

Характеристика стромальных клеток костного мозга в реакции смешанной культуры лимфоцитов

А.С. Григорян¹, Н.В. Цупкина², В.С. Сергеев³, Р.В. Деев³, Г.П. Пинаев²

¹ Санкт-Петербургский Государственный Университет

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

³ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Characteristics of bone marrow stromal cells in mixed lymphocytes culture response

A.S. Griegoryan¹, N.V. Tsyapkina², V.S. Sergeev³, R.V. Deev³, G.P. Pinaev²

¹ Saint-Petersburg State University

² Institute of Cytology, RAS, Saint-Petersburg

³ S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg

В настоящее время стромальные клетки костного мозга (СККМ) привлекают все больший интерес в связи с потенциальной возможностью применения их в качестве иммуномодуляторов в клинической практике. Некоторыми исследователями был отмечен супрессивный эффект, оказываемый СККМ на пролиферацию лимфоцитов в смешанных культурах. В данной работе изучены свойства аллогенных и сингенных СККМ *in vitro*. В качестве метода оценки воздействия СККМ на пролиферацию лимфоцитов была выбрана реакция смешанной культуры лимфоцитов (РСКЛ), в качестве метода визуализации результата — иммуноцитохимическое окрашивание клеток, находящихся в S-фазе, на включение бромдезоксифуридина (BrdU). В качестве источника СККМ, спленоцитов и фибробластов, использовавшихся в контрольных опытах, были выбраны крысы линии Вистар и беспородные крысы.

Показано, что как аллогенные, так и сингенные СККМ не оказывают подавляющего воздействия на пролиферацию лимфоцитов. Более того, аллогенные СККМ стимулируют пролиферацию лимфоцитов как в РСКЛ, так и при обычном сокультивировании. При этом пролиферация лимфоцитов в ответ на аллогенные СККМ достигает при высоких концентрациях СККМ 85%, что статистически значимо выше уровня пролиферации лимфоцитов в ответ на аллогенные фибробласты. Установлено, что супернатанты культур СККМ также вызывают пролиферацию лимфоцитов.

Ключевые слова: стромальные клетки костного мозга, реакция смешанной культуры лимфоцитов.

Введение

Стромальные клетки костного мозга (СККМ), или в значительной степени синонимичные им мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки привлекают все больший интерес исследователей в связи с потенциальной возможностью применения их в качестве иммуномодуляторов в клинической практике, особенно в тех случаях, когда стандартная терапия не приводит к положительным результатам. СККМ оказывают супрессивный эффект на иммунную систему реципиента, а также способны к дифференцировке в различные типы клеток [1]. Следовательно, при введении аллогенных СККМ с целью воздействия на регенерацию поврежденных тканей, а также при их котрансплантации с другими клетками (тканями, органами) можно снизить вероятность возникновения и/или степень выраженности иммунологических реакций, получивших названия «реакция трансплантат против хозяина» и «реакция хозяин против трансплантата» [2].

Существует большой спектр противоречивых данных как о фенотипических характеристиках СККМ, так и об их спо-

At present more and more attention has been given to stromal cells of bone marrow (BMSCs) due to the possibility of using them as immunomodulators in clinical practice. Some investigators have noticed suppressive effect of bone marrow stromal cells on lymphocytes proliferation in mixed cultures. Properties of allogeneic and syngeneic BMSCs *in vitro* have been studied. BMSCs influence on lymphocytes proliferation was assessed by the lymphocytes mixed culture response, the results were visualized with immune cytochemical staining of cells in S-phase on Bromdesoxyuridine (BrdU) inclusion. Bone marrow stromal cells, spleenocytes, and fibroblasts were obtained from Wistar rats and outbred rats. Both allogeneic and syngeneic bone marrow stromal cells have not been shown to suppress lymphocytes proliferation. Moreover, allogeneic BMSCs stimulate lymphocytes proliferation both in lymphocytes mixed culture response and in co-culturing. At the same time, proliferation of lymphocytes in response to allogeneic BMSCs reaches 85% in BMSCs high concentrations, that is relevantly more than proliferation of lymphocytes in response to allogeneic fibroblasts. It has been stated that supernatants of BMSCs cultures produce proliferation of lymphocytes as well.

