

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc630626>

Сравнительная характеристика влияния мезенхимальных стромальных клеток, их микровезикул и плазмы, обогащённой растворимыми факторами тромбоцитов, на выживаемость и апоптоз лимфоцитов селезёнки крыс *in vitro*

О.В. Клименкова¹, М.П. Потапнев¹, Н.В. Гончарова¹, О.А. Куделич², Г.Г. Кондратенко²¹ Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь;² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

АННОТАЦИЯ

Одной из важных, но недостаточно изученных характеристик мезенхимальных стромальных клеток (МСК), их микровезикул (МВ МСК) и плазмы, обогащённой растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ/PRP), является их трофическая функция, обеспечивающая жизнеспособность клеток-мишеней.

Цель исследования — провести анализ способности МСК, МВ МСК, ПОРФТ/PRP оказывать влияние на жизнеспособность, спонтанный и активационный апоптоз культивированных *in vitro* лимфоцитов селезёнки крыс.

Материалы и методы. МСК выделяли из фракции мононуклеарных клеток костного мозга бедренной кости крыс линии Wistar методом адгезии на пластике. МВ МСК получали из кондиционной среды культуры МСК методом центрифугирования при 14 500 g. ПОРФТ/PRP приготавливали путём замораживания/оттаивания концентрата тромбоцитов периферической крови крыс. Лимфоциты селезёнки крыс выделяли на градиенте плотности 1,077 г/см³. Выживаемость и степень апоптоза лимфоцитов *in vitro* оценивали методом проточной цитометрии по включению красителя 7-AAD и связыванию с annexin V.

Результаты. Присутствие МСК в концентрациях 10 и 20% вызывало повышение количества живых интактных и ФМА-активированных лимфоцитов (ФМА — форбол-миристан-ацетат) к концу 3-суточного культивирования *in vitro*. По сравнению с контролем в 8,3–13,5 раза снизилось количество некротических клеток, в 2,3–4,0 раза — количество апоптотических клеток, преимущественно за счёт лимфоцитов, находящихся в стадии позднего апоптоза. МВ МСК в использованных концентрациях не оказывали существенного эффекта на жизнеспособность лимфоцитов, культивированных *in vitro*, но снижали уровень апоптоза интактных и ФМА-активированных лимфоцитов в 3,6 ($p=0,03$) и 4,8–5,2 ($p=0,048$; $p=0,03$) раза соответственно. Исследования с крысиной ПОРФТ/PRP показали, что в концентрации 1,25% она обладает рост-стимулирующим действием в отношении МСК, но не лимфоцитов, культивированных *in vitro*. В культуре интактных лимфоцитов ПОРФТ/PRP не оказывала существенного влияния на жизнеспособность клеток при некотором снижении (в 2,7–2,9 раза, $p > 0,05$) количества некротических клеток. В культуре ФМА-активированных лимфоцитов 1,25–2,50% ПОРФТ/PRP обеспечивали повышение количества живых клеток в 1,6–2,2 раза ($p=0,002$, $p=0,01$) и снижение числа некротических клеток — в 2,0 раза ($p=0,02$).

Заключение. МСК, МВ МСК и ПОРФТ/PRP вызывают в убывающем порядке повышение жизнеспособности, подавление позднего апоптоза лимфоцитов селезёнки крыс при культивировании *in vitro*. Лимфоциты, активированные ФМА, более чувствительны к их витальному действию по сравнению с покоящимися клетками.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки; микровезикулы; плазма, обогащённая растворимыми факторами тромбоцитов; лимфоциты селезёнки крыс; жизнеспособность; апоптоз.

Как цитировать:

Клименкова О.В., Потапнев М.П., Гончарова Н.В., Куделич О.А., Кондратенко Г.Г. Сравнительная характеристика влияния мезенхимальных стромальных клеток, их микровезикул и плазмы, обогащённой растворимыми факторами тромбоцитов, на выживаемость и апоптоз лимфоцитов селезёнки крыс *in vitro* // Гены и клетки. 2024. Т. 19, № 3. С. 387–399. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc630626>

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc630626>

Comparison the impact of mesenchymal stromal cells, their microvesicles and plasma enriched with soluble platelet factors on survival and apoptosis of rat spleen lymphocytes *in vitro*

Oksana V. Klimenkova¹, Michael P. Potapnev¹, Natalia V. Goncharova¹, Oleg A. Kudelich², Gennady G. Kondratenko²

¹ Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Belarus;

² Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

ABSTRACT

BACKGROUND: The trophic function is one of the important but insufficiently studied features of mesenchymal stromal cells (MSCs), their microvesicles (MVs), and plasma enriched with soluble platelet factors (PRPs), which ensure the viability of target cells.

AIM: To analyze the capability of MSCs, MVs, and PRP to affect the viability and spontaneous and activation-induced apoptosis of rat spleen lymphocytes during culturing *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS: MSCs were isolated from the mononuclear cell fraction of the femoral bone marrow of Wistar rats using the plastic adhesion method. MVs were obtained from the conditioned medium of MSCs by centrifugation at 14,500 g. PRP was prepared by freezing/thawing rat peripheral blood platelet concentrate. Rat spleen lymphocytes were isolated on a density gradient of 1.077 g/cm³. The viability and degree of lymphocyte apoptosis *in vitro* were assessed by flow cytometry for 7-AAD incorporation and binding to annexin V.

RESULTS: The presence of MSCs at 10 and 20% concentrations caused an increase in the number of living intact and PMA-activated lymphocytes by the end of 3-day *in vitro* cultivation. Compared with controls, the amount of necrotic cells decreased 8.3–13.5 times, and the number of apoptotic cells decreased 2.3–4.0 times, mainly due to lymphocytes at the late stage of apoptosis. MVs of MSCs at the indicated concentrations did not significantly affect the viability of lymphocytes cultured *in vitro* but reduced the level of apoptosis of intact and PMA-activated lymphocytes by 3.6 ($p=0.03$) and 4.8–5.2 ($p=0.048$; $p=0.03$) times respectively. Studies have shown that 1.25% rat PRP has a growth-stimulatory activity against MSCs but not against lymphocytes cultured *in vitro*. In the culture of intact lymphocytes, PRPs did not significantly affect cell viability with a slight decrease (2.7–2.9 fold, $p > 0.05$) in the number of necrotic cells. In the culture of PMA-activated lymphocytes, 1.25–2.50% PRP increased the number of living cells by 1.6–2.2 times ($p=0.002$; $p=0.01$) and the number of necrotic cells by two times ($p=0.02$).

CONCLUSION: MSCs, MVs of MSCs, and PRP, in decreasing order, enhanced the viability of rat spleen lymphocytes and suppressed late apoptosis during *in vitro* cultivation. Lymphocytes activated by phorbol myristate acetate are more sensitive to their vital action compared with resting cells.

Keywords: mesenchymal stromal cells; microvesicles; plasma enriched with soluble platelet factors; lymphocytes of rat spleen; viability; apoptosis.

