

На правах рукописи

Бигильдеев Алексей Евгеньевич

**УСТРОЙСТВО И РЕГУЛЯЦИЯ ОТДЕЛА СТВОЛОВЫХ
МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК**

14.01.21 – гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва

2017 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ НМИЦ гематологии МЗ РФ)

Научные консультанты:

Савченко Валерий Григорьевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор

Дризе Нина Иосифовна, доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Купраш Дмитрий Владимирович, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Зарицкий Андрей Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, директор Института гематологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Томилин Алексей Николаевич, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии стволовых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2017 г. в _____ часов

на заседании диссертационного Совета Д 208.074.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства».

по адресу: 193024, Россия, г. Санкт-Петербург, 2-я Советская ул., д.16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального Государственного Учреждения «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства».

Автореферат разослан «___» _____ 2017 года

Ученый секретарь диссертационного Совета

доктор медицинских наук

Т. В. Глазанова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Полноценное кроветворение невозможно без специального микроокружения, которое необходимо стволовым кроветворным клеткам (СКК) для их поддержания, а их потомству – для пролиферации и дифференцировки в нужном направлении и количестве. Микроокружение создаётся клетками стромы костного мозга (КМ). Известно, что за образование стромы КМ отвечают мезенхимные стволовые клетки (МСК). В настоящее время отсутствует четкое представление об устройстве и регуляции отдела МСК. Присутствие МСК в КМ было показано во второй половине XX века на моделях образования колоний-клонов фибробластов, способных к дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлениях, и формирования очагов эктопического кроветворения. Однако, наличие высокого пролиферативного потенциала у МСК было показано только косвенно в силу отсутствия в то время методов индивидуального маркирования клеток. Отдел морфологически узнаваемых зрелых клеток и их унипотентных мезенхимных клеток-предшественниц к настоящему времени описан, хотя и существенно менее подробно, чем для кроветворных клеток. Большинство экспериментальных данных указывает на то, что в отделе МСК существует иерархия клеток-предшественниц.

Регуляция в отделе МСК также является недостаточно изученной. Большинство сведений о факторах роста и индукции дифференцировки получены в системах *in vitro* и относятся к линейно-специфическим факторам. МСК и их потомки разных стадий дифференцировки взаимодействуют в КМ как на уровне прямых межклеточных контактов, так и на уровне сигнальных молекул. В силу этого перспективным направлением исследования регуляции в отделе МСК является установление роли факторов, традиционно известных по своему воздействию на кроветворные клетки.

Настоящая работа посвящена изучению иерархического устройства отдела МСК на уровне отдельных категорий клеток-предшественниц и индивидуальных клеток – представителей этих категорий – у человека и мыши. Для установления иерархии, или структурной многоуровневой организации, отдела МСК и процессов, обеспечивающих функционирование системы в целом, в работе подробно исследуются характеристики мезенхимных клеток-предшественниц, устанавливаются качественные соотношения между ними, и исследуются факторы, влияющие на основные свойства различных типов мезенхимных клеток-предшественниц. Доказана системная роль интерлейкина-1 β в регуляции отдела МСК и представлена схема устройства отдела МСК.

Степень разработанности темы

В настоящее время известно, что взрослый организм содержит стволовые клетки различных типов, которые обеспечивают обновление каждого конкретного органа или ткани в процессе онтогенеза и регенерацию в случае экстренной ситуации. Свидетельства того, что в КМ кроме СКК присутствует второй тип стволовых клеток – МСК – были впервые получены в работах А.Я. Фриденштейна (Friedenstein *et al.*, 1974; Friedenstein, Gorskaja and Kulagina, 1976; Owen and Friedenstein, 1988), а позднее подтверждены в экспериментах И.Л. Черткова, (Drize, Gurevitch and Chertkov, 1986; Чертков and Гуревич, 1984). Эти исследования стали основополагающими для изучения числа, свойств и кинетики клеток-предшественниц кроветворной стромы. Значительный вклад в эту область внесли эксперименты И.Л. Черткова с сотрудниками, основанные на модели длительной культуры костного мозга (ДККМ). В них было показано, что существует промежуточные мезенхимные клетки-предшественницы, которые уступают по пролиферативному потенциалу МСК и не способны к построению кроветворной территории *in vivo* у мышей. Академик В.Г. Савченко совместно с сотрудниками лаборатории Физиологии кроветворения ФГБУ «НМИЦ Гематологии» МЗ РФ ведут активную работу по исследованию клеток, по своим характеристикам напоминающих МСК – мультипотентных

мезенхимных стромальных клеток (ММСК) – выделяемых из КМ и культивируемых *in vitro*. Следует также отметить значение работ, выполняемых под руководством В.А. Ткачука и Е.В. Парфеновой, по ангиогенному и регенеративному потенциалу ММСК. Исследования клонального роста ММСК, выделенных из селезенки и печени зародышей крысы, чувствительности этих клеток к ростовым факторам ведутся сотрудниками Института биологии развития РАН О.В. Паюшиной и В.И. Старостиным. Известно, что в организме МСК находятся в КМ в условиях гипоксии. Поэтому актуальными являются исследования, демонстрирующие свойства ММСК: их пролиферативный, дифференцировочный потенциал, спектр секретируемых веществ, – в условиях недостатка кислорода. Ведущие позиции в России в этой области занимают сотрудники Института медико-биологических проблем РАН Л.Б. Буравкова и Е.Р. Андреева.

Несмотря на значительный успех в исследовании МСК, существует мало информации о том, как устроена стромальная ткань на клональном уровне. Однозначно разрешить этот вопрос могут помочь методы индивидуального маркирования клеток и наблюдения за каждым отдельным клоном в процессе построения очага. Методы индивидуального маркирования используются отечественными и зарубежными учёными для исследования клональности кроветворения. Среди зарубежных учёных, занимающих лидирующие позиции в этом вопросе, следует выделить Дж.Л. Абковиц (J.L. Abkowitz), Б. Минтц (B. Mintz), Дж. Дика (J. Dick), И.Л. Вейссмана (I.L. Weissman), П.Дж. Квезенберри (P.J. Quesensberry), С.Дж. Сцилвасси (S.J. Szilvassy) и Л.И. Зона (L.I. Zon). Указанные методы были успешно применены Л. В. Быстрых и Е. Веровской для исследования клонального состава СКК и его динамики в кроветворении.

Цель исследования:

Цель данной работы – уточнить основные уровни иерархии отдела мезенхимных стволовых клеток у млекопитающих, изучить свойства

стромальных-клеток предшественниц на клональном уровне и определить факторы, регулирующие эти свойства.

Задачи исследования:

1. Представить дополненное иерархическое древо мезенхимных стволовых клеток.
2. Изучить клональный состав и концентрацию мезенхимных стволовых клеток и клеток-предшественниц в костном мозге мыши с помощью индивидуального маркирования лентивирусным вектором *in vivo*.
3. Проанализировать клональный состав мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека в системе *in vitro* с помощью индивидуального маркирования клеток-предшественниц.
4. Определить факторы роста стромального микроокружения у мышей.
5. Установить роль интерлейкина-1 β в отделе мезенхимных стволовых клеток мыши.
6. Исследовать влияние интерлейкина-1 β на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки человека.

Научная новизна:

Установлены соотношения между основными уровнями иерархии клеток-предшественниц в отделе МСК. На вершине иерархии находятся мезенхимные стволовые клетки, обладающие высоким пролиферативным потенциалом, достаточным для серийного переноса кроветворного микроокружения *in vivo*, способные дифференцироваться по всем стромальным направлениям. Установлено, что в КМ одного бедра у мышей одновременно функционирует как минимум несколько сотен МСК. Ниже в иерархии располагаются колониеобразующие единицы фибробластные (КОЕф) – полипотентные клетки-предшественницы, не способные к переносу кроветворного микроокружения *in vivo*, но обладающие пролиферативным потенциалом, достаточным для образования клеточной колонии *in vitro*. Ещё ниже в иерархии находятся индуцибельные клетки-предшественницы, участвующие в

построении кроветворного микроокружения *in vivo* под действием внешних ростовых факторов. У основания иерархии находятся полностью дифференцированные клетки стромы.

Получены экспериментальные доказательства того, что ММСК человека содержат полипотентные клетки-предшественницы и представляют собой гетерогенную по пролиферативному потенциалу клеточную популяцию, чувствительную к интерлейкину-1 β (ИЛ-1), поддержание которой осуществляется за счёт функционирования множества короткоживущих клонов, сменяющих друг друга. Продемонстрировано, что поликлональность свойственна не только кроветворной, но и стромальной ткани КМ у человека и мыши, и, следовательно, является общим принципом функционирования и поддержания этих тканей.

Установлено, что ИЛ-1 помимо важной роли в индукции воспаления и клеточного иммунного ответа является одним из системных регуляторов стромального кроветворного микроокружения человека и мыши. Чувствительность к ИЛ-1 определяет взаимное расположение клеток-предшественниц в иерархии МСК. Этот фактор не влияет на количество МСК *in vivo* у мышей, но стимулирует КОЕф к пролиферации и дифференцировке в индуцибельные клетки-предшественницы, что приводит к увеличению кроветворной территории в модели формирования очагов эктопического кроветворения под капсулой почки. Человеческие ММСК чувствительны к ИЛ-1. В ответ на него увеличивается пролиферация клеток культуры, клональный потенциал, а также способность поддерживать кроветворные клетки-предшественницы, что может вносить вклад в регуляцию кроветворения стромальным микроокружением костного мозга.

Теоретическая и практическая значимость работы:

Настоящее исследование вносит значительный вклад в понимание основных принципов организации отдела МСК. Показано, что построение и длительное поддержание кроветворного микроокружения КМ осуществляется за счёт

зрелых мезенхимных стромальных клеток, образующихся посредством пролиферации и дифференцировки МСК через ряд промежуточных полипотентных клеток-предшественниц, пролиферативный потенциал которых снижается по мере дифференцировки. Показано, что ИЛ-1 является ростовым фактором для индуцибельных мезенхимных клеток-предшественниц у мыши *in vivo* и для ММСК человека *in vitro*. Культивирование ММСК с добавлением ИЛ-1 приводит к увеличению суммарной клеточной продукции культуры в несколько раз и не изменяет основных свойств этой культуры, не индуцирует дифференцировку клеток и не влияет на основные поверхностные маркеры ММСК. После дополнительных исследований, ИЛ-1 может быть использован как вспомогательный ростовой фактор ММСК.

Методология и методы исследования

В работе изучали кроветворное микроокружение КМ мыши и человека. Клетки КМ мыши (первичный КМ или стромальный подслон длительной культуры костного мозга /ДККМ/) имплантировали под капсулу почки мышей-реципиентов под общей анестезией. Через 6 недель после операции извлекали очаг эктопического кроветворения и анализировали клеточный состав. Все эксперименты над животными проводили в соответствии с международной конвенцией по использованию лабораторных животных для научных исследований. В работе также использовали КМ здоровых доноров и больных различными видами гематологических заболеваний. Все доноры и пациенты подписали информированное согласие на использование биоматериала в научных целях. ММСК человека, ДККМ человека и мыши, а также КОЕф получали и культивировали в стандартных условиях. Для маркирования исследуемых клеток использовали самоинактивирующиеся лентивирусные векторы. Анализ вирусного титра проводили с помощью проточной цитофлуориметрии или полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (РВ-ПЦР). Поверхностный фенотип клеток анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии. Отдельные популяции клеток

сортировали с помощью системы магнитной сепарации. Иммуноферментный анализ проводили с помощью коммерческих наборов по стандартной методике. Экспрессию генов анализировали с помощью обратной транскрипции и последующей традиционной ПЦР и РВ-ПЦР. Секвенирование отдельных фрагментов ДНК проводили по методу Сэнгера. Высокопроизводительное параллельное секвенирование проводили на платформе Illumina. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программах Statistica и Microsoft Excel.

