

**А. П. Ястребов, Д. Ю. Гребнев, И.Ю. Маклакова**

**СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ИХ СВОЙСТВА,  
ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ И РОЛЬ В  
РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ**

Екатеринбург

2016

УДК

**Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю.** Стволовые клетки, их свойства, источники получения и роль в регенеративной медицине. – Екатеринбург 2016. - 282с.

Монография подготовлена в государственном автономном учреждении здравоохранения Свердловской области «Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий» в лаборатории антивозрастных технологий, в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации на кафедре патологической физиологии. Монография посвящена вопросам изучения влияния мультипотентных мезенхимальных стромальных и гемопоэтических стволовых клеток на регенерацию быстрообновляющихся тканей (миелоидная, эпителий кишечника, лимфоидная) в физиологических условиях и в условиях воздействия экстремальных факторов, а также при старении. В качестве экстремальных факторов изучалось влияние ионизирующего излучения, острой кровопотери.

Монография предназначена для патофизиологов, физиологов, биологов, цитологов, гистологов, специалистов в области геронтологии, студентов медицинских и ветеринарных вузов.

Ил. 58 Табл. 110 Библиогр.: 362 названий

Монография рекомендована к изданию проблемной комиссией «Общая патология» и Ученым Советом педиатрического факультета ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава РФ в 2016 г.

Ответственный редактор чл. – корр. РАН, профессор А.П. Ястребов  
Рецензент главный врач ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», д.м.н., профессор Леонтьев Сергей Леопольдович

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Условные обозначения и сокращения.....</b>	<b>9</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>11</b>
<b>ГЛАВА 1. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ИХ СВОЙСТВА, ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ И РОЛЬ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) .....</b>	<b>13</b>
1.1. Свойства и фенотип гемопоэтических стволовых клеток.....	13
1.2. Поиск оптимального источника ГСК.....	21
1.3. Плацента как источник гемопоэтических стволовых клеток.....	22
1.4. Плацента как источник негемопоэтических стволовых и прогениторных клеток.....	26
1.5. Способы выделения ГСК.....	29
1.6. Выбор оптимальной терапевтической дозы ГСК.....	30
1.7. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки: общая характеристика.....	31
1.8. Основные поверхностные маркеры ММСК.....	32
1.9. Пластичность ММСК.....	34
1.10. Применение ММСК в эксперименте и в клинике.....	36
1.11. Перспективные направления развития регенеративной медицины.....	43
<b>ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>50</b>
2.1. Общая характеристика лабораторных животных, использованных в исследованиях.....	50
2.2. Экспериментальное планирование беременности.....	53
2.3. Выделение моноклеарной фракции клеток из плодной части плаценты ...	54
2.4. Культивирование и субкультивирование ММСК.....	56
2.5. Идентификация ММСК.....	58
2.5.1. Дифференцировка в остеогенном направлении.....	58
2.5.2. Дифференцировка в адипоцитарном направлении.....	61

2.5.3. Идентификация ММСК иммуноцитохимическим методом.....	62
2.6. Морфологический анализ культур клеток.....	65
2.7. Выделение ГСК методом прямой иммуномагнитной сепарации.....	65
2.7.1. Методика SCA-1 позитивной иммуномагнитной сепарации.....	65
2.7.2. Методика CD 117 позитивной иммуномагнитной сепарации.....	66
2.8. Иммунофенотипирование ГСК.....	67
2.9. Подсчет и определение жизнеспособности клеток.....	72
2.10. Тест колониеобразования.....	74
2.11. Облучение лабораторных животных на гамма-терапевтической установке.....	78
2.12. Методы исследования кроветворной ткани.....	80
2.12.1. Морфологическое исследование крови и костного мозга.....	80
2.12.2. Морфологическое исследование селезенки.....	83
2.12.2.1. Исследование клеточного состава селезенки.....	83
2.12.2.2. Определение основных морфометрических показателей селезенки.....	84
2.13. Методы оценки регенераторных процессов в слизистой оболочке тощей кишки.....	85
2.14. Методы статистической обработки полученных результатов.....	92

### **ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ГСК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ С ММСК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ МИЕЛОИДНОЙ ТКАНИ ЗРЕЛЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ И В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ.....**

3.1. Влияние ГСК в количестве 250 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 7 сутки в физиологических условиях.....	94
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

3.2. Влияние ГСК в количестве 250 тыс. клеток/кг при проведении	
-----------------------------------------------------------------	--

сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения.....	98
3.3. Влияние ГСК в количестве 250 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери.....	101
3.4. Влияние ГСК в количестве 300 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 7 сутки в физиологических условиях.....	105
3.5. Влияние ГСК в количестве 300 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 7 сутки в условиях воздействия ионизирующего излучения.....	107
3.6. Влияние ГСК в количестве 300 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери.....	109
3.7. Влияние ГСК в количестве 330 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 7 сутки в физиологических условиях.....	111
3.8. Влияние ГСК в количестве 330 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения.....	113
3.9. Влияние ГСК в количестве 330 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных после острой кровопотери.....	116
3.10. Заключение.....	119

<b>ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЛАЦЕНТАРНЫХ ММСК И ГСК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ МИЕЛОИДНОЙ ТКАНИ ЗРЕЛЫХ И СТАРЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ И В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ .....</b>	<b>124</b>
4.1. Состояние миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных на 1 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях .....	124
4.2. Состояние миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК.....	128
4.3. Состояние миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях.....	133
4.4. Состояние миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК.....	138
4.5. Состояние миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях.....	143
4.6. Состояние миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК.....	148
4.7. Заключение.....	155
 <b>ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЛАЦЕНТАРНЫХ ММСК И ГСК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ КРАСНОЙ И БЕЛОЙ ПУЛЬПЫ СЕЛЕЗЕНКИ ЗРЕЛЫХ И СТАРЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ И В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ.....</b>	 <b>163</b>

5.1. Морфометрические и цитологические показатели селезенки зрелых и старых лабораторных животных на 1 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях.....	163
5.2. Морфометрические и цитологические показатели селезенки зрелых и старых лабораторных животных на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК.....	166
5.3. Морфометрические и цитологические показатели селезенки зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях.....	170
5.4. Морфометрические и цитологические показатели селезенки зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК.....	173
5.5. Морфометрические и цитологические показатели селезенки зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях.....	181
5.6. Морфометрические и цитологические показатели регенерации селезенки зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК.....	183
5.7. Заключение.....	189

<b>ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЛАЦЕНТАРНЫХ ММСК И ГСК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ЭПИТЕЛИЯ ТОЩЕЙ КИШКИ ЗРЕЛЫХ И СТАРЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ И В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ.....</b>	<b>198</b>
6.1. Состояние регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 1 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях.....	198
6.2. Состояние регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК.....	199
6.3. Состояние регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях .....	202
6.4. Состояние регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях.....	203
6.5. Состояние регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК.....	205
6.6. Состояние регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК.....	208
6.7. Заключение.....	210
<b>ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>217</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>234</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТЬ.....</b>	<b>282</b>

## УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АИ – апоптотический индекс

БОЕ-Е – бурстообразующая единица эритроидная

ГИМ - гемопозиндуцирующее микроокружение

Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

Гр.д. – гранулоцитарный дифферон

ГСК – гемопозитическая стволовая клетка

ИИ – ионизирующее излучение

ИЛ – интерлейкин

ИП- индекс пролиферации

иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

КОЕ-бл - колониеобразующая единица, формирующая в культуре колонии бластных клеток

КОЕ-ВПП - колониеобразующая единица высокого пролиферативного потенциала

КОЕ-Г - колониеобразующая единица гранулоцитарного ряда

КОЕ-ГЭММ - колониеобразующая единица гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов, мегакариоцитов.

КОЕ - М - колониеобразующая единица моноцитарного ряда

КОЕ-с - колониеобразующая единица селезенки

КОЕ-Э - колониеобразующая единица эритроидного ряда

МИ- митотического индекс

ММСК – мультипотентная мезенхимальная стромальная клетка

МЯТ – микроядерный тест

ПГ – простагландин

РТПХ – реакция трансплантат против хозяина

СКК – средняя клеточность крипты

СУМ – спонтанный уровень клеток с микроядрами

Эр.д. – эритроидный дифферон

ЯСК – ядродержащие клетки

CAFC – клетки, формирующие области булыжной мостовой

CXCR4 – хемокиновый рецептор - 4 тип.

FBS – фетальная бычья сыворотка

FIt-3 лиганд – лиганд тирозин киназы-3

HSP – белок теплового шока

IFN –  $\gamma$  – гамма интерферон

iNO-синтаза – индуцибельная NO-синтаза

LT-HSC – длительно репопулирующие костный мозг гемопоэтические стволовые клетки

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

SCA-1 – антиген стволовой клетки-1

SCF – фактор стволовых клеток

SDF-1 – стромой вырабатываемый фактор-1

ST-HSC – кратковременно репопулирующие костный мозг гемопоэтические стволовые клетки

TGF- $\beta$  – трансформирующий фактор роста- $\beta$

VEGF – сосудисто-эндотелиальный фактор роста

## ВВЕДЕНИЕ

Проблема клеточного восстановления после воздействия повреждающего фактора продолжает оставаться актуальным вопросом современной биологии и медицины. Известно, что активация компенсаторно–приспособительных механизмов после воздействия экстремальных факторов на организм может приводить к восстановлению специфических функций выполняемых данной тканью. Особый интерес представляет изучение восстановления функции быстрообновляющихся тканей, поскольку именно такие ткани нуждаются в поддержании высокого пролиферативного потенциала. Известно, что при старении происходит прогрессирующее уменьшение содержания стволовых клеток в организме. Также известно, что в ранние сроки после воздействия экстремальных факторов происходит существенное снижение скорости клеточного обновления быстрообновляющихся тканей. При этом восстановление регенерации обеспечивается обладающими высоким пролиферативным потенциалом сохранившимися стволовыми клетками. Восполнение пула стволовых клеток в физиологических условиях, а также после действия экстремальных факторов представляется перспективным в плане активации регенерации тканей.

