

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук

Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

на тему «**ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПРИ
МІЄЛОДИСПЛАСТИЧНИХ СИНДРОМАХ**»

Виконала: студентка 2-го року навчання
Галузь знань: 09 Біологія
Спеціальність: 091 Біологія та біохімія
Освітньо-наукова програма: Лабораторна
діагностика біологічних систем
Луніна Карина Євгенівна

Керівник Білько Н. М., доктор
медичних наук, професор, зав. кафедри
лабораторної діагностики біологічних
систем НаУКМА, заслужений
працівник освіти України

Рецензент Колибо Денис Васильович,
головний науковий співробітник
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України, докт.біол.наук, професор

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пахаренко М. В.
« ____ » червня 20__ року

Київ – 2025

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Загальна характеристика мезенхімальних стовбурових клітин	7
1.1.1. Джерела отримання МСК та їх характеристика.	7
1.1.2. Роль МСК у підтримці гемопоезу	9
1.2. Мієлодиспластичні синдроми: патогенез і клінічна характеристика	11
1.2.1. Порівняльний аналіз класифікацій мієлодиспластичних синдромів.	11
1.2.2. Клінічна характеристика МДС та методи лікування.	14
1.2.3. Роль мікрооточення кісткового мозку в розвитку МДС.	17
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	22
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	22
2.1. Характеристика об'єкта дослідження.	22
2.2. Реактиви, розчини, середовища та обладнання, що були використані у роботі	22
2.3. Отримання фракції моноклеарів кісткового мозку.	23
2.4. Оцінка кількісних характеристик клітин кісткового мозку	24
2.5. Отримання моношару з мезенхімальних стовбурових клітин	25
2.6. Культивування ГСК у напіврідкому агарі.	25
2.6.1. Культивування ГСК у напіврідкому агарі з використанням GM-CSF.	25
2.6.2. Паралельне культивування ГСК у напіврідкому агарі з використанням супернатанту з МСК-культури і ГМ-КСФ.	26
2.7. Статистична обробка результатів.	27

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	28
3.1. Оцінка якісного та кількісного складу ГСК та МСК виділених у хворих на МДС.	28
3.2. Порівняльна характеристика морфологічних і функціональних особливостей стовбурових клітин пацієнтів хворих на МДС, вирощених у культурі <i>in vitro</i>	30
3.2.1. Оцінка колонієутворюючої активності гемопоетичних стовбурових клітин у пацієнтів із мієлодиспластичним синдромом у присутності GM-CSF.	30
3.2.2. Морфологічні особливості МСК у пацієнтів хворих на МДС, вирощених у культурі <i>in vitro</i>	35
3.2.3. Оцінка ефективної дози супернатанта МСК як стимулюючого середовища для колонієутворення ГСК.	39
3.2.4. Культивування ГСК у напіврідкому агарі з використанням супернатанта з МСК-культури з кісткового мозку здорової людини і хворих на МДС паралельно з ГМ-КСФ.	40
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	44
ВИСНОВКИ	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	47

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

МДС - мієлодиспластичні синдроми;

ГСК – гемопоетичні стовбурові клітини;

МСК – мезенхімальні стромальні клітини;

КМ – кістковий мозок;

СК – стовбурові клітини;

ПК – периферична кров;

МЦ – метафазна цитогенетика.

ХММЛ - хронічний мієломоноцитарний лейкоз

GM-CSF - **G**ranulocyte-**M**acrophage **C**olony-**S**timulating **F**actor

(гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор)

ВСТУП

Мієлодиспластичні синдроми (МДС) являють собою групу гетерогенних захворювань, що характеризуються порушеннями процесів гемопоезу та прогресуючим дефіцитом клітин крові у кістковому мозку (КМ) [1]. Ці порушення виникають внаслідок аномалій у стовбурових клітинах кісткового мозку, що призводить до порушення їхнього диференціювання, проліферації та функціонування.

Мезенхімальні стовбурові клітини, як ключові регулятори мікросередовища КМ, забезпечують підтримку гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК), а також беруть участь у процесах імунної регуляції, ангиогенезу та відновлення тканин. Однак при МДС їх функціональна активність значно змінюється: порушується здатність до підтримки нормального гемопоезу, знижується рівень секреції регуляторних молекул, а також порушується їхня взаємодія з іншими клітинними елементами мікрооточення [2].

Вивчення механізмів, які впливають на функціонування мезенхімальних стромальних клітин (МСК) при мієлодиспластичних синдромах, є важливим для розуміння патогенезу цих захворювань та розробки нових терапевтичних підходів.

Дослідження механізмів дисфункції МСК при МДС має особливу значущість з огляду на те, що ці клітини можуть бути потенційними мішенями для терапевтичних втручань. Зокрема, особливу увагу привертають такі аспекти, як роль епігенетичних змін, порушення сигнальних шляхів і вплив запального мікрооточення.

З огляду на вищевикладене, метою роботи було вивчення особливостей функціонування мезенхімальних стовбурових клітин при МДС-ІВ в культурі *in vitro*.

Для виконання мети були сформульовані такі завдання:

- 1) Проаналізувати якісні характеристики гемопоетичних (ГСК) та мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), виділених з кісткового мозку пацієнтів із мієлодиспластичними синдромами (МДС), у порівнянні з контрольними зразками.
- 2) Оцінити проліферативну активність гемопоетичних і мезенхімальних стовбурових клітин у пацієнтів із МДС у порівнянні з нормою.
- 3) Провести тестування супернатанту з культур МСК і перевірити його стимулюючий ефект в нормі і при МДС-ІВ у порівнянні з відомим ростовим фактором ГМ-КСФ.
- 4) Оцінити здатність мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) пацієнтів із мієлодиспластичним синдромом (МДС) підтримувати ріст гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) у культурі *in vitro*.

Експериментальну частину роботи було виконано на кафедрі лабораторної діагностики Києво-Могилянської академії під керівництвом доктора медичних наук, заслуженого працівника освіти України Білько Н. М.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика мезенхімальних стовбурових клітин

1.1.1. Джерела отримання МСК та їх характеристика. Ідея стовбурових клітин виникла наприкінці ХІХ століття. Термін "стовбура клітина" увійшов у науковий обіг під час досліджень, які намагалися дати відповіді на два головні ембріологічні питання того періоду: як передається спадковість через зародкову плазму та яким чином формується система кровотворення. Теодор Бовері та Валентин Хеккер одними з перших застосували цей термін, описуючи клітини, що беруть участь у формуванні зародкової лінії. Хеккер запропонував ідею, що стовбурові клітини здатні мігрувати під час ембріонального розвитку й здійснювати асиметричний поділ, при якому одна клітина стає джерелом зародкової лінії, а інша – основою мезодермальних тканин. Ця концепція стала основою для подальшого вивчення різних типів стовбурових клітин, зокрема мезенхімальних, які відіграють ключову роль у формуванні сполучних тканин та регенерації пошкоджених структур організму [3].

Мезенхімальні стромальні клітини (МСК) — це мультипотентні клітини, які мають здатність до диференціювання в різні типи клітин мезодермального походження, включаючи остеобласти, хондроцити, адипоцити, міоцити та клітини строми кісткового мозку.

МСК характеризуються низкою ключових властивостей, що роблять їх перспективними для біомедичного застосування. Однією з основних рис є пластичність, що проявляється в здатності змінювати форму й функції

залежно від мікрооточення. У культурі вони адгезують до пластикової поверхні, що є важливим критерієм їхньої ідентифікації.

МСК мають мультипотентність, тобто здатність диференціюватися в клітини остеогенної, хондрогенної та адипогенної ліній. За певних умов вони також можуть утворювати нейроноподібні клітини та клітини ендотелію. Ще однією важливою властивістю є імуномодульовальна активність - здатність пригнічувати проліферацію Т-клітин, функцію природних кілерів і впливати на дендритні клітини та макрофаги. Це робить МСК перспективними для лікування аутоімунних, алергічних захворювань, хронічних запалень і трансплантаційної медицини.

На сьогодні джерелами для отримання мезенхімальних стромальних клітин (МСК) є не лише кістковий мозок, але й трабекулярна та кортикальна кісткова тканина, синовіальна оболонка, жирова тканина, плацента, молоко матері, пульпа зуба, сухожилля, скелетні м'язи, периферична кров, окістя, пуповинна кров, желе Вартона, шкіра та нервова тканина (рис.1.1) [4,5].

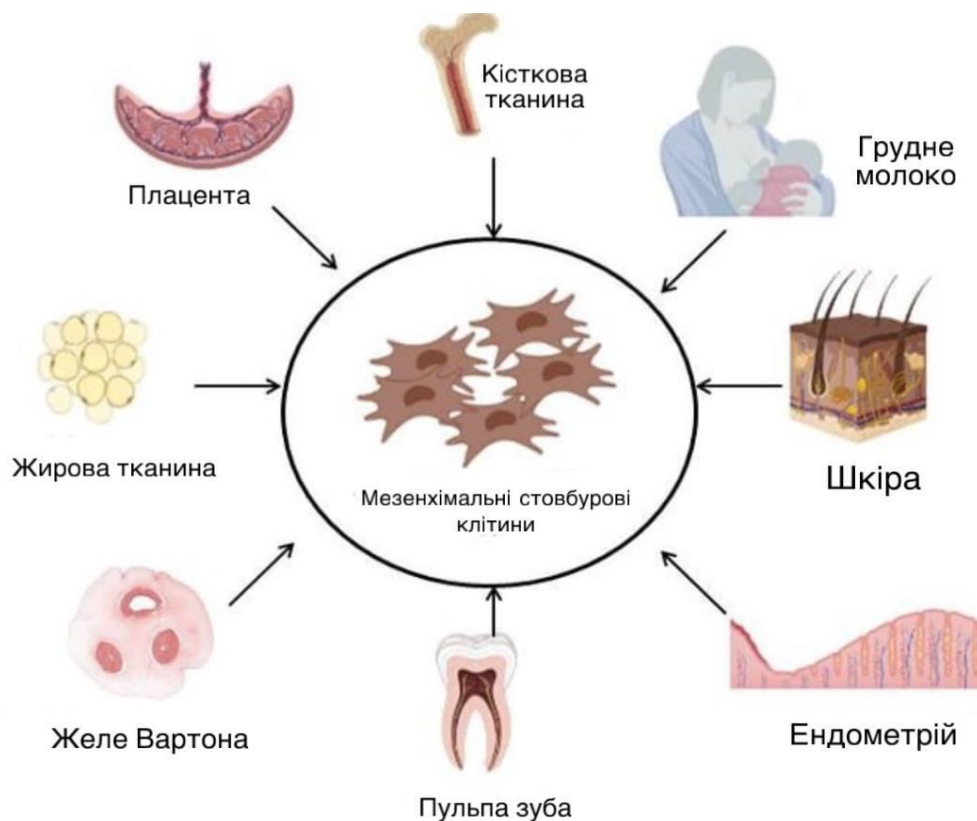


Рис. 1.1. Джерела отримання мезенхімальних стовбурових клітин. Адаптовано з [4,5].

У деяких випадках, на основі аналізу транскриптомів, МСК поділяють на дві категорії: клітини дорослого організму (отримані з кісткового мозку або жирової тканини) та клітини пренатального походження (ізолювані з плаценти, амніону чи пуповини). МСК характеризуються різноманітною морфологією: найчастіше зустрічаються клітини фібробластоподібної форми, але також можуть бути веретеноподібні, епітеліоподібні та округлі [4,5].

Методи виділення МСК базуються на градієнтному центрифугуванні, адгезії до пластикової поверхні та магнітній сепарації зі специфічними антитілами. У культурі вони формують колонії (CFU-F), що свідчить про їхню клоногенну активність [6]. Ідентифікація МСК ґрунтується на експресії маркерів CD73, CD90, CD105 і відсутності гематопоетичних (CD34, CD45) та ендотеліальних (CD31) маркерів [7].

1.1.2. Роль МСК у підтримці гемопоезу. Мезенхімальні стромальні клітини (МСК), завдяки своєму специфічному розташуванню у синусоїдальних судинах дорослого кісткового мозку, відіграють ключову роль у регуляції взаємодії між кістковим мозком і периферичною кров'ю, забезпечуючи гомеостаз кісткового мозку. Їх можна назвати своєрідними «стражами» кісткового мозку, які контролюють його середовище та функціонування [8].