Положения, выносимые на защиту:

1. Отдел мезенхимных клеток-предшественниц человека и мыши устроен по принципу иерархии. Удаётся выделить пять категорий клеток, различающихся по своим свойствам. На вершине иерархии находятся мезенхимные стволовые клетки. Ниже располагаются колониеобразующие единицы фибробластные (КОЕф). Индуцибельные клетки-предшественницы, чувствительные к внешним ростовым факторам, находятся в иерархии ниже, чем КОЕф. Ещё ниже в иерархии располагаются унипотентные морфологически различимые клетки-предшественницы. В основании иерархической структуры располагаются полностью дифференцированные клетки стромы КМ.
2. Поликлональность является общим и фундаментальным принципом функционирования костного мозга человека и мыши. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки человека представляют собой гетерогенную по пролиферативному потенциалу популяцию, в которой одновременно функционирует не менее нескольких десятков небольших короткоживущих клонов, сменяющих друг друга с течением времени. Большие долгоживущие клоны выявляются не у каждого донора КМ, а если выявляются, то составляют 6 – 24% от общего количества функционирующих клонов культуры. В костном мозге мыши одновременно функционирует, по меньшей мере, несколько сотен клонов мезенхимных

клеток-предшественниц, участвующих в построении кроветворного микроокружения.

3. Плейотропный цитокин интерлейкин-1 β является одним из системных регуляторов стромального кроветворного микроокружения человека и мышцы. Чувствительность к этому фактору определяет положение клеток в иерархии МСК. Интерлейкин-1 β является фактором роста мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека.

Степень достоверности и апробация результатов

По теме диссертации опубликована 41 печатная работа, в том числе 10 статей в отечественных журналах и 3 статьи в зарубежных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации результатов диссертационных исследований. Диссертация рассмотрена на объединенном заседании проблемных комиссий «Клинические исследования в гематологии (гемобластозы, депрессии кроветворения; ТКМ; миело- и лимфопролиферативные заболевания; опухоли лимфатической системы; патология красной крови; ИТП; порфирий), трансфузиологии, патологии гемостаза, хирургической гематологии, анестезиологии и интенсивной терапии», «Фундаментальные исследования в гематологии, трансплантологии, трансфузиологии: Гемопоз, молекулярная биология, биотехнология, иммуногематология; биохимия; биофизика» и «Проблемы донорства, производства и контроля качества компонентов и препаратов крови, разработки средств воздействия на систему крови», состоявшемся «15» февраля 2017 года в ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, протокол № 1.

Положения диссертационной работы были представлены на Международных конгрессах Европейской ассоциации по гематологии: 2010 год – Барселона, Испания; 2011 год – Лондон, Великобритания; 2015 год – Вена, Австрия; 2016 год – Копенгаген, Дания; ежегодных конференциях Международного общества по экспериментальной гематологии и стволовым

клеткам: 2012 год – Амстердам, Нидерланды; 2015 год – Киото, Япония; 2016 год – Сан Диего, США, 2017 год – Франкфурт-на-Майне, Германия; конференциях Международного общества по исследованию стволовых клеток: 2011 год – Торонто, Канада; 2012 год – Йокогама, Япония; конференции Европейского общества трансплантации костного мозга (Стамбул, Турция, 2015); конференции Американского общества гематологии (Сан Диего, 2016); Международной научной конференции «Наука, технология и жизнь» (Карловы Вары, Чехия, 2015); а также во Всероссийских конференциях и конференциях с международным участием: на Конгрессе гематологов России (Москва, 2012, 2016), на Всероссийской научной школе-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2011); на 5-м Мемориальном симпозиуме в честь памяти Р.М. Горбачевой «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток» (Санкт-Петербург, 2011); на IV международной (XI итоговой) научно-практической конференции молодых ученых (Челябинск, 2013); на XIII Международной молодежной научной школе «Проблемы фундаментальной и прикладной радиобиологии» (Обнинск, 2013); на IV Съезде физиологов СНГ (Сочи, 2014).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и трех приложений. Материалы диссертации изложены на 257 страницах машинописного текста и включают 60 рисунков, 10 таблиц и список литературы из 380 источников.

Личный вклад автора

Автором лично выполнены эксперименты по исследованию клонального состава МСК мыши и ММСК человека, эксперименты по изучению влияния ИЛ-1 на представителей различных ступеней в иерархии МСК, эксперименты по исследованию экспрессии генов ММСК человека, ДККМ человека и мыши.

Проведена обработка данных, статистический анализ и обобщение результатов исследований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Обзор литературы посвящен описанию свойств мезенхимных стволовых клеток и их более дифференцированных потомков. Описаны основные методы исследования мезенхимных клеток-предшественниц, такие как метод формирования очагов эктопического кроветворения под капсулой почки у мышей *in vivo* и культивирование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, получение колониеобразующих единиц фибробластных. Особое внимание уделено методам индивидуального маркирования и слежения за судьбой отдельных маркированных клеток. Кроме того, в разделе приведено описание известных факторов роста и регуляции стромальных клеток-предшественниц.

Материалы и методы

Исследование проводили на клетках мыши и человека. В работе использовали самок мышей гибридов F1 (СВА х С57В16). Эксперименты с животными были одобрены комиссией по биомедицинской этике при институте медико-биологических проблем РАН, протокол №257. В работе использовали образцы костного мозга (КМ) здоровых доноров независимо от пола в возрасте от 12 до 78 лет (медиана 34 года). Всего за время исследования с 2008 по 2016 год были получены образцы КМ от 113 доноров (56 мужчин и 57 женщин). Все образцы КМ были получены во время эксфузии донорского КМ для аллогенной трансплантации в отделении высокодозной химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга ФГБУ «НМИЦ Гематологии» МЗ РФ после подписания донорами информированного согласия. Приведенные в данной работе эксперименты были одобрены локальным этическим комитетом.

Клональный состав мезенхимных стволовых клеток (МСК) мыши и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) человека изучали, маркируя длительные культуры костного мозга (ДККМ) мыши и ММСК человека, соответственно, самоинактивирующимися лентивирусными векторами на основе системы LeGO (Weber *et al.*, 2008). Для получения вирусных частиц в клетки пакующей линии PhoenixGP с помощью кальциево-фосфатной трансфекции вводили плазмиды, кодирующие структурные компоненты лентивирусов. Одновременно с ними вводили плазмиду, несущую маркер в виде флуоресцентного белка eGFP с активным промотором или без него, или маркер в виде генетического штрих-кода, представленного последовательностью из 35 случайных нуклеотидов. Титр вируса в полученных сконцентрированных супернатантах определяли с помощью проточной цитофлуориметрии или полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для заражения ДККМ лентивирусами, через 14 дней после установления культур из флаконов с ДККМ полностью отбирали среду для культивирования и наносили на подслои прилипающих клеток (ППК) вирусные частицы из расчета примерно 10^7 инфекционных частиц на флакон с площадью дна 25 см^2 (T25) в 3 мл среды α MEM с 10% ЭТС и 8 мкг/мл полибрена. Через 3-24 ч среду с вирусами заменяли на 10 мл полной питательной среды. Для заражения ММСК человека лентивирусами, из флаконов с клетками полностью отбирали среду для культивирования и наносили на клеточные подслои вирусные частицы из расчета примерно 10^7 инфекционных частиц на флакон T25 (или 3×10^7 инфекционных частиц на флакон T175) в 3 (7) мл среды α MEM с 10% ЭТС и 8 мкг/мл полибрена. Через 6 часов среду меняли на 5 (25) мл полной питательной среды.

Клональный состав МСК мыши исследовали с помощью метода формирования эктопических очагов кроветворения под капсулой почки (Чертков и Гуревич, 1984). Реципиентам под общей анестезией надрезали брюшную полость, экспонировали почку и надрезали её капсулу. Приподнимали край капсулы и на кончике шпателя имплантировали под

капсулу костномозговой цилиндр или ППК мышью ДККМ, собранный скреппером из культурального флакона и осаждённый в течение 1 мин (1000 об/мин). Использовали сингенных доноров и реципиентов. Место операции ушивали хирургической нитью. Через 6 недель выделяли образовавшийся очаг. В экспериментах по исследованию клонального состава МСК мышцы в качестве источника трансплантата использовали ППК ДККМ ($n = 20$), маркированные лентивирусами с генетическими штрих-кодами. Через 6 недель выделяли образовавшийся очаг, разделяли костную раковину и внутреннюю клеточную массу. Часть внутренней клеточной массы ретрансплантировали под капсулу почки вторичному реципиенту. Из костных раковин и внутренних клеточных масс первичных и вторичных очагов выделяли ДНК стандартными методами и определяли штрих-коды с помощью высокопроизводительного параллельного секвенирования (NGS) на платформе Illumina. Десять ППК из 20 зараженных ДККМ были клонированы по 500 клеток на ячейку 96-луночного планшета для получения стромальных колоний из колониеобразующих единиц фибробластных (КОЕф) (Bigildeev *et al.*, 2016). Из каждой полученной колонии выделяли ДНК и определяли последовательности штрих-кодов с помощью секвенирования по Сэнгеру. Анализ штрих-кодов осуществляли в программе Arlequin v. 3.5.1.3 (Excoffier and Lischer, 2010).

Клональный состав ММСК человека исследовали следующим образом. Получали ММСК из КМ доноров гемопоэтических клеток в стандартной среде для культивирования, состоящей из среды α MEM с 10% ЭТС, 2 mM L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. ММСК были охарактеризованы морфологически, иммунофенотипически по маркерам CD105, CD73, CD59, CD90, CD45, CD34, CD14 и HLA-DR, а также функционально по их способности к остеогенной и адипогенной дифференцировке после добавления соответствующих индукторов. ММСК ($n = 6$) маркировали лентивектором LeGO с eGFP. На каждом пассаже культуры с первого по пятый включительно ММСК клонировали по 1 клетке на ячейку 96-ячеечного планшета. При достижении конfluence в лунке каждый клон

ММСК пересаживали в лунку 24-луночного планшета. Далее, при достижении конфлуентности, – в лунку 6-луночного планшета и, наконец, во флакон T25. Из клонов, полученных в T25, лунках 6- и 24-луночных планшетов выделяли ДНК и устанавливали сайты интеграции провируса с помощью ПЦР, опосредованной лигированием (ОЛ-ПЦР), и с помощью метода гибридизации по Саузерну.

Влияние интерлейкина-1 β (ИЛ-1) на мезенхимные клетки-предшественницы мыши исследовали с помощью метода формирования эктопических очагов кроветворения под капсулой почки. Мышам-реципиентами КМ были как интактные животные (n = 40), так и облучённые животные (n = 6). Для установления роли ИЛ-1 в формировании кроветворного микроокружения, этот фактор вводили ежедневно внутривнутрибрюшинно и подкожно в течение первых 15 дней после имплантации КМ под капсулу почки в объёме 0,3 мл в дозе 15 (n = 11), 25 (n = 6), 30 (n = 11), 100 (n = 6), 200 (n = 2) и 400 (n = 4) пг/мышь. Контрольным животным вводили фосфатно-солевой буфер (ФСБ) по тому же расписанию. Несколько первичных очагов, полученных в контрольных (n = 5) животных и в животных, которым вводили ИЛ-1 в дозе 100 пг (n = 6), были ретрансплантированы сингенным реципиентам для получения вторичных очагов. Определяли размер образовавшихся первичных и вторичных очагов эктопического кроветворения по числу кроветворных клеток в них через 6 недель после имплантации КМ. Остеогенную активность стромальных клеток-предшественниц оценивали по весу новообразованной кости. Для того, чтобы доказать роль ИЛ-1 в формировании кроветворного микроокружения эктопических очагов, реципиентам сингенного КМ инъецировали 100 пг ИЛ-1 одновременно с анакинрой (ингибитор действия ИЛ-1), которую вводили в дозе 3 и 30 мкг/мышь подкожно ежедневно в течение первых 15 дней после имплантации КМ под капсулу почки. В тех же условиях анакинру вводили облучённым реципиентам КМ. Необлучённым контрольным реципиентам КМ вводили только анакинру в указанных дозах по указанному расписанию.