Одна из основных целей регенеративной медицины – понять механизмы по которым трансплантация клеток с высоким регенерационным потенциалом приводит к регенерации поврежденных тканей. Эти механизмы реализуются на основе пластичности трансплантированных клеток, слияния с клетками реципиента, паракринными механизмами, через формирование межклеточных контактов. Существенное значение имеет способность трансплантированных клеток изменять хоуминг и формировать «ниши» для стволовых клеток.

Накоплен значительный экспериментальный материал, доказывающий способность ММСК и ГСК к трансдифференцировке. В ряде исследований показана способность ММСК дифференцироваться в клетки энтодермального и эктодермального происхождения. Трансплантация ММСК способна ускорить процесс приживания ГСК и, соответственно, процесс восстановления

регенерации тканей. Эффективность применения ММСК в качестве котрансплантата при введении ГСК обусловлена тем, что они вырабатывают цитокины и факторы роста, необходимые для хоуминга и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток. ММСК синтезируют компоненты матрикса, в том числе фибронектин, ламинин, коллаген и протеогликаны. При этом ММСК способны дифференцироваться в клетки стромы, которая обеспечивает синтез экстрацеллюлярного матрикса, формирующего микроокружение, необходимое для пролиферации и дифференцировки стволовых клеток. Кроме этого, ММСК обладают свойством продуцировать противовоспалительные цитокины, а также обеспечивать стимуляцию ангиогенеза. Проведенные в последние годы исследования позволили установить возможность слияния ГСК с эпителиальными клетками кишечника, что не приводило к появлению морфологически измененных эпителиоцитов.

Актуальным является поиск таких тканей, которые бы являлись богатым источником стволовых клеток с высоким пролиферативным потенциалом. В этом отношении интерес представляет плацентарная ткань, получение которой возможно неоперативным путем и лишенным этических проблем. Учитывая низкую иммуногенность клеток фетальных тканей, а также возможность выделения достаточного количества ГСК и ММСК из плаценты, этот орган представлялся перспективным в плане выделения из него указанных видов клеток.

Способность ММСК оказывать иммуносупрессивное действие может обеспечить приживление аллогенного трансплантата. Выделение ММСК хемоаттрактантов для ГСК обеспечивает направленный хоуминг ГСК, а формирование соответствующего микроокружения дополнительно улучшает приживление трансплантированных аллогенных ГСК.

Несмотря на значительное количество публикаций, посвященных изучению действия стволовых клеток, остается неизученной возможность использования аллогенной сочетанной трансплантации стволовых клеток, выделенных из

плаценты для активации регенерации быстрообновляющихся тканей в условиях старения организма, а также в условиях действия экстремальных факторов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 301 странице и состоит из введения, 6 глав, общего заключения, выводов, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 110 таблицами, 58 рисунками. Список литературы включает 426 источника, из которых 107 отечественных и 319 зарубежных.

## **ГЛАВА 1.**

### **СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ИХ СВОЙСТВА, ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ И РОЛЬ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ**

#### **1.1. Свойства и фенотип гемопоэтических стволовых клеток**

Гемопоэтические стволовые клетки – клетки мезенхимального происхождения, способные к повторным делениям и дифференцировке в различные зрелые клетки крови. При этом популяция ГСК разнообразна. Можно выделить три основные популяции клеток, относящиеся к ГСК.

Первая популяция ГСК обладает наибольшим пролиферативным потенциалом, максимально выраженной способностью к самообновлению, а также при трансплантации облученному реципиенту способна в течение длительного времени поддерживать кроветворение (long-term repopulating hematopoietic stem cell). К этой группе относят примитивную стволовую кроветворную клетку, обеспечивающую поддержание кроветворения в длительной культуре костного мозга (Long-term Culture Initiating Cell - LT-HSC), клетки, образующие при культивировании так называемые области булыжной мостовой (Cobble-stone Area Forming Cell, CAFC).

Вторая группа ГСК получила название - кратковременно репопулирующие костный мозг (short-term repopulating hematopoietic stem cell), также способны дифференцироваться в более зрелые прогениторные клетки, но по сравнению с LT-HSC обладаю меньшим пролиферативным потенциалом и меньшей

способностью к самообновлению. К этой группе относят колониеобразующие единицы селезенки (КОЕ-с).

Третья группа клеток, относящихся к ГСК - мультипотентные прогениторные ГСК (multipotent progenitor hematopoietic stem cell). Они в отличие от предыдущих двух групп обладают меньшим пролиферативным потенциалом, но большей пролиферативной активностью и не обладают способностью к самообновлению. К этой группе относят колониеобразующую единицу высокого пролиферативного потенциала (КОЕ ВПП) и колониеобразующую единицу, формирующую в культуре колонии бластных клеток (КОЕ-бл). Эти клетки дают начало полипотентным клеткам предшественницам лимфопоэза из которых образуются Т и В лимфоциты, НК клетки и полипотентным клеткам предшественницам миелопоэза, которые, проходя промежуточные стадии, дают начало эритроцитарному, гранулоцитарному, моноцитарному и мегакариоцитарному росту кроветворения.

Появляются данные, согласно которым, ГСК способны к трансдифференцировке в негемопоэтические ткани. Так, предполагается, что ГСК способны давать начало как овальным клеткам печени, некоторые ученые считают их стволовыми клетками печени, так и непосредственно образовывать гепатоциты. Несмотря на то, что последние развиваются из зародышевой энтодермы, а не из мезодермы как гемопоэтические клетки. Есть данные, что ГСК способны при создании соответствующих условий образовывать  $\beta$ -клетки поджелудочной железы, кардиомиоциты, нейроны, а также клетки почек. Было доказано участие ГСК в регенерации клубочкового аппарата почки при хроническом гломерулонефрите. Локализация ГСК в почках зависит от их функционального состояния. В норме ГСК заселяют эпителиальную выстилку дистальных канальцев почки, однако при хроническом гломерулонефрите ГСК локализованы преимущественно в клубочках почек. Это позволяет предположить, что дистальные канальца служат «нишей» стволовых клеток почки. Было подсчитано, что у здорового взрослого человека в организме около 50 млн. ГСК и они могут образовывать до  $10^{13}$  зрелых клеток крови в течение нормальной

продолжительности жизни. В опытах на мышах было показано, что одна трансплантированная гемопоэтическая клетка способна поддерживать гемопоэз у облученных лабораторных животных.

В 1978 г. Schofield сформулировал положение о нише стволовых клеток. Она представляет собой анатомическое образование, в котором способность стволовых клеток к дифференцировке ингибирована. В то же время в нише созданы условия для поддержания определенной (стабильной) концентрации клеток. В заполненной нише ГСК пролиферируют каждые 3-5 дней. В том случае, если содержание стволовых клеток уменьшается, например, под действие какого-либо повреждающего фактора скорость пролиферации стволовых клеток увеличивается и может составлять менее суток, что в свою очередь способствует восстановлению численного состава ГСК в нише. Покинувшие нишу стволовые клетки вступают на путь дифференцировки. В ряде случаев стволовые клетки могут повторно вернуться в нишу. В этой ситуации способность их к дифференцировке вновь угнетается. Отличительными особенностями стволовых клеток (в том числе ММСК и ГСК) является способность к самообновлению, самоподдержанию, они обладают высоким пролиферативным потенциалом, а также способностью к возвращению в состояние клеточного покоя.

Несмотря на то, что примитивная стволовая кроветворная клетка (LT-HSC) присутствует в гемопоэтической ткани в незначительном количестве, она может быть определена на основе характерных для нее иммунофенотипических признаков. ГСК мыши характеризуются высокой экспрессией антигена стволовых клеток (SCA - 1) и присутствием антигенов системы гистосовместимости H-2K. Для ГСК выделенных из эмбриональной печени характерно присутствие антигена - AA4.1. Помимо положительных маркеров ГСК следует выделить кластеры дифференцировки, которые присутствуют на поверхности этих клеток незначительно, либо отсутствуют. Антигены, локализованные на конечных этапах дифференцировки лимфоцитов (CD45R/B220, CD3, CD4, CD8), гранулоцитарных (CD11b/Mac-1, Ly-6G/Gr-1) и эритроидных клеток (TER-119) отсутствуют на ГСК (Lin-). Низкий уровень экспрессии характерен для таких кластеров

дифференцировки как Thy-1 (CD 90) и c-kit (CD 117). Следует отметить, что использование 5 – фторурацила может привести к появлению низкого уровня на мембране ГСК не типичных для них маркеров (CD4, B220, Gr-1, Mac-1, TER-119). ГСК человека характеризуются высокой экспрессией CD 34, умеренной экспрессией CD 90 и CD 117 и низким уровнем или отсутствием CD38, HLA-DR, CD45RA, CD71. В мембрану мышинных и человеческих ГСК встроен гликопротеин – Р, ответственный за транспорт веществ (липиды, пептиды, билирубин и др.) через мембрану клетки. Следует отметить, что повышенная экспрессия этого гликопротеина может обеспечивать устойчивость опухолевых клеток к химиотерапии за счет выведения цитостатиков из клетки. В норме гликопротеин – Р помимо выведения из клетки перечисленных веществ, способен экспортировать флуоресцентные красители. На этом основан один из методов определения примитивных гемопоэтических стволовых клеток – по выведению из клетки флуорохрома (Rhodamine - 123). Флуоресцентное свечение LT-HSC вследствие выведения Rhodamine – 123 существенно меньше, чем их более зрелых потомков.