To cite this article:

Klimenkova OV, Potapnev MP, Goncharova NV, Kudelich OA, Kondratenko GG. Comparison the impact of mesenchymal stromal cells, their microvesicles and plasma enriched with soluble platelet factors on survival and apoptosis of rat spleen lymphocytes *in vitro*. *Genes & cells*. 2024;19(3):387–399. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc630626>

Received: 22.04.2024

Accepted: 25.07.2024

Published online: 06.09.2024

ВВЕДЕНИЕ

За последние годы регенеративная медицина обогатилась новыми лечебными технологиями, включающими такие клеточные продукты, как мезенхимальные стромальные клетки (МСК) и внеклеточные микровезикулы МСК (МВ МСК), а также плазму, обогащённую растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ/PRP) (PRP — platelet-rich plasma) [1–3]. В Российской Федерации МСК относят к биологическим лекарственным препаратам. Их биологическая и терапевтическая значимость связана с доступностью источника получения, а также с установленным в качестве основного противовоспалительным/иммуномодулирующим и регенеративным действием. Данные биопрепараты рассматривают как лечебные средства с «сетевым», но не адресным действием, что предполагает проявление необходимой активности в зависимости от условий *in vivo* или *in vitro*. Среди описанных свойств этих биопрепаратов остаётся малоизученной их способность вызывать снижение повреждающего действия патологических процессов на органы и ткани, а также способность подавлять апоптоз клеток сердца, сосудов [4–6], лёгких [7], почек [8], поджелудочной железы [9]. В экспериментах *in vitro* показана способность МСК (в том числе праймированных) проявлять антиапоптотическое действие в отношении кардиомиоцитов и эндотелиальных клеток [5]. МСК и кондиционированная среда, содержащая МВ МСК, уменьшают апоптоз моноцитов и нейтрофилов [10], снижают уровень индуцированной β -амилоидом или гипоксией смерти нейронов [2]. ПОРФТ/PRP повышает выживаемость и продукцию инсулина β -клетками [9], выживаемость ЛПС- и эрастин-активированных кардиомиоцитов [6], пролиферацию и выживаемость фибробластов различного происхождения [3]. Способность этих биопродуктов поддерживать жизнеспособность органов и тканей проявляется быстро, в течение нескольких часов, и предшествует проявлению других биологических свойств МСК, МВ МСК, ПОРФТ/PRP в течение последующего времени [5]. Общеизвестно, что МСК костного мозга (МСК КМ) является стандартным источником клеток для клеточной терапии с использованием МСК.

Цель исследования — провести анализ способности МСК, МВ МСК, ПОРФТ/PRP оказывать влияние на жизнеспособность, спонтанный и активационный апоптоз культивированных *in vitro* лимфоцитов селезёнки крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили с крысами линии Wistar обоего пола весом 250–300 г, содержащимися в соответствии с нормативами индивидуального размещения в виварии Белорусского государственного медицинского университета (БГМУ). Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с международными и разработанными

в Республике Беларусь требованиями санитарии и биоэтики. Проведение исследований с участием экспериментальных животных одобрено Комитетом по этике БГМУ (протокол № 8 от 01.02. 2022 г.). Для осуществления забора органов и тканей крыс подвергали эвтаназии путём внутривентрального введения тиопентала натрия в дозе 200 мг/кг веса животного. В стерильных условиях осуществляли забор селезёнки, а также клеток костного мозга из бедренных костей обеих лап.

Получение лимфоцитов селезёнки крысы

Для получения лимфоцитов селезёнку крысы переносили в пробирку, гомогенизировали, ресуспендировали в питательной среде RPMI-1640 (Elabscience, Китай) с 1% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; Gibco, США) с дальнейшим выделением моноклеарных клеток на градиенте плотности (Гистопак-1077; Sigma, США) в течение 30 мин при 1200 об./мин при комнатной температуре. Моноклеарную фракцию лимфоцитов собирали, дважды отмывали средой RPMI-1640 с 1% ЭТС, доводили до концентрации 2 млн/мл и использовали для проведения экспериментов *in vitro*.

Культивирование мезенхимальных стромальных клеток

Мезенхимальные стромальные клетки костного мозга получали из бедренной кости крыс путём перфузии питательной средой DMEM/F12 (Elabscience, Китай) с 5% ЭТС. Собранную клеточную взвесь отмывали центрифугированием при 1500 об./мин. в течение 20 мин. МСК КМ рассевали в питательной среде DMEM/F12 с 10% ЭТС в культуральных флаконах T25 (Sarstedt, Германия). После формирования крупных колоний МСК КМ клетки снимали 0,25% трипсином-ЭДТА (Elabscience, Китай), отмывали центрифугированием и высевали в новые культуральные флаконы в концентрации 3000/см². Клеточную массу МСК КМ наращивали в CO₂-инкубаторе (Esco, Сингапур) при +37°C и 5% CO₂ до достижения 80% конфлюентного роста в питательной среде DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС и раствора антибиотиков (стрептомицин/пенициллин, Sigma-Aldrich, США). Концентрацию МСК КМ доводили до 200 тыс./мл и использовали в экспериментах *in vitro*. Культивирование и снятие с ростовой поверхности МСК КМ осуществляли под контролем инвертированного микроскопа Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия) при увеличении $\times 25$. В исследовании использовали МСК 2–3-го пассажей.

Выделение микровезикул мезенхимальных стромальных клеток

Методом дифференциального центрифугирования с подбором различных скоростных режимов центрифугирования, времени и фильтрации в растворе получали МВ МСК [11]. На первом этапе МСК КМ высевали в культуральный флакон T75 (Sarstedt, Германия)

в концентрации 3000/см² в полную питательную среду DMEM/F12 с 10% ЭТС, 2,5 мм L-глутамина и раствора антибиотиков стрептомицина и пенициллина (Cargicorn Scientific, Германия). Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (Esco, Сингапур) при +37 °C и 5% CO₂ до достижения конfluence на ростовой поверхности более 90%. На втором этапе для обогащения культуральной среды МВ культуру клеток промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ; Elabscience, Китай) и переводили на бессывороточную среду DMEM/F12. Культивирование продолжали в течение 48 ч для создания условий лёгкого клеточного стресса, не вызывающего некротической гибели клеток и способствующего выделению внеклеточных МВ. Третий этап представлял собой непосредственно получение фракции МВ из культуральной жидкости МСК. Полученную кондиционированную среду в количестве 10 мл центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об./мин. при +4 °C для удаления крупных частиц, клеток и клеточного дебриса. Супернатант, содержащий МВ, собирали и осаждали путём центрифугирования в пробирках типа Эппендорф объёмом 1,5 мл при 14 500 g в течение 30 мин при температуре +4 °C (микроцентрифуга MicroCL 21R; Thermo Fisher Scientific, США). Удаляли 2/3 супернатанта, осадки в объёме 250 мкл объединяли в одну пробирку, доводили ФСБ (профильтрованным через фильтры 0,2 мкм) до 1,5 мл и центрифугировали при 14 500 g в течение 30 мин при температуре +4 °C. Удаляли супернатант, оставляя в пробирке 250 мкл осадка, которые объединяли в одну пробирку. Доводили ФСБ до 1,5 мл и центрифугировали в том же режиме. Полученный 10-кратно концентрированный осадок МВ ресуспендировали в 1 мл ФСБ и использовали в экспериментах.

Получение аллогенной плазмы, обогащённой растворимыми факторами тромбоцитов

Для получения аллогенной ПОПФТ/PRP использовали здоровых животных — крыс обоего пола весом 250–300 г. ПОПФТ/PRP получали методом R. Yamaguchi с соавт. [12] в нашей модификации. Эвтаназию животных выполняли с помощью внутрибрюшинного введения тиопентала натрия в дозе 200 мг/кг массы тела. Затем у животных вскрывали грудную клетку и шприцем путём внутрисердечной пункции забирали около 5 мл крови, которую переносили в пробирки с 3,8% цитратом натрия (Merck, Германия). Содержимое пробирок перемешивали, затем центрифугировали при 1000 об./мин в течение 20 мин при комнатной температуре. Собирали плазму и лейкоцитотромбоцитарный слой, объединяли из различных пробирок и центрифугировали повторно при 1500 об./мин в течение также 20 мин. После центрифугирования отбирали верхний слой плазмы так, чтобы количество тромбоцитов в нижней части составило около $2,2 \times 10^{12}/л$ при подсчёте на гематологическом анализаторе SysmexKX-21N (Sysmex, Япония). Полученный

концентрат тромбоцитов ($\times 3,0$ – $3,5$ по сравнению с исходным уровнем) замораживали на ночь при -80 °C. Через 1–3 дня пробирку с замороженным концентратом тромбоцитов в плазме размораживали и центрифугировали при 3000 об./мин в течение 15 мин. Супернатант отбирали, стерилизовали через фильтры с диаметром пор 0,2 мкм, расфасовывали по 0,5 мл в пробирки типа Эппендорф и хранили при -80 °C до использования в экспериментальных исследованиях.