Влияние ИЛ-1 оценивали также и на ММСК человека. ММСК выделяли из КМ 26 доноров (13 мужчин и 13 женщин) в возрасте от 18 до 56 лет (медиана 32 года). Рекомбинантный ИЛ-1 добавляли в концентрации 4 пг/мл при получении культуры и далее одновременно со сменой среды дважды в неделю. Анализировали кумулятивную клеточную продукцию ММСК. Для оценки пролиферативного потенциала ММСК на втором и пятом пассажах клонировали по 1 клетке на ячейку 96-луночной платы. Каждый раз клонировали 120 клеток в полной питательной среде с добавлением 5 нг/мл bFGF. Подсчитывали количество лунок, содержащих колонии-клоны. Эффективность клонирования вычисляли по числу отрицательных лунок по формуле Пуассона. Из ММСК и индуцированных к дифференцировке ММСК тех же доноров КМ выделяли тотальную РНК с помощью стандартного метода с гуанидина изотиоцианатом и фенольной экстракции. Проводили обратную транскрипцию с помощью MMLV ревертазы и смеси случайных гексамеров и олиго-dT праймеров. Изучали экспрессию ранних и поздних генов-маркёров остеогенной (остеопонтин /SPP1/ и остеокальцин /BGLAP/), адипогенной (рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом гамма /PPARG/) и хондрогенной дифференцировки (SOX9) с помощью ПЦР. Кроме этого, в контрольных ММСК и ММСК, культивированных с ИЛ-1, исследовали экспрессию генов, кодирующих молекулы адгезии, белки, играющие роль в иммуномодуляции, ростовые факторы, факторы транскрипции. Влияние ИЛ-1 на экспрессию поверхностных маркеров, характерных для ММСК, оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии с антителами против CD105, CD73, CD59, CD90, CD45, CD34, CD14 и HLA-DR.

Статистический анализ результатов проводили в программах Microsoft Excel и Statistica 6.0. Для поиска статистически значимых различий между исследуемыми группами использовали t-критерий Стьюдента в случае нормального распределения выборок и односторонний U-тест Манна-Уитни в случае ненормального распределения выборок.

Результаты работы

Маркирование мезенхимных клеток-предшественниц с помощью лентивирусов

Для того чтобы детализировать устройство отдела МСК, необходимо было маркировать отдельные клетки-предшественницы и проследить за судьбой потомства каждого клона. В этой работе использовали введение генетических маркеров с помощью векторов, основанных на лентивирусах, которые способны заражать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, что особенно важно при изучении редко пролиферирующих в физиологических условиях стволовых клеток, а также при изучении клонального состава медленно самообновляющихся тканей, таких как строма. Был поставлен ряд экспериментов по исследованию принципиальной возможности маркирования МСК мышцы с помощью лентивирусов. Через 2 недели после инициации ДККМ мышцы из КМ бедра, клетки культуры инфицировали лентивектором, содержащим маркерный ген eGFP с активным промотором SFFV или без промотора. Затем, ещё через 2 недели после инфицирования, ППК снимали скрепером, не превращая его в одноклеточную суспензию, и имплантировали под капсулу почки сингенных мышей. Из МСК, содержащихся в подслое ДККМ и имплантированных под капсулу почки, формировался очаг эктопического кроветворения. Через 6 недель после имплантации каждый очаг вынимали из-под капсулы почки, часть клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) очага клонировали по 20000 клеток на ячейку 96-луночной платы и через 14 дней производили анализ клеточных колоний – клонов, образованных КОЕф. По мере достижения конfluентности клоны переносили в 24-луночные платы и, наконец, во флаконы с площадью дна 25 см². В ППК исходных ДККМ, зараженных вирусом с активным промотором eGFP, и в КОЕф, полученных из этих клеток, определяли долю маркированных клонов с помощью проточной цитофлуориметрии (Рис.1). Долю маркированных КОЕф, полученных из первичных очагов, образованных ППК ДККМ, заражённых вирусом без промотора eGFP определяли методом ПЦР (Рис.1).

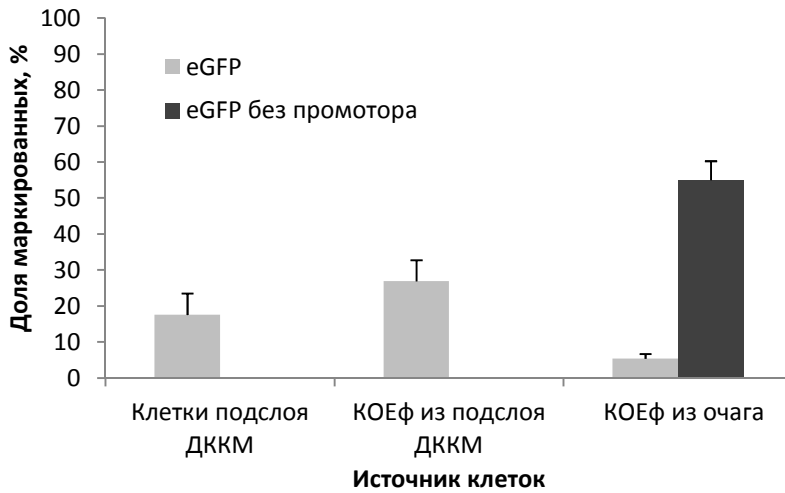


Рисунок 1 – Сравнение пропорции маркированных клеток в подслоях ДККМ, в КОЕф из них и из образованных ими очагов эктопического кроветворения. Группы: eGFP – маркирование вектором, содержащим eGFP под промотором SFFV; eGFP без промотора – маркирование те же вектором с eGFP, но после удаления промотора SFFV. Представлены средние значения ($n = 29$) и стандартные ошибки средних.

Оказалось, что ППК ДККМ можно стабильно маркировать лентивирусами, несущими eGFP. Однако, при активном промоторе флуоресцентного белка, доля маркированных КОЕф, полученных из первичных очагов эктопического кроветворения, была очень низка. Удаление промотора позволило увеличить эту долю в 10 раз до 55%. Маркированные вектором без промотора МСК оказались способными к вторичному построению стромального микроокружения, что было показано при ретрансплантации маркированных очагов вторичным реципиентам. Пропорция маркированных КОЕф – потомков МСК – во вторичных очагах эктопического кроветворения достоверно не уменьшалась и составляла $65\% \pm 10\%$. Результаты описанных экспериментов позволили разработать оптимальный метод маркирования индивидуальных стромальных клеток-предшественниц в составе ППК ДККМ. Метод включает в себя использование лентивирусных векторов, несущих тот или иной маркер, не экспрессирующих флуоресцентные белки; добавление вирусного супернатанта в концентрации 10^7 инфекционных частиц/мл на 6 часов для инфицирования клеток; заражение ДККМ через 2 недели после инициации. Подобранные

условия позволяют добиться 40% эффективности заражения ППК ДККМ, а также стабильного маркирования МСК и их более дифференцированных потомков КОЕф. Данный подход был использован в сочетании с методом формирования очагов эктопического кроветворения под капсулой почки и методами высокопроизводительного параллельного секвенирования для определения концентрации МСК в КМ мышей.

Исследование клонального состава МСК в костном мозге мышей

Мышиные ДККМ (n = 20) заражали библиотекой лентивирусных векторов, несущих генетический штрих-код (Рис.2), через 2 недели после установления культуры.

...NNNACTNNCGANNCTTNNCGANNCTTNGGANNCTANNACTNNCGANNCTTNNCGANNCTTNGGANNCTANNACTNNCGANNCTC...

Рисунок 2 – Структура генетического штрих-кода. Синим цветом обозначены константные нуклеотиды, одинаковые во всех плаزمиде библиотеки. Буквами N обозначены вырожденные нуклеотиды.

Теоретическое разнообразие возможных комбинаций вырожденных нуклеотидов в таких штрих-кодах составляет 4^{32} , или приблизительно 10^{19} . Такое разнообразие позволяет маркировать большие клеточные популяции с низкой вероятностью попадания одного и того же штрих-кода в более чем одну клетку. Еще через 2 недели часть клеток каждого заражённого ППК из ДККМ собирали и имплантировали под капсулу почки сингенному реципиенту. Оставшуюся часть прикрепленных клеточных подслоев ДККМ клонировали по 500 клеток на ячейку 96-луночного планшета. Из полученных клеточных колоний выделяли ДНК и анализировали штрих-коды с помощью секвенирования по Сэнгеру. Через 6 недель в месте имплантации подслоя ДККМ формировался очаг эктопического кроветворения, в состав которого входили костная раковина (КР) и внутренняя клеточная масса (ВКМ). Каждый сформировавшийся очаг разделяли на ВКМ и КР. Из части ВКМ и из всей КР каждого очага выделяли ДНК. Оставшуюся часть ВКМ первичных очагов ретрансплантировали под капсулу почки вторичным сингенным реципиентам

(n = 8). Сформировавшиеся за 6 недель вторичные очаги снова разделяли на КР и ВКМ. Выделяли ДНК из части ВКМ и целой КР каждого вторичного очага. ДНК, выделенную из первичных и вторичных очагов, использовали для анализа штрих-кодов с помощью методов высокопроизводительного параллельного секвенирования на платформе Illumina (Рис.3).

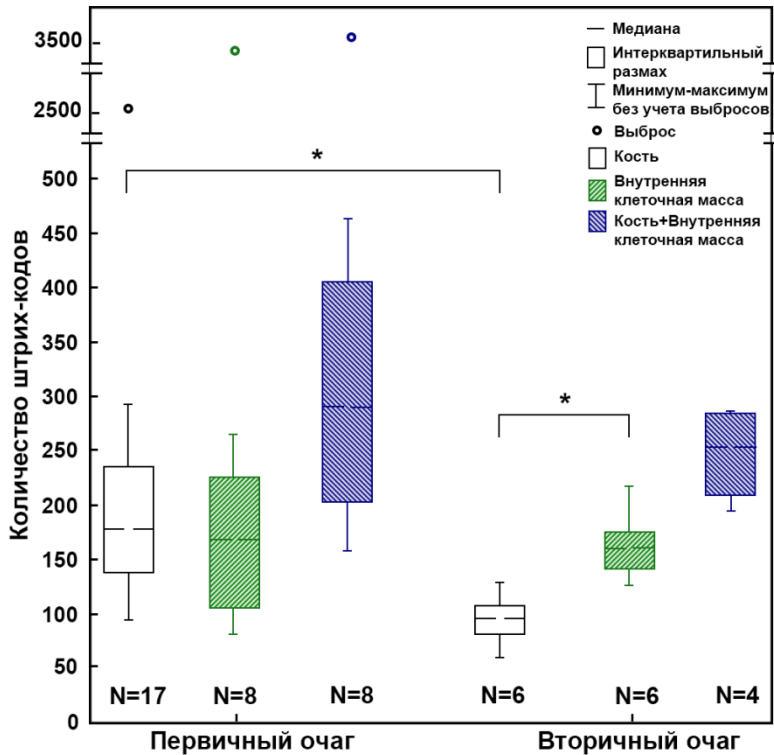


Рисунок 3 – Результаты анализа содержания штрих-кодов в первичных и вторичных очагах эктопического кроветворения.

Суммарное количество штрих-кодов в первичных и вторичных очагах статистически значимо не отличалось друг от друга. Если в первичных очагах насчитывалось от 157 до 3582 штрих-кодов (медиана 290), то во вторичных очагах насчитывалось от 195 до 285 штрих-кодов (медиана 254). В КР вторичных очагов было выявлено от 62 до 168 штрих-кодов (медиана – 96), а в ВКМ – от 126 до 217 штрих-кодов (медиана – 160). Отмечено, что если в первичных очагах количество штрих-кодов в КР и соответствующих им ВКМ не различалось, то во вторичных очагах статистически значимо меньше штрих-кодов выявлялось в косточках по отношению к ВКМ. Более того, в КР вторичных очагов выявлено статистически значимо меньше штрих-кодов по сравнению с КР первичных очагов. Снижение количества штрих-кодов в КР

ретрансплантированных очагов может свидетельствовать о том, что в условиях стресса доля МСК, обладающих способностью к остеогенной дифференцировке, уменьшается при сохранении общего числа МСК.