Key words: bone marrow stromal cells, lymphocytes mixed culture response.

собности влиять или даже регулировать процессы иммуногенеза. Свойство иммуносупрессии СККМ у человека отмечается в опытах *in vitro* (в реакции смешанной культуры лимфоцитов), а также в экспериментах на животных [2–9].

Показано, что уровень подавления пролиферации лимфоцитов зависит от количества СККМ. Большие их количества ингибируют, а низкие — усиливают пролиферацию лимфоцитов в реакции смешанной культуры. Т-клетки не подвергаются апоптотической гибели и не впадают в состояние анергии. При удалении СККМ из культуры лимфоциты могут быть рестимулированы к пролиферации [5, 6]. Кроме того, аллогенные СККМ увеличивают количество регуляторных Т-клеток [11, 12].

В то же время научной группой A.J. Nauta et al. в 2005 году было продемонстрировано, что аллогенные СККМ вызывают реакцию отторжения при котрансплантации с аллогенным костным мозгом [13]. Также в 2006 году было обнаружено, что СККМ, трансплантированные в головной мозг взрослых животных, вызывают воспалительную реакцию, приводящую к отторжению трансплантата [14].

Вышеизложенные положения послужили предпосылками к планированию нашего исследования, целью которого стало обнаружение влияния различных количеств аллогенных и сингенных СККМ на пролиферацию лимфоцитов в реакции смешанной культуры лимфоцитов (РСКЛ).

Материал и методы

Реакция смешанной культуры лимфоцитов

Цель РСКЛ – оценка МНС-совместимости донора и реципиента, для чего проводится сокультивирование лимфоцитов донора (клеток-респондеров) и лимфоцитов потенциального реципиента (клеток-стимуляторов), предварительно обработанных агентом, подавляющим их собственную пролиферацию. В данном исследовании РСКЛ проводилась в присутствии исследуемых популяций клеток.

В качестве агента, подавляющего пролиферацию клеток-стимуляторов, был использован митомицин С в концентрации 50 мкг/мл (Sigma, США). Для оценки пролиферации лимфоцитов-респондеров был применен иммуноцитохимический метод окрашивания клеток в S-фазе на включение в их ДНК бромдезоксисуридина (BrdU) (Sigma, США). Обработка клеток митомицином С и их иммуноцитохимическая окраска проводились по протоколам фирмы-производителя.

Эксперимент включал в себя несколько серий:

1. Постановка РСКЛ в отсутствие СККМ. Подбор оптимального соотношения клеток-респондеров (спленоцитов крыс линии Вистар) и клеток-стимуляторов (спленоцитов беспородных крыс)¹ и времени их сокультивирования, при которых достигается максимальный пролиферативный ответ со стороны клеток-респондеров. Каждый отдельный опыт для повышения достоверности результата проводился в четырех параллелях. В контрольных опытах были поставлены серии РСКЛ при сингенном происхождении клеток-респондеров и клеток-стимуляторов, а также определен уровень пролиферации клеток-респондеров в отсутствие клеток-стимуляторов в бессывороточной ростовой среде α MEM и в среде с 10% FBS.

2. Постановка РСКЛ в присутствии аллогенных клеткам-респондерам СККМ в разных соотношениях. Определение эффекта, оказываемого аллогенными СККМ на пролиферацию лимфоцитов реципиента. В контрольных опытах были поставлены серии РСКЛ в присутствии аллогенных клеткам-респондерам фибробластов.

3. Постановка РСКЛ в присутствии СККМ, полученных от различных беспородных крыс².