МСК створюють сигнали, необхідні для диференціювання та проліферації гематопоетичних стовбурових клітин (ГСК) через прямий контакт "клітина-клітина". Ніша, у якій функціонують ГСК, є підсистемою кісткового мозку, що створює оптимальні умови для кровотворної системи. Однією з основних функцій МСК у цій ніші є секреція біологічно активних

факторів, зокрема CXCL12, який впливає на адгезію, міграцію та прикріплення ГСК [8].

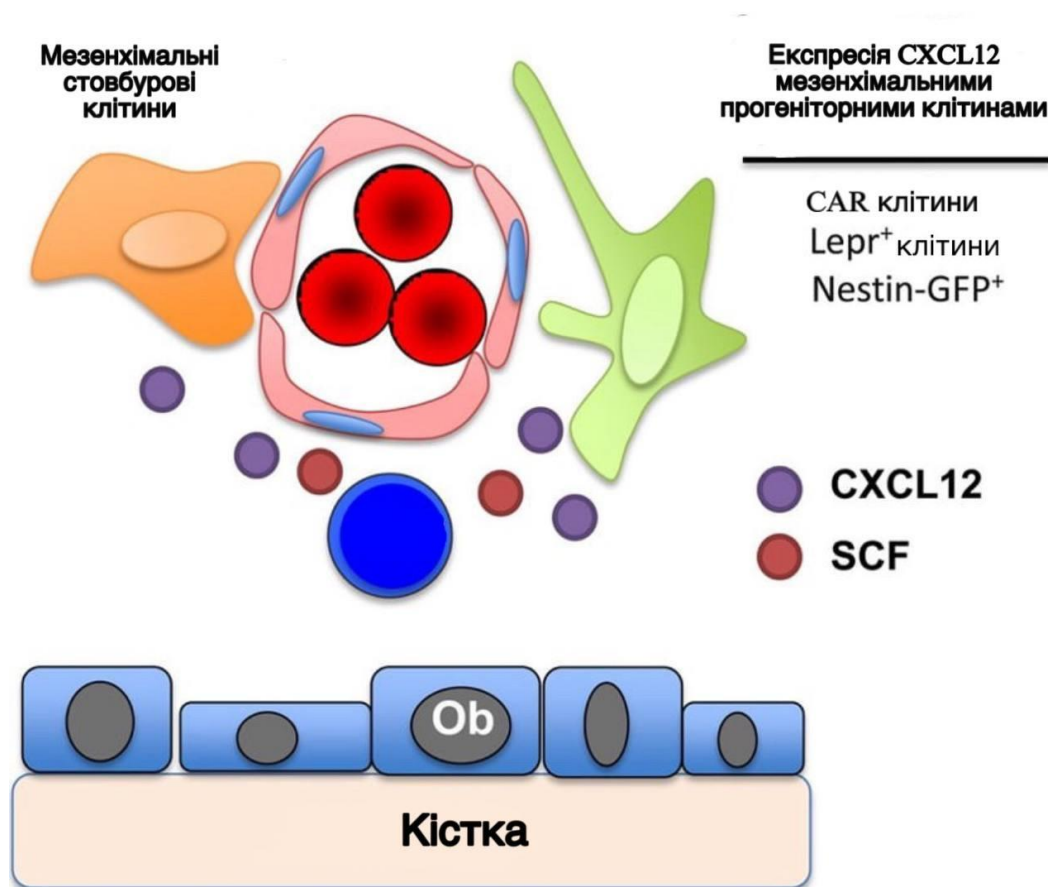


Рис. 1.2. Модель ніші гемопоетичних стовбурових клітин.

Адаптовано з [8]

Ще один важливий компонент – фактор стовбурових клітин, який забезпечує підтримку прогеніторних клітин. Важливо зазначити, що МСК беруть участь у формуванні ГСК-ніші ще на етапі пренатального розвитку [9,10].

Також, було доведено, що МСК відіграють важливу роль у підтримці ГСК у недиференційованому стані, функціонуючи як живильне мікросередовище. МСК секретують широкий спектр цитокінів і факторів росту, які сприяють збереженню ГСК у недиференційованому стані та підтримують їх життєздатність. Це забезпечує стабільне функціонування

гемопоетичної системи. До таких регулюючих факторів належать IL-6, Flt3-L, SCF, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, TPO, CXCL12 (SDF1) та IL-11 [11]

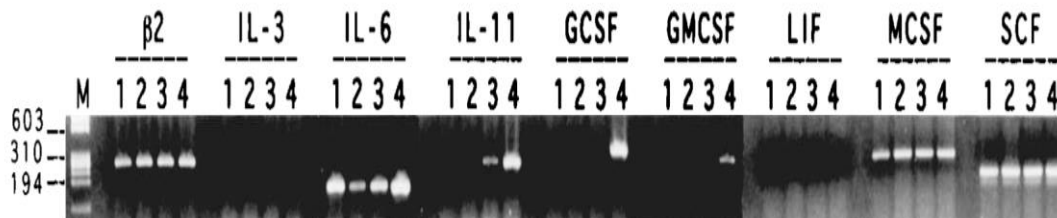


Рис. 1.3. Експресія генів гемопоетичних цитокінів виділених з мезенхімальних стовбурових клітин. [11]

Цей регулюючий вплив МСК запобігає неконтрольованому диференціюванню ГСК, що може призводити до старіння або загибелі клітин. Завдяки взаємодії стовбурових клітин з їх мікрооточенням, МСК виступають важливими інгібіторами надмірного диференціювання, забезпечуючи збереження життєздатного пулу гемопоетичних клітин та їх ефективну регенерацію.

Таким чином, роль МСК виходить за межі структурної підтримки: вони є активними учасниками регуляції кровотворення, забезпечуючи рівновагу між проліферацією, диференціюванням і виживанням ГСК.

1.2. Мієлодиспластичні синдроми: патогенез і клінічна характеристика

1.2.1. Порівняльний аналіз класифікацій мієлодиспластичних синдромів.

Мієлодиспластичні синдроми (МДС) – це група клональних гематологічних розладів, які характеризуються неефективним гемопоезом, гіперклітинністю кісткового мозку, дисплазією кров'яних клітин та цитопеніями [1,12].

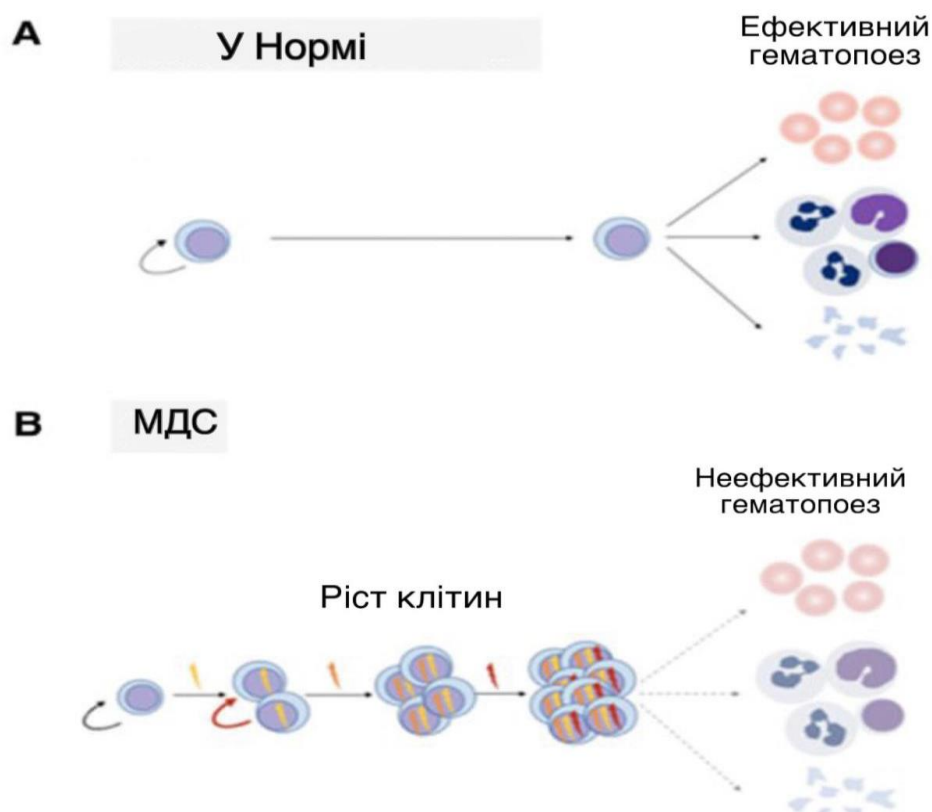


Рис. 1.4. Механізм диференціації ГСК: А – у нормі, Б – за МДС.

Адаптовано з [12]

У більшості випадків МДС діагностують у пацієнтів у віці від 60 до 70 років. МДС є фактором ризику розвитку гострого мієлоїдного лейкозу, який може виникнути у 10-15% пацієнтів із цим синдромом [13,14].

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) класифікує мієлодиспластичні синдроми (МДС) як кілька окремих груп захворювань, які відрізняються за морфологічними ознаками кісткового мозку та периферичної крові. До таких ознак належать вміст бластів, наявність кільцеподібних сидеробластів, ступінь дисплазії, цитопенії та цитогенетичні зміни [15,16]. Для оцінки ризику розвитку і прогресування МДС використовують різні системи стратифікації, зокрема метафазну

цитогенетику. Часто при цьому виявляють делецію довгого плеча 5-ї хромосоми (5q), яка у деяких формах МДС асоціюється з більш сприятливим перебігом захворювання. Водночас делеція ділянки 7q вважається несприятливим прогностичним фактором і часто супроводжує агресивні варіанти МДС, наприклад, рефрактерну анемію з підвищеною кількістю бластів. Ще однією частою хромосомною аномалією є трисомія 8, яка також зустрічається при МДС, особливо при хронічному мієломоноцитарному лейкозі.

У 2022 році з'явилися оновлені класифікації мієлодиспластичних синдромів — International Consensus Classification (ICC) і п'ята редакція класифікації ВООЗ. Відповідно до цих класифікацій усі варіанти МДС розглядаються як мієлодиспластичні неоплазії, які характеризуються наявністю цитопенії та морфологічних порушень у клітинах [17,18]. Пацієнтів тепер поділяють на дві основні категорії - з генетично визначеними аномаліями та з морфологічними особливостями [19]. До першої належать форми МДС із низьким рівнем бластів, що супроводжуються ізольованою делецією 5q, мутацією SF3B1 або біалельною інактивацією TP53 [20, 43]. Друга категорія включає форми, що визначаються за морфологічними ознаками, такі як МДС із низьким вмістом бластів, гіпопластичний МДС, МДС із підвищеним вмістом бластів та МДС із фіброзом [19, 21].

Оновлення класифікації відображають зростаюче значення генетичних характеристик при диференціації типів МДС, на відміну від традиційних морфологічних ознак, які раніше широко застосовувалися для оцінки ризику, зокрема кількості бластів, наявності кільцевих сидеробластів і ступеня дисплазії [19]. Водночас для прогнозування перебігу хвороби використовують більш комплексні інструменти, зокрема IPSS-R (Revised International Prognostic Scoring System) [22,23]. Визначення типу мієлодиспластичного синдрому на основі генетичних і молекулярних

особливостей має ключове значення для вибору терапії та прогнозування перебігу хвороби [15]. Імовірно, що майбутні класифікації будуть зосереджені переважно на генетичних порушеннях, однак морфологічні характеристики збережуть свою роль як відображення фенотипових проявів генетичних аномалій.

1.2.2. Клінічна характеристика МДС та методи лікування. Мієлодиспластичний синдром характеризується значною клінічною варіабельністю. У близько п'ятої частини пацієнтів захворювання може протікати без клінічно виражених симптомів, що ускладнює своєчасну діагностику на ранніх стадіях. Симптоматика МДС тісно пов'язана з ураженням конкретних паростків кровотворення [24].