Определение иммунофенотипа мезенхимальных стромальных клеток и их микровезикул

Имунофенотипическую характеристику полученных МСК КМ проводили методом проточной цитометрии. Принадлежность выделенной популяции клеток к МСК определяли по наличию экспрессии поверхностного маркера CD90 (Bio-Rad, США) и отсутствию экспрессии CD45 (BD Biosciences, США). Регистрацию и анализ данных выполняли с использованием проточного цитофлуориметра FACSCanto II (Becton Dickinson, США) и программного обеспечения FACSDiva 7.0 (Becton Dickinson, США).

Идентификацию МВ МСК осуществляли также на проточном цитофлуориметре FACSCanto II относительно латексных калибровочных частиц (Becton Dickinson, США) размером 300–1000 нм при усилении чувствительности прибора. Популяцию МВ оценивали после выделения логического «гейта» калибровочных частиц с использованием анализа dot plot по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию. Количество МВ МСК оценивали как количество регистрируемых событий в выделенной области, для каждой пробы анализировали от 100 000 до 200 000 частиц. Принадлежность выделенной фракции МВ к МВ МСК подтверждали экспрессией молекул CD90 и отсутствием экспрессии молекул CD45.

Оценка показателей жизнеспособности и апоптоза лимфоцитов, культивированных *in vitro* в присутствии мезенхимальных стромальных клеток, их микровезикул и плазмы, обогащённой растворимыми факторами тромбоцитов

Для изучения количества жизнеспособных клеток и клеток на разных стадиях спонтанного апоптоза или апоптоза, индуцированного форбол-миристан-ацетатом (ФМА; Roth, Германия), свежесыводенные лимфоциты селезёнки крыс высевали в полной питательной среде RPMI-1640 (Elabscience, Китай) с добавлением 5% ЭТС в лунки 12-луночного планшета (Corning, США) в конечной концентрации 1 млн/мл и инкубировали при +37 °C в увлажнённом воздухе с 5% CO₂. Контролем служили образцы лимфоцитов, культивированные без внесения биопродуктов — без или с ФМА (50 нг/мл). В качестве дополнительных биопродуктов в культуры

интактных или ФМА-индуцированных лимфоцитов вносили: МСК КМ крысы в концентрации 10 или 20% от количества лимфоцитов; МВ МСК — 5 или 10% от объёма инкубационной среды; ПОРФТ/PRP — 0,625; 1,25 и 2,5% от объёма инкубационной среды. Все агенты воздействия вносили в культуру клеток одновременно. Дозы и соотношения вносимых реагентов и клеток устанавливали на основании анализа литературы и предварительной раститровки для обеспечения максимально репрезентативных результатов. По истечении 3-суточного культивирования лимфоциты собирали, переносили в маркированные пробирки, отмывали в холодном ФСБ при 1500 об./мин в течение 5 мин. Затем проводили подсчёт и оценку жизнеспособности клеток с 0,4% трипановым синим («БиолоТ», РФ).

Для определения показателей жизнеспособности и апоптоза клеток использовали набор FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (Becton Dickinson, США) в соответствии с инструкцией производителя. Аналитическую цитометрию производили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II с использованием программного обеспечения FACSDiva v. 7.0 (Becton Dickinson, США) после выделения целевых популяций и отсеечения клеточных агрегатов и дебриса. Целевые популяции лимфоцитов и МСК идентифицировали по морфологическим показателям исходя из их размера и гранулярности. Для каждого образца анализировали не менее 30 000 событий, степень чистоты — не менее 98%. Оценивали интенсивность флуоресценции аннексин V, конъюгированного

с изотиоцианатом флуоресцеина (FITC, FL1, 530 нм), и флуоресценции 7-аминоактиномицина D (7-AAD, FL3, 680 нм). В качестве контроля аутофлуоресценции использовали неокрашенные лимфоциты крыс. Для корректной настройки протокола анализа и учёта использовали отрицательный и положительный контроль апоптоза лимфоцитов. Клетки с фенотипом $\text{annexin V}^-7\text{-AAD}^-$ оценивали как жизнеспособные; $\text{annexin V}^-7\text{-AAD}^+$ — как некротические; $\text{annexin V}^+7\text{-AAD}^-$ — как ранние апоптотические; $\text{annexin V}^+7\text{-AAD}^+$ — как клетки, находящиеся в стадии позднего апоптоза (рис. 1).

Статистическая обработка данных

Статистическую компьютерную обработку полученных данных проводили при помощи пакета программ Excel 2016 (Microsoft, США) и GraphPad Prism 9.3.1.471 (GraphPad, США). Для каждой группы данных определяли нормальность частотного распределения каждого признака. Так как выборки являлись малыми ($n < 50$), проверку осуществляли по критерию Шапиро–Уилка. Поскольку в группах выявлено нормальное распределение, для определения статистической значимости различий уровней жизнеспособности клеток, спонтанного и индуцированного апоптоза (раннего или позднего) при культивировании лимфоцитов крыс в разных условиях применяли t -критерий Стьюдента. Данные в таблицах представлены в виде среднего значения (M) \pm стандартное отклонение (SD). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

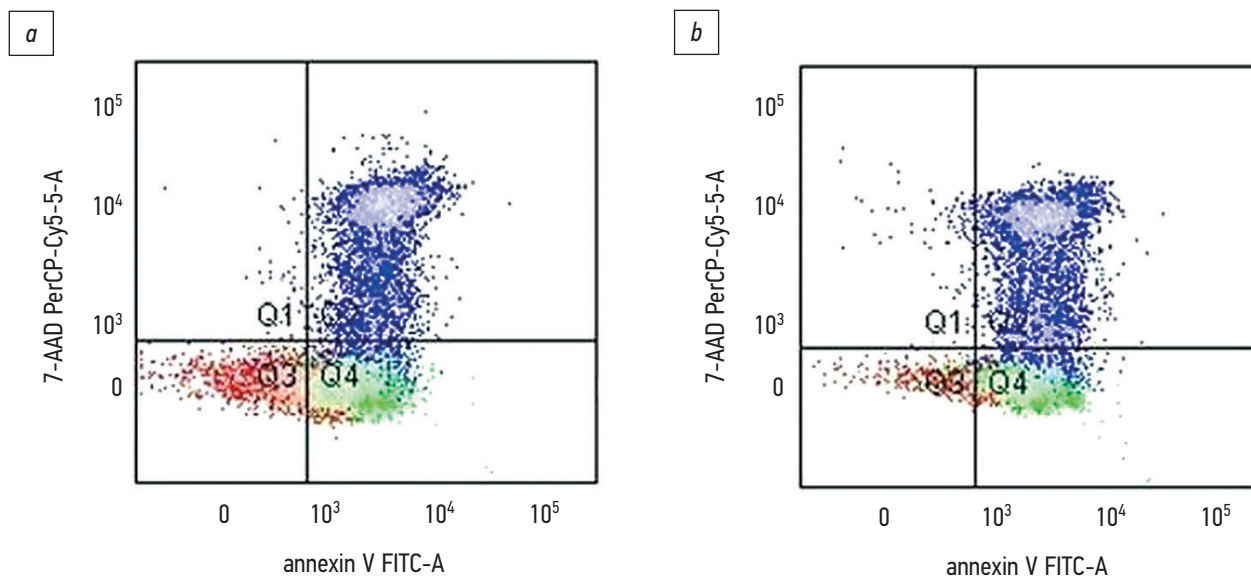


Рис. 1. Анализ dot plot распределения культивированных в течение 3 сут *in vitro* лимфоцитов крыс при окрашивании аннексин V-FITC и 7-аминоактиномицином D (7-AAD): *a* — интактных, *b* — активированных фобол-миристат-ацетатом. Квадрант 1 — клетки в стадии некроза ($\text{annexin V}^-7\text{-AAD}^+$); 2 — клетки в стадии позднего апоптоза ($\text{annexin V}^+7\text{-AAD}^+$); 3 — живые клетки ($\text{annexin V}^-7\text{-AAD}^-$); 4 — ранние апоптотические клетки ($\text{annexin V}^+7\text{-AAD}^-$).