Помимо «классических» маркеров ГСК в последние годы выявлены новые антигены: было показано, что значительная доля ГСК мыши отрицательна по CD 34. Однако, у человека CD 34 экспрессируется на CD 117 + и Lin – ГСК полученных из тканей плода, а также от новорожденных. В дальнейшем, с возрастом, происходит снижение экспрессии данного антигена. Межвидовые отличия касаются и экспрессии на поверхности ГСК CD 38. Стволовые кроветворные клетки человека не имеют кластера дифференцировки CD 38, в то время как зрелые клеточные формы его уже содержат. И напротив, когда были выделены мышинные примитивные гемопоэтические стволовые клетки (LT-HSC) из костного мозга и из фетальной печени с фенотипом Lin-, Sca -1+, CD 117+ было установлено, что на их поверхности присутствовал CD 38. Через 12 дней эти клетки имели уже низкий уровень экспрессии CD 38.

Таким образом, большинство ГСК мыши имеют фенотип CD 34- и CD 38+. Следует подчеркнуть, что у человека ГСК могут быть отрицательные по CD 34.

Такие клетки (CD 34-) также, как и CD 34+ способны к самообновлению и поддержанию своей численности. Тем не менее, у них есть некоторые отличия от CD 34+ клеток проявляющиеся в менее выраженной способности формировать колонии и в меньшей способности к направленному движению – хоумингу. Важной характеристикой CD 34- является их способность длительное время поддерживать кроветворение. В целом в кроветворной ткани существует пути взаимного превращения CD 34- клеток в CD 34+. При этом обе фракции могут, как поступать в периферическую кровь из костного мозга, так и мигрировать обратно. На поверхности ГСК человека установлено наличие нового кластера дифференцировки CD 133, который экспрессируется на большинстве CD 34+ клеток, выделенных из фетальной печени, костного мозга, периферической крови (как до, так и после мобилизации). В отличие от CD 34 данный антиген не определяется уже на поздних прогениторных клетках (КОЕ – Э, КОЕ - Г). Следует отметить, что CD 133 может быть локализован и на CD 34 отрицательных клетках. Так, в пуповинной крови были обнаружены CD 34-, CD 133+, Lin- ГСК.

Проведенные исследования на мышинных гемопоэтических стволовых клетках, выделенных из костного мозга (SCA - 1+, CD 117+, Lin -) позволили установить наличие в этих ГСК трансмембранных тирозинкиназных рецепторов (FLK -2). По экспрессии FLK -2 рецептора все ГСК можно разделить на три группы: клетки FLK-2 отрицательные и с низким уровнем CD90 обладают способностью к длительному поддержанию гемопоэза и, относятся, таким образом, к примитивным ГСК. С фенотипом FLK-2 + и с низким уровнем CD90 обладают способностью к кратковременному поддержанию гемопоэза. Кроветворные клетки с фенотипом отрицательным по CD 90 и FLK-2+ являются мультипотентными прогениторными клетками, способные, как и две предыдущие популяции ГСК дифференцироваться во все клетки крови, но в отличие от них не способны к самообновлению. ГСК мыши, полученные из печени плода имеют следующий иммунофенотип: AA4.1 +, Mac-1 +, а также высокий уровень свечения флуорохрома Родамин – 123. Таким образом, популяции мышинных ГСК

выделенные в пренатальный и в постнатальный период отличаются иммунофенотипом. Было обнаружено, что от 0,1 % до 0,5 % CD 34+ ГСК человека, выделенных из костного мозга, пуповинной крови и периферической крови имеют на своей поверхности рецептор к сосудисто-эндотелиальному фактору роста (VEGFR2). Этот рецептор, также как и FLK-2 у мышей относится к семейству тирозиновых киназ, поэтому у человека его еще обозначают как FLK-1. Бипотентные и унипотентные прогениторные клетки, имеющие антиген CD 34+ не содержат рецептор FLK-1. Колониеобразующая единица высокого пролиферативного потенциала (КОЕ-ВПП), относящаяся в иерархии гемопоэтических клеток к мультипотентным прогениторным клеткам, может, как содержать рецептор к сосудисто-эндотелиальному фактору роста, то есть быть FLK-1+, так и не иметь этого рецептора - FLK-1. Примитивная гемопоэтическая стволовая клетка – стволовая клетка, поддерживающая кроветворение в длительной культуре костного мозга (LTC - IC) имеет экспрессию FLK-1 в 300 раз большую по сравнению с КОЕ-ВПП. В то же время во фракции клеток отрицательных по FLK-1 такие клетки отсутствуют. Популяция LTC – IC (CD 34+, FLK-1+) клеток может быть увеличена добавлением в культуру сосудисто-эндотелиального фактора. Это дает основание предполагать, что FLK-1 может играть важную роль в механизмах самообновления клеток.

Активный поиск новых кластеров дифференцировки, позволяющих существенно обогатить фракцию примитивными гемопоэтическими клетками продолжается. Так, у человека был обнаружен маркер ГСК – дополнительный рецептор к TGF- $\beta$  – эндоглин (CD 105). Выделение клеток по этому рецептору позволяет обогатить суспензию LTC – IC в пять раз. В более зрелых прогениторных клетках он либо не был обнаружен, либо была его незначительная экспрессия.

В последние годы было установлено наличие в некоторых клетках трансмембранных белков (ABC), ответственных за формирование устойчивости к различным лекарственным препаратам. Механизм этой устойчивости заключается в выведении из клетки соответствующих веществ. Клетки, в мембране которых

присутствуют белки семейства ABC, получили название SP-клетки (side - population). P- гликопротеин (один из представителей семейства ABC; кодируется геном MDR1) присутствует на мембране примитивных гемопоэтических клеток. Индукция активности Mdr1 (аналог гена человека MDR1) в клетках костного мозга мыши вызывало активацию пролиферации ГСК *in vitro*. Также были проведены эксперименты по блокированию гена Mdr1 в клетках костного мозга мыши, что позволило установить нарушение выведения Rhodamine- 123. Тем не менее, содержание SP- клеток, способных выводить другой флуорохром - Hoechst - 33342 оставалось в норме. Это способствовало поиску других белков семейства ABC и, такие представители были найдены. Так, была доказана высокая экспрессия транспортера Vcrp1 (он же Abcg2; аналоги BCRP1/ABCG2у человека) на мышечных клетках костного мозга, скелетных мышечных волокнах, культивированных эмбриональных стволовых клетках.

Трансплантация клеток костного мозга с повышенной экспрессией Vcrp1 мышам, облученных летальной дозой способствовало поддержанию гемопоэза в течение 15 недель. Проведенные исследования позволили установить, что костномозговые примитивные гемопоэтические клетки человека и мыши содержат транспортеры MDR1, BCRP1/ABCG2 и Mdr1, Vcrp1/Abcg2 соответственно. Эти рецепторы не только обеспечивают устойчивость к действию химических веществ (эта особенность используется при их идентификации флуорохромами), но и обеспечивают высокий пролиферативный потенциал примитивных ГСК. Более зрелые прогениторные клетки отрицательны по этим маркерам. Помимо описанных иммунофенотипических маркеров, расположенных на поверхности клетки в литературе есть данные о характерных для ГСК внутриклеточных ферментах, их активность коррелирует со степенью дифференцировки ГСК. Рядом авторов было показано, что высокая активность внутриклеточного фермента альдегиддегидрогеназы четко коррелирует с пролиферативным потенциалом гемопоэтических клеток. Наибольшая активность этого фермента установлена в примитивных гемопоэтических клетках и практически отсутствует в более зрелых прогениторах.

Таким образом, анализируя данные литературы, можно составить фенотип ГСК, который выглядит следующим образом:

Экспрессия маркера	ГСК мыши	ГСК человека
Высокая	1. Sca-1 2. H-2K 3. CD 38 4. ALDH 5. Эндоглин 6. Р- гликопротеин 7. Bcrp1/Abcg2	1. CD 133 2. CD34 3. Flk-1 4. ALDH 5. BCRP1/ABCG2
Средняя		1. CD 117 2. CD 90
Низкая	1. CD 117 2. CD90 3. Rhodamine –123 4. Hoechst – 33342	1. Rhodamine –123 2. Hoechst – 33342
Отсутствует	1. CD 34 2. Flk-2 3. Lin	CD34 CD45RA HLA-DR CD38 CD 71

Важным свойством ГСК является их способность к направленному движению – хоумингу. Этот механизм реализуется за счет того, что на поверхности ГСК расположен трансмембранный рецептор CXCR4 (chemokine receptor type 4, CD 184). Клетки стромы могут вырабатывать хемоаттрактант для этого рецептора – SDF-1 (stromal cell – derived factor 1, также называемый CXCL 12). Взаимодействие SDF-1 со своим рецептором обеспечивает направленное движение ГСК. Помимо CXCR4 ГСК способны экспрессировать на своей поверхности и другие рецепторы VLA-4, VLA-5, LF1-1, к соответствующим

белкам адгезии VCAM-1 и ICAM-1. Следует отметить важную роль в механизмах хоуминга ГСК гиалуроновой кислоты.