Учёт штрих-кодов во вторичных очагах и учёт вероятности попадания нескольких штрих-кодов в одну МСК позволили оценить содержание МСК в первичных очагах: оно составило от 181 до 382 МСК. Каждый очаг был получен из 90% клеток ППК ДККМ (остальные 10% клеток были использованы для клонирования КОЕф), а эффективность маркирования ППК можно считать равной 40%. Тогда в исходном ППК инфицированной ДККМ могло содержаться как минимум $180/(0,9 \times 0,4) = 500$ МСК. Каждая ДККМ была получена из КМ одного бедра. Следовательно, в бедре мыши содержится как минимум 500 МСК. В пересчете на общее количество клеток КМ в бедре мыши, которое варьирует в зависимости от линии мышей и их возраста в пределах $20 - 40 \times 10^6$ ядерных клеток, минимальная частота МСК, рассчитанная по результатам данного эксперимента составляет $500/(40 \times 10^6) \approx 1,25 \times 10^{-5}$, или 1 МСК на 80000 клеток КМ.

Клональный состав ММСК человека

ММСК человека были маркированы лентивирусными векторами, несущими зелёный флуоресцирующий белок. Маркированные культуры были клонированы по одной клетке на ячейку 96-луночного планшета на каждом из семи пассажей. Оценивали процент маркированных клоногенных предшественниц по экспрессии eGFP под инвертированным флуоресцентным микроскопом. Было показано, что процент маркированных клеток был стабилен и составил $60,1\% \pm 4,3\%$ в среднем по всем пассажам. Средняя эффективность клонирования ММСК по всем донорам составила $0,34 \pm 0,03$, т.е. каждая третья ММСК обладала способностью к пролиферации и образованию клона. Среднее количество образованных ММСК клонов снижалось по мере пассирования, что указывает на снижение пролиферативного потенциала ММСК в пассажах.

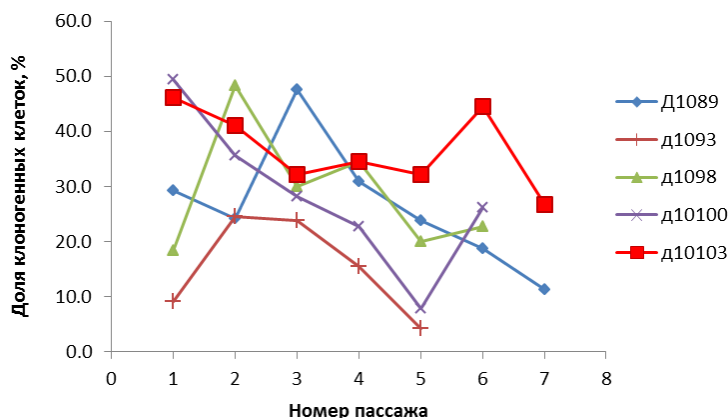


Рисунок 37 – Доля клоногенных клеток в маркированных ММСК отдельных доноров.

При достижении конfluентности в лунке 96-луночного планшета маркированные клоны ММСК пересаживали сначала в 24-луночные, затем в 6-луночные планшеты и, наконец, во флаконы T25. Клетки, которые не обладали способностью образовывать клон, считались «зрелыми» и составляли $75,7\% \pm 2,4\%$ популяции ММСК. Считали, что клетки, которые не образовывали конfluэнтный подслой в 96-луночных планшетах, обладали низким пролиферативным потенциалом (НПП) $/13,3\% \pm 1,3\%/$. Клетки, способные образовать конfluэнтный подслой при переносе в 24-луночные планшеты, обладали средним пролиферативным потенциалом (СПП) $/6,6\% \pm 1,0\%/$, а достигшие конfluентности в 6-луночных планшетах и флаконах T25 имели высокий пролиферативный потенциал (ВПП) $/6,7\% \pm 0,9\%/$. На каждом пассаже было показано, что клоны, достигшие конfluентности во флаконе T25, были способны к остео- и адипогенной дифференцировке под воздействием соответствующих индукторов. Это подтверждает присутствие в общей популяции ММСК мультипотентных мезенхимных клеток-предшественниц с относительно высоким пролиферативным потенциалом, которые сохраняют способность к дифференцировке вплоть до седьмого пассажа.

Анализ сайтов интеграции провируса в клонах с помощью ОЛ-ПЦР выявил поликлональность ММСК на всех пассажах. Сайты интеграции (СИ) лентивекторов были определены для 122 клонов ММСК от трёх доноров (из них 103 клон с ВПП и 19 клонов с СПП). Большинство клонов имело

уникальный профиль СИ. Некоторые клоны обладали одинаковым профилем СИ, но таких клонов было относительно немного. Из 36 клонов донора Д1093 34 обладали уникальными профилями СИ. Все 11 клонов донора Д1089 имели неповторимые профили СИ, а анализ 75 клонов донора Д10103 позволил выявить 57 уникальных профилей СИ. Доля клонов ММСК с одинаковыми СИ среди общего количества клонов ММСК на каждом пассаже отражает размер маркированного материнского клона в ММСК на данном пассаже. Учитывая это обстоятельство, можно заключить, что популяция ММСК состоит из маленьких клеточных клонов. Долгоживущие большие клоны были найдены в ММСК от донора Д10103 (Рисунок 4) с помощью Саузерн-блот гибридизации и подтверждены с помощью ОЛ-ПЦР.

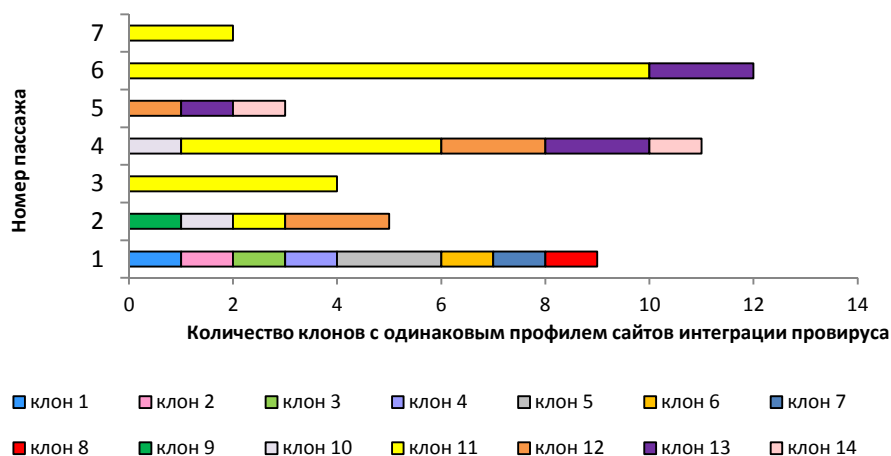


Рисунок 4 – Результаты анализа сайтов интеграции (СИ) провируса в клонах ММСК, полученных от донора Д10103, с помощью Саузерн-блот гибридизации. Каждая горизонтальная линия отражает разнообразие клонов с разными СИ на одном из пассажей. Цвет обозначает уникальный набор СИ в клоне. Размер прямоугольника каждого цвета отображает количество клонов с одинаковыми СИ.

ММСК донора Д10103 отличались от культур других доноров увеличенной кумулятивной клеточной продукцией. Принимая во внимание, что приблизительно 1/2500 клеточной популяции ММСК была клонирована на каждом пассаже, вероятность обнаружения клонов с одинаковым набором СИ была очень мала, если только маркированный материнский клон не был

относительно большим. Следовательно, увеличенную клеточную продукцию ММСК донора Д10103 можно объяснить существованием доминантных клонов с очень высоким пролиферативным потенциалом.

Основываясь на результатах этого эксперимента можно заключить, что популяция ММСК гетерогенна и содержит множество преимущественно маленьких клонов, различающихся по пролиферативному потенциалу. Эти клоны сосуществуют друг с другом в процессе культивирования. Клоны с очень большим, но ограниченным пролиферативным потенциалом обнаруживаются очень редко, что может объясняться как низкой концентрацией МСК в КМ человека, так и влиянием внешних факторов при культивировании клеток *in vitro*. В общей массе ММСК не отвечают критерию стволовых клеток.

Обобщая результаты по исследованию клонального состава человеческих ММСК и мышинных МСК, можно сделать вывод, что поликлональность является общим принципом функционирования стромальной ткани у млекопитающих. Стромальная ткань в организме млекопитающих поддерживается за счёт одновременного функционирования множества клеточных клонов, представляющих собой дифференцированное потомство многих МСК.

Факторы роста стромального микроокружения у мышей

Для понимания физиологической регуляции, существующей в отделе МСК, необходимо знать, какие ростовые факторы и каким образом воздействуют на представителей различных ступеней в иерархии стромальных клеток-предшественниц. С другой стороны, чувствительность к тем или иным ростовым факторам может способствовать в расстановке изучаемых клеток на соответствующие уровни иерархии. В настоящей работе исследовали влияние ростовых факторов на примере ИЛ-1 и других способов воздействий на примере гамма-квантового облучения на различные уровни стромальных клеток-предшественниц в иерархии МСК.

Ранее было показано, что при имплантации КМ интактных мышей под капсулу почки облученным реципиентам образуются очаги в 2–3 раза большего размера по сравнению с очагами в интактных реципиентах (Чертков и Гуревич, 1984). Однако при переносе большого очага из облученных реципиентов под капсулу почки вторичным необлученным мышам образуется очаг обычного размера, что свидетельствует о том, что количество МСК остается стабильным при ретрансплантациях очага, а также о том, что в составе очага находятся более зрелые клетки-предшественницы, способные увеличивать размер стромального микроокружения. Источник фактора, влияющего на размер эктопического кроветворения, был обнаружен в сыворотке облученных мышей. На основании этих результатов был разработан метод тестирования стимулирующей рост кроветворного микроокружения активности (СМА) в культуральной системе (Drize, Ershler and Chertkov, 2001), но природа этой активности оставалась до настоящего времени неизвестной. В этой работе удалось установить природу СМА и показать, что одним из ее компонентов является ИЛ-1. Для изучения СМА *in vitro*, культивировали кости облученных и интактных животных, а затем культуральную среду (КС), кондиционированную клетками костей, добавляли к мышинным стромальным клеткам (ДККМ) или человеческим ММСК. Анализировали изменение клеточности культур. Показали, что добавление 10% КС, кондиционированной костями облученных мышей, к культуральной среде человеческих ММСК или ДККМ мыши индуцирует рост стромальных клеток в обеих системах. Для подтверждения индукции роста стромального микроокружения под действием СМА *in vivo* была использована модель образования очага эктопического кроветворения. Сразу после имплантации КМ под капсулу почки мышам ежедневно в течение 2-х недель вводили КС, кондиционированную культивируемыми костями облученных мышей, содержащую СМА. В качестве положительного контроля использовали реципиентов, облученных в дозе 6 Гр, в качестве отрицательного контроля использовали мышей, которым вводили КС от культивирования

необлученных костей. Введение КС от культивирования облученных костей стимулировало увеличение очага (Рисунок 5).