Fig. 1. Dot plot analysis of the distribution of rat lymphocytes cultured for 3 days *in vitro* and stained with annexin V-FITC and 7-aminocinomyacin D (7-AAD): *a* — without phorbol myristate acetate, *b* — activated with phorbol myristate acetate. Quadrant 1 — necrotic cells ($\text{annexin V}^-7\text{-AAD}^+$); 2 — late apoptotic cells ($\text{annexin V}^+7\text{-AAD}^+$); 3 — living cells ($\text{annexin V}^-7\text{-AAD}^-$); 4 — early apoptotic cells ($\text{annexin V}^+7\text{-AAD}^-$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

По данным иммунофенотипирования, МСК КМ крыс 2-го пассажа, использованные для экспериментов *in vitro*, в 94,1–99,9% случаев имели типичный фенотип МСК как CD90⁺/CD45⁻ клеток. При этом важной особенностью экспериментов *in vitro* было то, что в условиях культивирования в питательной среде RPMI-1640 с 5% ЭТС к концу совместного культивирования с лимфоцитами крыс через 3 сут суспензионные клетки (лимфоциты) содержали незначительную примесь МСК с жизнеспособностью 0,5–3,1%, поэтому МСК КМ не могли повлиять на результаты оценки жизнеспособности и апоптоза лимфоцитов при использовании метода проточной цитометрии. Жизнеспособные МСК КМ к концу 3-х суток культивирования оставались прикрепленными ко дну лунки и в анализируемые клеточные популяции не попадали. Количество

лимфоцитов крыс во всех пробах колебалось в пределах 640 000–700 000 кл./мл с жизнеспособностью (при оценке с использованием трипанового синего) 55–85%.

Присутствие МСК КМ оказало существенное влияние на жизнеспособность культивированных лимфоцитов. Как видно из табл. 1, внесение в инкубационную среду МСК КМ крыс в концентрации 10 и 20% вызывало статистически значимое повышение количества живых интактных и ФМА-индуцированных лимфоцитов. Существенно, в 8,3–13,5 раза по сравнению с контролем, снизилось количество некротических клеток, в 2,3–4,0 раза — количество апоптотических клеток в культуре лимфоцитов. Важным является то, что снижение количества апоптотических клеток в культурах интактных клеток и активированных ФМА клеток произошло преимущественно за счёт снижения количества лимфоцитов, находящихся в стадии позднего апоптоза. Как видно из табл. 2, относительное

Таблица 1. Влияние мезенхимальных стромальных клеток на жизнеспособность культивированных *in vitro* лимфоцитов селезёнки крысы, М±SD

Table 1. Effect of mesenchymal stromal cells on the viability of rat spleen lymphocytes cultured *in vitro* (M±SD)

Лимфоциты	Фракции лимфоцитов (n=6), %		
	некроз	апоптоз	живые
Интактные			
Контроль*	32,4±8,1	29,3±4,1	57,2±15,9
+ МСК 10%	2,7±0,7 (p=0,007)	11,4±3,7 (p=0,03)	81,4±8,0 (p=0,03)
+ МСК 20%	2,4±0,8 (p=0,006)	8,9±2,6 (p=0,006)	77,1±13,0
ФМА-индуцированные			
Контроль*	28,5±2,4	42,7±6,9	57,3±7,5
+ МСК 10%	3,2±0,4 (p=0,00003)	17,8±6,3 (p=0,03)	73,2±9,1 (p=0,03)
+ МСК 20%	3,4±1,9 (p=0,00005)	10,6±5,2 (p=0,02)	74,1±15,0

* контроль — мезенхимальные стромальные клетки (МСК) не вносили. Здесь и в табл. 2–5: ФМА — форбол-миристат-ацетат.

* control — mesenchymal stromal cells (MCK) were not added. Here and in Tables 2–5: ФМА — phorbol myristate acetate.

Таблица 2. Влияние мезенхимальных стромальных клеток на апоптоз культивированных *in vitro* лимфоцитов селезёнки крысы, М±SD

Table 2. Effect of mesenchymal stromal cells on the apoptosis of rat spleen lymphocytes cultured *in vitro* (M±SD)

Лимфоциты	Фракции лимфоцитов (n=6), %	
	апоптоз ранний	апоптоз поздний
Интактные		
Контроль*	1,4±0,8	20,2±5,6
+ МСК 10%	4,6±3,6	9,6±4,2
+ МСК 20%	4,0±2,1	4,5±3,6 (p=0,005)
ФМА-индуцированные		
Контроль*	2,6±0,6	44,4±4,2
+ МСК 10%	4,2±3,2	12,8±6,2 (p=0,0008)
+ МСК 20%	4,4±2,8	9,0±2,0 (p=0,0007)

* контроль — мезенхимальные стромальные клетки (МСК) не вносили.

* control — mesenchymal stromal cells (MCK) were not added.

количество клеток в стадии позднего апоптоза под действием совместного культивирования с 10 и 20% МСК снизилось соответственно в 2,1 и 4,5 раза в сравнении с интактными лимфоцитами, и в 3,5 и 4,8 раза — в культуре лимфоцитов, активированных ФМА. При этом присутствие МСК КМ практически не влияло на количество в культуре лимфоцитов, находящихся в стадии раннего апоптоза.

Результаты оценки влияния МВ МСК на жизнеспособность крысиных лимфоцитов, культивированных без или в присутствии ФМА, представлены в табл. 3. Исходя из полученных данных, использованные концентрации МВ МСК не оказывали существенного эффекта на показатели жизнеспособности лимфоцитов, культивированных *in vitro*. В то же время установлено, что присутствие МВ МСК снижает уровень апоптоза культивированных лимфоцитов. Как видно из табл. 4, количество лимфоцитов (интактных или ФМА-индуцированных) в стадии раннего

апоптоза практически не изменялось в присутствии 5 и 10% МВ МСК. В то же время количество интактных лимфоцитов в стадии позднего апоптоза снижалось в присутствии 5 и 10% МВ МСК в 1,5 ($p > 0,05$) и 3,6 ($p = 0,03$) раза соответственно. Эффект МВ МСК был более выражен в культурах ФМА-активированных лимфоцитов: в присутствии 5 и 10% МВ МСК количество активированных лимфоцитов в стадии позднего апоптоза статистически значимо снижалось — в 4,75 и 5,20 раза соответственно.

Нами также была изучена ПОРФТ/PRP, обладающая широким спектром терапевтического действия в регенеративной медицине, в отработанной экспериментальной модели оценки антиапоптотического действия на культивируемые МСК и лимфоциты крысы. Сравнительные эксперименты показали, что крысиная ПОРФТ/PRP в концентрации 1,25% обладает рост-стимулирующим действием в отношении МСК, но не лимфоцитов, культивированных *in vitro* (рис. 2).

Таблица 3. Влияние микровезикул мезенхимальных стромальных клеток на жизнеспособность культивированных *in vitro* лимфоцитов селезёнки крысы, $M \pm SD$

Table 3. Effect of extracellular vesicles of mesenchymal stromal cells on the viability of rat spleen lymphocytes cultured *in vitro* ($M \pm SD$)

Лимфоциты	Фракции лимфоцитов, $n=6$		
	некроз	апоптоз	живые
Интактные			
Контроль*	27,8±11,2	26,3±6,2	60,5±15,4
+ МВ МСК 5%	25,9±13,0	26,4±7,8	64,3±7,9
+ МВ МСК 10%	19,9±10,6	25,5±6,7	71,6±5,0
ФМА-индуцированные			
Контроль*	24,8±7,6	38,8±11,6	60,7±3,3
+ МВ МСК 5%	21,7±12,8	31,3±8,7	63,1±3,9
+ МВ МСК 10%	14,6±7,2	30,5±10,2	65,9±5,6

* контроль — микровезикулы мезенхимальных стромальных клеток (МВ МСК) не вносили.

* control — microvesicles of mesenchymal stromal cells (MB MCK) were not added.