Найчастіше уражається еритроїдний ряд, що спостерігається приблизно у 70% випадків і призводить до розвитку анемії. Клінічно це проявляється загальною слабкістю, швидкою втомлюваністю, задишкою, зниженням працездатності та толерантності до фізичних навантажень, блідістю шкіри, стенокардією, головокружінням. У деяких пацієнтів можуть виникати когнітивні порушення й емоційна лабільність без очевидної причини [25, 45].

У випадках нейтропенії відзначається підвищена схильність до інфекцій, зокрема бактеріального та грибового походження. Важливою клінічною особливістю є їхня резистентність до стандартної антимікробної терапії. Часто зустрічаються гінгівіти, а серед причин інфекційної смертності провідне місце займає пневмонія, яка, за даними деяких джерел, становить до 40% усіх летальних випадків інфекційного генезу при МДС. Крім того, шкірні покриви залишаються однією з найчастіших локалізацій інфекційного процесу [27, 44]. Зменшення кількості тромбоцитів зумовлює геморагічний синдром. У клінічній картині домінують спонтанні крововиливи - петехії, синці, кровотечі з ясен і носа. У важчих випадках

можливі внутрішні кровотечі - шлунково-кишкові, маткові, ниркові та навіть легеневі, що значно підвищує ризики ускладнень. Інші клінічні ознаки, такі як гепатомегалія та спленомегалія, зустрічаються рідше й не є типовими для початкових стадій [26, 27].

Особливу увагу привертає автоімунна складова захворювання. Приблизно у 10-20% пацієнтів з МДС діагностуються супутні автоімунні порушення. Згідно з даними американської бази Medicare, серед найчастіших супутніх патологій фігурують хронічна ревматична хвороба серця (7%), ревматоїдний артрит (6%), перніціозна анемія (6%), а також псоріаз і ревматична поліміалгія (по 2% відповідно). Це підкреслює важливість мультидисциплінарного підходу до ведення пацієнтів з МДС та необхідність ретельного обстеження на предмет супутніх імунозалежних захворювань [28].

Серед основних методів лікування мієлодиспластичного синдрому ключове місце займає алогенна трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин [29]. Вона є єдиним варіантом, що потенційно може призвести до повноговиліковування. Однак цей підхід не завжди придатний для пацієнтів літнього віку через супутні ризики.

Широко використовуються також препарати, що стимулюють ріст клітин крові, зокрема еритропоетин і гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор [29].

Досить ефективними виявилися гіпометилуючі засоби, такі як азацитидин, імуномодулюючі ліки, а також заходи підтримуючої терапії: переливання еритроцитарної маси з паралельним застосуванням препаратів для хелатування заліза, а також тромбоцитарних трансфузій [30, 31].

Останні дослідження показали, що гіпометилувальні препарати, зокрема азацитидин (AZA), можуть модулювати транскрипційні профілі BM-MSCs, отриманих від пацієнтів із МДС [32, 42, 54]. Зокрема, AZA впливає на експресію генів, пов'язаних із сигнальними шляхами

інтерферону-гамма (IFN- γ) та взаємодією з рецепторами позаклітинного матриксу. Така регуляція може пояснити підвищену здатність оброблених AZA BM-MSCs підтримувати здорові гемопоетичні стовбурові клітини (HSPCs), надаючи перевагу їм над патологічними HSPCs пацієнта. Також встановлено, що AZA підвищує рівень експресії інгібітора серинових протеаз SPINT2 (HAI-2), який блокує активацію фактора росту гепатоцитів (HGF).

Інший препарат – децитабін - також схвалений для лікування МДС і діє шляхом деметилювання [54]. Експериментальні дослідження показали, що після обробки децитабіном BM-MSCs пацієнтів з МДС демонстрували зменшення частки клітин у фазах G0/G1 циклу клітинного поділу. Це супроводжувалося зниженням експресії гена CDKN1A, який кодує інгібітор циклічно-залежних кіназ. Крім того, під дією децитабіну зменшувалась здатність BM-MSCs індукувати перетворення Т-клітин у регуляторні Т-клітини, що було пов'язано зі зниженням експресії гена PD-L1.

Ще один інноваційний засіб — луспATERCEPT, що належить до класу препаратів, які нейтралізують ліганди суперродини TGF- β , знижуючи активацію SMAD2/3 [42]. При МДС активація цих факторів порушує еритроїдне дозрівання. ЛуспATERCEPT не тільки поліпшує еритропоез, а й діє на BM-MSCs: знижує активацію SMAD2/3, стимулює секрецію CXCL12 і підвищує адгезію та колонієутворення нормальних HSPCs, а також експресію їх рецептора CXCR4.

Незважаючи на те, що жоден з вищезазначених методів не гарантує повного одужання, вони дозволяють суттєво покращити якість життя пацієнтів, зменшуючи прояви цитопенії та уповільнюючи перебіг захворювання.

Анемія є найпоширенішою формою цитопенії при МДС, і її досить успішно коригують препаратами, які стимулюють утворення еритроцитів. Інгібітори ДНК-метилтрансферази сприяють відновленню нормального

патерну метилювання в клітинах кровотворної системи, що дозволяє стримувати трансформацію МДС у гостру мієлоїдну лейкемію [33]. Оскільки клітини при МДС мають тенденцію до швидкого поділу та підвищеної активності теломерази, перспективним виявився іметелстат – препарат, що блокує теломеразну активність [34].

Мієлодиспластичний синдром характеризується складною патофізіологією, що відкриває широкий спектр можливих терапевтичних мішеней. За останні роки значного розвитку набули моделі для доклінічного дослідження МДС, що дозволило детальніше вивчити механізми розвитку хвороби й визначити перспективні мішені в клітинах-попередниках для подальшого таргетного лікування [35].

1.2.3. Роль мікрооточення кісткового мозку в розвитку МДС.

Мікрооточення кісткового мозку виконує ключову роль у регуляції роботи гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) та складається з МСК, остеобластів, ендотеліальних клітин, а також з позаклітинного матриксу. У нормі мікрооточення КМ забезпечує підтримку гомеостазу та ефективне функціонування гемопоезу [36]. Проте, при мієлодиспластичному синдромі відзначаються якісні зміни в мікрооточенні, насамперед у мезенхімальних стромальних клітинах (МСК). Водночас з'являються дані про те, що у МСК за МДС фіксують порушення в роботі ключових сигнальних шляхів, зокрема РІЗК/АКТ і WNT/ β -катеніну, а також змінену експресію білків, відповідальних за адгезію клітин. [37].

Сигнальний шлях Wnt є критичним регулятором гематопоезу, особливо на рівні гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК). До цієї родини належить дев'ятнадцять гідрофобних, багатих на цистеїн глікопротеїнів, які беруть участь у міжклітинній комунікації в кістковому мозку. Дисбаланс у цьому сигнальному каскаді асоціюється з порушенням нормального

кровотворення та розвитком гематологічних захворювань, зокрема мієлодиспластичного синдрому (МДС) та лейкозів.

Wnt-сигналізація поділяється на три основні гілки: канонічну (β -катенін-залежну), неканонічну шляхом планарної клітинної полярності (PCP) та кальцієвий шлях (Wnt/Ca²⁺). У гематопоезі найбільше значення має саме канонічний шлях. При активації цього каскаду Wnt-ліганди зв'язуються з рецепторами Frizzled та ко-рецепторами LRP5/6, що запобігає деградації β -катеніну, дозволяючи йому накопичуватись у цитоплазмі й транспортуватися в ядро. Там β -катенін взаємодіє з транскрипційними факторами родини TCF/LEF, активуючи експресію генів, які регулюють проліферацію, самовідновлення та виживання ГСК.

Баланс у рівні активації Wnt-сигналів є критичним: помірною активація сприяє збереженню стовбурових властивостей клітин, тоді як надмірна — може пригнічувати диференціювання або сприяти злоякісній трансформації. Окрім ролі в транскрипції, β -катенін також бере участь у регуляції міжклітинної адгезії, зокрема через взаємодію з E-кадгеріном, що має значення для організації гемопоетичних ніш у кістковому мозку.

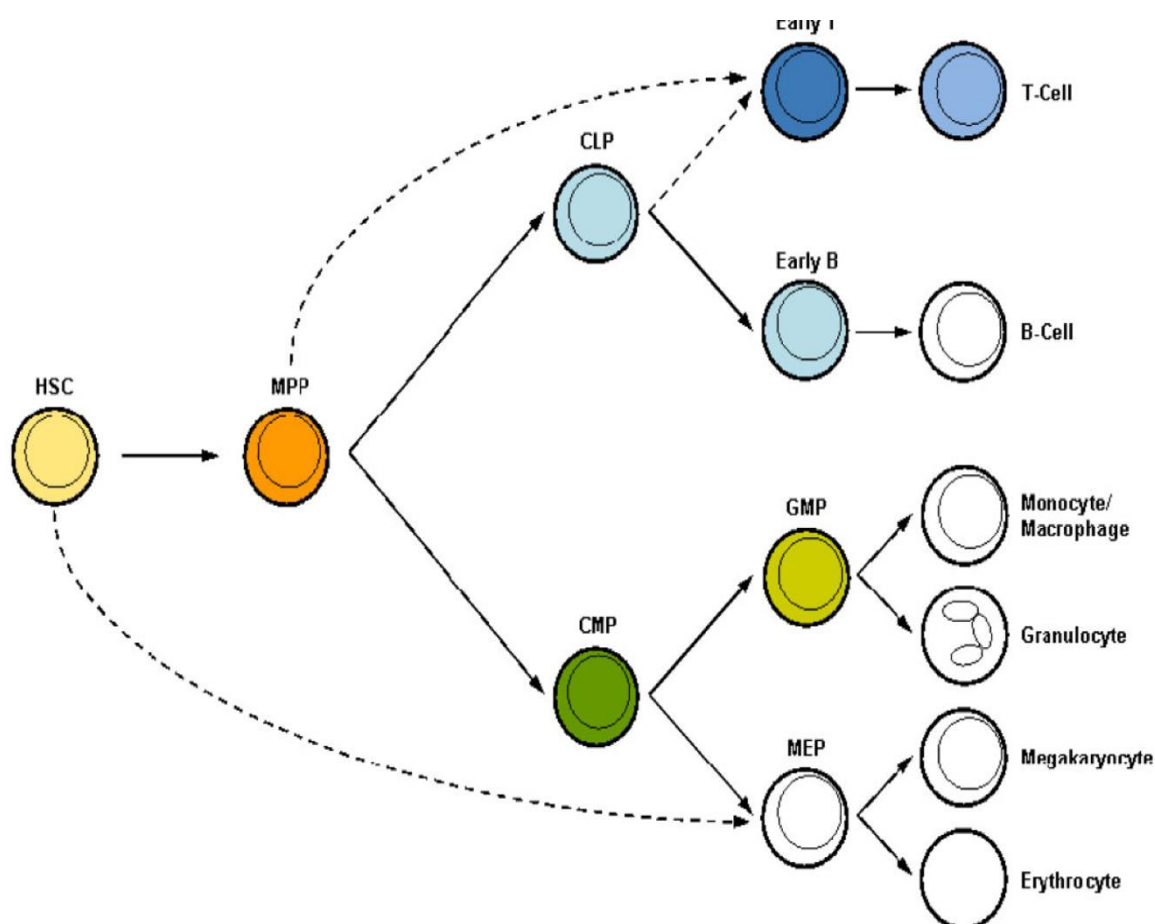


Рис 1.5. Диференціювання ГСК за участі Wnt – шляху під час гематопоезу [38, 41].

Останні дослідження свідчать, що в мезенхімальних стромальних клітинах (МСК), ізольованих від пацієнтів із мієлодиспластичним синдромом (МДС), спостерігаються порушення у сигнальних механізмах, зокрема у функціонуванні FAK - кінази. Цей білок відіграє ключову роль у передачі сигналів між клітиною та мікрооточенням, регулює клітинну адгезію, проліферацію, виживання, міграцію, а також процеси клітинного старіння [39, 40].

У нормальному мікрооточенні FAK також бере участь у регуляції диференціювання МСК та взаємодії між ендотеліальними клітинами й лімфоцитами. Раніше автори дослідження вже описували специфічну роль

гіперактивованого FAK у MSC при РАЕБ (рефрактерна анемія з надлишком бластів), що підтримує пухлиноподібне мікрооточення.