4. Сокультивирование спленоцитов с аллогенными СККМ. Определение эффекта СККМ на пролиферацию спленоцитов. В контрольных опытах было проведено сокультивирование спленоцитов как с аллогенными, так и с сингенными фибробластами, без присутствия клеток-стимуляторов.

5. Культивирование спленоцитов в ростовой среде, в которой до этого культивировались аллогенные СККМ.

6. Постановка РСКЛ в присутствии сингенных клеткам-респондерам СККМ в разных соотношениях. Определение эффекта, оказываемого сингенными СККМ на пролиферацию лимфоцитов реципиента. В контрольных опытах были поставлены серии РСКЛ в присутствии сингенных клеткам-респондерам фибробластов.

Все манипуляции с крысами выполнялись с учетом правил гуманного обращения с животными [15].

Выделение спленоцитов

Селезенку помещали в чашку Петри в 8 мл среды DMEM с 10% FBS (HyClone, Новая Зеландия), фрагментировали и гомогенизировали. Полученную суспензию фильтровали в центрифужную пробирку через нейлоновое сито с диаметром отверстий 200 нм.

После этого проводилось выделение моноклеарной фракции на градиенте перколла (плотность – 1,086 г/л) центрифугированием при 300g в течение 30 мин при комнатной температуре. Количество полученных спленоцитов определяли подсчетом клеток в камере Горяева.

Выделение СККМ

Полученный костный мозг помещали в чашку Петри, содержащую 5–6 мл среды α MEM (ISN, США) с 10% FBS (HyClone, Новая Зеландия) и гомогенизировали. Затем проводили выделение моноклеарной фракции на градиенте перколла (плотность – 1,086 г/л) центрифугированием при 300g в течение 20 мин при комнатной температуре. Отмывку от перколла производили раствором Хэнкса центрифугированием при 200g 20 мин. Затем клетки высевали на две чашки Петри и помещали в 5% CO₂-инкубатор. Смену среды производили спустя сутки. Через несколько дней культивирования на дне культурального сосуда можно было обнаружить большое количество адгезировавшихся расплывчатых многоотростчатых клеток, контактировавших между собой (рис. 1).

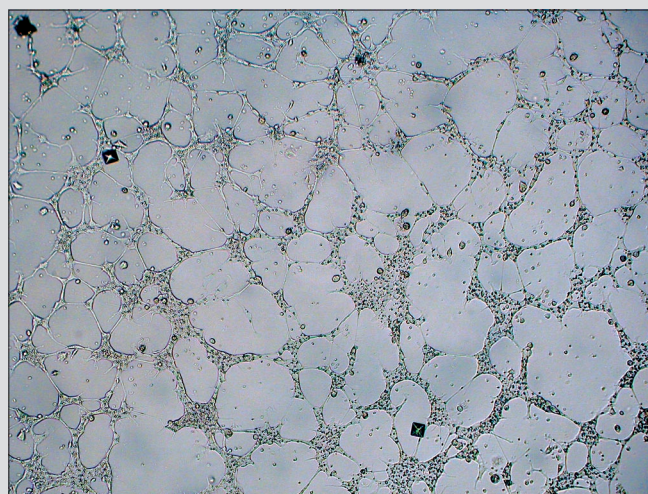


Рис. 1. Культура стромальных клеток костного мозга крысы. Микрофотография выполнена после фиксации. Увеличение: $\times 400$

Культивирование СККМ

Клетки культивировали в среде α MEM (ICN, США) с 10% FBS (HyClone, Новая Зеландия) и гентамицина сульфата (50 мкг/мл) на чашках Петри в 5% CO₂-инкубаторе. Для пассирования использовали стандартную смесь трипсина (0,25%) и ЭДТА (0,02%) (Gibco, США), в которой клетки инкубировали 3–4 мин.

¹ В качестве экспериментальных животных, от которых был получен клеточный материал, использовались самки крыс линии Вистар и самки беспородных крыс возраста от четырех до шести месяцев, полученные из питомника лабораторных животных РАН «Рапполово».