Таблица 4. Влияние микровезикул мезенхимальных стромальных клеток на апоптоз культивированных *in vitro* лимфоцитов селезёнки крысы, $M \pm SD$

Table 4. Effect of extracellular vesicles of mesenchymal stromal cells on the apoptosis of rat spleen lymphocytes cultured *in vitro* ($M \pm SD$)

Лимфоциты	Фракции лимфоцитов ($n=8$), %	
	апоптоз ранний	поздний апоптоз
Интактные		
Контроль*	7,6±8,6	21,3±6,3
+ МВ МСК 5%	11,0±8,3	14,5±5,9
+ МВ МСК 10%	9,5±8,0	5,9±4,5 ($p=0,03$)
ФМА-индуцированные		
Контроль*	9,6±9,5	36,1±13,7
+ МВ МСК 5%	13,5±9,9	7,6±5,1 ($p=0,048$)
+ МВ МСК 10%	9,8±6,1	6,9±5,1 ($p=0,03$)

* контроль — микровезикулы мезенхимальных стромальных клеток (МВ МСК) не вносили.

* control — microvesicles of mesenchymal stromal cells (MB MCK) were not added.

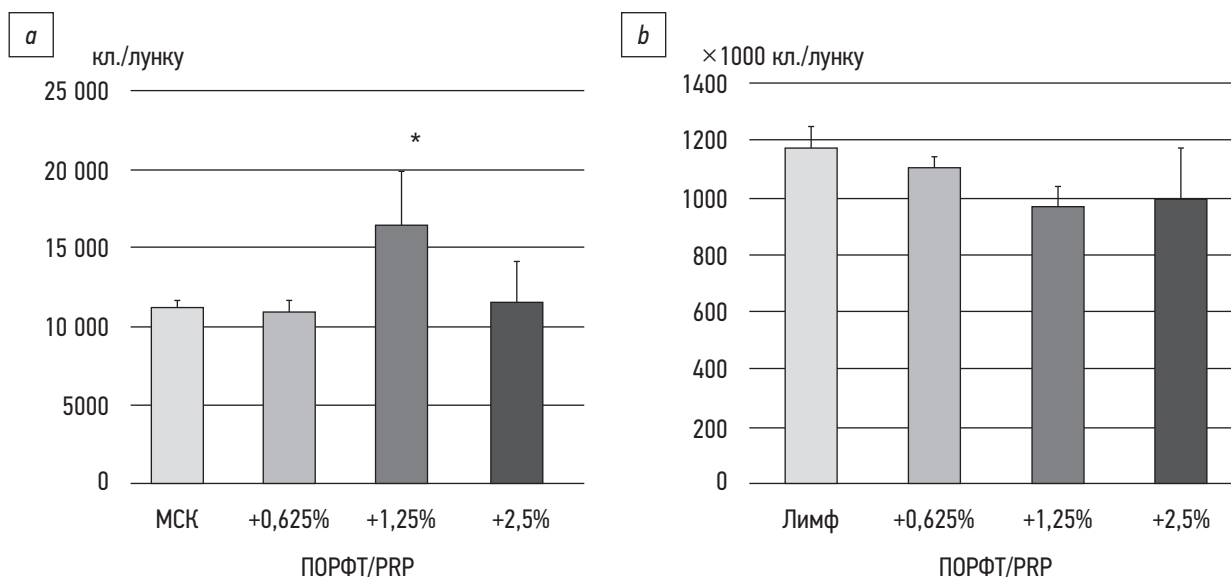


Рис. 2. Различная способность плазмы, обогащённой растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ/PRP), вызывать пролиферацию (а) мезенхимальных стромальных клеток ($n=4$) и (б) лимфоцитов селезёнки крыс ($n=4$). В лунки культур клеток исходно высевали 9000 МСК/мл (МСК) или 2 000 000 лимфоцитов/мл (Лимф); * $p=0,025$ по отношению к контролю МСК.

Fig. 2. Differential ability of platelet rich plasma (PRP) to induce proliferation of (a) mesenchymal stromal cells ($n=4$) and (b) rat spleen lymphocytes ($n=4$). Cell culture wells were initially seeded with 9,000 MSC/ml (МСК) or 2,000,000 lymphocytes/ml (Лимф); * $p=0.025$ relative to control MSC.

Оценка антиапоптотического действия ПОРФТ/PRP на лимфоциты при культивировании *in vitro* показала, что в культуре интактных лимфоцитов ПОРФТ/PRP не оказывала существенного влияния на жизнеспособность клеток при некотором снижении (в 2,7–2,9 раза, $p > 0,05$) количества некротических клеток (табл. 5). В то же время внесение в культуру ФМА-активированных крысиных лимфоцитов 1,25–2,50% ПОРФТ/PRP обеспечивало повышение количества живых клеток в 1,6–2,2 раза ($p=0,002$ и $p=0,01$), при этом значительно снизилось количество клеток в стадии некроза (более чем в 2 раза, $p=0,02$).

Проведённая дополнительно оценка апоптоза лимфоцитов не выявила статистически значимого стимулирующего или угнетающего действия ПОРФТ/PRP в концентрациях 1,25 и 2,50% на распределение стадий раннего и позднего апоптоза интактных и ФМА-активированных лимфоцитов ($n=8$, данные не представлены).

ОБСУЖДЕНИЕ

Мезенхимальные стромальные клетки, относящиеся к негемопозитическим клеткам, обладают регенеративным

Таблица 5. Влияние присутствия плазмы, обогащённой растворимыми факторами тромбоцитов, на жизнеспособность культивированных *in vitro* лимфоцитов селезёнки крысы, $M \pm SD$

Table 5. Effect of the presence of PRP on the viability of rat splenic lymphocytes cultured *in vitro* ($M \pm SD$)

Лимфоциты	Фракции лимфоцитов (%), $n=6$		
	некроз	апоптоз	живые
Интактные			
Контроль*	30,2±11,5	33,7±9,1	43,4±4,7
+ ПОРФТ/PRP 1,25%	10,4±4,5	39,3±9,3	47,8±7,7
+ ПОРФТ/PRP 2,5%	11,3±9,5	34,5±10,6	51,7±4,0
ФМА-индуцированные			
Контроль*	27,2±1,2	48,4±8,4	24,0±5,0
+ ПОРФТ/PRP 1,25%	13,3±8,8 ($p=0,02$)	43,3±8,6	54,0±7,7 ($p=0,002$)
+ ПОРФТ/PRP 2,5%	12,7±9,7	45,5±12,9	39,8±7,3 ($p=0,01$)

* контроль — ПОРФТ/PRP (плазму, обогащённую растворимыми факторами тромбоцитов) не вносили.

* control — PRP (platelet-rich plasma) was not added.

действием в отношении многих тканей, а также модулирующим действием в отношении иммунной системы [4, 5, 7, 10]. При этом трофическая функция МСК рассматривается как одна из основных на ранних этапах воздействия на другие клетки [13–15]. Иммуномодулирующее действие МСК опосредовано механизмами, связанными с перестройкой в иммунной системе реципиента и индукцией M2, Th2, T-регуляторных клеток [4, 14–16]. Из них терапевтически значимыми оказались эффекты МСК, проявлявшиеся прежде всего иммуносупрессией реакций T-, B-лимфоцитов, ЕК-клеток (ЕК — естественные киллеры), моноцитов и нейтрофилов [17, 18]. Клиническое использование МСК, оказывающих пролонгированный эффект в течение 6–12 мес, свидетельствует о вовлечении иммунной системы, обладающей длительной иммунологической памятью. Выживание клеток в ходе перестройки иммунной системы становится первейшей задачей, решаемой при применении МСК, их дериватов или ПОРФТ/PRP. Клетки иммунной системы в условиях патологического процесса находятся в состоянии активационного стресса, что повышает вероятность их гибели [7, 19]. При этом функция МСК по регулированию и предотвращению клеточной смерти включена в перечень шести основных функций, имеющих терапевтическое значение. Регулируемая клеточная смерть в основном представлена апоптозом, некроптозом, пироптозом клеток-мишеней, в отношении которых МСК оказывают витальное действие путём секреции паракринных факторов, регулирования обмена ионов Ca^{2+} , митохондриального переноса, переноса биоактивных микроРНК и белков посредством внеклеточных везикул при преимущественно межклеточных контактах [20]. Установление факта воздействия МСК на снижение количества некротических клеток, а среди апоптотических — клеток в стадии позднего апоптоза, является тем элементом новизны, который отличает настоящую работу от ранее выполненных. Проведённые исследования *in vitro* показали, что МСК (и их культуральная среда, содержащая МВ) способны в большей степени повышать жизнеспособность активированных клеток при их сокультивировании, и в меньшей степени оказывать витальное действие на клетки, находящиеся в состоянии покоя [21–24]. Способность МСК потенцировать выживание лимфоидных клеток связывают чаще с прямыми межклеточными контактами. Эта способность зависит от соотношения МСК и лимфоидных клеток [22, 24]. При этом даже межклеточные взаимодействия связаны с продуцируемыми МСК цитокинами, хемокинами, ростовыми факторами. В качестве таких факторов выступают SDF-1, HGF, IGF-1, EGF, NGF, TGF- α , bFGF, STC-1, SFRP1, SFRP2, GM-CSF, VEGF, TGF- β , IL-6, IL-10 [10, 18, 20, 25]. Эффект растворимых факторов, содержащихся в культуральной среде МСК или во фракции МВ МСК, в отношении живых лимфоидных клеток слабее (или отсутствует) по сравнению с МСК [22, 26]. В наших исследованиях с культивированными лимфоцитами крыс присутствие