З огляду на дані про участь FAK у пухлинному мікрооточенні, автори припускають, що FAK і його активована форма (p-FAK Y397) можуть бути залучені до прогресії захворювання від LR-MDS до високоризикового МДС або навіть до ГМЛ (гострого мієлоїдного лейкозу).

У дослідженні Ferrer та співавт. [53] було комплексно проаналізовано функціональні характеристики мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку (BM-MSCs) у пацієнтів з мієлодиспластичним синдромом (МДС), включаючи їхню підтримку гемопоезу, експресію адгезійних молекул, секрецію регуляторних факторів та реакцію на імуномодуючий препарат леналідомід (LEN).

Результати показали, що MSC у хворих на МДС мають знижену проліферативну активність і змінений імунний фенотип, що відрізняється залежно від підтипу та стадії захворювання. LR- та HR-MSC демонстрували знижену експресію CD44 і CD49e, що негативно впливало на їхню взаємодію з гемопоетичними клітинами. Натомість MSC із підтипом 5q- виявляли підвищену експресію адгезійних молекул (CD44, CD49e, CD54, CD146), що, ймовірно, є адаптивною реакцією на порушення мікрооточення.

Крім того, MSC при МДС мали знижений адипогенний потенціал і змінену секрецію ключових цитокінів і факторів підтримки гемопоезу, зокрема SDF-1 α , SCF та Angiopoietin-1, що свідчить про порушення функції «ніші» кісткового мозку. У ко-культурах із нормальними CD34⁺ клітинами та лейкемічною лінією KG1a MSC продемонстрували здатність стимулювати проліферацію обох типів клітин. Однак при додаванні TNF- α

апоптоз значно активніше індукувався в лейкемічних клітинах, ніж у нормальних, що вказує на потенційну терапевтичну вразливість.

Вплив леналідоміду на MSC виявився переважно непрямим: препарат не впливав на ріст, життєздатність або диференціацію MSC, однак знижував секрецію SDF-1 α , що може послаблювати утримання злоякісних клітин у мікрооточенні та покращувати ефективність інших терапій.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика об'єкта дослідження

Об'єктом дослідження були зразки кісткового мозку, вилучені у 7 пацієнтів із мієлодиспластичним синдромом, а саме МДС – ІВ (з надлишком бластів). Як контроль використовували зразки кісткового мозку отриманих від 1 пацієнта без гематологічних патологій. Під час забору кісткового мозку для дослідження критично важливо було отримати 1 мл зразка, оскільки подальші порції можуть містити домішки крові, що може негативно вплинути на результати аналізу.

Після забору кістковий мозок поміщали у пробірку з культуральним середовищем DMEM, збагаченим 10% гепарином, що запобігало згортанню крові та агрегації клітин. Зразки піддавали обережному прокручуванню, уникаючи струшування, оскільки утворення піни може спричинити руйнування клітин. Транспортування до лабораторії здійснювали у термосумці за температури 0°C. Подальше дослідження проводили протягом години після забору зразків.

2.2. Реактиви, розчини, середовища та обладнання, що були використані у роботі

Під час виконання роботи було використано такі реактиви:

- неорганічні сполуки: перекис водню 3% (ТОВ Фармацевтична фабрика, Україна), фізіологічний розчин 0,9%, 500 мл (Нemofarm hospitalLogica, Сербія), 3%-ий розчин хлориду натрію (ТОВ Фармацевтична фабрика, Україна),

- органічні сполуки: етиловий спирт 96% (Сановет, Україна), Historaque (Sigma, США), масло емерсійне кедрове 100 мл (Cargille, США), барвник Май-Грюнвальда (Sigma, США), основний барвник Романовського-Гімза (Sigma, США), ГМ-КСФ 40 нг/мл (Біофарм, Україна), антибіотики (пеніцилін (Київмедпрепарат, Україна) та стрептоміцин (Київмедпрепарат, Україна)), L-глутамін (Sigma, США).

Під час виконання роботи було використано таке обладнання: камера Горяєва (ПАО «Склоприлад», Україна), інвертований світловий мікроскоп (Olympus SK-2, Японія), прямий світловий мікроскоп (Leica DMRB, Німеччина), цитоцентрифуга Cytospin (Shandon, США), цифровий фотоапарат (Canon400D , Японія), витяжна шафа (Labcaire, США), CO₂ – інкубатор (LEEC, Велика Британія), культуральні флакони (Хімлаборреактив, Україна).

Для культивування ГСК та МСК кісткового мозку у роботі використовували живильні середовища такого складу:

- середовище ДМЕМ з високим вмістом глюкози, L-глутаміном з додаванням антибіотиків (пеніциліну, стрептоміцину) та 20% вмістом фетальної бичачої сироватки (ФБС).

2.3. Отримання фракції мононуклеарів кісткового мозку

Для отримання фракції мононуклеарів проводили градієнтне центрифугування із використанням Historaque (Sigma, США). Препарат кісткового мозку ресуспендували у 3 мл фосфатного буфера (PBS) з метою зниження його щільності. Отриману суспензію вносили семплером вздовж

стілки пробірки з 3 мл Histopaque (Sigma, США), дотримуючись кута 45°, щоб уникнути перемішування. Пробірки зі зразком центрифугували протягом 30 хвилин при 750 об/хв. У результаті утворювалися чітко розмежовані шари: осад еритроцитів у нижній частині пробірки, над ним – прозора плазматична фракція з фізіологічним розчином. Верхній шар представлений залишками Histopaque. Між плазматичною фракцією та Histopaque утворюється мутнувате кільце, що містить мононуклеарні клітини. Фракцію мононуклеарів обережно відбирали за допомогою семплера та переносили у стерильну пробірку. Після чого, для видалення залишків Histopaque, клітини тричі промивали 4 мл фізіологічного розчину із наступним центрифугуванням протягом 10 хвилин при 650 об/хв.

2.4. Оцінка кількісних характеристик клітин кісткового мозку

До мононуклеарів додавали 1000 мкл живильного середовища, ресуспендували для досягнення однорідної суспенсії. Щоб визначити кількість мононуклеарів, 10 мкл отриманої суспензії з живильним середовищем вводили у камеру Горяєва. Підрахунок здійснювали під інвертованим мікроскопом, аналізуючи клітини у п'яти діагонально розташованих квадратах.

Тоді, наступні розрахунки кількості клітин в 1 мл суспензії проводили за формулою (2.1) :

$$N = \frac{a \cdot 1000}{0,004} = a * 250000 \quad (2.1)$$

де: а – кількість клітин отримана в 1 квадраті; 1000 - коефіцієнт перерахування мм³ у мл.

2.5. Отримання моношару з мезенхімальних стовбурових клітин

Для отримання моношару з МСК, на початковому етапі експлантації клітини суспензії у концентрації 1×10^7 монокулеарів висівали на поверхню культурального флакону (Хімлаборреактив, Україна), що дозволяло прикріплюватися тим, які мають адгезивні властивості. Через 24 години супернатант із неадгезованими клітинами видаляли та замінювали свіжим середовищем аналогічного складу. Подальшу заміну середовища здійснювали кожні 72 години, оновлюючи половину об'єму супернатанту. Процес культивування тривав до утворення первинного моношару, що зазвичай спостерігалось на 6-7-й день – для контролю і на 10-14-й день для МДС-ІВ.

2.6. Культивування ГСК у напіврідкому агарі

2.6.1. Культивування ГСК у напіврідкому агарі з використанням GM-CSF. Після отримання фракції мононуклеарів проводили культивування клітин у напіврідкому агарі. У лунки, розташовані навколо експериментальних, додавали стерильний фізіологічний розчин для запобігання висиханню зразка. У центральні лунки 24-лункового планшету (Nunc, Німеччина), вносили суспензію наступного складу: культуральне середовище DMEM, що містило 20 % фетальної телячої сироватки, L-глутамін (Sigma, США), а також антибіотики пеніцилін (Київмедпрепарат, Україна) та стрептоміцин (Київмедпрепарат, Україна). До культурального середовища додавали гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (ГМ-КСФ) (Біофарм, Україна), попередньо розведений у стерильному фізіологічному розчині до кінцевої концентрації 40 нг/мл та суспензію клітин у концентрації 1×10^5 мононуклеарів.

Напіврідке середовище готували з використанням бактоагару (Difco, США), вихідна концентрація якого становила 3,3 %, із подальшим розведенням до 0,033 %. Планшет розміщували в CO₂-інкубатор (LEEC, Велика Британія) за умов 100 % вологості, 5 % концентрації CO₂ та температури 37 °С.

2.6.2. Паралельне культивування ГСК у напіврідкому агарі з використанням супернатанта з МСК-культури чи ГМ-КСФ. Паралельно проводили культивування ГСК з додаванням середовища, вилученого після культивування МСК, в першому випадку, і ГМ-КСФ – у другому.

Супернатант, вилучений з культур МСК на 6-7-й день культивування у контролі і на 10-14-й день при МДС-ІВ, поміщали в лунки 24-лункового планшету з розрахунку на кожний варіант 4 лунки з живильним середовищем. Концентрація клітин складала 1×10^7 . Супернатант додавали до живильного середовища до внесення напіврідкого агару у об'ємі 100 мкл, 150 мкл, 200 мкл і 250 мкл з розрахунку, що загальний об'єм живильного середовища повинен дорівнювати 500 мкл. Далі додавали гемопоетичні клітини у концентрації 1×10^5 . Останнім у середовище занурювали 0,33% напіврідкий агар фірми Difco, США. Таким чином, досягали отримання культур з підростаючою концентрацією стимулюючого агенту. У другому варіанті культур до живильного середовища додавали ГМ-КСФ у об'ємі 100 мкл, у концентрації 40 нг, теж у 4 лунки. Концентрація клітин була така ж сама 1×10^5 . Культури інкубували в CO₂-інкубаторі (LEEC, Велика Британія) (5 % CO₂, 37 °С, 100 % вологість). Загальна тривалість культивування дорівнювала 14 діб. Морфологію клітин оцінювали за допомогою інвертованого мікроскопа. (Olympus SK-2, Японія).

2.7. Статистична обробка результатів

Статистична обробка отриманих даних включала розрахунок основних параметрів:

Відповідність отриманих даних нормальному розподілу перевіряли за допомогою критерію Шапіро-Вілка, який розраховували за формулою 2.2:

$$W = \frac{b^2}{(n-1)*S^2} \quad (2.2)$$

, де W - значення критерію Шапіро-Вілка, b – коефіцієнт, S^2 – сума квадратів відхилення значень вибірки від середнього арифметичного, n – об'єм вибірки.

Якщо отримане значення критерію було меншим за табличне, розподіл вважали відмінним від нормального.

Для встановлення різниці між колонієутворюючою здатністю ГСК з додаванням в якості ростового фактора GM-CSF та середовища отриманого після культивування МСК застосовували t-критерій Стьюдента за формулою 2.3.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s^2}{n_1} + \frac{s^2}{n_2}}} \quad (2.3)$$

, де t – значення критерію Стьюдента; \bar{x} – значення вибіркового середнього; s^2 – об'єднана оцінка дисперсії, n – обсяг вибірки.

Розрахунки здійснювали на рівнях значущості 0,01 та 0,05.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка якісного та кількісного складу клітин виділених у хворих на МДС

Препарати кісткового мозку готували з матеріалу, отриманого від 7 пацієнтів із МДС-ІВ. Як контроль використовувався зразок від одного донора без порушень системи крові. Після фіксації та забарвлення, препарати аналізували під світловим мікроскопом (Leica DMRB, Німеччина) при збільшенні $\times 900$.

У зразку контролю переважали зрілі клітини всіх ліній кровотворення, а вміст бластів був незначним. Частка бластних клітин становила приблизно 1,3%, кількість мієлобластів — 0,4%, мієлоцитів — 14,8%, метамієлоцитів — 17,1%, паличкоядерних нейтрофілів — 20,9%, сегментоядерних нейтрофілів — 21,5%, лімфоцитів — 6,1%, моноцитів — 1,4% (табл. 3.1).