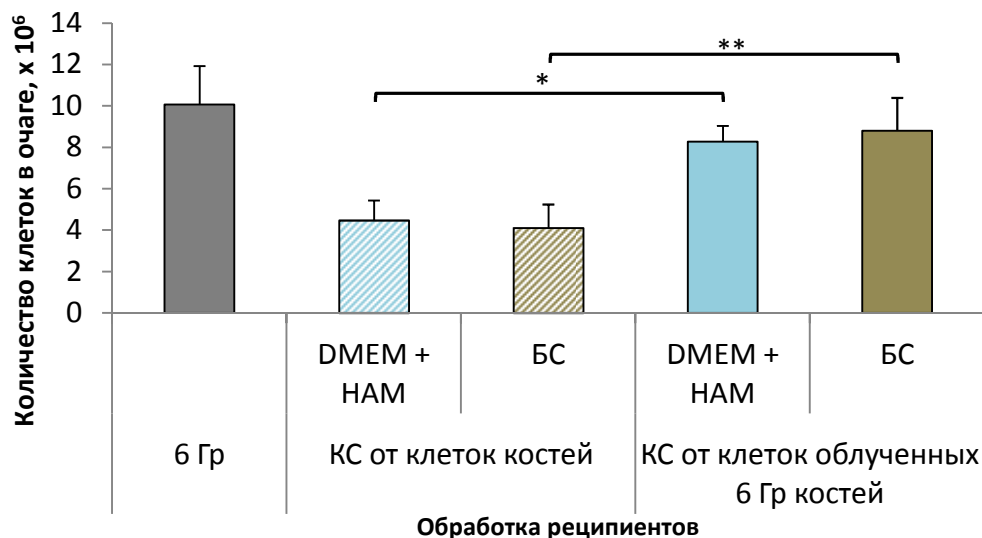


Рисунок 5 – Размер очага эктопического кроветворения у мышей, которым вводили КС. Группы: 6 Gr – мыши-реципиенты были облучены в дозе 6 Gr; КС от клеток костей – мышам-реципиентам вводили КС от клеток костей необлученных животных; КС от клеток облученных 6 Gr костей – мышам-реципиентам вводили КС от клеток костей облученных в дозе 6 Gr животных. DMEM + HAM – кости, культивированные в смеси среды DMEM + HAM; BC – кости, культивированные в бессывороточной среде. * – $p = 0,01$, ** – $p = 0,03$ по критерию Стьюдента.

С помощью РВ-ПЦР в костях облученных и необлученных животных были исследованы гены, дифференциально экспрессирующихся в стромальных клетках. Из 84 проанализированных генов, только у 12 уровень экспрессии был увеличен более чем в 2 раза (Таблица 1) после облучения. Среди генов с повышенным уровнем экспрессии было выявлено всего два гена, кодирующих секретлируемые белки, а именно *Il1b* (ИЛ-1) и *Vegfa* (сосудистый фактор роста эндотелия α).

Таблица 1 – Гены с повышенным относительным уровнем экспрессии в облученных костях по сравнению с контрольными костями.

Ген	Увеличение относительного уровня экспрессии, разы
Il1b	134,3
Nt5e	54,1
Abcb1a	16,6
Sox2	9,6
Runx2	8,1
Nes	6,6
Ngfr	5,1
Itgax	3,7
Notch1	3,7
Vegfa	3,7
Eng	2,9
Vwf	2,5

Наиболее выраженное повышение экспрессии было обнаружено у гена, кодирующего ИЛ-1. Концентрация белка ИЛ-1 была измерена в периферической крови облученных и необлученных мышей с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА). Концентрация ИЛ-1 в сыворотке облученных мышей в среднем составила 22 ± 16 пг/мл ($n = 4$), а в сыворотке необлученных – 14 ± 5 пг/мл ($n = 3$). Кроме этого, концентрация ИЛ-1 была измерена с помощью того же метода в КС, полученных при культивировании костей облученных и необлученных животных. Концентрация ИЛ-1 составила 11 пг/мл и 4 пг/мл, соответственно. Эти данные непосредственно указывают на то, что облучение стимулирует секрецию ИЛ-1 клетками костей. Для подтверждения роли ИЛ-1 в индукции роста стромальных клеток-предшественниц, необлученным реципиентам в течение 3-х недель после имплантации костномозгового цилиндра под капсулу почки вводили ИЛ-1 в дозах 15, 25, 30, 100, 200 и 400 пг/мышь. Через 6 недель после имплантации КМ определяли размер сформировавшихся очагов эктопического кроветворения (Рисунок 6).

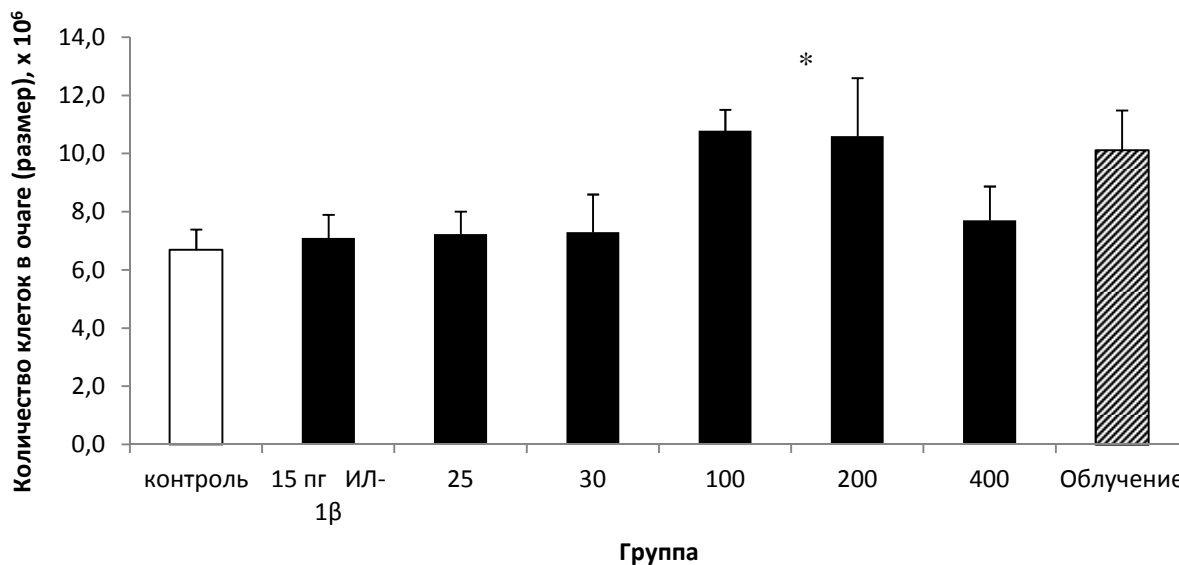


Рисунок 6 – Влияние системного введения ИЛ-1 и облучения на развитие очагов эктопического кроветворения. * – статистически значимые различия с контрольной группой ($p = 0,001$).

Показано, что введение 15 – 25 пг ИЛ-1 (на одну мышь) не приводит к увеличению размера очагов, тогда как введение большей дозы (100 пг) приводит к достоверному ($p = 0,001$) увеличению размера очагов эктопического кроветворения. Увеличение происходит в той же мере, что и после облучения реципиента в дозе 6 Гр.

При переносе увеличенных в размере очагов от мышей, которым инъецировали ИЛ-1, у вторичных реципиентов образуются очаги нормального размера, аналогично очагам от облученных реципиентов (Рисунок 7), что говорит о том, что ИЛ-1 не действует на МСК, а индуцирует рост более зрелых клеток-предшественниц.

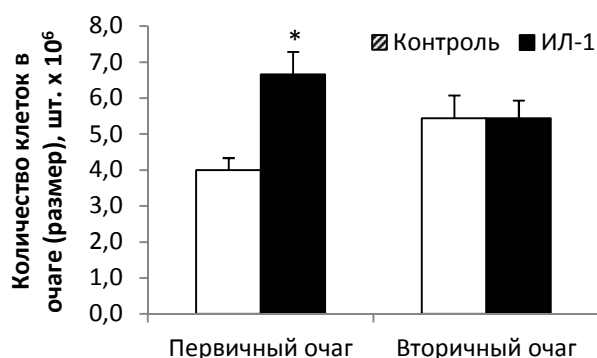


Рисунок 7 – Размер первичных и вторичных очагов в контроле и в мышах, которым вводили ИЛ-1. * – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p = 0,007$).

Для того, чтобы доказать роль ИЛ-1 в увеличении размера очагов эктопического кроветворения был поставлен следующий эксперимент. ИЛ-1 вводили внутривенно в дозе 100 пг/день/мышь в течение первых 3 недель после имплантации КМ под капсулу почки сингенным реципиентам. Параллельно с инъекциями ИЛ-1 вводили рекомбинантный антагонист рецептора ИЛ-1 (Анакинра/Kineret) подкожно в дозах 3 и 30 мкг/день/мышь. Для того, чтобы доказать ведущую роль ИЛ-1 при увеличении очагов в облученных реципиентах, только Анакинру (без ИЛ-1) вводили облучённым животным в дозах 3 и 30 мкг/день/мышь в течение 3 недель после имплантации КМ под капсулу почки. Необлучённые животные, которым вводили только Анакинру, но не ИЛ-1 были использованы в качестве контроля. Анакинра сама по себе не приводила к изменению размера очагов эктопического кроветворения у необлученных животных (Рисунок 8). Введение Анакинры в дозе 30 мкг/день/мышь привело к статистически значимому ($p = 0,008$) снижению размера очагов в облучённых реципиентах, а также к снижению размера очагов в группе животных, которым вводили ИЛ-1, до контрольных значений ($p = 0,004$). Эти данные демонстрируют главенствующую роль ИЛ-1 в стимулировании стромального кроветворного микроокружения *in vivo*. Таким образом, полученные результаты позволяют рассматривать ИЛ-1, или продукты генов, являющиеся мишенями ИЛ-1, в качестве индуцируемого облучением ростового фактора, необходимого для активации стромальных клеток-предшественниц.

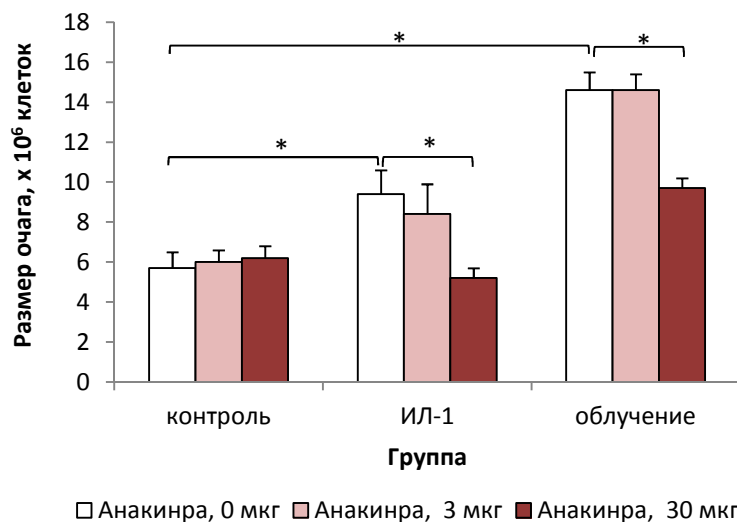


Рисунок 8 – Размер очагов эктопического кроветворения в контрольных, облучённых и необлучённых реципиентах, которым вводили ИЛ-1. Представлены средние значения ($n = 6 - 8$) и стандартные ошибки среднего. * – статистически значимые отличия по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Полученные данные о размере первичных и вторичных очагов свидетельствуют о том, что МСК являются нечувствительными к действию ИЛ-1. Этот фактор действует не на МСК, а на более зрелые клетки-предшественницы, которые способны к формированию кроветворного микроокружения *in vivo*, но не способны к его переносу вторичным реципиентам. Таким образом, один из уровней клеток-предшественниц в иерархии МСК может быть определён как чувствительные к ИЛ-1 клетки-предшественницы. (Nifontova, Svinareva and Drize, 2008). С другой стороны, введение только Анакинры не приводило к изменению размера очагов эктопического кроветворения, что указывает на существование другого уровня клеток-предшественниц, не чувствительных к ИЛ-1. Вероятно, этими предшественницами являются сами МСК.

Концентрация КОЕф в эктопических очагах, полученных у животных, которым вводили ИЛ-1, была ниже контрольных значений независимо от полученной дозы ИЛ-1. У мышей, которым вводили ИЛ-1, концентрация КОЕф снижалась не только в очагах эктопического кроветворения, но и в КМ. При этом наблюдалась чёткая обратно пропорциональная зависимость между дозой

ИЛ-1 и концентрацией КОЕф (коэффициент корреляции Пирсона $R = -0,97$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что КОЕф являются чувствительными к действию ИЛ-1. Чувствительность КОЕф к внешним ростовым факторам, таким как ИЛ-1 и FGF2, является важной характеристикой данного типа стромальных клеток-предшественниц и указывает на то, что КОЕф находятся в иерархии ниже МСК, которые не чувствительны к действию ИЛ-1, как показывают данные о формировании вторичных очагов нормального размера (Рисунок 7).