МСК в соотношениях 1:5–1:10 привело к значительному росту количества жизнеспособных клеток, особенно в условиях активации лимфоцитов с помощью ФМА. Витальное действие МВ МСК как продуктов, выделяемых МСК в процессе жизнедеятельности, активации, старения или смерти, в наших исследованиях наблюдалось только в отношении лимфоцитов, находящихся в стадии позднего апоптоза [26]. Витальное действие МСК может быть связано как с ингибцией апоптоза (подавлением экспрессии Fas-рецептора), так и с другими механизмами (повышением экспрессии ICAM-1 в лимфоцитах и МСК при отсутствии влияния на экспрессию V α 1-2 в лимфоцитах, повышением экспрессии IL-6 в МСК) [21, 22, 24, 27]. Поэтому нами было оценено антиапоптотическое действие МСК и МВ МСК в качестве одного из механизмов витального действия МСК. В результате показано, что как МСК, так и МВ МСК очевидно подавляют апоптоз лимфоцитов, при этом наиболее важным оказалось снижение количества клеток, находящихся в стадии позднего (необратимого) апоптоза, но не раннего апоптоза, что рассматривалось в качестве самостоятельно регулируемых процессов [28, 29]. Это действие для МСК (и МВ МСК) является наиболее существенным в обеспечении пролонгирования жизни и функциональной активности лимфоидных клеток, что мы рассматриваем впервые в данном исследовании.

В работах [30, 31] показано, что ПОРФТ/PRP хорошо известна как биоконтакт с выраженным регенеративным действием, способствующий пролиферации МСК *in vitro*. ПОРФТ/PRP в экспериментальных условиях хорошо поддерживала жизнеспособность кардиомиоцитов мышей, особенно в условиях кислородного взрыва, вызванного бактериальным липополисахаридом, или эрастин-индуцированного ферроптоза [6], а также клеток поджелудочной железы, продуцирующих инсулин [9]. В настоящей работе показано, что ПОРФТ/PRP обладала витальным (снижение процента некротических клеток) и рост-стимулирующим действием в отношении МСК, но не лимфоидных клеток крыс. При оценке влияния на жизнеспособность лимфоцитов ПОРФТ/PRP (в оптимальной концентрации 1,25%) оказывала в культуре ФМА-активированных, но не покоящихся лимфоцитов витальное действие, которое проявлялось снижением количества некротических клеток и повышением — жизнеспособных клеток. При этом нами не выявлено протективного влияния ПОРФТ/PRP на апоптотическую гибель лимфоцитов крыс при культивировании *in vitro*.

Таким образом, нами в экспериментах *in vitro* показано, что МСК КМ обладают выраженной способностью поддерживать жизнеспособность лимфоидных клеток, в большей степени — активированных лимфоцитов. МВ МСК и ПОРФТ/PRP обладают способностью поддерживать жизнеспособность лимфоцитов, культивированных *in vitro*, при этом воздействуют на различные механизмы апоптотической и неапоптотической гибели клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследованиях *in vitro* установлено, что внесение в культуру лимфоцитов крыс МСК КМ костного мозга в концентрации 10 и 20% вызывало повышение жизнеспособности лимфоцитов, при этом снижалось количество клеток, находящихся в стадии позднего апоптоза (в 2,1–4,8 раза) и некроза (в 8,3–13,5 раза). Микровезикулы МСК не оказывали существенного эффекта на жизнеспособность исследованных клеток, но статистически значимо снижали количество лимфоцитов селезёнки крыс в стадии позднего апоптоза — в 3,6–5,2 раза. ПОРФТ/PRP не оказывала существенного влияния на жизнеспособность интактных лимфоцитов крыс, но обеспечивала повышение жизнеспособности ФМА-активированных лимфоцитов в 1,6–2,2 раза, при этом в 2,0 раза снижалось количество некротических клеток.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта № 20220724 Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Конфликт интересов. У авторов отсутствует конфликт интересов, связанный с публикацией данной статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи,

прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: О.В. Клименкова — экспериментальные процедуры, биоинформационный анализ данных, написание текста; М.П. Потапнев — сбор и анализ литературных источников и редактирование статьи; Н.В. Гончарова — экспериментальные процедуры, биоинформационный анализ данных, написание статьи; О.А. Куделич — экспериментальные процедуры, написание статьи; Г.Г. Кондратенко — обзор литературы, редактирование статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This work was supported by the grant No. 20220724 of Ministry of Health the Republic of Belarus.

Competing interests. The authors declare that they have no conflict of interest related to publication of this article.

Authors' contribution. All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication). The greatest contribution is distributed as follows: O.V. Klimenkova — experimental procedures, bioinformatics data analysis, writing of the text; M.P. Potapnev — collection and analysis of literature sources, editing the article; N.V. Goncharova — experimental procedures, bioinformatics data analysis, writing of the text; O.A. Kudelich — experimental procedures, writing of the text; G.G. Kondratenko — literature review, editing the article.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Samadi P., Saki S., Manoochehri H., Sheykhasan M. Therapeutic applications of mesenchymal stem cells: a comprehensive review // *Curr Stem Cell Res Ther.* 2021. Vol. 16, N 3. P. 323–353. doi: 10.2174/1574888X15666200914142709
- Gowen A., Shahjin F., Chand S., et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: challenges in clinical applications // *Front Cell Dev Biol.* 2020. Vol. 8. P. 149. doi: 10.3389/fcell.2020.00149
- Giusti I., D'Ascenzo S., Macchiarelli G., Dolo V. In vitro evidence supporting applications of platelet derivatives in regenerative medicine // *Blood Transfus.* 2020. Vol. 18, N 2. P. 117–129. doi: 10.2450/2019.0164-19
- Fan X.L., Zhang Y., Li X., Fu Q.L. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy // *Cell Mol Life Sci.* 2020. Vol. 77, N 14. P. 2771–2794. doi: 10.1007/s00018-020-03454-6
- Sarre C., Contreras-Lopez R., Nernpermpisooth N., et al. PPAR β / δ priming enhances the anti-apoptotic and therapeutic properties of mesenchymal stromal cells in myocardial ischemia-reperfusion injury // *Stem Cell Res Ther.* 2022. Vol. 13, N 1. P. 167. doi: 10.1186/s13287-022-02840-0 Corrected and republished from: *Stem Cell Res Ther.* 2022. Vol. 13. P. 338. doi: 10.1186/s13287-022-03086-6
- Jiao Y., Zhang Q., Zhang J., et al. Platelet-rich plasma ameliorates lipopolysaccharide-induced cardiac injury by inflammation and ferroptosis regulation // *Front Pharmacol.* 2022. Vol. 13. P. 1026641. doi: 10.3389/fphar.2022.1026641
- Armstrong B.B.S., Montano Pedroso J.C., Carvalho J.C., Masako Ferreira L. Mesenchymal stem cells in lung diseases and their potential use in COVID-19 ARDS: A systematized review // *Clinics (Sao Paulo).* 2023. Vol. 78. P. 100237. doi: 10.1016/j.clinsp.2023.100237
- Kadono M., Nakashima A., Ishiuchi N., et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells cultured in serum-free medium attenuate acute contrast-induced nephropathy by exerting anti-apoptotic effects // *Stem Cell Res Ther.* 2023. Vol. 14, N 1. P. 337. doi: 10.1186/s13287-023-03553-8
- Nemati M., Karbalaei N., Mokarram P., Dehghani F. Effects of platelet-rich plasma on the pancreatic islet survival and function, islet transplantation outcome and pancreatic pdx₁ and insulin gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats // *Growth Factors.* 2020. Vol. 38, N 3-4. P. 137–151. doi: 10.1080/08977194.2021.1881502
- Lopes-Pacheco M., Robba C., Rocco P.R., Pelosi P. Current understanding of the therapeutic benefits of mesenchymal stem cells in acute respiratory distress syndrome // *Cell Biol Toxicol.* 2020. Vol. 36, N 1. P. 83–102. doi: 10.1007/s10565-019-09493-5
- Маркова К.Л., Козырева А.Р., Горшкова А.А., и др. Использование различных методических подходов для оценки размера и морфологии микровезикул клеточных линий // *Клеточные*