У хворих на МДС-ІВ структура кісткового мозку мала варіативний характер: у п'яти пацієнтів відзначалася гіперпластична форма, у двох — гіпопластична. У всіх випадках спостерігалось порушення дозрівання клітин мієлоїдного ряду. Частка бластних форм сягала до 4,8%, що вказує на підвищену проліферативну активність. У клітинах як незрілих, так і зрілих нейтрофільного ряду виявлялися морфологічні аномалії.

Таблиця 3.1.

Показники кісткового мозку пацієнтів з мієлодиспластичним синдромом порівняно з контролем

Клітинні елементи	МДС – ІВ (n = 7)	Контроль (n = 1)
Паличкоядерні нейтрофіли, %	11,1 ± 1,3	3,4 ± 0,6
Сегментоядерні нейтрофіли, %	36,9 ± 6,8	66,7 ± 6,1
Лімфоцити, %	40,4 ± 3,1	25,1 ± 4,7
Моноцити, %	15,8 ± 3,0	4,2 ± 1,2
ШОЕ, мм/год	45,1 ± 8,3	3,6 ± 1,5

Статистично достовірна різниця порівняно з контрольною групою, $p < 0,05$

Отримані результати свідчать про значущі зміни у клітинному складі кісткового мозку пацієнтів з МДС-ІВ. Зокрема, спостерігається суттєвий дисбаланс між різними стадіями диференціації нейтрофілів: зменшення відсотка сегментоядерних нейтрофілів на тлі збільшення кількості паличкоядерних свідчить про порушення нормального процесу дозрівання мієлоїдних клітин. Такі зміни характерні для порушень функціональної активності мієлоїдного ростка, що є одним із патогенетичних механізмів мієлодиспластичного синдрому.

Крім того, підвищений вміст моноцитів і лімфоцитів може бути маркером активізації запальних та імунних процесів у кістковому мозку, що часто супроводжує деструктивні зміни в гемопоезі при МДС.

Аналогічні результати були отримані у дослідженні Yannick Simon [46, 50]. Зокрема, дослідження показало, що в кістковому мозку пацієнтів з МДС спостерігається підвищена кількість моноцитів, що може бути пов'язано з порушенням їх здатності до диференціації та функціональної активності. Також виявлено, що лімфоцити в кістковому мозку пацієнтів з МДС можуть мати аномалії в експресії поверхневих маркерів, що свідчить про порушення їх функції.

3.2. Порівняльна характеристика морфологічних і функціональних особливостей стовбурових клітин пацієнтів хворих на МДС, вирощених у культурі *in vitro*

3.2.1. Оцінка колонієутворюючої активності гемопоетичних стовбурових клітин у пацієнтів із мієлодиспластичним синдромом у присутності GM-CSF. Для оцінки функціонального потенціалу гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) у пацієнтів із МДС-ІВ було проведено аналіз колонієутворюючої активності в умовах *in vitro* за наявності гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулювального фактора (GM-CSF). ГСК культивували у напіврідкому середовищі, після чого підраховували кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) на 10^5 клітин. В якості контролю оцінювали зразки отримані від 1 пацієнта без патології (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Колонієутворююча активність ГСК при МДС - ІВ культивованих у середовищі з додаванням GM-CSF *in vitro*

Пацієнт	Кількість колонієутворюючих одиниць (КУО/10 ⁵ клітин)			Середнє значення (КУО/10 ⁵ клітин)	Контроль (КУО/10 ⁵ клітин) (n = 1) 1 повтор - 34,0 2 повтор - 35,0 3 повтор - 33,0 34,0±2,1
	1 повтор	2 повтор	3 повтор		
1	7	4	12	7,7±4,0	
2	5	4	6	5,0±1,0	
3	3	6	10	6,3±3,5	
4	5	2	4	3,7±1,5	
5	9	5	6	6,7±2,1	
6	15	11	9	11,7±3,1	
7	12	9	10	10,3±1,5	

У ході проведеного дослідження, колонієутворююча активність в усіх пацієнтів з МДС виявилася нижчою за контрольні значення (табл. 3.2).

Результати дослідження показали, що середні значення КУО у пацієнтів із мієлодиспластичним синдромом (МДС) варіювали в межах від 3,7±1,5 до 11,7±3,1 КУО/10⁵ клітин. Натомість усі отримані показники були суттєво нижчими за значення контрольної групи (34 КУО/10⁵ клітин).

Зокрема, найвищу колонієутворюючу здатність продемонстрували клітини пацієнта № 6 (11,7±3,1 КУО/10⁵ клітин). Незважаючи на знижений рівень у порівнянні з контролем, це значення є відносно високим серед

інших зразків і вказує на часткове збереження функціональної активності ГСК. Аналогічну тенденцію було виявлено у пацієнтів №7 ($10,3 \pm 1,5$ КУО/ 10^5 клітин) та №1 ($7,7 \pm 4$ КУО/ 10^5 клітин), що може свідчити про менш агресивний характер захворювання. Різниця у порівнянні з контролем статистично значуща ($p \leq 0,05$).

Натомість, найнижчі значення колонієутворення спостерігались у пацієнтів №4 ($3,7 \pm 1,5$ КУО/ 10^5 клітин) та №2 ($5,0 \pm 1,0$ КУО/ 10^5 клітин). У порівнянні з іншими дослідженими зразками, активність ГСК у цих пацієнтів була в 2,1 - 3,1 рази нижчою, ніж у пацієнта №6, і майже в 7 - 9 разів нижчою, ніж у контрольної групи, що вказує на глибоке порушення проліферативного потенціалу клітин кровотворення. Різниця у порівнянні з контролем статистично достовірна ($p \leq 0,05$). Імовірно, це є ознакою більш тяжкого та прогресуючого перебігу МДС у цих хворих.

На підставі проведеного аналізу встановлено, що колонієутворююча активність гемопоетичних стовбурових клітин пацієнтів з мієлодиспластичним синдромом є суттєво зниженою порівняно з нормою, навіть при наявності стимуляції GM-CSF (рис.3.1). Це свідчить про порушення клітинної здатності до проліферації та диференціації, що є характерним для патогенезу МДС. Водночас виявлені індивідуальні коливання активності відображають гетерогенність клінічного перебігу захворювання та потенційні варіації у відповіді клітин на стимулюючі фактори.

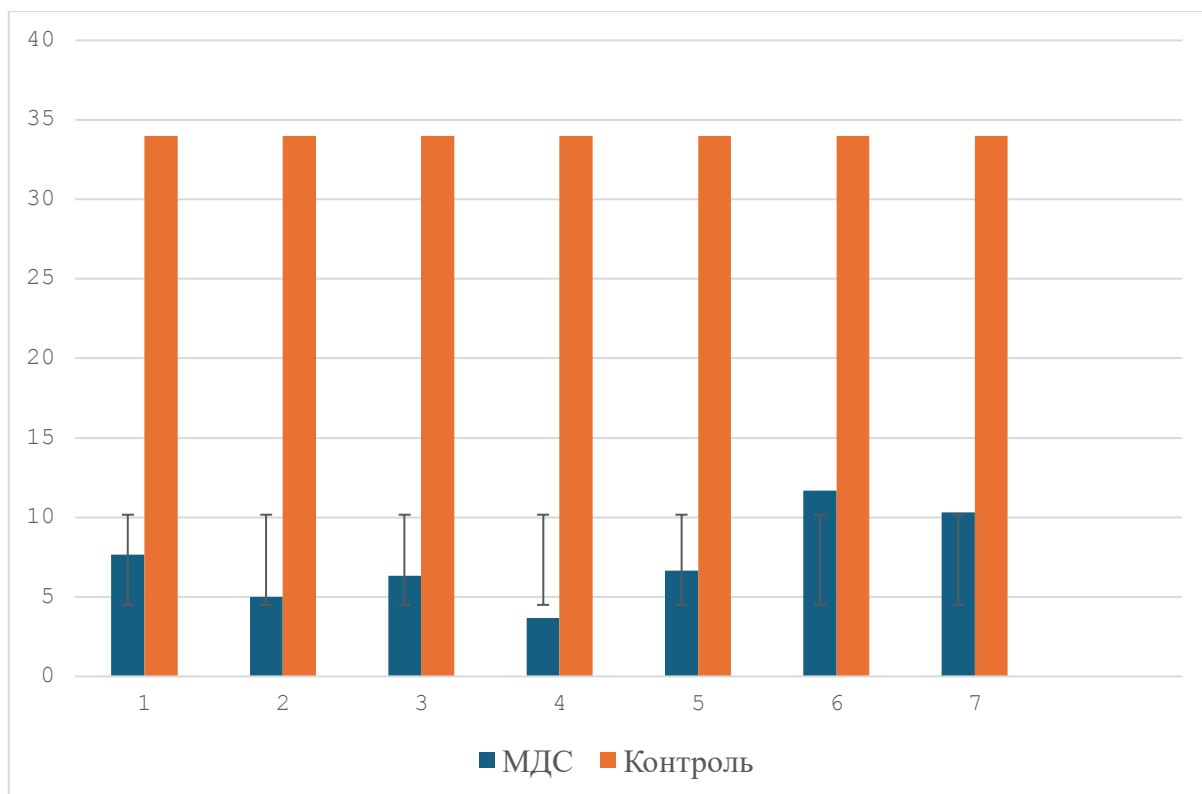


Рис. 3.1 Колонієутворююча активність ГСК при МДС, культивованих у середовищі з додаванням GM-CSF *in vitro*

Отримані дані узгоджуються з попередніми дослідженнями, зокрема з даними описаними у роботі, де також було продемонстровано порушення колонієутворення в пацієнтів з МДС, навіть за умов стимуляції гемопоєзу цитокінами, такими як GM-CSF [47]. Ці результати підтверджують гіпотезу про первинну недостатність функціонального резерву ГСК при МДС і вказують на обмежену ефективність стимуляції колонієутворення лише за допомогою GM-CSF.

Також, в ході проведеного дослідження було встановлено, що колонії, утворені з клітин кісткового мозку пацієнта без гематологічної патології, зазвичай містили від 50 до 200 клітин гранулоцитарного і моноцитарного ряду на різних стадіях диференціювання (рис. 3.2).

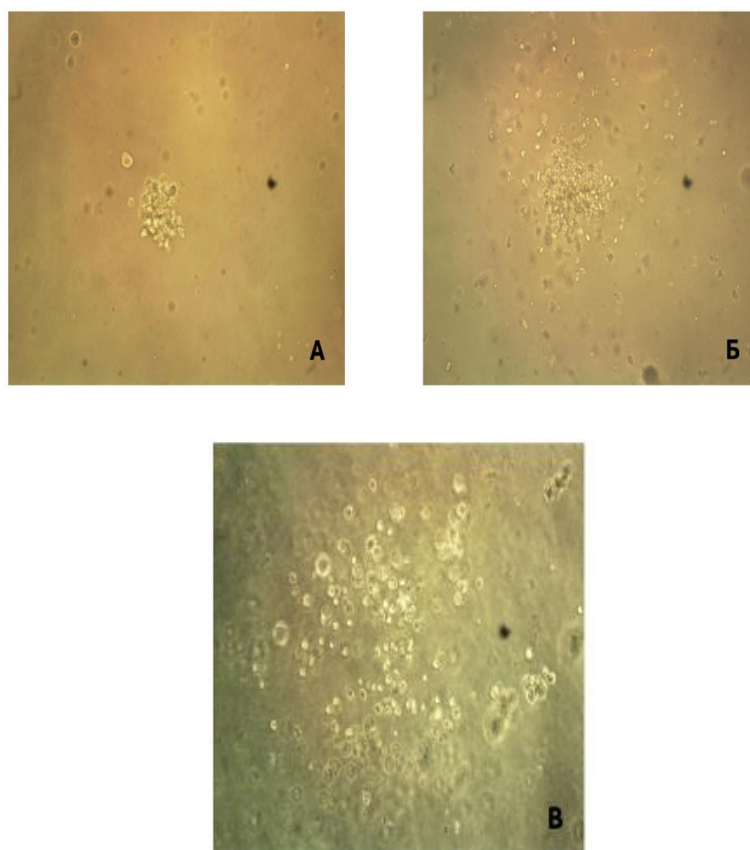


Рис. 3.2. Колонії ГСК у хворих на МДС – ІВ на 14 добу культивування: а – компактна колонія; б – змішана колонія з вінчиком; в – дифузна колонія. Збільшення, відповідно: А - x100, Б - x200, В - x400. Інвертований світловий мікроскоп.