Так, в экспериментах, было показано, что в физиологических условиях гиалуроновая кислота, не оказывая существенного влияния на образование новых клеток в миелоидной ткани способствует выходу зрелых элементов из костного мозга в периферический кровоток. В условиях воздействия экстремального фактора (ионизирующее излучение) гиалуроновая кислота регулирует работу гемопозиндуцирующего микроокружения (ГИМ). Так, было доказано, что в условиях воздействия ионизирующего излучения гиалуроновая кислота способствует образованию в ГИМ биологически активных веществ, стимулирующих пролиферацию (ИЛ 6, ИЛ 12) и дифференцировку (белковый фактор Стила) ГСК. Свое действие гиалуроновая кислота реализует через связывание со специфическим рецептором CD 44.

## **1.2. Поиск оптимального источника ГСК**

До недавнего времени костный мозг считали единственным источником ГСК. Трансплантация аллогенных ГСК костного мозга часто приводит к развитию иммунологических конфликтов, так как не более 30 % реципиентов имеют HLA – идентичных родственников. При этом содержание ГСК в костном мозге весьма незначительное и составляет 0,01 %, а вместе с клетками – предшественниками – 0,05 %. Известно, что ключевая роль в восстановлении гемопоза принадлежит именно ГСК. Количество ГСК в периферической крови взрослого организма примерно в 100 раз меньше, чем в костном мозге. Поэтому были предприняты попытки увеличить содержание ГСК в периферической крови. Эти попытки оказались относительно успешными. Использование колониестимулирующих факторов (Г-КСФ, ГМ - КСФ) позволило увеличить количество ГСК в периферической крови в 10 раз. Однако проблема недостаточного для эффективной терапии содержания ГСК в применяемых образцах по-прежнему оставалась.

Поиск альтернативных источников ГСК привел к тому, что в 1988 г. впервые в мире профессором Элиан Глюкман была выполнена успешная трансплантация пуповинной крови шестилетнему ребенку с анемией Фанкони. Во время трансплантации был использован HLA – идентичный трансплантат пуповинной крови. Но уже в 1993 г. доктором J. Kurtzberg пациенту в возрасте 20 месяцев с диагнозом острый лейкоз была впервые успешно проведена неродственная трансплантация клеток пуповинной крови.

Было установлено, что при частичном несовпадении HLA5/6 при достаточном количестве клеток пуповинной крови удается получить результаты, которые наблюдаются при трансплантации полностью совместимых клеток. В настоящее время появляется все большее количество публикаций, свидетельствующих о преимуществах неродственной трансплантации фетальных клеток (клеток пуповинной крови) по сравнению с трансплантацией костного мозга. Реакция «трансплантат против хозяина» значительно снижается, если при неродственной трансплантации используются клетки пуповинной крови. Это обусловлено незрелостью Т – лимфоцитов, а также присутствием в трансплантате противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10). Несмотря на преимущества использования для восстановления гемопоэза клеток пуповинной крови над трансплантацией костного мозга и ГСК из периферической крови, остается существенное ограничение для применения пуповинной крови. Это ограничение выражается в недостаточном количестве ГСК для трансплантации пациентам зрелого возраста. Поскольку использование образцов, содержащих ГСК, проводится в расчете на единицу массы тела, то актуальным является поиск таких источников, которые позволили бы увеличить выход ГСК.

### **1.3. Плацента как источник гемопоэтических стволовых клеток**

Известно, что после гаструляции к 4 дню эмбрионального развития образуется бластоциста, в которой выделяют внутреннюю клеточную массу и периферические клетки (трофобласт). В процессе эмбриогенеза внутренняя клеточная масса бластоцисты расслаивается на гипобласт и эпибласт. Гипобласт дает начало

внезародышевой энтодерме, которая в свою очередь, образует внутренний слой желточного мешка и аллантаоиса. Клетки эпибласта формируют все зародышевые листки (эктодерму, энтодерму, мезодерму), а также, мигрируя из эпибласта, образуют внезародышевую мезодерму. Внезародышевая мезодерма участвует в формировании задней стенки желточного мешка и аллантаоиса. В образовании хориона плаценты участвует как внезародышевая мезодерма, так и производные трофобласта (цито - и синцитиотрофобласт). В области аллантаоиса начинается ангиогенез, образующиеся сосуды прорастают мезодерму хориона и амниона и участвуют в дальнейшем в развитии пупочного канатика с проходящими в его составе сосудами (пупочными артериями и пупочной веной).

В настоящее время подробно изучены механизмы становления кроветворения у мышей, которое может служить моделью развития гемопоэза у человека. Исследования, проведенные на лабораторных мышах, доказали наличие кроветворения у плода в различных тканях: желточный мешок, область гонады – аорта - мезонефрос (так называемая - АГМ область), а также в печени плода и плаценте. Тем не менее, вклад каждого из этих регионов в становление и развитие гемопоэза остается окончательно невыясненным. Наиболее ранние очаги эмбрионального кроветворения появляются в стенке желточного мешка, где образуются кровяные островки.

Было установлено, что появившиеся там ранние предшественники кроветворения имеют высокий пролиферативный потенциал, но в то же время ограниченный дифференцировочный потенциал (дифференцируются преимущественно в эритроидном направлении). Гемопоэтические предшественники, образующиеся в области АГМ, имеют высокий пролиферативный и дифференцировочный потенциал, способны к самообновлению. При этом отмечена способность к дифференцировке в эндотелиальные клетки. После образования кровяных островков в стенке желточного мешка и в области АГМ стволовые кроветворные клетки мигрируют в потенциальные очаги кроветворения. На 5-6 неделе внутриутробного развития человека появляются очаги кроветворения в печени (вследствие хоуминга). При этом печень будет основным органом гемопоэза до

шестого месяца эмбриогенеза. В результате исследований, проведенных на мышах, было выявлено наличие в плаценте клеток, обладающих способностью к самообновлению, высоким пролиферативным потенциалом, способных дифференцироваться во все клетки крови (*in vitro*). Трансплантация этих клеток облученным мышам обеспечивала поддержание гемопоэза. Также было установлено, что в плаценте лабораторных мышей в процессе онтогенеза мультипотентные гемопоэтические клетки появляются раньше, чем в печени. Выделенные из плаценты (хориона) мультипотентные гемопоэтические клетки экспрессируют один из основных транскрипционных факторов гемопоэза - Runx1. Мультипотентность гемопоэтических клеток, выделенных из плаценты, подтверждается их способностью образовывать миело – и эритроидные клетки, а также Т и В–лимфоциты. Это доказывает, что плацента мыши в эмбриональном периоде гемопоэтический орган. Клоногенные прогениторные клетки выявляются в плаценте на 9-й день эмбрионального развития мыши. Это несколько позже, чем в АГМ - области зародыша и стенке желточного мешка. Значительное увеличение ГСК в плаценте мыши происходит с 10,5 – 11,0 дня эмбрионального развития. К 12 дню онтогенеза количество колоний гемопоэтических клеток в плаценте превышает количество гемопоэтических колоний в печени. А в сроке 12,5 – 13,5 дней содержание ГСК превосходит содержание в первичном очаге гемопоэза (АГМ - область) в 15 раз. После 13,5 дней развития эмбриона количество ГСК начинает существенно уменьшаться.

Учитывая, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки участвуют в формировании ниши для гемопоэтических клеток в различных тканях организма, то можно предположить, что они также играют важную роль в регуляции процессов пролиферации ГСК в плаценте. Такие исследования были проведены: выделенные из плаценты человека ММСК, способны при совместном культивировании с ГСК пуповинной крови увеличивать их содержание.

Накопленный научный материал, свидетельствует о том, что плацента лабораторных животных (мышей) содержит значительные количества ГСК и

гемопоэтических прогениторных клеток делает актуальным вопрос об аналогичных способностях плаценты человека быть источником ГСК.

Учитывая, что в плаценте мыши к 17-18 дню онтогенеза ГСК практически отсутствуют, весьма интересными представляются данные о содержании ГСК в плаценте человека. Было установлено присутствие в ткани плаценты человека на 6 неделе гестации CD 34+ и CD 34- фракций гемопоэтических прогениторных клеток. К 15 неделе гестации присутствовали преимущественно CD 34 + гемопоэтические прогениторные клетки. Схожие данные, когда в плаценте были обнаружены CD 34 + гемопоэтические прогениторные клетки, получены и другими исследователями, при этом из плаценты были выделены 2 фракции гемопоэтических клеток CD34 (++) , CD45 (низкий уровень) и CD34 (+) , CD45 (низкий уровень). Первая фракция также содержала маркеры, характерные для примитивной ГСК и обладала способностью образовывать эритроидные, миелоидные колонии, а также демонстрировала дифференцировочный потенциал с экспрессией CD 56+ (характерен для НК клеток) и CD 19 (наиболее ранний маркер В-клеточной дифференцировки). Популяция клеток с фенотипом CD34 (+) , CD45(низкий уровень) демонстрировала способность образовывать только эритроидные и миелоидные колонии. При этом количество клеток с фенотипом CD34 (++) увеличивалось с течением времени гестации и к 8 неделе достигало своего максимального значения. Эти данные нашли свое подтверждение и в работах других авторов.