технологии в биологии и медицине. 2020. № 2. С. 129–138. EDN: EJWQXS

12. Yamaguchi R., Terashima H., Yoneyama S., et al. Effects of platelet-rich plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor // *J Surg Res*. 2012. Vol. 173, N 2. P. 258–266. doi: 10.1016/j.jss.2010.10.001

13. Caplan A.I., Dennis J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators // *J Cell Biochem*. 2006. Vol. 98, N 5. P. 1076–1084. doi: 10.1002/jcb.20886

14. Fu Y., Karbaat L., Wu L., et al. Trophic effects of mesenchymal stem cells // *Tissue Eng Part B Rev*. 2017. Vol. 23, N 6. P. 515–528. doi: 10.1089/ten.TEB.2016.0365

15. Samsonraj R.M., Raughunath M., Nurcombe V., et al. Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine // *Stem Cells Transl Med*. 2017. Vol. 6, N 12. P. 2173–2185. doi: 10.1002/sctm.17-0129

16. Zhuan X., Jiang Y., Yang X., et al. Advances of mesenchymal stem cells and their derived extracellular vesicles as a promising therapy for acute respiratory distress syndrome: from bench to clinic // *Front Immunol*. 2023. Vol. 14. P. 1244930. doi: 10.3389/fimmu.2023.1244930

17. Wang L., Zhao Y., Shi S. Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes: implications for immunotherapy and tissue regeneration // *J Dent Res*. 2012. Vol. 91, N 11. P. 1003–1010. doi: 10.1177/0022034512460404

18. Ayala-Cuellar A.P., Kang J.H., Jeung E.B., Choi K.C. Roles of mesenchymal stem cells in tissue regeneration and immunomodulation // *Biomol Ther (Seoul)*. 2019. Vol. 27, N 1. P. 25–33. doi: 10.4062/biomolther.2017.260

19. Потапнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регулирование цитокинами // *Иммунология*. 2002. Т. 23, № 4. С. 237–243.

20. Naji A., Favier B., Deschaseaux F., et al. Mesenchymal stem/stromal cell function in modulating cell death // *Stem Cell Res Ther*. 2019. Vol. 10, N 1. P. 56. doi: 10.1186/s13287-019-1158-4

21. Benvenuto F., Ferrari S., Gerdoni E., et al. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state // *Stem Cells*. 2007. Vol. 25, N 7. P. 1753–1760. doi: 10.1634/stemcells.2007-0068

22. Xu G., Zhang Y., Zhang L., et al. The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells // *Biochem Biophys Res Commun*. 2007. Vol. 361, N 3. P. 745–750. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.052

23. Bocelli-Tyndall C., Bracci L., Schaeren S., et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the in vitro proliferation of lymphocytes stimulated by interleukin 2, 7 and 15 // *Ann Rheum Dis*. 2009. Vol. 68, N 8. P. 1352–1359. doi: 10.1136/ard.2008.094003

24. Rubtsov Y., Goryunov K., Romanov A., et al. Molecular mechanisms of immunomodulation properties of mesenchymal stromal cells: a new insight into the role of ICAM-1 // *Stem Cells Int*. 2017. Vol. 2017. P. 6516854. doi: 10.1155/2017/6516854

25. Chang Y.F., Cheng Y.H., Ko Y.C., et al. Anti-apoptotic and autophagic effect: Using conditioned medium from human bone marrow mesenchymal stem cells to treat human trabecular meshwork cells // *Regen Ther*. 2022. Vol. 22. P. 50–58. doi: 10.1016/j.reth.2022.12.002

26. Del Fattore A., Luciano R., Pascucci L., et al. Immunoregulatory effects of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles on T lymphocytes // *Cell Transplant*. 2015. Vol. 24, N 12. P. 2615–2627. doi: 10.3727/096368915X687543

27. Le Burel S., Thepenier C., Boutin L., et al. Effect of Mesenchymal stromal cells on T cells in a septic context: immunosuppression or immunostimulation? // *Stem Cells Dev*. 2017. Vol. 26, N 20. P. 1477–1489. doi: 10.1089/scd.2016.0184

28. Pizzuti V., Balducci E., Di Nunzio M., et al. Urine-derived renal epithelial cells isolated after kidney transplant are sensitive to neutrophil gelatinase-associated lipocalin exposure during in vitro culture // *Eur J Cell Biol*. 2024. Vol. 103, N 3. P. 151442. doi: 10.1016/j.jcb.2024.151442

29. Никифоров В.С., Блинова Е.А., Котикова А.И., Аклев А.В. Транскрипционная активность генов репарации, апоптоза и клеточного цикла (TP53, MDM2, ATM, BAX, BCL-2, CDKN1A, OGG1, XPC, PADI4, MAPK8, NF-KB1, STAT3, GATA3) у хронически облученных людей с различной интенсивностью апоптоза лимфоцитов периферической крови // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022. Т. 26, № 1. С. 50–58. EDN: KBBUEC doi: 10.18699/VJGB-22-08

30. Игнатенко С.И., Космачева С.М., Потапнев М.П., и др. Рост-стимулирующая активность препаратов тромбоцитов в отношении мезенхимальных стволовых клеток in vitro // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2016. № 1. С. 52–58.

31. Strunk D., Lozano M., Marks D.C., et al. International forum on GMP-grade human platelet lysate for cell propagation: summary // *Vox Sang*. 2018. Vol. 113, N 1. P. 80–87. doi: 10.1111/vox.12593

REFERENCES

1. Samadi P, Saki S, Manoochehri H, Sheykhasan M. Therapeutic applications of mesenchymal stem cells: a comprehensive review. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2021;16(3):323–353. doi: 10.2174/1574888X15666200914142709

2. Gowen A, Shahjin F, Chand S, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: challenges in clinical applications. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:149. doi: 10.3389/fcell.2020.00149

3. Giusti I, D'Ascenzo S, Macchiarelli G, et al. In vitro evidence supporting applications of platelet derivatives in regenerative medicine. *Blood Transfus*. 2020;18(2):117–129. doi: 10.2450/2019.0164-19

4. Fan XL, Zhang Y, Li X, Fu QL. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(14):2771–2794. doi: 10.1007/s00018-020-03454-6

5. Sarre C, Contreras-Lopez R, Nernpermpisooth N, et al. PPARβ/δ priming enhances the anti-apoptotic and therapeutic properties of mesenchymal stromal cells in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):167. doi: 10.1186/s13287-022-02840-0 Corrected and republished from: *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):338. doi: 10.1186/s13287-022-03086-6

6. Jiao Y, Zhang Q, Zhang J, et al. Platelet-rich plasma ameliorates lipopolysaccharide-induced cardiac injury by inflammation and ferroptosis regulation. *Front Pharmacol*. 2022;13:1026641. doi: 10.3389/fphar.2022.1026641