Факторы роста ММСК человека

Учитывая сходную функцию ИЛ-1, а также гомологию аминокислотных последовательностей белков, кодирующих этот фактор у человека и у мыши, мы предположили, что ИЛ-1 способен влиять на человеческие стромальные клетки кроветворного микроокружения. Для изучения этого вопроса, в культуральную среду добавляли ИЛ-1 в конечной концентрации 4 пг/мл при смене среды и культивировали ММСК в течение нескольких пассажей. Оценивали ростовые характеристики культуры (кумулятивную клеточную продукцию и эффективность клонирования), способность поддерживать ранние кроветворные клетки-предшественницы (CAFC-8 и LTC-IC). Определяли поверхностный иммунофенотип, иммуномодулирующие свойства (экспрессию генов-иммунорегуляторов, ингибирование пролиферации лимфоцитов в смешанной культуре) и экспрессию генов в ММСК.

Было показано, что при добавлении ИЛ-1 в среду культивирования увеличивается суммарная клеточная продукция ММСК. Начиная с нулевого пассажа, количество клеток во флаконах, обработанных ИЛ-1, увеличивалось в 1,3 раза по сравнению с контрольными. Ко второму пассажу суммарная клеточная продукция увеличивалась почти в 2 раза, а далее увеличение происходило в 1,6 раза. Увеличение клеточности культур происходило за счёт повышения эффективности клонирования ММСК после добавления ИЛ-1 (Рис. 9).

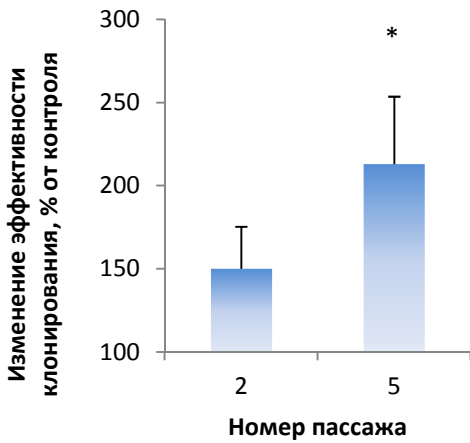


Рисунок 9 – Влияние ИЛ-1 на эффективность клонирования ММСК.

Как показали результаты РВ-ПЦР, ИЛ-1 достоверно не изменяет экспрессию генов-маркеров дифференцировки *SPP1* (остеогенная), *PPARG* (адипогенная) и *SOX9* (хондрогенная) в ММСК на 1-5 пассажах, в среду культивирования которых не добавлялись индукторы дифференцировок. При этом, культивирование ММСК с ИЛ-1 в 1,5 раза повышает способность ММСК поддерживать полипотентные кроветворные клетки-предшественницы – колонии, образующие области булыжника на 8 сутки (CAFC-8), – что согласуется с результатами экспериментов других исследователей (Wagner *et al.*, 2007). С помощью ПЦР-анализа были обнаружены достоверные отличия в уровне экспрессии генов, отвечающих за прикрепление и движение СКК по стромальным клеткам (Рисунок 10). Уровень экспрессии *ICAM1* статистически значимо повышался в 3 раза. Достоверно, но не существенно снижалась экспрессия *JAG1* и *ANXA2*. Кроме этого снижалась экспрессия гена, кодирующего фактор *SDF1*, обуславливающий хоминг СКК в КМ. Экспрессия гена *FGF2*, способствующего экспансии кроветворных и стромальных клеток (Itkin *et al.*, 2012) повышалась, но статистически незначимо.

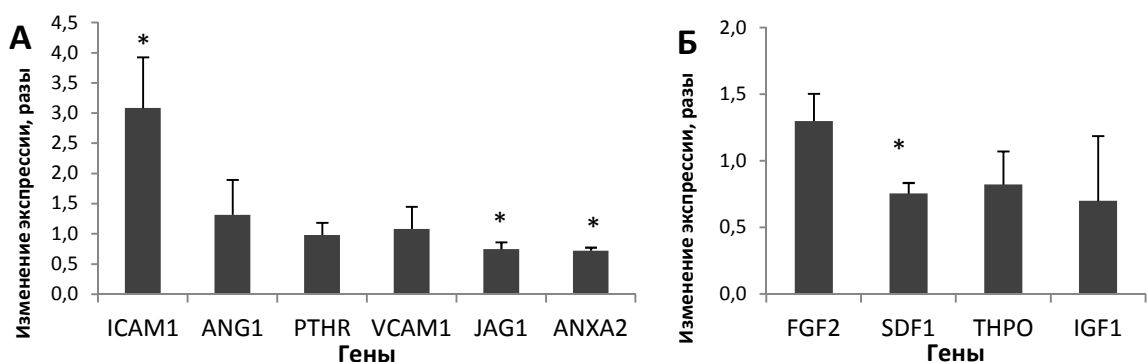


Рисунок 10 – Изменение экспрессии генов в ММСК при культивировании с ИЛ-1. **А.** Гены, кодирующие поверхностные рецепторы и молекулы адгезии. **Б.** Гены, кодирующие секретируемые цитокины и ростовые факторы. За единицу принят уровень экспрессии в контрольных ММСК.

Из данных экспериментов можно заключить, что ИЛ-1 оказывает стимулирующее действие на человеческие стромальные клетки, участвующие в поддержании кроветворения. ИЛ-1 увеличивает пролиферативный потенциал ММСК – элемента кроветворного стромального микроокружения, – что ведёт к увеличению суммарной клеточной продукции и эффективности клонирования. Одновременно увеличивается их способность к поддержанию СКК за счет изменения экспрессии генов, кодирующих молекулы адгезии и ростовые факторы.

До настоящего времени, в качестве системного регулятора кроветворного микроокружения был известен только паратиреоидный гормон (Calvi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). В данном исследовании убедительно продемонстрировано, что ИЛ-1 является еще одним фактором, влияющим на кроветворное микроокружение системно, а не локально.

Построение иерархического древа МСК

Одной из задач представленной работы является построение схемы устройства отдела МСК человека и мыши. Опираясь на изложенные результаты уже можно охарактеризовать отдел МСК как совокупность клеток-предшественниц, различающихся пролиферативным и дифференцировочным потенциалами, а также чувствительностью к внешним факторам. Для более полной характеристики устройства отдела МСК необходимо определить положение КОЕф и ММСК среди стромальных клеток-предшественниц.

Клетки, образующие колонии прикрепленных к пластику фибробластов на 7-14 сутки после посадки КМ в культуру, которые способны дифференцироваться в остеобласты и адипоциты *in vitro*, принято называть колониобразующими единицами фибробластными (КОЕф). В зависимости от

условий эксперимента, концентрация КОЕф в КМ здоровых людей колеблется в диапазоне от $19,6 \pm 4,2 \times 10^{-6}$ до $48,1 \pm 8,7 \times 10^{-6}$ (Петинати *et al.*, 2012, 2013, Shipounova *et al.*, 2013, 2014; Kuzmina *et al.*, 2016). Известно, что с возрастом частота КОЕф в КМ снижается (Kaneko, Motomura and Ibayashi, 1982; Galotto *et al.*, 1999; Stolzing *et al.*, 2008; Gothard, Dawson and Oreffo, 2013; Shipounova *et al.*, 2014), что часто сопровождается ухудшением параметров роста ММСК от этого же донора (Carlan and Bruder, 2001). Корреляция между параметрами роста ММСК и содержанием КОЕф указывает на то, что эти ступени иерархии располагаются близко друг от друга.

Сравнение экспрессии различных генов в ММСК и КОЕф выявило существенные различия (Shipounova *et al.*, 2013). В работе было показано, что гены-маркеры остеогенной и адипогенной дифференцировок *SPP1* и *PPARG* существенно больше экспрессируются в КОЕф по сравнению с ММСК, что доказывает более дифференцированное состояние КОЕф. В то же время, повышенная экспрессия генов *FGFR2*, *VEGF* и *BMP4* в ММСК указывает на их менее зрелый статус. Концентрация КОЕф существенно различается в КМ здоровых доноров. Для того, чтобы прояснить различия ММСК в КМ с большим и малым содержанием КОЕф, все доноры были разделены на две группы (у которых концентрация КОЕф была выше и ниже медианы). Изучали различия в кумулятивной клеточной продукции ММСК и экспрессии генов в указанных группах. Оказалось, что кумулятивная клеточная продукция ММСК существенно ниже в тех случаях, когда культура была получена из КМ с низким содержанием КОЕф (Hernigou *et al.*, 2005; Cuthbert *et al.*, 2012; Shipounova *et al.*, 2013).

В целом данные по экспрессии генов и ростовым характеристикам КОЕф и ММСК, указывают на то, что КОЕф являются более дифференцированными стромальными клетками-предшественницами, чем ММСК, и находятся ниже в иерархии отдела МСК.

Имеются сведения о том, что химиотерапия повреждает как ММСК, так и КОЕф больных гематологическими заболеваниями. Известно, что СКК не

подвержены воздействию проникающих в клетку агентов благодаря высокому уровню экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости (Goodell *et al.*, 1996). Можно предполагать, что МСК обладают аналогичным механизмом защиты: на мышинной модели было показано, что МСК не чувствительны к воздействию химиотерапевтических препаратов (Nifontova *et al.*, 2008). Таким образом, отсутствие характерной системы защиты КОЕф от химических агентов, не позволяют отнести их к истинно стволовым клеткам.

Ранее считалось, что КОЕф представляют собой гетерогенную популяцию, содержащую как МСК, так и более дифференцированные стромальные клетки-предшественницы (Owen and Friedenstein, 1988). Двумя атрибутами любых стволовых клеток являются способность к самоподдержанию, т.е. неограниченный пролиферативный потенциал и способность дифференцироваться в нескольких направлениях, т.е. полипотентность. Для КОЕф была продемонстрирована полипотентность (Caplan, 1991; Kuznetsov, Friedenstein and Robey, 1997), однако, способность их к самоподдержанию в последствии не подтвердилась. Несмотря на то, что КОЕф способны дифференцироваться в костную и хрящевую ткань при имплантации в диффузионных камерах в брюшную полость (Friedenstein, Chailakhyan and Gerasimov, 1987), они не способны к переносу полноценного кроветворного микроокружения *in vivo*, что доказывает их ограниченный пролиферативный потенциал (Nifontova, Svinareva and Drize, 2008; Shipounova (Nifontova) *et al.*, 2008). Таким образом, имеющиеся в настоящее время сведения позволяют с уверенностью утверждать, что КОЕф не являются истинными стволовыми клетками и находятся ниже МСК в иерархии стромальных клеток-предшественниц.

Результаты изучения характеристик ММСК человека позволяют определить их место в иерархии отдела МСК. Как было продемонстрировано, ММСК являются мультипотентными клетками-предшественницами, способными дифференцироваться в различных стромальных направлениях (Svinareva *et al.*, 2009). Однако их самоподдержание не было установлено в

ходе описанных экспериментов. Показано, что ММСК обладают высоким, но ограниченным пролиферативным потенциалом, и способностью к многократным, но всё же к конечным количествам клеточных пассажей. Эксперименты по исследованию клонального состава ММСК на уровне отдельных клеток показали, что большинство клеточной популяции ММСК представлено клетками, не способными пролиферировать, и только около 5% клеток обладают достаточным пролиферативным потенциалом для того, чтобы проделать 18 и более митозов. Эти же эксперименты по маркированию индивидуальных клеток культуры убедительно доказывают, что ММСК, в основном, состоят из множества одновременно функционирующих (пролиферирующих) клеточных клонов, которые обнаруживаются на одном или двух пассажах, а затем исчерпывают свой пролиферативный потенциал и на смену им начинают пролиферировать другие клоны. Большие долгоживущие клеточные клоны являются редкостью и связаны с увеличенной кумулятивной клеточной продукцией ММСК. Таким образом, можно утверждать, что ММСК не являются истинными стволовыми клетками. Этот вывод, кроме того, базируется и на данных, не связанных напрямую с пролиферативным потенциалом, а опирается на чувствительности ММСК к ростовым факторам, таким как FGF2 и ИЛ-1, а также на ухудшении ростовых характеристик этих клеток после курсов химиотерапии.