Было установлено, что в плаценте человека начиная с 6 недели беременности и далее в I, II триместре гестации, а также, что важно, в зрелой плаценте присутствуют ГСК. Трансплантация гемопоэтических клеток, выделенных из плаценты человека, иммунодефицитным мышам (NOD-SCID мыши) способствовала активации и поддержанию гемопоэза.

ГСК выделенные из пуповинной крови обладают способностью к самообновлению и большим пролиферативным потенциалом, чем ГСК выделенные из костного мозга. ГСК выделенные из плаценты человека имеют более высокий уровень экспрессии CD 90 и CD 31 по сравнению с образцами

пуповинной крови, что может иметь значение в степени выраженности их пролиферативного и дифференцировочного потенциала. ГСК с кластером дифференцировки CD 90+ проявляют существенно большую клоногенную активность, чем ГСК CD 90-.

Фетальные клетки (выделенные из пуповинной крови) имеют менее выраженную экспрессию антигенов HLA-системы, чем у взрослых, что позволяет проводить трансплантацию ГСК при частичном несовпадении по HLA – системе. Содержание ГСК в плаценте превышает количество ГСК в доступном объеме пуповинной крови. Эти клетки сохраняют способность дифференцироваться во все клетки крови. Было показано, что зрелая плацента человека может быть источником ГСК и криоконсервирование плаценты может быть альтернативным и эффективным способом сохранения ГСК в количестве, достаточном для активации кроветворения у пациентов зрелого и пожилого возраста.

#### **1.4. Плацента как источник негемопоэтических стволовых и прогениторных клеток**

В последние годы увеличилось количество публикаций, в которых изучается возможность выделения стволовых и прогениторных клеток из различных тканей плаценты. В частности, производится выделение этих клеток из соединительной ткани хориона и амниона, а также из эпителия амниона, изучается дифференцировочный потенциал этих клеток. Согласно современной терминологии из плаценты выделяются следующие клетки: амниотические эпителиальные клетки человека (hAEC), амниотические мезенхимальные стромальные клетки человека (hAMSC), мезенхимальные стромальные клетки хориона человека (hCMSC).

Обязательными критериями hAMSC и hCMSC является: способность прикрепляться к пластику при культивировании, образовывать фибробласт подобные колонии, экспрессировать на своей поверхности специфические маркеры CD90, CD73, CD105 и не должно быть кластеров дифференцировки CD45, CD34, CD14, HLA-DR. Положительные маркеры должны выявляться с

частотой не менее 95%, а отрицательные не более 2%. Также эти клетки должны демонстрировать способность к дифференцировке в остеогенном, адипоцитарном, хондрогенном направлении.

Выявлена экспрессия генов транскрипционных факторов, характерных для эмбриональных стволовых клеток OCT-4, SOX-2, Rex-1 и Nanog. Участие таких генов как SSEA-3 и SSEA-4 еще обсуждается. Была продемонстрирована способность hAMSC после индукции в нейрональном направлении экспрессировать нейрональные (нейрон специфическая эналаза, нестин, MAP2) и глиальные маркеры (глиальный фибриллярный кислый белок). Также была продемонстрирована способность *in vitro* hAMSC дифференцироваться в гепатоциты. Было установлено, что hAMSC экспрессировали следующие маркеры:  $\alpha$  – фетопротейн, цитокератин 18,  $\alpha 1$  – антитрипсин, а также гепатоцитарный ядерный фактор транскрипции - 4 $\alpha$ . Выявлена способность hAMSC экспрессировать кардиоспецифический транскрипционный фактор GATA4, кардиоспецифичные предсердные и желудочковые легкие цепи миозина, а также сердечные тропонины (сTnI и сTnT).

После трансплантации hAMSC лабораторным крысам с моделированным инфарком миокарда эти клетки демонстрировали способность к дифференцировке в кардиомиоциты. Об ангиогенном потенциале hAMSC свидетельствует обнаружение в этих клетках специфических маркеров эндотелия (рецепторы FLT-1 и KDR), а также значительное увеличение содержания hAMSC в ответ на сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF).

Следует отметить, что не только строма плаценты содержит стволовые и прогениторные клетки, интересные данные были получены при изучении hAEC. Так, было отмечено присутствие на мембране hAEC антигенов, специфических для эмбриональных стволовых клеток SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, а также установлена экспрессия генов, ответственных за плюрипотентность стволовых клеток (OCT-4, SOX-2, Nanog). Маркер мезенхимальных клеток отсутствует на hAEC, однако появляется в процессе культивирования этих клеток.

Биологический смысл одновременного присутствия в hAEC эпителиальных и мезенхимальных маркеров до конца не выяснен.

При изучении дифференцировочного потенциала hAEC была показана способность эпителиальных клеток амниона экспрессировать нейрональные и глиальные маркеры. Также была показана способность hAEC синтезировать и выделять катехоламины, ацетилхолин, нейротрофические факторы. Более того, рядом авторов в исследованиях *in vivo* доказана возможность амниотических эпителиальных клеток, выделенных из плаценты человека, после трансплантации лабораторным крысам оказывать нейротрофическое действие на нейроны коры, а также обеспечивать повышение жизнеспособности нейронов сетчатки цыплят. В исследованиях *in vitro* установлена способность hAEC экспрессировать гепатоцитарные ядерные факторы транскрипции (HNF 4 $\alpha$ ),  $\alpha$ 1 - антитрипсин, глутамин-синтетазу, фосфоенолпируват карбоксикиназу, цитокератин 18.

В исследованиях *in vitro* также была показана возможность hAEC секретировать сывороточный альбумин и  $\alpha$  – фетопротеин. После трансплантации амниотической мембраны человека в брюшную полость иммунодефицитным мышам (SCID) установлено наличие в крови животных человеческого альбумина. В других исследованиях после трансплантации hAEC отмечено наличие  $\alpha$ 1-антитрипсина человека в сыворотке мышей, а также включение через две недели после трансплантации клеток человека (hAEC) в паренхиму печени SCID – мышей. Используя специальные среды при культивировании hAEC, удалось активировать их панкреатическую дифференцировку. Инсулин продуцирующие hAEC были способны нормализовать уровень глюкозы в крови лабораторных мышей со стрептозотоциновым сахарным диабетом. На гормон продуцирующих hAEC был выявлен маркер клеток поджелудочной железы –  $\alpha$  амилаза 2B. Изучение культивированных hAEC также позволило установить способность hAEC синтезировать гормон глюкагон.

### 1.5. Способы выделения ГСК

В настоящее время используются различные подходы для выделения и подсчета ГСК. Наиболее распространенный способ выделения ГСК - по кластерам дифференцировки. ГСК человека экспрессируют CD 34, CD 90, CD 133 и в то же время не образуют на своей поверхности CD45, CD 38, а также ряд других маркеров, обозначаемых как линейные маркеры (Lin-). Для выделения ГСК используют различные методики, но чаще всего это позитивная или негативная сепарация клеток. Помимо фенотипирования ГСК по поверхностным антигенам широко используется определение ГСК по их функциональной активности. Для этого проводятся функциональные тесты. К таким функциональным тестам относят способность ГСК «выводить» из внутриклеточного пространства во внеклеточное пространство различные флуоресцентные вещества (Hoechst - 33342, Rhodamine - 123) используя трансмембранные каналы семейства ABC. При помощи флуоресцентной микроскопии или проточной цитометрии есть возможность обнаружить ГСК, которые будут иметь в этом случае слабое свечение.

В последние годы был предложен еще один функциональный тест, основанный на определении активности локализованного в цитоплазме клеток фермента – альдегиддегидрогеназы. Этот фермент, взаимодействуя с BODIPY-аминоацетальдегидом, приводит к образованию флуоресцирующего вещества. По интенсивности свечения делается заключение о функциональной активности ГСК. Для клеток, находящихся в иерархии ГСК выше, т.е. для менее зрелых мультипотентных предшественников, обладающих большим пролиферативным потенциалом характерна высокая активность альдегиддегидрогеназы. Функциональные тесты, связанные с определением «выведения» из клетки флуорохромов, а также основанные на установлении активности альдегиддегидрогеназы позволяют обнаружить популяцию примитивных стволовых кроветворных клеток.

Помимо обнаружения кластеров дифференцировки и функциональных тестов для определения принадлежности клеток к ГСК используют культуральные

методы. Наиболее распространенный культуральный метод - постановка стандартного теста колониеобразования в полутвердой метилцеллюлозной среде. Морфология, а также время появления колоний в полутвердой метилцеллюлозной среде будет служить характеристикой изначально высеянных клеток. Также используется постановка долгосрочных культур родоначальных клеток. В этом случае, ранее выделенные ГСК культивируют с ММСК. Последние используют в качестве питательной подложки. Культивирование проводят в течение 5 – 7 недель.