² Данный этап необходим, так как в качестве источника аллогенного материала в эксперименте использовались беспородные крысы.

Выделение фибробластов

Щипок подкожной соединительной ткани размером около 1 см² помещали в чашку Петри и накрывали стерильным покровным стеклом, после чего заливали 5 мл среды α MEM (ICN, США) с 10% FBS (Hyclone, Новая Зеландия) и помещали в 5% CO₂ инкубатор. Затем через каждые 4–5 суток производили смену среды.

Культивирование фибробластов

Примерно через две недели после начала выселения фибробластов из ткани они образовывали на дне чашки Петри монослой. После этого стерильным пинцетом из чашки удаляли покровное стекло и кусочки ткани и производили первый пассаж. Для пассирования использовали стандартную смесь трипсина (0,25%) и ЭДТА (0,02%) (Gibco, США). Клетки культивировали в среде α MEM фирмы ICN с 10% FBS (Hyclone, США) и гентамицина сульфата (50 мкг/мл) либо в среде DME на чашках Петри в 5% CO₂ инкубаторе.

Статистическая обработка данных

Количество клеток в S-фазе, окрашенных иммуноцитохимическим методом на включение BrdU, было подсчитано в световом микроскопе из расчета на 500 клеток. Для каждого отдельного опыта производили по 3 параллельных подсчета, после чего выводили среднее число клеток в S-фазе для каждого опыта. Для статистической обработки данных был использован однофакторный дисперсионный анализ.

Результаты и обсуждение

1. Максимальная пролиферация клеток-респондеров наблюдалась на пятые сутки инкубации в РСКЛ при количествах клеток-респондеров от $1,0 \times 10^7$ до $2,0 \times 10^7$ и клеток-стимуляторов – $4,0 \times 10^7$ и достигала 63%. В контрольных опытах при сингенном происхождении клеток-респондеров и клеток-стимуляторов уровень пролиферации отвечающих спленоцитов весьма низок, и, как в ростовой среде с 10% FBS, так и в бессывороточной среде, составляет от 8 до 12%, что позволяет нам считать пролиферацию лимфоцитов в ответ на компоненты сыворотки «фоновой», так как уровень пролиферации отвечающих клеток при аллогенной стимуляции оказывался гораздо выше (рис. 2).

Известно, что пролиферация клеток *in vitro* зависит, в том числе, от плотности культуры, обуславливающей число межклеточных контактов и концентрацию в среде растворимых факторов, продуцируемых клетками. Для проверки нашего предположения о наличии подобной зависимости мы поставили дополнительный контрольный опыт, в котором установили весьма слабую зависимость пролиферации спленоцитов от их исходного количества. Максимальный пролиферативный ответ действительно наблюдался, когда исходное количество клеток-респондеров было от $1,0 \times 10^7$ до $2,0 \times 10^7$, но процент пролиферирующих клеток от общего их числа менялся слабо (в среднем от 4% до 8%), что указывает на то, что мы наблюдали пролиферацию одной и той же клеточной субпопуляции в пределах выделенной из селезенки гетерогенной популяции спленоцитов, и большее количество отвечающих клеток было необходимо для лучшей визуализации результата. Однако некоторое изменение уровня пролиферации в зависимости от плотности культуры все же наблюдалось. При исходных количествах спленоцитов от $0,25 \times 10^7$ до $0,5 \times 10^7$ в S-фазе находилось от 3,8% до 6,2% клеток от общей популяции; при исходных количествах спленоцитов от $1,0 \times 10^7$ до $2,0 \times 10^7$ в S-фазе находилось около 8% от общего количества клеток.