За формою колонії поділяли на три типи: компактні, змішані та дифузні. Компактні колонії мали щільну, округлу структуру з домінуванням недиференційованих та проліферативно активних клітин гранулоцитарного ряду у центральній частині. На периферії колоній переважали зрілі форми - сегментоядерні гранулоцити та макрофаги, які утворювали чітко окреслену зовнішню зону колонії.

Змішані колонії також мали щільний центр, однак відрізнялися наявністю навколо нього зони менш щільного клітинного розміщення, що формувала своєрідний "вінчик".

Така будова відображає змінені механізми клітинної міграції й росту. На відміну від них, дифузні колонії мали менш впорядковану, розсіяну архітектоніку, без вираженого центру.

3.2.2. Морфологічні особливості МСК у пацієнтів хворих на МДС, вирощених у культурі *in vitro*. Для порівняння морфологічних особливостей мезенхімальних стовбурових клітин за МДС у порівнянні з нормою, МСК культивували у культуральних флаконах, як описано у п.2.5.

У процесі культивування МСК, отриманих із кісткового мозку хворих на мієлодиспластичний синдром, було відзначено характерну морфологію клітин, притаманну даному типу попередників сполучної тканини. На 4-у добу культивування візуалізувалися поодинокі клітини видовженої, фібробластоподібної форми, що активно прикріплювалися до донця культурального флакону. Клітини розміщувалися ізольовано одна від одної, не утворюючи щільних скупчень, що свідчить про початкову фазу колонієутворення (рис 3.3).

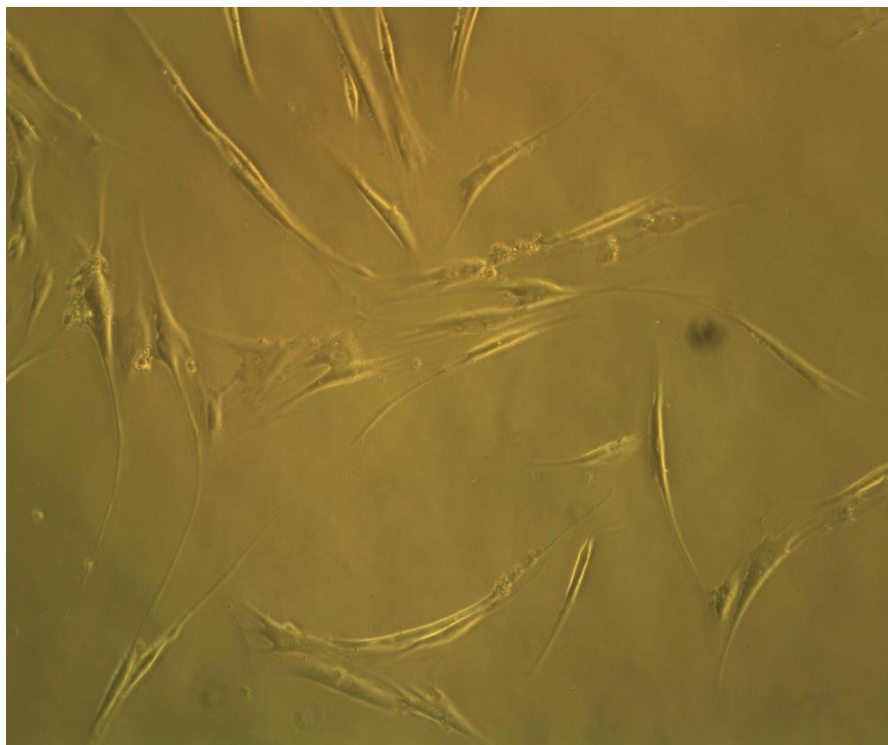


Рис. 3.3. Клітинні угруповування МСК на 4-у добу культивування у культуральних флаконах *in vitro* вилучених у хворих на МДС-ІВ. Інвертований мікроскоп. Збільшення x200.

На 14-ту добу *in vitro* культивування мезенхімальні стромальні клітини (МСК), ізольовані з кісткового мозку хворих на мієлодиспластичний синдром (МДС), формували щільний моношар, який покривав більшу частину поверхні культурального флакону. Клітини зберігали фібробластоподібну морфологію з видовженим тілом і вираженими адгезивними властивостями. Клітинні угруповування характеризувались щільним розміщенням клітин, що прилягали одна до одної та мали переважно радіальне або хаотичне розташування.

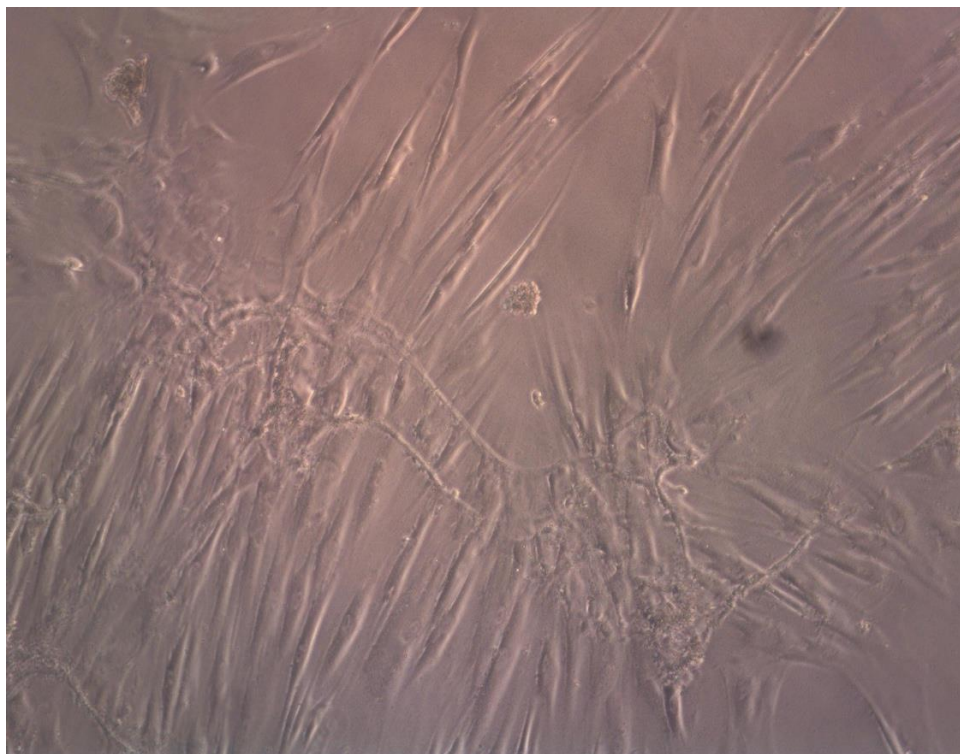


Рис. 3.4. Моношар утворений мезенхімальними стовбуровими клітинами, вилучених у хворих на МДС-ІВ на 14-у добу культивування. Інвертований мікроскоп. Збільшення x200.

Для порівняння, у контрольному зразку, отриманому від пацієнта без гематологічних захворювань, формування моношару МСК спостерігалось значно раніше - вже на 6 - 7-му добу культивування. Мезенхімальні клітини отримані у контролі також мали типовий фібробластоподібний вигляд, але характеризувалися вищим ступенем проліферативної активності, та утворювали більш впорядковані колонієподібні угруповання. Ці клітини щільно прилягали одна до одної, формуючи рівномірний та стабільний моношар, що свідчить про збережену здатність до адгезії, міграції та розмноження в культурі.

Отримані результати узгоджуються з даними інших досліджень. Зокрема, у роботі, присвяченій остеогенній диференціації мезенхімальних стовбурових клітин, було продемонстровано, що після 14 днів

культивування в умовах *in vitro* клітини утворюють щільний моношар з типовою фібробластоподібною морфологією [48,56]. Це свідчить про збереження ними характерних морфологічних ознак і функціональних властивостей, зокрема високого рівня адгезивності до поверхні культурального флакону. Формування щільного моношару також підтверджує збережену здатність мезенхімальних стовбурових клітин до проліферації та колонієутворення в умовах *in vitro*, що є важливим критерієм їхньої життєздатності та функціональної активності.

В ході дослідження було встановлено, що порівняно з контролем, у пацієнтів з мієлодиспластичним синдромом (МДС) було зафіксовано суттєве зниження проліферативної активності мезенхімальних стромальних клітин (МСК). Це зниження проявлялося у значно повільнішому темпі формування моношару клітин на культуральній поверхні, що може свідчити про порушення клітинного циклу, знижену мітотичну активність або зменшену здатність до прикріплення та розмноження.

Зниження колонієутворюючої здатності КУО-ГМ є характерною ознакою порушень мікрооточення кісткового мозку при МДС, де МСК відіграють ключову роль у підтримці гемопоетичних стовбурових клітин. Аналогічні дані подано в роботі *Zhi-Gang Zhao.*, де було показано, що МСК, ізольовані від пацієнтів з МДС, мають знижений проліферативний потенціал, що може бути наслідком передчасного клітинного старіння та змін у сигнальних шляхах, відповідальних за підтримку клітинної життєздатності та розмноження. Ці функціональні порушення можуть обмежувати відновлювальний потенціал МСК у пацієнтів із МДС та впливати на ефективність гемопоезу [49, 52, 55]

3.2.3. Оцінка ефективної дози супернатанта МСК, як стимулюючого середовища, для колонієутворення ГСК. Доведено, що МСК відіграють важливу роль у підтримці ГСК у недиференційованому стані, функціонуючи як живильне мікросередовище [56, 57]. МСК секретують широкий спектр цитокінів і факторів росту, які сприяють збереженню ГСК у недиференційованому стані та підтримують їх життєздатність. Це забезпечує стабільне функціонування гемопоетичної системи. До таких регулюючих факторів належать IL-6, Flt3-L, SCF, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, TPO, CXCL12 (SDF1) та IL-11 [11]. Отримані з супернатанту культур МСК вони зберігають свій вплив на гемопоез. В роботі не ставиться задача, якщо виділяти кожний з них, ми сприйmemo супернатант як комплекс цитокінів, тому важливо провести тестування його в культурі. В цьому разі має значення кількість посажених клітин і об'єм супернатанту, який надалі буде діяти в культурі ГСК як стимулюючий агент.

Для цього провели тестування супернатанту МСК, щоб підібрати дозу, яка б відповідала ГМ-КСФ, який є досліджений препарат, відома його концентрація, яка складає 40 мг на мл. Супернатант же можна розглядати, як активність.

Супернатант, вилучений з культур МСК на 14-й день культивування, поміщали в лунки 24-лункового планшету з живильним середовищем і 0,33% напіврідким агаром у об'ємі 100 мкл, 150 мкл, 200 мкл і 250 мкл з розрахунку, що об'єм живильного середовища повинен дорівнювати 500 мкл. Кожного разу, коли до середовища додавали супернатант, об'єм середовища зменшували, враховуючи об'єм (супернатанта, тобто у контролі середовища брали 500 мкл, при наданні 100 мкл супернатанту додавали 400 мкл середовища, у другому випадку – 350 мкл, у третьому 300 мкл, у четвертому - 250 мкл. А після цього вводили гемопоетичні клітини

здорової особи і останнім додавали агар. Таким чином, досягали отримання культур з підростаючою концентрацією стимулюючого агенту.

Результати аналізу показали, що колонієутворення у першому випадку не відбувалося у зв'язку з відсутністю стимулу. У другому випадку КУО-ГМ дорівнювала $4,8 \pm 0,7$, у третьому – $5,8 \pm 1,2$, у третьому – $6,3 \pm 1,5$ і у четвертому $6,6 \pm 1,8$. В зв'язку з тим, що четвертий варіант статистично не відрізнявся від третього, за основу брали третій варіант, який, не збільшуючи об'єму супернатанту, призводить до результатів, аналогічних концентрації ГМ-КСФ фактора, який звичайно вноситься у культуру для отримання колонієутворення грануломоноцитарними клітинами-попередниками.

3.2.4. Культивування ГСК у напіврідкому агарі з використанням супернатанта з МСК-культури з кісткового мозку здорової людини і хворих на МДС паралельно з ГМ-КСФ.