### **1.6. Выбор оптимальной терапевтической дозы ГСК**

В настоящее время нет единой точки зрения об эффективной терапевтической дозе ГСК. По данным Э. Глюкман для успешного приживления трансплантата необходимо вводить реципиенту не менее  $300 \cdot 10^5$  ядродержащих клеток пуповинной крови или  $1 \cdot 10^5$  CD 34 + кл./кг. Опыт работы Института стволовых клеток человека, г. Москва говорит о том, что критическая доза клеток, меньше которой, смертность значительно возрастает, составляет  $1,7 \cdot 10^5$  CD 34+ кл./кг. Исследования, проведенные V. Rocha свидетельствуют, что критически значимым для клинического использования будет содержание ядродержащих клеток пуповинной крови менее  $2,5 \cdot 10^7$  кл./кг, а количество CD 34+ клеток менее  $2 \cdot 10^5$  кл./кг. При анализе данных Московского банка стволовых клеток установлена медиана числа ядродержащих клеток пуповинной крови на килограмм веса реципиента на уровне  $6 \cdot 10^7$  (разброс  $0,2 \cdot 10^7$  –  $21,5 \cdot 10^7$ ), CD 34+ клеток –  $7,7 \cdot 10^5$  кл./кг (разброс  $0,5 \cdot 10^5$  -  $40 \cdot 10^5$ ). Исследования, проведенные в Институте молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина (Казахстан) позволили установить, что трансплантация  $1 \cdot 10^6$  кл./кг культивированных ГСК лабораторным крысам стимулирует процессы репаративного моделирования миокарда и ангиогенез после индуцированного инфаркта миокарда. В исследовании связанном с изучением экспрессии рецепторов на поверхности ГСК (CXCR-4) после их стимуляции Г-КСФ указано, что для успешного восстановления гемопоэза минимально необходимая доза это  $2 \cdot 10^6$  CD 34+

клеток, при этом также указано, что доза  $5 \cdot 10^6$  CD 34+ клеток является более предпочтительной.

### **Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки:**

#### **общая характеристика**

Костный мозг является универсальным, но далеко не единственным источником получения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Наряду с ним, можно выделить следующие источники ММСК: периферическая и пуповинная кровь, жировая ткань, ткани эмбриона, плацента, селезенка, тимус, ткань мозга, синовиальная оболочка, скелетная мускулатура, лимфатические узлы, плевральная полость, молочные зубы.

Для ММСК характерны фибробластоподобная морфология, адгезивная способность к пластику, морфологическая гетерогенность популяции. Способность к адгезии на пластик при культивировании - один из отличительных признаков ММСК, что позволяет достаточно просто отделять ММСК костного мозга от других клеток, например, гемопоэтических.

Важной особенностью является также способность покидать свою «тканеспецифичную нишу» и циркулировать в кровеносном русле. Этим и объясняется присутствие ММСК в периферической крови. Однако для того, чтобы реализовать программу дифференцировки, циркулирующие ММСК должны вернуться (посредством хоуминга) в подходящее микроокружение.

Культуры ММСК из костного мозга не гомогенны и представляют собой депо для некоммутированных и коммутированных клеток, которые благодаря способности к самообновлению и высокому дифференцировочному потенциалу, а также обладая миграционными свойствами, обеспечивают ткани и органы мезенхимальными клетками на протяжении всей жизни, поддерживая, таким образом, вместе с ГСК процессы физиологической и репарационной регенерации в них.

ММСК обладают способностью под влиянием различных условий культивирования дифференцироваться *in vitro* в клетки различных тканей: кость,

жир, хрящ; мускулатуру, а также формировать клетки микроокружения костного мозга, поддерживая гемопоэз.

### 1.8. Основные поверхностные маркеры ММСК

Антигенный профиль ММСК еще до конца не изучен, однако считается, что ни один из многочисленных маркеров, экспрессируемых ММСК, не является специфичным. Общепринято, что взрослые человеческие ММСК не экспрессируют маркеры, характерные для гемопоэтических стволовых клеток: CD45, CD34, CD14, или CD11. Они также не экспрессируют костимулирующие молекулы CD80, CD86, или CD40, молекулы адгезии CD31 (platelet/endothelial cell adhesion molecule [PECAM]-1), CD18 (leukocyte function-associated antigen-1 [LFA-1]) и CD56 (молекула клеточной адгезии нейронов).

Но ММСК могут экспрессировать CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90 (Thy-1), Sca-1 (stem cell antigen-1), CD71 (рецептор к трансферрину) и Stro-1, а также молекулы адгезии CD106 (vascular cell adhesion molecule [VCAM]-1), CD166 (activated leukocyte cell adhesion molecule [ALCAM]), внутриклеточную молекулу адгезии (ICAM)-1 и CD29.

Однако важно отметить, что различия в экспрессии многих маркеров могут возникать из-за влияния биологических агентов, секретируемых вспомогательными клетками на начальных этапах культивирования, и экспрессия некоторых маркеров ММСК *in vitro* не всегда совпадает с экспрессией *in vivo*. ММСК экспрессируют специфические антигены: SH2, SH3, SH4, STRO-1, SMA (smooth muscle actin), MAB 1740, а также синтезируют следующие цитокины и ростовые факторы: IL-1, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, Lif, SCF, Flt-3 ligand, GM-CSF, G-CSF, M-CSF [139]. На поверхности ММСК присутствуют рецепторы цитокинов и ростовых факторов: IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIF-R, SCF-R, G-CSFR, IFN-R, TNF-IR, TNF-IIR, TGF-IR, TGF-IIR, PDGFR, EGFR, CXCR4, TLRs (Toll-like receptors). Для ММСК характерно образование следующих молекул адгезии: интегрины (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, P-selectin, L-selectin, endoglin, CD-44), а также молекул внеклеточного матрикса (коллаген типа - I, III, IV, V и VI фибронектин, ламинин, гиалуронан, протеогликаны).

Полагают, что экспрессия ММСК молекул МНС меняется в зависимости от типа изучаемых клеток: эмбриональных или взрослых. Взрослые человеческие МСК экспрессируют значительное количество МНС I класса, но не экспрессируют МНС II класса. Эмбриональные же человеческие ММСК почти не экспрессируют МНС I класса.

ММСК по иммунофенотипу (МНСI+, МНСII-, CD40-, CD80-, CD86-) считаются неиммуногенными, и при аллогенной трансплантации не требуют иммуносупрессии.

Благодаря рецепторам к хемо- и цитокинам, ММСК способны мигрировать в ткани, возможно, в ответ на сигналы, возникающие под воздействием повреждающих факторов. Хотя этот механизм еще до конца не изучен, вероятно, хемокины и их рецепторы играют в нем важную роль как основные факторы, контролирующие клеточную миграцию. Хемокин CXCL12 (stromal cell-derived factor-1) и его рецептор CXCR4, находящийся на ММСК, критичны для поддержания функционирования костного мозга, его мобилизации и хоуминга гемопоэтических стволовых клеток.

Ряд цитокинов таких как IL-6, 7, 8, 11, 12, 14, а также GM-CSF, G-CSF, M-CSF, Lif, SCF, Flt-3 лиганд, продуцируемые ММСК, являются важнейшими гемопоэтическими факторами, которые необходимы для дифференцировки гемопоэтических клеток.

Важно отметить, что взрослые ММСК экспрессируют TLRs (Toll-like receptors), которые вместе с TLR-лигандами могут служить регуляторами пролиферации и дифференцировки ММСК. Активация ММСК с помощью TLR-лигандов индуцируется секрецией IL-6 и транскрипционного фактора - NF- $\kappa$ B. Передача сигнала с помощью TLR играет роль в сдерживании дифференцировки ММСК и таким образом способствует их обновлению.

Известно, что многие молекулы, участвующие в адгезии и миграции лейкоцитов из кровяного русла в ткани, экспрессируются на ММСК. Это интегрины, селектины, рецепторы к хемокинам. Например, P-selectin и VCAM-1, которые участвуют в адгезии лейкоцитов, функционально важны и в адгезии ММСК к эндотелию.

ММСК вырабатывают компоненты матрикса, в том числе фибронектин, ламинин, коллаген и протеогликаны. Они экспрессируют также некоторые ко-рецепторы, вовлекаемые во взаимодействия клеток друг с другом и с матриксом. Особенно типична сильная экспрессия CD44 - рецептора для различных лигандов типа гиалуронана и остеопонтина, которые играют центральную роль в организации экстрацеллюлярного матрикса в костном мозге или кости, соответственно.

ММСК из различных источников наряду с общими фенотипическими маркерами (CD13+, CD44+, CD45-, CD90+, CD105+), имеют некоторую специфичность, отчасти проявляющуюся морфологически и по экспрессии отдельных генов. Например, ММСК, полученные из жировой ткани, не экспрессируют CD 106. По экспрессии основных маркерных генов (CD44, CD90, CD105, CD13) ММСК из различных источников практически не отличаются, экспрессия данных генов очень высокая: 87,0-99,7% и почти не изменяется по ходу культивирования.

### **1.9. Пластичность ММСК**

В настоящее время ММСК рассматривают как плюрипотентные клетки с фибробластоподобной морфологией, которые присутствуют во взрослом костном мозге. Они способны пролиферировать как недифференцированные клетки и способны дифференцироваться в различные типы тканей, включая костную, хрящевую, жировую, сухожилия, мышечную ткань и костномозговую строму. Однако уже доказана возможность ММСК дифференцироваться не только в клетки мезодермального, но энтодермального и нейроэктодермального происхождения, включая нейроны, гепатоциты и эндотелиальные клетки.

Имеющиеся в настоящее время публикации свидетельствуют о том, что ММСК костного мозга отличаются очень широкой пластичностью. ММСК способны давать начало некоторым элементам нервной ткани, кардиомиоцитам, эпителиальным клеткам легких. В последние годы начинают проясняться молекулярные механизмы, лежащие в основе необычно широкой пластичности

ММСК. Глобальный анализ геной экспрессии выявляет в ММСК не только транскрипты, характерные для адипоцитов, хондроцитов, миоцитов, остеобластов и стромальных клеток, но и для эндотелиальных, эпителиальных и нейральных клеток.