2. Было обнаружено, что аллогенные СККМ не только не подавляют, но, напротив, стимулируют пролиферацию клеток-респондеров. Наблюдалось статистически значимое увеличение пролиферации клеток-респондеров относительно уровня их максимальной пролиферации в РСКЛ при отсутствии аллогенных СККМ. При различных соотношениях клеток-респондеров и аллогенных СККМ изменялся и характер стимуляции: при соотношении 10³:1 стимуляции практически не было – пролиферация лимфоцитов-респондеров даже несколько снижалась, однако в отдельных опытах этот эффект не был стабильным; при соотношении 10²:1 стимуляция была незначительной (около 60%); при соотношениях 10:1 и 1:1 пролиферация клеток-респондеров достигала 85%, т.е. могла превышать максимальную пролиферацию лимфоцитов-респондеров в РСКЛ на 12%. В контрольных опытах были проведены реакции смешанной культуры лимфоцитов в присутствии сингенных (отрицательный контроль) и аллогенных (положительный контроль) клеткам-респондерам фибробластов. Сингенные фибробласты не оказывали существенного влияния на пролиферацию стимулированных клеток-респондеров; в случае добавления в культуру аллогенных фибробластов наблюдалось усиление пролиферации спленоцитов, однако достоверно меньше, нежели в случае добавления в культуру аллогенных СККМ (рис. 3).

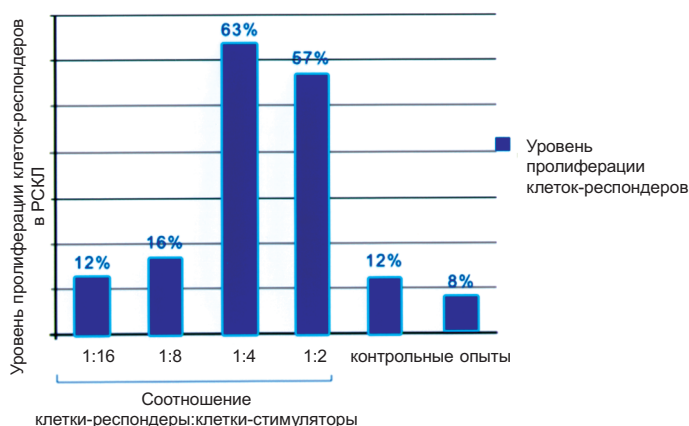


Рис. 2. Проплиферация клеток-респондеров в РСКЛ ($p = 0,05$)

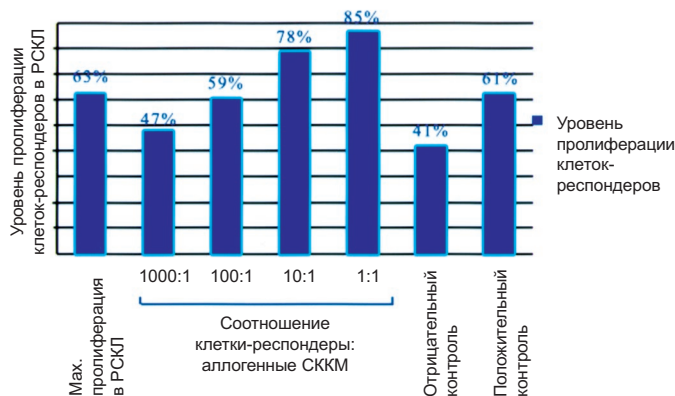


Рис. 3. Эффект аллогенных СККМ на пролиферацию клеток-респондеров в РСКЛ ($p = 0,05$)

Также следует особо отметить тот факт, что слой аллогенных СККМ повреждался в РСКЛ, чего не происходило в контрольных опытах с фибробластами. Это можно было наблюдать визуально — обычно к пятым–шестым суткам инкубации в РСКЛ слой адгезивных клеток сохранялся только по периферии культуральной чашки, основная же его часть подвергалась лизису. В суспензии обнаруживались крупные клеточные агрегаты, характерные для пролиферирующих лимфоцитов. Количество этих агрегатов также визуально увеличивалось при увеличении количества стромальных клеток, присутствовавших в РСКЛ.