Після тестування супернатанта паралельно проводили культивування ГСК з додаванням середовища, вилученого після культивування МСК чи з внесенням ГМ-КСФ.

Експеримент проводився таким чином. У 24-лунковому планшеті виділяли 16 лунок: 4 – для культури гемопоетичних клітин з додаванням супернатанту від культур МСК донора (200 мкл), 4 лунки - з супернатантом, вилученим з культури МСК хворого на МДС-ІВ (200 мкл), 4 – з ГМ-КСФ (100 мкл) і 4 – без додавання цитокінів. Суспензію для культивування ГСК готували в такому складі: 0,033% агар, клітини кісткового мозку у концентрації 1×10^5 мононуклеарів, культуральне середовище DMEM. У перші 4 лунки додавали ГМ-КСФ у об'ємі 100 мкл з активністю 40 нм, у наступні 4 лунки додавали середовище, отримане після культивування МСК донора у об'ємі 200 мкл і у 4 лунки додавали супернатант, отриманий від хворого на МДС у такому ж об'ємі. В останні 4

лунки додавали 500 мкл середовища і культивували без факторів. Клітини інкубували в CO₂-інкубаторі (LEEC, Велика Британія) за умов 5 % CO₂, 37 °С, 100 % вологості. Загальна тривалість культивування становила 14 діб. Морфологію клітин оцінювали за допомогою інвертованого світлового мікроскопа (Olympus СК-2, Японія).

Аналіз отриманих результатів свідчив про те, що культивування у відсутності стимулюючих молекул не призводило до формування клітинних агрегатів в культурі. Проте дія супернатанту з культур МСК донора призводила до утворення колоній. Цей феномен пояснюється тим, що МСК є джерелом цілої суміші різних цитокінів, які здійснюють регулюючу дію на гемопоез. Додавання супернатанту з культур МСК донора призводило до формування колоній, що відповідало результатам, отриманим при використанні ГМ-КСФ ($6,3 \pm 1,5$ і $6,5 \pm 1,2$, відповідно, різниця недостовірна, $p \geq 0,05$), але значно вище, ніж при додаванні супернатанту, вилученого з культур МСК хворого на МДС ($4,8 \pm 1,1$) (табл 3.3).

Таблиця 3.3

Результати культивування ГСК з додаванням стимулюючих агентів

Стимулюючий агент	Об'єм супернатанту	КУО-ГМ на 1×10^5				
		1 лунка	2 лунка	3 лунка	4 лунка	Середнє
ГМ-КСФ	100 мкл	5,1	7,2	8,0	5,7	$6,5 \pm 1,2$

Супернатант з нормальної МСК культури	200 мкл	4,9	7,5	6,1	6,7	6,3 ± 1,5
Супернатант з МСК культури за МДС	200 мкл	3,3	5,9	4,2	5,8	4,8 ± 1,1

Статистично достовірних відмінностей між групами не виявлено ($p > 0,05$).

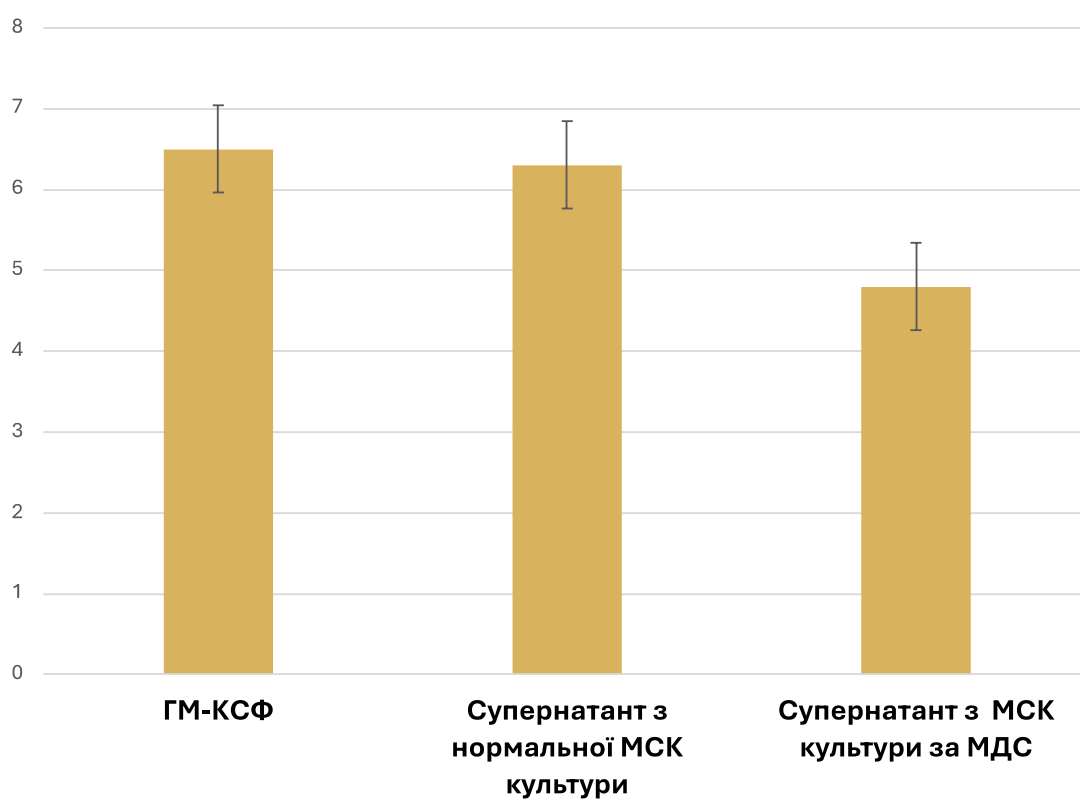


Рис. 3.5. Показники культивування ГСК із застосуванням стимулюючих агентів

Визнаний стимулятор колонієутворення ГМ-КСФ використовувався для порівняння. Його дія на гемопоез широко відома. Проте пригнічення у порівнянні з нормою, яка становить $34,0 \pm 2,2$ на 1×10^5 експлантованих у культуру мононуклеарів, свідчить про те, що, не зважаючи на присутність фактору росту у культурі, неможливо отримати більше колонієутворення у зв'язку з дефектом ГСК при МДС. У той же час супернатант у підбраному об'ємі, реалізує підтримку гемопоезу, не гіршу ніж ГМ-КСФ.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Мезенхімальні стромальні клітини (МСК), завдяки своєму специфічному розташуванню у синусоїдальних судинах дорослого кісткового мозку, відіграють ключову роль у регуляції взаємодії між кістковим мозком і периферичною кров'ю, забезпечуючи гомеостаз кісткового мозку. На сьогодні доведено, що МСК відіграють важливу роль у підтримці ГСК у недиференційованому стані, функціонуючи як живильне мікросередовище. МСК секретують широкий спектр цитокінів і факторів росту, які сприяють збереженню ГСК у недиференційованому стані та підтримують їх життєздатність. Це забезпечує стабільне функціонування гемопоетичної системи [11, 57]. Проте при мієлодиспластичному синдромі відзначаються якісні зміни в мікрооточенні, насамперед у мезенхімальних стромальних клітинах (МСК), які продовжують активно досліджуватись.

Результат експерименту щодо використання супернатанту з культур МСК від хворого на МДС у якості стимулюючого агента показав, що, не зважаючи на зміни у мікрооточенні при МДС, на які вказують численні науковці, строма має потенціальні можливості підтримувати гемопоез не гірше, ніж всім відомий ГМ-КСФ, якщо підібрати відповідний об'єм супернатанту. Зв'язок ГСК і МСК у цих культурах свідчить про регулюючу роль МСК, навіть в умовах його пошкодження. Пригнічення КУО-ГМ у культурі порівняно з нормою ($34,0 \pm 2,2$) можна пояснити тим, що, не зважаючи на присутність фактору росту у культурі чи відповідного об'єму супернатанту, неможливо отримати більше колонієутворення у зв'язку з дефектом ГСК при МДС. Ці результати можуть свідчити про первинну

недостатність функціонального резерву ГСК при МДС і вказують на залежність ефективності колонієутворення від стимулюючих молекул, які діють на гемопоєз [50, 51].

Подальше вивчення комплексу цитокінів, які перебувають у супернатанті культур МСК, дозволить отримати додаткову інформацію про регулюючий вплив агентів, які здатні впливати на проліферативну активність ГСК.

ВИСНОВКИ

1. При мієлодиспластичному синдромі відзначаються якісні зміни клітин, як у гемопоетичних, так і у мезенхімальних стромальних клітинах (МСК). Зокрема, гемопоетичні клітини виявляють знижену колонієутворюючу здатність, а також морфологічні аномалії, характерні для диспластичних змін у різних лініях кровотворення. Одночасно з цим МСК, ізольовані з кісткового мозку пацієнтів із МДС, демонструють знижену проліферативну активність.

2. Пригнічення КУО-ГМ у культурі МДС-ІВ з ГМ-КСФ порівняно з нормою ($6,5 \pm 1,2$ і $34,0 \pm 2,2$, відповідно) можна пояснити тим, що, не зважаючи на присутність фактору росту у культурі чи відповідного об'єму супернатанту, неможливо отримати більше колонієутворення у зв'язку з дефектом ГСК при МДС.

3. Використання супернатанту, після його тестування, з культур МСК від хворого на МДС у якості стимулюючого агента показав, що, не зважаючи на зміни у мікрооточенні при МДС, строма має потенціальні можливості підтримувати гемопоез не гірше, ніж всім відомий ГМ-КСФ ($6,5 \pm 1,2$ і $6,3 \pm 1,5$, відповідно). Різниця статистично недостовірна.

4. Зв'язок ГСК і МСК у культурах гемопоетичних клітин при МДС-ІВ свідчить про регулюючу роль мікрооточення, навіть в умовах його пошкодження.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Goldberg SL, Chen E, Corral M, Guo A, Mody-Patel N, Pecora AL, Laouri M. Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndromes among United States Medicare beneficiaries. *J Clin Oncol.* 2010 Jun 10;28(17):2847-52.
2. Zheng L, Zhang L, Guo Y, Xu X, Liu Z, Yan Z, Fu R. The immunological role of mesenchymal stromal cells in patients with myelodysplastic syndrome. *Front Immunol.* 2022 Dec 7;13:1078421. doi: 10.3389/fimmu.2022.1078421. PMID: 36569863; PMCID: PMC9767949.
3. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow // *Nature.* – 2002. – 418. – P.41–49.
4. Lee O.K., Kuo T.K., Chen W.M., Lee K.D., Hsieh S.L., Chen T.H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood // *Blood.* – 2004. – 103. – P.1669–1675.
5. Dzobo, Kevin. (2021). Multipotent Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells: An Updated Review on Historical Background, Recent Trends and Advances in their Clinical Applications. 10.20944/preprints202103.0373.v1.
6. Nasr El-Din, W., & Essawy, A. (2022). The potential therapeutic efficacy of intravenous versus subconjunctival mesenchymal stem cells on experimentally ultraviolet-induced corneal injury in adult male albino rats. *Folia Morphologica*, 81(4), 900–916. <https://doi.org/10.5603/FM.a2021.0085>

7. Lin CS, Xin ZC, Dai J, Lue TF. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histol Histopathol.* 2013 Sep;28(9):1109-16. doi: 10.14670/HH-28.1109. Epub 2013 Apr 16. PMID: 23588700; PMCID: PMC3839663.].
8. Anthony BA, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol.* 2014 Jan;35(1):32-7. doi: 10.1016/j.it.2013.10.002. Epub 2013 Nov 5. PMID: 24210164; PMCID: PMC3947365
9. Jalali S, Ansell SM. Role of the Bone Marrow Niche in Supporting the Pathogenesis of Lymphoid Malignancies. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jul 28;9:692320. doi: 10.3389/fcell.2021.692320. PMID: 34395425; PMCID: PMC8355623.
10. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol.* 2017 Sep;17(9):573-590. doi: 10.1038/nri.2017.53. Epub 2017 Jun 12. PMID: 28604734.
11. Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res.* 2000 Dec;9(6):841-8. doi: 10.1089/152581600750062264. PMID: 11177595.
12. Lindsley RC. Uncoding the genetic heterogeneity of myelodysplastic syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2017 Dec 8;2017(1):447-452. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.447. PMID: 29222292; PMCID: PMC6142603.
13. Sekeres MA, Taylor J. Diagnosis and Treatment of Myelodysplastic Syndromes: A Review. *JAMA.* 2022 Sep 6;328(9):872-880. doi: 10.1001/jama.2022.14578. PMID: 36066514.