Важным фактором в дифференцировке ММСК является плотность их микроокружения и физические условия культивирования. Так, например, мягкое, имитирующее ткань мозга, культивационное микроокружение приводит к превращению ММСК в нейроны; сходное по плотности с мышечной тканью – в миоциты; а сравнительно жесткое – в костную ткань.

ММСК «оценивают» окружающую среду по силе, которую им приходится затрачивать на взаимодействие с окружающими их поверхностями. От количества энергии, затраченной на это взаимодействие, зависит запуск тех или иных внутриклеточных химических сигналов и, соответственно, направление дифференцировки.

Дифференцировку ММСК *in vitro* индуцируют различные молекулы и факторы роста, которые добавляются в среду культивирования и впоследствии приводят к морфологическим и фенотипическим изменениям клеток.

Например, инкубация при нейроиндуцирующих условиях ведет к появлению клеточной популяции, изменяющей морфологию и экспрессирующей нейрональные маркеры: нестин, нейрофиламенты, MAP-2. Важным маркером «молодых» линий ММСК постнатальных и взрослых тканей является отсутствие потенциала дифференцироваться в типичные клоны фибробластов, синтезирующих избыток коллагена I типа. «Стареющие» ММСК приобретают способность к конверсии в фибробласты и рубцеобразованию в ходе регенерации.

Только часть клонов или часть потомства изолированных ММСК дифференцируются в остеобласты, которые быстро минерализуются. ММСК могут также дифференцироваться в определенных условиях в миофибробласты и гладкомышечные васкулярные клетки, имеющие отличный от фибробластов фенотип. Более того, аппликации ММСК в зону повреждения кожных покровов, приостанавливают развитие рубцовой ткани.

### 1.10. Применение ММСК в эксперименте и в клинике

Одни из первых исследований *in vivo* по изучению влияния стромального микроокружения на гемопоэтические стволовые клетки были проведены под руководством отечественного ученого Иосифа Львовича Черткова. Его учениками было показано, что аллогенная и ксеногенная (от лабораторных крыс) трансплантация ГСК под капсулу почки мышей не приводит к выраженному развитию реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) вследствие формирования иммунологической толерантности.

Другими авторами также доказана способность ММСК оказывать иммуносупрессивное действие. ММСК выделенные из жировой ткани и из костного мозга человека ингибировали способность активированных аллогенных Т- лимфоцитов вырабатывать провоспалительные цитокины TNF-  $\alpha$  и IFN-  $\gamma$  и, в то же время существенного влияния на выработку IL-2 они не оказывали. Аллогенные ММСК ( $5 \cdot 10^4$  клеток / мышь) выделенные из жировой ткани повышали выживаемость мышей после моделирования РТПХ проведением гаплоидентичной трансплантации ГСК (количество ЯСК костного мозга мыши –  $1 \cdot 10^7$ ). ММСК, трансплантированные в ранние сроки (0, 7, 14 сутки) обеспечили выживаемость всех животных, в то время как после трансплантации ММСК более поздние сроки в сроки (21, 28 сутки) все лабораторные мыши (также как животные с РТПХ без ММСК) погибли в срок до 2 месяцев. В 2004 г были опубликованы первые работы, в которых продемонстрирована эффективность аллогенных ММСК ( $2 \cdot 10^6$  кл/кг), выделенных из костного мозга в лечении тяжело протекающей РТПХ IV степени, устойчивой к гормональной терапии. Эти исследования были продолжены другими авторами, которые доказали не меньшую эффективность ММСК ( $2 \cdot 10^6$  кл/кг), выделенных из жировой ткани в лечении РТПХ IV степень.

Действие ММСК проявляется также и в регуляции иммунных реакций. Доказана способность ММСК под действием воспалительных цитокинов мигрировать в очаг воспаления и моделировать воспалительную реакцию. В частности, была установлена способность ММСК человека влиять на выработку

цитокинов дендритными клетками: секреция TNF- $\alpha$  снижалась, а синтез противовоспалительного ИЛ-10 наоборот увеличивалась. Способность Т хелперов-1 (Th1) секретировать IFN- $\gamma$  снижается, а Т хелперов-2 (Th2) вырабатывать ИЛ-4 увеличивается под действием ММСК. Также ММСК человека способны снижать выработку НК-клетками (натуральные киллеры) IFN –  $\gamma$ . После аутоиммунной внутривенной трансплантации ММСК, проведенной в два этапа 68 летней пациентке с тяжелой апластической анемией, не поддающейся лечению, а также при наличии противопоказаний для проведения аллогенной трансплантации ГСК, введенные клетки (доза ММСК составила соответственно  $2 \cdot 10^6$  кл/кг и  $6 \cdot 10^6$  кл/кг) были идентифицированы при биопсии в эндостальной ткани костного мозга реципиента. Было установлено восстановление стромы и увеличение содержания гемопоэтической ткани в костном мозге.

Изучена способность ММСК *in vivo* влиять на костную и хрящевую ткань. Детям с таким наследственным заболеванием как несовершенный остеогенез было проведено две трансплантации аллогенных ММСК, выделенных из костного мозга, использовались соответственно дозы ММСК  $1 \cdot 10^6$  кл/кг и  $5 \cdot 10^6$  кл/кг. В результате клинических наблюдений в течение 18-36 месяцев после клеточной терапии отмечено существенное увеличение роста кости в длину, минеральной плотности костной ткани. Интересные данные были получены при использовании иммобилизованных аутологичных ММСК на макропористых каркасах гидроксиапатита у пациентов с переломами трубчатых костей. Размер дефекта трубчатых костей составлял у пациентов от 4 до 7 см. Выделенные из костного мозга пациентов ММСК культивировали для получения популяции, обогащенной данными клетками.

Обогащенную, таким образом, фракцию клеток наносили на носитель из гидроксиапатита, который по форме и размеру соответствовал дефекту кости. Формирование 3 стадии костной мозоли было отмечено через 2 месяца, в то время как после использования традиционного костного трансплантата процесс выздоровления с подобными дефектами занимает от 12 до 18 месяцев.

Установленная эффективность применения ткане-инженерных конструкций с использованием ММСК для восстановления целостности трубчатых костей, оказалась не эффективной для восстановления дефекта нижней челюсти [280]. Дальнейшие исследования на мышах показали, что в восстановлении костной ткани нижней челюсти (развивается из нервного гребня – эктодермальное происхождение) после перелома эффективны стволовые клетки, образующиеся в эмбриональном периоде из нервного гребня. В восстановлении целостности большеберцовой кости (мезодермальное происхождение) также после перелома эффективны ММСК, выделенные из тканей мезодермального происхождения.

Трансплантация ММСК, полученных из мезодермальных тканей, в область перелома нижней челюсти приводила к образованию не остеобластов, а хондроцитов. Авторы установили, что стволовые клетки нижней челюсти по гену *Nox* – негативны, но они становятся *Nox*- положительными после трансплантации в большеберцовую кость. И наоборот, стволовые клетки, выделенные из большеберцовой кости *Nox* - позитивны, но после трансплантации в дефект нижней челюсти становятся по гену *Nox* - отрицательными. Таким образом, источник эмбрионального развития и экспрессия гена *Nox* может существенно влиять на эффективность восстановления костной ткани при применении ММСК.

Трансплантация ММСК может быть методом лечения при сердечно-сосудистой патологии. Выделенные из костного мозга ММСК и дифференцированные с использованием 5-азациитидина способны в эксперименте на лабораторных животных уменьшать зону инфаркта миокарда. ММСК выделенные из жировой ткани также способны дифференцироваться в кардиомиоциты. ММСК способны вырабатывать широкий спектр биологически активных веществ, повышающих жизнеспособность клеток, а также активирующих ангиогенез.

Доказана возможность ММСК, выделенных из костного мозга дифференцироваться в эндотелиальные клетки, при этом ММСК выделенные из жировой ткани обладают большим дифференцировочным потенциалом в эндотелиальные клетки, чем ММСК костного мозга. ММСК, имплантированные в

сосудистые протезы, могут способствовать восстановлению поврежденной сосудистой стенки. Интракоронарная трансплантация аутологичных, выделенных из костного мозга ММСК и эндотелиальных прогениторных клеток была проведена пациентам с перенесенным инфарктом миокарда в области передней части межжелудочковой перегородки. В опытной группе по сравнению с контролем было установлено существенное увеличение индекса сократимости миокарда, а также уменьшение накопления  $Tc(99m)$  в кардиомиоцитах, что свидетельствует о восстановлении поврежденного миокарда. Схожие данные получены иранской группой специалистов, которые интракоронарно трансплантировали аутологичные ММСК, выделенные из костного мозга восьми пациентами. И также по сравнению с контрольной группой (не получали клеточную терапию) выявлено существенное уменьшение зоны ишемии.