Известно, что СКК являются нечувствительными ко многим линейно-специфичным и плеiotропным ростовым факторам. Чувствительными к ростовым факторам являются более дифференцированные кроветворные клетки-предшественницы. Можно полагать, что аналогичная регуляция существует и в отделе МСК. Если это так, то ММСК, вероятно, не являются стволовыми клетками, т.к. они чувствительны к основному фактору роста фибробластов (Kuznetsov, Friedenstein and Robey, 1997; Martin *et al.*, 1997; Ng *et al.*, 2008) и к ИЛ-1, как показано в данной работе. ИЛ-1 приводит к увеличению кумулятивной клеточной продукции, эффективности клонирования ММСК, а

также к увеличению их способности поддерживать кроветворные клетки-предшественницы.

Известно, что СКК не подвержены повреждающему воздействию проникающих в клетку агентов, тогда как ММСК повреждаются при химиотерапии, что указывает на то, что ММСК не являются истинно стволовыми клетками (Shirounova *et al.*, 2014, 2016; Ciomber *et al.*, 2016). С другой стороны, существует небольшая вероятность, что в ММСК могут попадать клетки с высоким пролиферативным потенциалом, которые наиболее близко подходят под определение МСК. Из 17 доноров КМ только в одном случае наблюдалась повышенная кумулятивная продукция ММСК, что было обусловлено присутствием большого долгоживущего клона. Культура ММСК в стандартных условиях инициируется 3×10^6 ядросодержащими клетками КМ, 95% из которых – кроветворного происхождения (French *et al.*, 2002). Это означает, что только 150 000 мезенхимных клеток попадают в анализ. Следовательно, концентрация МСК в костном мозге человека $< 1 : 150\,000$. Таким образом, концентрация МСК в КМ человека и мыши оценивается величинами одного порядка.

Учитывая все полученные экспериментальные результаты, можно предложить следующую обобщенную схему устройства отдела МСК человека и мыши (Рисунок 11).

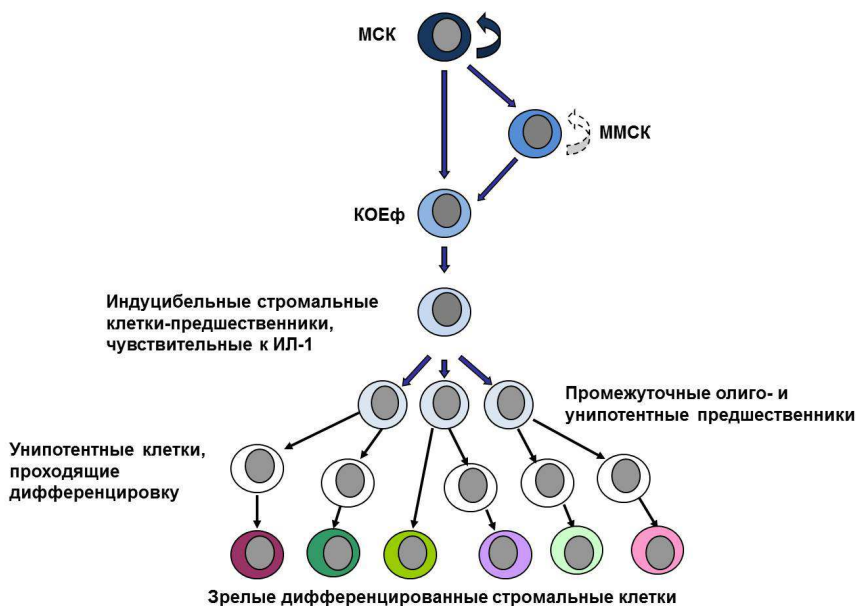


Рисунок 11 – Схема устройства отдела МСК у человека.

На вершине иерархии располагается мезенхимная стволовая клетка, обладающая самоподдержанием *in vivo*, способная дифференцироваться во все виды клеток стромальных тканей. МСК отвечает за построение, рост и поддержание мезенхимных тканей в течение всей жизни организма. МСК не обладает чувствительностью к ростовым факторам таким как FGF2 и ИЛ-1, а также является устойчивой к внешним негативным воздействиям в виде химических агентов. Минимальная концентрация таких клеток в КМ оценивается как 1 на 100000 - 150000 стромальных клеток для человека и 1 на 80000 мононуклеарных клеток КМ мыши. Наиболее близким к МСК из известных на настоящий момент клеток-предшественниц являются ММСК.

ММСК представляют собой клеточную культуру, получаемую *in vitro*. ММСК являются мультипотентными клетками-предшественницами, способными дифференцироваться по основным стромальным направлениям. Клеточная популяция ММСК гетерогенна по пролиферативному потенциалу, большинство клеток обладает низким пролиферативным потенциалом. Менее 10% популяции ММСК обладают высоким пролиферативным потенциалом, достаточным для прохождения 15-17 митозов. С небольшой вероятностью в ММСК могут попадать клоны с очень высоким пролиферативным потенциалом. Клетки-предшественницы таких клонов, вероятно, являются истинными МСК в КМ. ММСК чувствительны к ростовым факторам и внешним повреждающим воздействиям.

Ниже в иерархии располагаются КОЕф. Их место в иерархии определяется повышенной в сравнении с ММСК экспрессией генов-маркеров дифференцировки и повышенной чувствительностью к внешним повреждающим агентам. КОЕф являются полипотентными клетками-предшественницами.

Ниже КОЕф располагаются индуцибельные стромальные клетки-предшественницы, чувствительные к ИЛ-1. Выделить этот подтип предшественниц помогли эксперименты по введению ИЛ-1 мышам *in vivo*. Было показано, что при воздействии ИЛ-1 увеличивается размер очагов

эктопического кроветворения и одновременно снижается концентрация КОЕф в этих очагах. Это указывает на существование стромальных предшественниц, находящихся в иерархии ниже КОЕф, но также как и КОЕф чувствительных к ИЛ-1. Вероятно, именно за счет пролиферации и дифференцировки этого типа клеток происходит увеличение кроветворной территории в эктопических очагах после введения ИЛ-1. Этот уровень в иерархии обозначен как индуцибельные стромальные клетки-предшественницы.

Ещё ниже в иерархии находятся олиго- и монопотентные стромальные клетки-предшественницы, состав и свойства которых в настоящее время остаются, в основном, неизученными.

Ниже располагаются унипотентные клетки, находящиеся в процессе дифференцировки. Примером такой клетки-предшественницы может служить незрелые формы остеоцитов – остеобласты, которые играют важную роль в поддержании СКК в остеобластных нишах.

У основания иерархии находятся дифференцированные стромальные клетки – остеоциты, адипоциты, теноциты, хондроциты, и т.д. Пролиферативный потенциал снижается по мере продвижения от вершины к основанию иерархической пирамиды. Полностью зрелые дифференцированные клетки не способны к делению.

Предложенная схема иерархического древа отдела МСК отражает результаты многих экспериментов, представленных в этой работе, и согласуется с данными других исследователей в области МСК. Однако без сомнения, необходимы новые исследования для её уточнения, выявления новых подклассов клеток-предшественниц и детального описания их основных свойств.

Выводы

1. Отдел мезенхимных стволовых клеток человека и мыши организован по иерархическому принципу. В иерархию стромальных клеток входят (по нисходящему ряду):

- мезенхимные стволовые клетки, обладающие высоким пролиферативным потенциалом, достаточным для серийного переноса кроветворного микроокружения *in vivo*, и способные дифференцироваться по всем стромальным направлениям;
- колониеобразующие единицы фибробластные - полипотентные клетки-предшественницы, не способные к переносу кроветворного микроокружения *in vivo*, но обладающие пролиферативным потенциалом, достаточным для образования клеточных колоний *in vitro*;
- индуцибельные клетки-предшественницы, участвующие в построении кроветворного микроокружения *in vivo* под действием внешних ростовых факторов;
- полностью дифференцированные клетки стромы.

2. Поликлональность является общим принципом функционирования и поддержания стромальной ткани костного мозга у человека и мыши. Кроветворное стромальное микроокружение у мышей формируется за счет одновременного функционирования как минимум нескольких сотен мезенхимных стволовых клеток – их концентрация составляет не менее 1 МСК на 80000 клеток костного мозга.

3. Поддержание мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека происходит за счет функционирования множества короткоживущих клонов.

4. Интерлейкин-1 β является одним из системных регуляторов и факторов роста стромального кроветворного микроокружения человека и мыши.

5. Чувствительность к интерлейкину-1 β служит критерием, определяющим местоположение клеток-предшественниц в иерархии мезенхимных стволовых клеток. Мезенхимные стволовые клетки мыши не чувствительны к интерлейкину-1 β . Колониеобразующие единицы фибробластные под стимулирующим действием интерлейкина-1 β пролиферируют и дифференцируются в элементы стромального

микроокружения, что приводит к увеличению кроветворных территорий при формировании очагов эктопического кроветворения.

б. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки человека, содержащие полипотентные клетки-предшественницы, гетерогенны по пролиферативному потенциалу и чувствительны к интерлейкину-1 β . В ответ на этот фактор увеличивается пролиферация клеток культуры, их клоногенный потенциал, а также способность поддерживать кроветворные клетки-предшественницы.

Практические рекомендации

Разработанные в работе методы введения генетических конструкций в ДНК мезенхимных клеток-предшественниц позволяют применять лентивирусные вектора для эффективного маркирования индивидуальных МСК и более дифференцированных клеток и изучать эти популяции на клональном уровне. Сочетание методов индивидуального маркирования с помощью лентивирусов с методами секвенирования нового поколения открывают широкие перспективы по исследованию больших клеточных популяций, включающих МСК и их более дифференцированные клетки-предшественницы, *in vivo* и *in vitro*. Предлагается использовать ИЛ-1 в качестве ростового фактора ММСК человека после дополнительных исследований.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Сац Н.В. Характеристики мезенхимальных стромальных клеток-предшественников, маркированных лентивирусным вектором, в длительной культуре костного мозга / Сац Н.В., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Свинарева Д.А., Жиронкина О.А., Дризе Н.И. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – №3. – С. 123-127.
2. Drize N. Hierarchy in the compartment of murine mesenchymal stem cells forming hematopoietic microenvironment / Drize N., Sats N., Bigildeev A., Zhironkina O., Shipounova I. // *Experimental Hematology*. – 2010. – vol. 38 (9). – suppl. 1. – P. S2. – Abstract 005.
3. Бигильдеев А.Е. Изучение клонального состава популяции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) человека, маркированных с помощью лентивирусного вектора / Бигильдеев А.Е., Шипунова И.Н., Жиронкина О.А., Сац Н.В., Дризе Н.И. // Вестник гематологии. – 2011. – том VII. – № 1. – С. 63-64.
4. Bigildeev A.E. Heterogeneity of human bone marrow derived mesenchymal stromal cells / Bigildeev A.E., Zhironkina O.A., Sats N.V., Shipounova I.N., Drize N.I. // *Hematologica/The hematology journal (EHA 16th Congress Abstract book)*. – 2011. – vol. 96 (s2). – P. 314-315. – Abstract 0753.