Таким образом, мы не получили подтверждения литературных данных о том, что СККМ вызывают подавление пролиферации лимфоцитов [10, 16–19]. Напротив, мы наблюдали выраженную пролиферацию клеток-респондеров, статистически значимо большую, нежели в ответ на аллогенные фибробласты, использовавшиеся в качестве положительного контроля. Возможно, это связано с секрецией стромальными клетками широкого спектра факторов, регулирующих в норме пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических клеток, в том числе и иммунокомпетентных, как было отмечено многими исследователями [20–22].

3. Мы также проверили, существуют ли различия в эффектах СККМ на пролиферацию спленоцитов в случае различного происхождения СККМ, поскольку в наших опытах источником аллогенных СККМ служил костный мозг беспородных крыс. Таких различий выявлено не было: аллогенные СККМ разного происхождения в одинаковой степени стимулировали пролиферацию лимфоцитов-респондеров, которая достигала 80–85%.

4. Стимулирующий эффект, оказываемый аллогенными СККМ на спленоциты, был выявлен нами и в отдельных опытах по сокультивированию лимфоцитов-респондеров с аллогенными СККМ при отсутствии клеток-стимуляторов. В ответ на аллогенные СККМ спленоциты пролиферировали несколько сильнее, чем в ответ на аллогенные фибробласты в контрольных опытах. Уровень их пролиферации составлял от 20% до 50% и также был пропорционален количеству аллогенных СККМ (рис. 4).

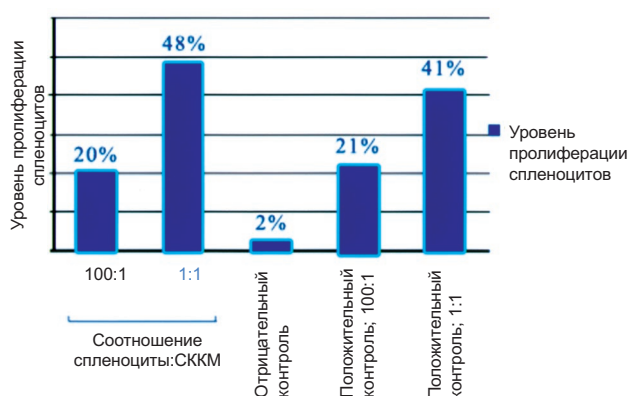


Рис. 4. Эффект аллогенных СККМ на пролиферацию спленоцитов ($p = 0, 05$)

5. Мы установили, что ростовая среда, в которой культивировались аллогенные СККМ, сохраняет свои стимулирующие свойства (рис. 5), что расходится с литературными данными о том, что, напротив, супернатанты культур СККМ оказывают на пролиферацию лимфоцитов супрессивный эффект [3, 22]. Объяснением этого факта может служить то, что за стимулирующий эффект ответственны растворимые факторы, продуцируемые СККМ, и набор этих факторов зависит от условий, в которых культивируются клетки, а также от степени гетерогенности популяции выделенных СККМ [3].

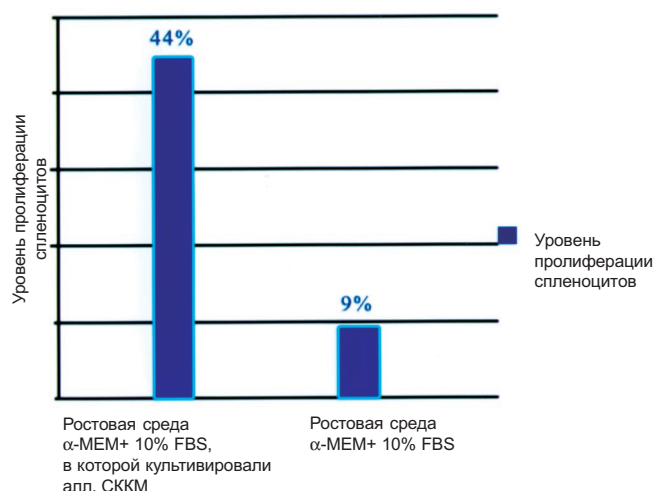


Рис. 5. Влияние на пролиферацию спленоцитов ростовой среды, в которой до этого в течение 5 суток культивировали аллогенные СККМ ($p = 0, 05$)

