплантации ГСК фетальной печени у старых животных, а у молодых - после трансплантации ГСК костного мозга, указывает на ускорение созревания клеток в тимусе и выхода их на периферию. Обнаружено достоверное повышение показателей фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов у облученных молодых и старых мышей в ранние сроки после трансплантации ГСК костного мозга или фетальной   
печени (р<0,05).

Возрастание через 3 недели после облучения количества ядросодержащих клеток костного мозга у молодых и старых реципиентов ГСК фетальной печени, массы тимуса и селезенки у молодых животных обеих групп, числа аутоантителообразующих клеток селезенки, титров гемагглютининов и гемолизинов крови во всех экспериментальных группах является временным и на 12-ой неделе эти показатели возвращаются к исходным значениям.

При этом у старых облученных реципиентов ГСК костного мозга и фетальной печени через 12 недель после трансплантации возрастает масса тимуса, тимический индекс, число ядросодержащих клеток тимуса и количество антителообразующих клеток селезенки, что может свидетельствовать об определенном стимулирующем эффекте трансплантированных клеток в старом организме.

У необлученных реципиентов ГСК, как и у облученных, в костном мозге и селезенке показано достоверное увеличение количества малодифференцированных предшественников Т-лимфоцитов с фенотипом CD4+8+ (р<0,05). Но среди этих животных прирост показателя был более выражен у молодых, чем у старых мышей. Также, в отличие от облученных реципиентов ГСК, отмечалась тенденция к превалированию возрастания количества CD3+, CD4+8- и CD4+8+ клеток у реципиентов ГСК фетальной печени, по сравнению с реципиентами ГСК костного мозга в обеих возрастных группах (р<0,05).

У необлученных реципиентов ГСК обеих возрастных групп обнаружено уменьшение соотношения стромальних клеток-предшественников к гемопоэтическим предшественникам в костном мозге и возрастание показателей бласттрансформации спленоцитов под влиянием фитогемаглютинина и липополисахарида E. coli (р<0,05).

Трансплантация сортированных ГСК, меченных зеленым флуоресцентным белком (GFP), обеспечивает возможность целенаправленного перенесения в организм и визуализации заданной популяции ГСК с необходимыми фенотипическими и функциональными характеристиками, с целью влияния на отдельные звенья гемопоэза. Показано, что донорские стволовые клетки и клетки-прогениторы костного мозга и фетальной печени владеют относительно большей пролиферативной активностью, чем прогениторы костного мозга реципиента. Трансплантированные сортированные меченные GFP гемопоэтические LSK-клетки в костном мозге реципиента дают начало колониям гранулоцитарно-макрофагального ряда, но не колониям фибробластоподобных клеток. Также показано, что ГСК фетальной печени способны мигрировать в очаг ишемического повреждения головного мозга мыши при их субокципитальном введении и сохранять там свою жизнеспособность в первые 14 суток после трансплантации.

В результате проведенных исследований установлено, что трансплантация ГСК вызывает изменения иммунологических показателей у мышей, степень которых в большей мере определяется возрастом реципиента, чем происхождением клеток.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, костный мозг, фетальная печень, Т-лимфоциты, тимус.

**ANNOTATION**

**Kyryk V. M. Characterization of expansion and differentiation of hematopoietic stem cells of different maturity and their effect on immune system functioning in mice of different ages. - Manuscript.**

Thesis for the degree of a Candidate of medical sciences in specialty 14.03.08 - immunology and allergology. National Medical University named after   
O. Bogomolets, Kyiv, 2009.

This work presents the results of research into the impact of transplantation of hematopoietic stem cells (HSC) from bone marrow and fetal liver on the immune system of irradiated and intact young (3 months) and old (20 months) CBA/Ca and FVB mice.

It has been found that 3-4 weeks after HSC transplantation there occurred a redistribution of cell subpopulations in the thymus towards an increase of early undifferentiated CD4-8- and differentiated CD4+8- and CD4-8+ thymocytes along with an increase of CD4+8+ cells in the bone marrow and spleen. In the non-irradiated recipients of HSC, the ratio of stromal cells to hematopoietic precursors in bone marrow decreased and the blast-transformation activity of splenocytes under influence of T-and B-cell mitogens increased. It has also been found that the transplanted fetal liver HSC can migrate into ischemic brain damage.

In conclusion, as a result of HSC transplantation the immunological parameters of study mice underwent changes, which extent is defined more by age of the recipient, than an origin of cells.

Key words: hematopoietic stem cells, bone marrow, fetal liver, Т-lymphocytes, thymus.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>