5. Zhironkina O.A. Self-renewal ability of marked by lentiviral vector mesenchymal stem cells / Zhironkina O.A., Sats N.V., Bigildeev A.E., Shipounova I.N., Drize N.I. // *Hematologica/The hematology journal* (EHA 16th Congress Abstract book). – 2011. – vol. 96 (s2). – P. 593-594. – Abstract 1499.
6. Жиронкина О.А. Гетерогенность популяции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека // Жиронкина О.А., Сац Н.В., Бигильдеев А.Е., Шипунова И.Н., Дризе Н.И. // *Вестник гематологии*. – 2011. – № 1. – С. 65-66.
7. Bigildeev A.E. Clonal composition of human multipotent mesenchymal stromal cells // Bigildeev A.E., Zhironkina O.A., Sats N.V., Shipounova I.N., Drize N.I. / *Experimental Hematology*. – 2011. – vol. 39 (7). – Suppl. 1. – S61. – Abstract P1107242.
8. Бигильдеев А.Е. Возможности применения некоторых молекулярно-биологических методов для анализа мультипотентных мезенхимных стромальных клеток // Бигильдеев А.Е., Шипунова И.Н., Жиронкина О.А., Сац Н.В., Мамонов В.Е., Петинати Н.А., Паровичникова Е.Н., Дризе Н.И., Савченко В.Г. / *Сборник тезисов IV Всероссийской научной школы-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина»*. – М.: Макс-пресс. – 2011. – С. 14-15.
9. Шипунова И.Н. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) и мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) // Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Жиронкина О.А., Сац Н.В., Дризе Н.И. / *Сборник тезисов IV Всероссийской научной школы-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина»*. – М.: Макс-пресс. – 2011. – С. 30-31.
10. Bigildeev A.E. Clonal composition of multipotent mesenchymal stromal cells // Bigildeev A.E., Zhironkina O.A., Sats N.V., Shipounova I.N., Drize N.I. / *Cellular Therapy and Transplantation (CTT)*. – 2011. – vol. 3 (12). – P. 27.
11. Bigildeev A.E. Heterogeneity of human multipotent mesenchymal stromal cells // Bigildeev A.E., Zhironkina O.A., Sats N.V., Shipounova I.N., Drize N.J. / *International Society for Stem Cell Research 9th annual meeting poster abstracts*. – 2011. – Abstract 2423.
12. **Жиронкина О.А. Проллиферативный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из костного мозга человека // Жиронкина О.А., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Сац Н.В., Петинати Н.А., Дризе Н.И. / *Клеточные технологии в биологии и медицине*. – 2011. – № 4. – С. 230-235.**
13. Bigildeev A.E. Clonal composition of human multipotent mesenchymal stromal cells // Bigildeev A.E., Zhironkina O.A., Shipounova I.N., Sats N.V., Kotyashova S.Yu., Drize N.I. / *Experimental Hematology*. – 2012. – vol. 40 (10). – P. 847-856.
14. **Петинати Н.А. Анализ экспрессии генов, участвующих в модуляции иммунного ответа, в неактивированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках // Петинати Н.А., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Кузьмина Л.А., Момотюк К.С., Паровичникова Е.Н., Дризе Н.И., Савченко В.Г. / *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2012. – № 2. – С. 211-216.**
15. Bigildeev A.E. IL1beta is a potential stromal growth factor // Bigildeev A.E., Shipounova I.N., Drize N.J. / *International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting poster abstracts*. – 2012. – vol.1. – P. 124. – poster board number T-2175.
16. Sats N. Marked by lentiviral vector mesenchymal stem cells have capacity for self-renewal // Sats N., Bigildeev A., Shipounova I., Zhironkina O. / *Modern Trends in Human Leukemia XIX. Wilsede Meeting*. – 2012. – P.93. – Abstract D3.
17. Shipounova I.N. Comparison of proliferative potential of colony-forming units fibroblastic (CFU-F) in steady-state hematopoietic stromal microenvironment and after its activation due to formation de novo // Shipounova I.N., Satz N.V., Bigildeev A.E., Zhironkina O.A., Drize N.I. / *Modern Trends in Human Leukemia XIX. Wilsede Meeting*. – 2012. – P. 94. – Abstract D4.
18. Bigildeev A. Irradiation induced growth factor for hematopoietic microenvironment // Bigildeev A., Shipounova I., Drize N. / *Haematologica*. – 2012. – vol. 97, e-Supplement 1. – P. 52. – Abstract P0114.

19. Бигильдеев А.Е. Фактор роста кроветворного микроокружения, индуцированный облучением // Бигильдеев А.Е., Шипунова И.Н., Дризе Н.И. / Гематология и трансфузиология. – 2012. – №3, Приложение. – С. 4.
20. Bigildeev A. IL-1beta as growth factor for hematopoietic microenvironment // Bigildeev A., Shipounova I., Lubkova O., Drize N. / Experimental hematology. – 2012. – vol. 40 (8). – (suppl1). – S87. – Abstract P73.
21. Бигильдеев А.Е. Новые функции белка интерлейкин-1 бета // Бигильдеев А.Е., Лубкова О.Н., Дризе Н.И. / Материалы IV международной (IX итоговой) научно-практической конференции молодых ученых. – Челябинск: Изд-во Южно-Уральского государственного университета. – 2013. – С. 52.
22. Bigildeev A.E. Interleukin-1 beta is an irradiation-induced stromal growth factor // Bigildeev A.E., Zhironkina O.A., Lubkova O.N., Drize N.J. / Cytokine. – 2013. – vol. 64 (1). – P. 131-137.
23. Drize N. Multipotent mesenchymal stromal cells exposed to il-1b demonstrate the increased proliferative potential and enhanced ability to maintain hematopoietic precursor cells // Drize N., Bigildeev A. / Experimental hematology. – 2013. – vol. 41 (8). – suppl.1. – S60.
24. **Петинати Н.А. Характеристики стромальных клеток-предшественников у больных после аллогенной трансплантации костного мозга // Петинати Н.А., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Кузьмина Л.А., Сарибекян Р.А., Гальцева И.В., Мисюрин А.В., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г., Дризе Н.И. / Терапевтический архив. – 2013. – №12. – С. 95-99.**
25. Бигильдеев А.Е. Интерлейкин 1 бета не стимулирует спонтанную дифференцировку мультипотентных мезенхимных стромальных клеток // Бигильдеев А.Е., Зезина Е.А., Шипунова И.Н., Дризе Н.И. / Гематология и трансфузиология. – 2014. – №1. – С. 34.
26. Бигильдеев А.Е. Влияние интерлейкина-1 бета на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки: пролиферацию, дифференцировку, способность поддерживать стволовые кроветворные клетки // Бигильдеев А.Е., Зезина Е.А., Шипунова И.Н., Дризе Н.И. / Сборник статей «Стволовые клетки и регенеративная медицина» М.: МГУ. – ред. Ткачук В.А. – 2014, С. 22-38.
27. **Шипунова И.Н. Анализ результатов профилактики острой реакции трансплантат против хозяина с помощью мультипотентных мезенхимных стромальных клеток донора у больных гемобластозами после аллогенной трансплантации костного мозга // Шипунова И.Н., Петинати Н.А., Бигильдеев А.Е., Зезина Е.А., Дризе Н.И., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. / Биохимия. – 2014. – № 12. – С. 1664-1672.**
28. Bigildeev A. Interactions between multipotent mesenchymal stromal cells and hematopoietic progenitor cells alter after Interleukin 1 beta administration // Bigildeev A., Zezina E., Shipounova I., Kostyushev D., Drize N. / Haematologica. – 2014. – vol. 99(s1). – P. 22.
29. Bigildeev A. Interleukin-1 beta improves the ability of multipotent mesenchymal stromal cells to maintain hematopoietic precursor cells by up-regulation of genes encoding adhesion molecules and cytokines // Bigildeev A., Zezina E., Shipounova I., Kostyushev D., Drize N. / Modern trends in human leukemia & cancer. – 2014. – М-II-05. – P. 59.
30. Бигильдеев А.Е. Изменение свойств поддерживающего кроветворение стромального микроокружения под действием интерлейкина 1 бета // Бигильдеев А.Е., Зезина Е.А., Шипунова И.Н., Дризе Н.И. / Научные труды IV съезда физиологов СНГ. – 2014. – С. 24.
31. Шипунова И.Н. Иерархическая структура поддерживающего кроветворение стромального микроокружения // Шипунова И.Н., Сац Н.В., Бигильдеев А.Е., Петинати Н.А., Дризе Н.И. / Научные труды IV съезда физиологов СНГ. – 2014. – С. 108-109.
32. Bigildeev A.E. Interleukin-1 beta enhances human multipotent mesenchymal stromal cell proliferative potential and their ability to maintain hematopoietic precursor cells // Bigildeev A.E., Zezina E.A., Shipounova I.N., Drize N.J. / Cytokine. – 2015. – vol. 71 (2). – P. 246-254.

33. Сац Н.В. Особенности переноса гена в мезенхимные стволовые клетки // Сац Н.В., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Костюшев Д.С., Дризе Н.И. / Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2015. – №1. – С. 21-24.
34. Сац Н.В. Стабильный перенос лентивирусного вектора в мезенхимные стволовые клетки *in vivo* // Сац Н.В., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Дризе Н.И. / Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – № 6. – С. 740-744.
35. Bigildeev A. Efficient and stable gene transfer into mesenchymal stem cells // Bigildeev A., Sats N., Shipounova I., Petinati N., Surin V., Cornils K., Aranyosy T., Fehse B., Drize N. / Haematologica. – 2015. – vol. 100(s1). – P. 451. – Abstract E1129.
36. Bigildeev A. Fibroblastic colony forming units (CFU-F) within adherent cell layer from long-term bone marrow cultures correspond to the progeny of distinct mesenchymal precursor cells // Bigildeev A., Sats N., Shipounova I., Petinati N., Surin V., Cornils K., Riecken K., Aranyosy T., Fehse B., Drize N. / Experimental hematology. – 2015. – vol. 43(9). – Supplement. – S53.
37. Бигильдеев А.Е. Библиотека штрих-кодов для изучения отдела мезенхимных стволовых клеток // Бигильдеев А.Е., Сац Н.В., Петинати Н.А., Шипунова И.Н., Сурин В.Л., Пшеничникова О.С., Дризе Н.И. / Гематология и трансфузиология. – 2016. – №1. – Приложение 1. – С. 33.
38. Бигильдеев А.Е. Использование библиотеки штрих-кодов для изучения отдела мезенхимных стволовых клеток // Бигильдеев А.Е., Корнилс К., Араносси Т., Сац Н.В., Петинати Н.А., Шипунова И.Н., Сурин В.Л., Пшеничникова О.С., Рикен К., Фезе Б., Дризе Н.И. / Биохимия. – 2016. – №4. – С. 516-526.
39. Bigildeev A.E. Clonal characteristics of mesenchymal stem cells able to transfer microenvironment // Bigildeev A.E., Pshenichnikova O.S., Sats N.V., Cornils K., Aranyosy T., Thielecke L., Glauche I., Petinati N.A., Surin V.L., Fehse B., Drize N.J. / Experimental hematology. – 2016. – vol.44 (9). – suppl. 1. – P. S59-S60. – Abstract 3015.
40. Бигильдеев А.Е. Воздействие интерлейкина-1 бета и гамма-квантового тормозного излучения на мезенхимные клетки-предшественники // Бигильдеев А.Е., Зезина Е.А., Дризе Н.И. / Молекулярная биология. – 2017. – № 3. – С. 447-459.
41. Петинати Н.А. Изменение свойств мультипотентных мезенхимных стромальных клеток под действием интерферона-гамма // Петинати Н.А., Капранов Н.М., Бигильдеев А.Е., Попова М.Д., Давыдова Ю.О., Гальцева И.В., Дризе Н.И., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. / Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – №2. – С. 194-199.

Список сокращений

- БС – бессывороточная среда
 БСА – бычий сывороточный альбумин
 ВКМ – внутренняя клеточная масса
 ВПП – высокий пролиферативный потенциал
 ДККМ – длительная культура костного мозга
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
 ИЛ-1 – интерлейкин-1 β
 КМ – костный мозг
 КОЕф – Колониеобразующая единица фибробластная
 КР – костная раковина
 КС – кондиционированная среда
 ММСК – мультипотентная мезенхимная стромальная клетка
 МСК – мезенхимная стволовая клетка
 НПП – низкий пролиферативный потенциал
 ОЛ-ПЦР – полимеразная цепная реакция, опосредованная лигированием

oРТПХ – острая реакция трансплантат против хозяина
ППК – прилипающий подслои клеток
ППС – полная питательная среда
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
РНК – рибонуклеиновая кислота
СИ – сайт интеграции
СКК – стволовая кроветворная клетка
СМА – стимулирующая рост кроветворного микроокружения активность
СПК – стромальный подслои клеток
СПП – средний пролиферативный потенциал
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
САФС-8 – клетка, образующая область булыжника на 8 сутки
eGFP – зелёный флуоресцирующий белок