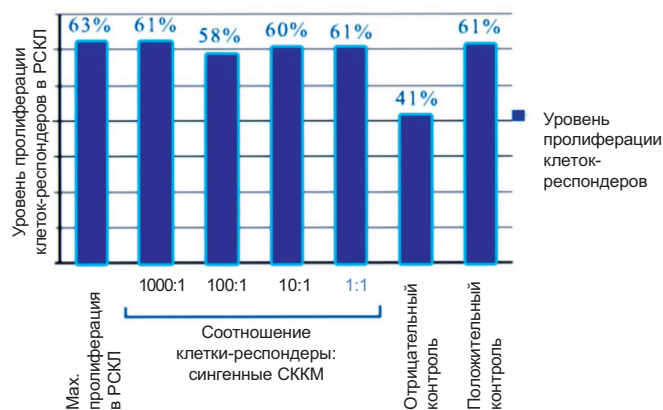


Рис. 6. Эффект сингенных СККМ на пролиферацию клеток-респондеров в РСКЛ ($p = 0, 05$)

6. В нашей работе был также проверен эффект сингенных СККМ на пролиферацию стимулированных спленоцитов в РСКЛ. Было обнаружено, что сингенные СККМ вне зависимости от их количества не подавляют пролиферацию клеток-респондеров (рис. 6). На пятые сутки инкубации пролиферация клеток-респондеров не имела достоверных отличий от их пролиферации в обычной РСКЛ в отсутствие сингенных СККМ и оставалась равной от 58% до 63%. В этой серии были также поставлены контрольные опыты, аналогичные контрольным опытам второй серии экспериментов. В случае присутствия в РСКЛ сингенных СККМ уровень пролиферации

клеток-респондеров был несколько выше, чем в присутствии сингенных клеткам-респондерам фибробластов, но эти отличия нельзя считать существенными. Различий в пролиферации клеток-респондеров в случаях присутствия в РСКЛ сингенных СККМ или аллогенных фибробластов практически не было. В целом сингенные клеткам-респондерам СККМ, как и сингенные им фибробласты, не оказывают существенного влияния на пролиферацию стимулированных отвечающих клеток в реакции смешанной культуры лимфоцитов. Такой результат согласуется с данными литературы о том, что собственные стромальные клетки костного мозга реципиента не способны купировать иммунные реакции, возникающие при введении реципиенту аллогенного материала [23, 24].

Закключение

В присутствии аллогенных и сингенных СККМ не происходило ингибирования пролиферации клеток-респондеров в реакции смешанной культуры лимфоцитов — наоборот, количество клеток-респондеров, находящихся в синтетической фазе клеточного цикла, в присутствии аллогенных СККМ могло достигать 85% при равном соотношении клеток-респондеров и аллогенных СККМ.

Известно, что нахождение клеток в S-фазе означает усиление синтеза нуклеиновых кислот, но не обязательно пролиферацию. Чтобы прояснить этот момент, мы производили

подсчет количества спленоцитов в начале и в конце их инкубации в смешанной культуре и определили, что спленоциты действительно пролиферируют. В то же время ясно, что сама по себе пролиферация лимфоцитов не всегда начинается их функциональную активность. Сам факт пролиферации лишь указывает на высокую вероятность последующего каскада иммунных реакций в ответ на чужеродный антиген. Также возможно, что СККМ стимулируют усиление метаболизма и пролиферации не только лимфоцитов, но и прочих типов клеток, присутствующих в смешанной культуре¹. Это может быть причиной терапевтического эффекта, оказываемого СККМ при их котрансплантации с аллогенным материалом [25].