14. Ye X, Chen D, Zheng Y, Wu C, Zhu X, Huang J. The incidence, risk factors, and survival of acute myeloid leukemia secondary to myelodysplastic syndrome: A population-based study. *Hematol Oncol*. 2019 Oct;37(4):438-446. doi: 10.1002/hon.2660. Epub 2019 Sep 6. PMID: 31378958; PMCID: PMC6900108
15. Hasserjian RP, Germing U, Malcovati L. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes. *Blood J*. 2023;blood.2023020078. DOI: 10.1182/blood.2023020078.
16. Malcovati L, Cazzola M. Recent advances in the understanding of myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts. *Br J Haematol*. 2016;174(6):847-58. DOI: 10.1111/bjh.14215
17. Gianelli U, Thiele J, Orazi A, Gangat N, Vannucchi AM, Tefferi A, Kvasnicka HM. International Consensus Classification of myeloid and lymphoid neoplasms: myeloproliferative neoplasms. *Virchows Arch*. 2022. DOI: 10.1007/s00428-022-03480-8
18. Zhang Y, Wu J, Qin T, Xu Z, Qu S, Pan L, Li B, et al. Comparison of the revised 4th (2016) and 5th (2022) editions of the World Health Organization classification of myelodysplastic neoplasms. *Leukemia*. 2022. DOI: 10.1038/s41375-022-01718-7
19. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, Bejar R, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022. DOI: 10.1038/s41375-022-01613-1
20. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, Wang SA, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia: Integrating Morphological, Clinical, and Genomic Data. *Blood*. 2022. DOI: 10.1182/blood.2022015850

21. Jain AG, Zhang L, Bennett JM, Komrokji R. Myelodysplastic Syndromes with Bone Marrow Fibrosis: An Update. *Ann Lab Med.* 2022;42(3):299-305. DOI: 10.3343/alm.2022.42.3.299 69.
22. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood.* 2012;120(12):2454-65. DOI: 10.1182/blood-2012-03-420489 78.
23. Lee WH, Tsai MT, Tsai CH, Tien FM, Lo MY, Tseng MH, Kuo YY, et al. Validation of the molecular international prognostic scoring system in patients with myelodysplastic syndromes defined by international consensus classification. *Blood Cancer J.* 2023;13(1). DOI: 10.1038/s41408-023-00894-8
24. Oster HS, Van de Loosdrecht AA, Mittelman M. Diagnosis of myelodysplastic syndromes: the classic and the novel. *Haematologica.* 2025 Feb 1;110(2):300-311. doi: 10.3324/haematol.2023.284937. PMID: 39445407; PMCID: PMC11788627.
25. Aster, Jon C., and Richard M. Stone. "Clinical manifestations, diagnosis, and classification of myelodysplastic syndromes (MDS)." (2023).
26. Ra J., Kang S., Shin S. Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells // *J. Transl. Med.* 2011. - 9. - P.181-198.]
27. Toma A, Fenaux P, Dreyfus F, Cordonnier C. Infections in myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2012 Oct;97(10):1459-70. doi: 10.3324/haematol.2012.063420. Epub 2012 Jun 24. PMID: 22733024; PMCID: PMC3487546.
28. Adrianzen-Herrera D, Sparks AD, Singh R, Alejos-Castillo D, Batra A, Glushakow-Smith S, Pradhan K, Shastri A, Zakai NA. Impact of preexisting autoimmune disease on myelodysplastic syndromes outcomes:

- a population analysis. *Blood Adv.* 2023 Nov 28;7(22):6913-6922. doi: 10.1182/bloodadvances.2023011050. PMID: 37729616; PMCID: PMC10685168
29. Hofmann WK, Koeffler HP. Myelodysplastic syndrome. *Annu Rev Med.* 2005;56:1-16. doi: 10.1146/annurev.med.56.082103.104704. PMID: 15660498
30. Stauder R, Lambert J, Desruol-Allardin S, Savre I, Gaugler L, Stojkov I, Siebert U, et al. Patient-reported outcome measures in studies of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: Literature review and landscape analysis. *Eur J Haematol.* 2020;104(5):476-87. DOI: 10.1111/ejh.13389 93.
31. Nachtkamp K, Kobbe G, Gattermann N, Germing U. Myelodysplastic syndromes: new methods of diagnosis, prognostication, and treatment. *DTSCH Arzteblatt Int.* 2023;120:203–10. DOI: 10.3238/arztebl.m2023.0005
32. Gerke MB, Christodoulou I, Karantanos T. Definitions, Biology, and Current Therapeutic Landscape of Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms. *Cancers.* 2023;15(15):3815. DOI: 10.3390/cancers15153815
33. Tobiasson M, Kittang AO. Treatment of myelodysplastic syndrome in the era of next-generation sequencing. *J Intern Med.* 2019;286(1):41-62. DOI: 10.1111/joim.12893
34. Saygin C, Carraway HE. Current and emerging strategies for management of myelodysplastic syndromes. *Blood Rev.* 2020:100791. DOI: 10.1016/j.blre.2020.100791
35. Shastri A, Will B, Steidl U, Verma A. Stem and progenitor cell alterations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2017;129(12):1586-94. DOI: 10.1182/blood-2016-10-696062
36. Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SE, Nerlov C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell

- repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol.* 2006;7(10):1048-56. DOI: 10.1038/ni1381
37. Eroz, I.; Kakkar, P.K.; Lazar, R.A.; El-Jawhari, J. Mesenchymal Stem Cells in Myelodysplastic Syndromes and Leukaemia. *Biomedicines* 2024, 12, 1677. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12081677>
38. Staal FJ, Luis TC. Wnt signaling in hematopoiesis: crucial factors for self-renewal, proliferation, and cell fate decisions. *J Cell Biochem.* 2010 Apr 1;109(5):844-9. doi: 10.1002/jcb.22467. PMID: 20069555
39. Wu Y, Aanei CM, Kesr S, Picot T, Guyotat D, Campos Catafal L. Impaired Expression of Focal Adhesion Kinase in Mesenchymal Stromal Cells from Low-Risk Myelodysplastic Syndrome Patients. *Front Oncol.* 2017 Aug 8;7:164. doi: 10.3389/fonc.2017.00164. PMID: 28848706; PMCID: PMC5551509
40. Comont, T.; Treiner, E.; Vergez, F. From Immune Dysregulations to Therapeutic Perspectives in Myelodysplastic Syndromes: A Review. *Diagnostics* 2021, 11, 1982. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11111982>
41. Teunissen, M., Verseijden, F., Riemers, F., van Osch, G. J. V. M., & Tryfonidou, M. A. (2020). The lower in vitro chondrogenic potential of canine adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (MSC) compared to bone marrow-derived MSC is not improved by BMP-2 or BMP-6. *The Veterinary Journal*, 269, 105605. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2020.105605>
42. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010 Aug 12;466(7308):829-34. doi: 10.1038/nature0926. PMID: 20703299; PMCID: PMC3146551
43. Aqmasheh S, Shamsasanjan K, Akbarzadehlaleh P, Pashoutan Sarvar D, Timari H. Effects of Mesenchymal Stem Cell Derivatives on

- Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cells. *Adv Pharm Bull.* 2017;7(2):165-177. doi:10.15171/apb.2017.021
44. Altaee, Maha & Sk, Nafee & Sj, Hamza. (2013). Evaluation for the Cytotoxic Effect of Exotoxin A Produced by *Pseudomonas aeruginosa* on Mice by using Cytogenetic Parameters. 257-261.
45. Mian SA, Bonnet D. Nature or Nurture? Role of the Bone Marrow Microenvironment in the Genesis and Maintenance of Myelodysplastic Syndromes. *Cancers.* 2021; 13(16):4116. <https://doi.org/10.3390/cancers13164116>
46. Simoni, Y.; Chapuis, N. Diagnosis of Myelodysplastic Syndromes: From Immunological Observations to Clinical Applications. *Diagnostics* 2022, 12, 1659. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12071659>
47. Hershman D, Neugut AI, Jacobson JS, Wang J, Tsai WY, McBride R, Bennett CL, Grann VR. Acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome following use of granulocyte colony-stimulating factors during breast cancer adjuvant chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Feb 7;99(3):196-205. doi: 10.1093/jnci/djk028. PMID: 17284714
48. Hanna, H., Mir, L.M. & Andre, F.M. In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem Cell Res Ther* 9, 203 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0942-x>
49. Fei C, Zhao Y, Guo J, Gu S, Li X, Chang C. Senescence of bone marrow mesenchymal stromal cells is accompanied by activation of p53/p21 pathway in myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* 2014 Dec;93(6):476-86. doi: 10.1111/ejh.12385. Epub 2014 Jun 28. PMID: 24889123.
50. Vellenga E, Young DC, Wagner K, Wiper D, Ostapovicz D, Griffin JD. The effects of GM-CSF and G-CSF in promoting growth of clonogenic

- cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood*. 1987 Jun;69(6):1771-6. PMID: 3495305.
51. Kassem NM, Ayad AM, El Husseiny NM, El-Demerdash DM, Kassem HA, Mattar MM. Role of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Acute Myeloid Leukemia/Myelodysplastic Syndromes. *J Glob Oncol*. 2018 Sep;4:1-6. doi: 10.1200/JGO.2017.009332. Epub 2017 Sep 29. PMID: 30241179; PMCID: PMC6180838.
52. Zhao Z, Wang Z, Li Q, Li W, You Y, Zou P. The different immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in patients with low-risk or high-risk myelodysplastic syndromes. *PLoS One*. 2012;7(9):e45675. doi: 10.1371/journal.pone.0045675. Epub 2012 Sep 21. PMID: 23029178; PMCID: PMC3448671.
53. Ferrer RA, Wobus M, List C, Wehner R, Schönefeldt C, Brocard B, Mohr B, Rauner M, Schmitz M, Stiehler M, Ehninger G, Hofbauer LC, Bornhäuser M, Platzbecker U. Mesenchymal stromal cells from patients with myelodysplastic syndrome display distinct functional alterations that are modulated by lenalidomide. *Haematologica*. 2013 Nov;98(11):1677-85. doi: 10.3324/haematol.2013.083972. Epub 2013 May 28. PMID: 23716561; PMCID: PMC3815166.
54. Pontikoglou CG, Matheakakis A, Papadaki HA. The mesenchymal compartment in myelodysplastic syndrome: Its role in the pathogenesis of the disorder and its therapeutic targeting. *Front Oncol*. 2023 Jan 25;13:1102495. doi: 10.3389/fonc.2023.1102495. PMID: 36761941; PMCID: PMC9907728.
55. Jiang X, Li W, Ge L, Lu M. Mesenchymal Stem Cell Senescence during Aging: From Mechanisms to Rejuvenation Strategies. *Aging Dis*. 2023 Oct 1;14(5):1651-1676. doi: 10.14336/AD.2023.0208. PMID: 37196126; PMCID: PMC10529739.

56. Al-Azab M, Safi M, Idiiatullina E, Al-Shaebi F, Zaky MY. Aging of mesenchymal stem cell: machinery, markers, and strategies of fighting. *Cell Mol Biol Lett*. 2022 Aug 19;27(1):69. doi: 10.1186/s11658-022-00366-0. PMID: 35986247; PMCID: PMC9388978.
57. Weng Z, Wang Y, Ouchi T, Liu H, Qiao X, Wu C, Zhao Z, Li L, Li B. Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies. *Stem Cells Transl Med*. 2022 Apr 29;11(4):356-371. doi: 10.1093/stcltm/szac004. PMID: 35485439; PMCID: PMC9052415.

Перевір джерела. Є такі, на які ти не посилалася. **Це груба помилка.**

Нема посилання 55 по 57. **Зроби посилання!!!!**