7. Armstrong BBS, Pedrosa JCM, Conceição Carvalho JD Jr, Ferreira LM. Mesenchymal stem cells in lung diseases and their potential use in COVID-19 ARDS: A systematized review. *Clinics (Sao Paulo)*. 2023;78:100237. doi: 10.1016/j.clinsp.2023.100237

8. Kadono M, Nakashima A, Ishiuchi N, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells cultured in serum-free medium attenuate acute contrast-induced nephropathy by exerting anti-apoptotic effects. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14(1):337. doi: 10.1186/s13287-023-03553-8
9. Nemati M, Karbalaee N, Mokarram P, Dehghani F. Effects of platelet-rich plasma on the pancreatic islet survival and function, islet transplantation outcome and pancreatic pdx1 and insulin gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Growth Factors.* 2020;38(3-4):137–151. doi: 10.1080/08977194.2021.1881502
10. Lopes-Pacheco M, Robba C, Rocco PRM, Pelosi P. Current understanding of the therapeutic benefits of mesenchymal stem cells in acute respiratory distress syndrome. *Cell Biol Toxicol.* 2020;36(1):83–102. doi: 10.1007/s10565-019-09493-5
11. Markova KL, Kozyreva AR, Gorshkova AA, et al. Methodological approaches to assessing the size and morphology of cell line microvesicles. *Cell Technologies in Biology and Medicine.* 2020;(2):129–138. EDN: EJWQXSX doi: 10.1007/s10517-020-04934-2
12. Yamaguchi R, Terashima H, Yoneyama S, et al. Effects of platelet-rich plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor. *J Surg Res.* 2012;173(2):258–266. doi: 10.1016/j.jss.2010.10.001
13. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006;98(5):1076–1084. doi: 10.1002/jcb.20886
14. Fu Y, Karbaat L, Wu L, et al. Trophic effects of mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part B Rev.* 2017;23(6):515–528. doi: 10.1089/ten.TEB.2016.0365
15. Samsonraj RM, Raughunath M, Nurcombe V, et al. Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. *Stem cells Transl Med.* 2017;6(12):2173–2185. doi: 10.1002/sctm.17-0129
16. Zhuan X, Jiang Y, Yang X, et al. Advances of mesenchymal stem cells and their derived extracellular vesicles as a promising therapy for acute respiratory distress syndrome: from bench to clinic. *Front Immunol.* 2023;14:1244930. doi: 10.3389/fimmu.2023.1244930
17. Wang L, Zhao Y, Shi S. Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes: implications for immunotherapy and tissue regeneration. *J Dent Res.* 2012;91(11):1003–1010. doi: 10.1177/0022034512460404
18. Ayala-Cuellar AP, Kang JH, Jeung EB, Choi KC. Roles of mesenchymal stem cells in tissue regeneration and immunomodulation. *Biomol Ther (Seoul).* 2019;27(1):25–33. doi: 10.4062/biomolther.2017.260
19. Potapnev MP. Apoptosis of cells of the immune system and its regulation by cytokines. *Immunologiya.* 2002;23(4):237–243. (In Russ.)
20. Naji A, Favier B, Deschaseaux F, et al. Mesenchymal stem/stromal cell function in modulating cell death. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):56. doi: 10.1186/s13287-019-1158-4
21. Benvenuto F, Ferrari S, Geronzi E, et al. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells.* 2007;25:1753–1760. doi: 10.1634/stemcells.2007-0068
22. Xu G, Zhang Y, Zhang L, et al. The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;361(3):745–750. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.052
23. Bocelli-Tyndall C, Bracci L, Schaeren S, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the in vitro proliferation of lymphocytes stimulated by interleukin 2, 7 and 15. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(8):1352–1359. doi: 10.1136/ard.2008.094003
24. Rubtsov Y, Goryunov K, Romanov A, et al. Molecular mechanisms of immunomodulation properties of mesenchymal stromal cells: a new insight into the role of ICAM-1. *Stem Cells Int.* 2017;2017:6516854. doi: 10.1155/2017/6516854
25. Chang YF, Cheng YH, Ko YC, et al. Anti-apoptotic and autophagic effect: Using conditioned medium from human bone marrow mesenchymal stem cells to treat human trabecular meshwork cells. *Regen Ther.* 2022;22:50–58. doi: 10.1016/j.reth.2022.12.002
26. Del Fattore A, Luciano R, Pascucci L, et al. Immunoregulatory effects of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles on T lymphocytes. *Cell Transplant.* 2015;24(12):2615–2627. doi: 10.3727/096368915X687543
27. Le Burel S, Thepenier C, Boutin L, et al. Effect of Mesenchymal stromal cells on T cells in a septic context: immunosuppression or immunostimulation? *Stem Cells Dev.* 2017;26(20):1477–1489. doi: 10.1089/scd.2016.0184
28. Pizzuti V, Balducci E, Di Nunzio M, et al. Urine-derived renal epithelial cells isolated after kidney transplant are sensitive to neutrophil gelatinase-associated lipocalin exposure during in vitro culture. *Eur J Cell Biol.* 2024;103(3):151442. doi: 10.1016/j.ejcb.2024.151442
29. Nikiforov VS, Blinova EA, Kotikova AI, et al. Transcriptional activity of repair, apoptosis and cell cycle genes (TP53, MDM2, ATM, BAX, BCL-2, CDKN1A, OGG1, XPC, PADI4, MAPK8, NF-KB1, STAT3, GATA3) in chronically exposed persons with different intensity of apoptosis of peripheral blood lymphocytes. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2022;26(1):50–58. EDN: KBBUEC doi: 10.18699/VJGB-22-08
30. Ihnatsenko SI, Kosmacheva SM, Potapnev MP, et al. Growth-stimulating activity of platelet preparations in relation to mesenchymal stem cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological Series [Vesci Nacyãnal'naj akademiï navuk Belarusi. Seryã biãlagiãnyh navuk].* 2016;(1):52–58.
31. Strunk D, Lozano M, Marks DC, et al. International forum on GMP-grade human platelet lysate for cell propagation: summary. *Vox Sang.* 2018;113(1):80–87. doi: 10.1111/vox.12593

ОБ АВТОРАХ

* **Потапнев Михаил Петрович**, д-р мед. наук, профессор;
адрес: Республика Беларусь, 220080, Минск,
Долгиновский тракт, д. 160;
ORCID: 0000-0002-6805-1782;
eLibrary SPIN: 5379-2168;
e-mail: mpotapnev@yandex.by

AUTHORS' INFO

* **Michael P. Potapnev**, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor;
address: 160 Dolginovski tract, 220080 Minsk,
Republic of Belarus;
ORCID: 0000-0002-6805-1782;
eLibrary SPIN: 5379-2168;
e-mail: mpotapnev@yandex.by

Клименкова Оксана Владимировна;

ORCID: 0009-0001-1651-4298;

eLibrary SPIN: 2802-5300;

e-mail: oks.klimenkovaaa@gmail.ru

Гончарова Наталья Васильевна;

ORCID: 0000-0002-8143-4518;

eLibrary SPIN: 2713-8210;

e-mail: ksj2006@gmail.ru

Куделич Олег Аркадьевич, канд. мед. наук, доцент;

ORCID: 0000-0003-0569-3427;

eLibrary SPIN: 7410-1760;

e-mail: kudelichsurg@gmail.com

Кондратенко Геннадий Георгиевич, д-р мед. наук, профессор;

ORCID: 0000-0001-5295-1068;

eLibrary SPIN: 4561-2842;

e-mail: gkondrat@yandex.ru

Oksana V. Klimenkova;

ORCID: 0009-0001-1651-4298;

eLibrary SPIN: 2802-5300;

e-mail: oks.klimenkovaaa@gmail.ru

Natalia V. Goncharova;

ORCID: 0000-0002-8143-4518;

eLibrary SPIN: 2713-8210;

e-mail: ksj2006@gmail.ru

Oleg A. Kudelich, MD, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor;

ORCID: 0000-0003-0569-3427;

eLibrary SPIN: 7410-1760;

e-mail: kudelichsurg@gmail.com

Gennady G. Kondratenko, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor;

ORCID: 0000-0001-5295-1068;

eLibrary SPIN: 4561-2842;

e-mail: gkondrat@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author