Аллогенные СККМ стимулируют начальные этапы реакции лимфоцитов на аллоантигены, т.е. усиление синтеза нуклеиновых кислот и пролиферацию. Тем не менее, это не может быть доказательством отсутствия у СККМ иммуномодулирующих свойств, так как неизвестно, как ведут себя лимфоциты после этих этапов: происходит ли продукция про- или противовоспалительных цитокинов, осуществляется ли специфический лизис аллогенных СККМ и др. Таким образом, в дальнейшей работе по характеристике морфофункциональных свойств СККМ требуется последовательный анализ всех этапов взаимодействия аллогенных и сингенных СККМ с лимфоцитами, так как до настоящего времени относительно них не существует единого мнения.

¹ Особенно макрофагов, также способных к адгезии.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. Multilineage potential of human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143–7.
2. Сергеев В.С. Иммунологические свойства мезенхимальных стромальных клеток. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2005; 2: 39–42.
3. Di Nicola M., Carlotella C., Magni M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838–43.
4. Krampera M., Glennie S., Dyson J. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101: 3722–9.
5. Le Blanc K., Tammik C., Gøtherstrøm C. et al. HLA-expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* 2003; 31: 890–6.
6. Maitra B., Szekely E., Gjini K. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor haematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant.* 2004; 33: 597–604.
7. Tse W.T., Pendleton J.D., Beyer W.M. et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 389–97.
8. Kraitchman D.L., Tatsumi M., Gilson W.D. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation* 2005; 112(10): 1451–61.
9. Makkar R.R., Price M.J., Lill M. Intramyocardial injection of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells without immunosuppression preserves cardiac function in a porcine model of myocardial infarction. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2005; 10(4): 225–33.
10. Dai W., Hale S.L., Martin B.J. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation* 2005; 112(2): 214–23.
11. Aggarwal S., Pittenger F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105: 1815–22.
12. Rasmusson I., Ringden O., Sundberg B., Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte activation by mitogens and allogens by different mechanisms. *Exp. Cell. Res.* In press.
13. Nauta A.J., Westerhuis G., Kruisselbrink A.B. et al. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate

donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 2005; 11.

14. Coyne T.M., Akiva M., Woodbury D. et al. Marrow Stromal Cells Transplanted to the Adult Brain are Rejected by an Inflammatory Response and Transfer Donor Labels to Host Neurons and Glia. <http://stemcells.alphaedpress.org/cgi/reprint/24/11/2483?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Coyne%2C+TM&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resourcetype=HWCIT>.
15. Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *JAVMA* 2001; 218(5): 669–96.
16. Augello A., Tasso R., Negrini S.M. et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35: 1482–90.
17. Di Nicola M., Carlotella C., Magni M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838–43.
18. Djouad F., Plence P., Bony C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003; 102: 3837–44.
19. Gøtherstrøm C., Ringdén O., Tammik C. et al. Immunological properties of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004; 190: 239–45.
20. Toksoz D., Zsebo K., Smith K. Support of human hematopoiesis in long term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane bound and secreted forms of the human homologue of the steel gene product, stem cell factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89: 7350–4.
21. Gøtherstrøm C., Ringdén O., Westgren M. et al. Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 32: 265–72.
22. Rasmusson I., Ringdén O., Sundberg B., Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 2003; 76: 1208–13.
23. Wang J.W., Liu Y.B., Xu B. The study on immunomodulation of donor mesenchymal stem cells on discordant liver xenotransplantation. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2005; 43(19): 1254–8.
24. Wang Y., Huso D., Harrington J. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 2005; 7(6): 509–19.
25. Zhang Y. Z., Fouillard L., Chapel A. et al. Mesenchymal stem cells from human proximal femurs possess immunosuppressive activity. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2005; 85(39).

Поступила 15.06.2007