Действие ММСК на регенерацию поврежденной кожи первично было продемонстрировано в исследованиях на лабораторных мышах. Дальнейшие клинические исследования на пациентах с острыми и хроническими лучевыми поражениями кожи подтвердили и дополнили экспериментальные данные. Культивированные ММСК, ранее выделенные из костного мозга были помещены на специальные носители на основе фибрина. Конструкции, содержащие ММСК в количестве  $1 \cdot 10^6$  кл/см<sup>2</sup> были наложены на участки лучевого поражения кожи (4 раза). Сочетанное применение ММСК с фибриновой подложкой способствовало восстановлению кожных дефектов. В 2012 г подобные исследования были проведены в России, когда пациентам с хроническими лучевыми поражениями кожи II-IV степени помимо традиционной терапии использовали аутологичные, выделенные из костного мозга ММСК. Использовали различные способы введения клеток, как обкалывание поврежденной зоны, так и аппликации ММСК в фибриновом геле. Результатом клеточной терапии была эпителизация поврежденного участка кожи.

Дальнейшие исследования позволили определить механизмы терапевтического действия ММСК на кожу. Было доказано, что в культуральной среде содержатся выделяемые ММСК факторы: сосудисто-эндотелиальный

фактор роста –  $\alpha$ , инсулинподобный фактор роста -1, эпидермальный фактор роста, фактор роста кератиноцитов, ангиопоэтин-1, SDF-1, макрофагальный воспалительный белок  $1\alpha$  (MIP1 $\alpha$ ) и MIP $\beta$ , а также эритропоэтин в существенно большем количестве, чем в культуральной среде фибробластов кожи. Были использованы аппликации с использованием культуральной среды ММСК, а также культуральной среды фибробластов на дефекты кожи (резекция участка кожи). Последующий анализ клеточной суспензии с раневой поверхности свидетельствовал о большем содержании CD 4/80 – положительных макрофагов и эндотелиальных прогениторных клеток с фенотипом Flk-1-, CD34-, c-kit + после аппликаций культуральной среды ММСК. Эпителизация раны в первом случае также наступала быстрее. Таким образом, вырабатываемые ММСК факторы через вовлечение в процесс регенерации макрофагов и эндотелиальных прогениторных клеток способствуют восстановлению кожи. ММСК могут стимулировать восстановление поврежденной кожи не только, за счет выработки биологически активных веществ, но и дифференцируясь в клетки кожи (трансдифференцировка).

Японским исследователям впервые удалось *in vivo* при культивировании ММСК получить кератин 14+ клетки. В экспериментах *in vivo* используя трансгенных мышей (доноры костного мозга) с геном GFP (green fluorescent protein) доказана способность аллогенных ММСК, участвуя в регенерации кожи, образовывать различные клетки: кератиноциты, эндотелиальные клетки и перициты. ММСК также способны восстанавливать эпителий роговицы после химического ожога, что было показано в эксперименте на лабораторных животных. В экспериментах на лабораторных крысах установлено, что аппликация ММСК и аппликации культуральной среды ММСК в условиях ожога роговицы оказывают противовоспалительное и ангиогенное действие за счет снижения образования провоспалительных цитокинов (ИЛ 2, IFN $\gamma$ ), увеличения образования противовоспалительных факторов (ИЛ 10, TGF- $\beta$ ), а также увеличения выработки одного из основных антиангиогенных факторов (тромбоспондин). В восстановлении роговицы после ожога имеет значение не

только паракринный механизм, но и трансдифференцировка ММСК в клетки роговицы.

Группой китайских ученых проведено отдельно совместное культивирование костномозговых ММСК человека и крысы с эпителием канальцев почек. При этом культивированные ММСК приобретали округлую форму, подобную эпителию канальцев почки. Стромальные клетки человека и крысы экспрессировали маркеры, характерные для почечного эпителия канальцев почек: цитокератин 18, аквапорин-1. После введения ММСК человека в организм лабораторных крыс с острой почечной недостаточностью было установлено ускоренное восстановление функции почек по сравнению с группой контроля (без ММСК).

Также было обнаружено, что трансплантированные клетки экспрессировали маркеры эпителия канальцев почек (рецептор к паратиреоидному гормону, аквапорин-1). Механизм взаимодействия культивированных ММСК и эпителия почечных канальцев был раскрыт отечественными учеными. Было доказано, что через образующиеся межклеточные контакты происходит обмен содержимым цитоплазмы, компонентами мембраны клетки, а также митохондрии из ММСК способны проникать в эпителий почечных канальцев. Белки, поступающие в ММСК способны индуцировать их дифференцировку в эпителиоциты почек и, наоборот, поступающие вещества из ММСК способны ингибировать апоптоз, снижать образование активных форм кислорода в эпителиоцитах канальцев почки.

Накоплен значительный экспериментальный материал доказывающий возможность дифференцировки ММСК в нейрональные клетки, что открывает перспективы возможного их клинического применения. Так, в исследованиях *in vitro* была продемонстрирована способность ММСК под действием индукторов экспрессировать нейрональные маркеры, однако этот эффект был не стойкий и кратковременный. Совместное культивирование ММСК и Шванновских клеток приводило к стабильной экспрессии нейрональных маркеров на поверхности ММСК. ММСК, выделенные из разных источников отличаются между собой по способности к дифференцировке в нейрогенном направлении.

Дифференцировочный потенциал в нейрогенном направлении выделенных из жировой ткани ММСК больше, чем у мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из костного мозга. Причем это проявлялось как при добавлении в культуральную среду специфических индукторов дифференцировки (нейротрофического фактора и ретиноевой кислоты), так и при совместном культивировании со Шванновскими клетками.

Bouchez G. и соавторами в исследованиях, проведенных на лабораторных крысах исследована способность трансплантированных ММСК, выделенных из костного мозга, корректировать болезнь Паркинсона. Модель болезни Паркинсона была вызвана введением в область substantia nigra 6-гидроксидопамина. Через 2 месяца после повреждения, было установлено, что введение ММСК в зону повреждения увеличивало количество дофаминовых маркеров: везикулярного транспортера моноаминов, мембранного транспортера дофамина, тирозингидроксилазы. Уровень дофамина после фармакологической стимуляции также был выше в опытной группе животных по сравнению с контролем (без трансплантации ММСК).

В отличие от болезни Паркинсона, рассеянный склероз – хроническое аутоиммунное заболевание, возникает преимущественно у людей молодого и среднего возраста. При этом заболевании происходит прогрессирующее разрушение миелиновых волокон отростков нейронов, а также олигодендроцитов. Проведенные доклинические исследования показали высокую эффективность нейрональных стволовых клеток, выделенных из субвентрикулярной зоны головного мозга в лечении аутоиммунного энцефаломиелита, как модели рассеянного склероза.

В связи с этим представляется перспективной доказанная возможность ММСК, выделенных из костного мозга, дифференцироваться в нервные клетки. Результат действия нейрональных клеток, полученных из ММСК путем дифференцировки и нейрональных стволовых клеток, выделенных из центральной нервной системы, на течение аутоиммунного энцефаломиелита у лабораторных животных был сопоставим. Применение кондиционированной среды ММСК способствовало устранению

симптомов аутоиммунного энцефаломиелита. Механизм этого заключался в восстановлении целостности миелиновых волокон и снижении активности иммунной системы. Фракционированное изучение действия кондиционированной среды свидетельствовало, что наибольшим терапевтическим потенциалом обладает фактор роста гепатоцитов (HGF). Добавление в культуру нейрональных стволовых клеток кондиционированной среды ММСК и HGF в равной степени способствовало дифференцировке стволовых клеток в олигодендроциты и нейроны, в обоих случаях также отмечена активация синтеза противовоспалительных и ингибирование синтеза воспалительных факторов [120, 410]. Введение мышам кондиционированной среды ММСК и HGF на фоне дополнительного введения антител к HGF существенно снижало эффективность лечения аутоиммунного энцефаломиелита в обеих группах лабораторных животных.

### **1.11. Перспективные направления развития регенеративной медицины**

Отечественным ученым А.А. Максимовым впервые было введено в науку представление об унитарной теории кроветворения, а также на основе собственных трудов сформулировано предположение о существовании стволовых клеток, из которых образуются более зрелые клетки тканей.

После того, как в 1960 проводя эксперименты на летально облученных мышах Till J.E. и McCulloch E.A. доказали наличие в костном мозге гемопоэтических стволовых клеток, возникли вопросы о возможном использовании этих клеток для восстановления тканей после их повреждения. В дальнейших исследованиях было показано, что с возрастом содержание стволовых клеток в организме уменьшается, снижается количество вырабатываемых ими биологически активных веществ, а также в клетках тканей развивается генерализованный G<sub>1</sub>/S блок. Активация собственных стволовых клеток в условиях воздействия на организм экстремальных факторов, а также проведение заместительной клеточной терапии представляется перспективным направлением регенерационной медицины.

В настоящее время одним из перспективных направлений регенерационной медицины является использование плюрипотентных стволовых клеток, способных дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков. Эмбриональные стволовые клетки человека впервые были выделены из бластоцисты в 1998 г. Позже, была доказана возможность приобретения плюрипотентных свойств соматической клеткой человека после слияния ее с эмбриональной клеткой.

Однако, возможность развития иммунологических конфликтов, а также этические соображения препятствовали применению этих клеток в медицинской практике. Проводя экспериментальные исследования на фибробластах кожи мыши S. Yamanaka и Takahashi K., используя в качестве векторов ретровирусы доставили в эти клетки репрограммирующие факторы OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC, что вызвало дифференцировку этих клеток в плюрипотентные клетки, которые получили название индуцированные плюрипотентные клетки (иПСК). Через год после данного открытия другими исследователями было показано, что экспрессия в зрелой соматической клетке другого набора транскрипционных факторов также может придать клетке плюрипотентные свойства (OCT4, SOX2, NANOG и LIN28). При этом в обоих экспериментах была необходима экспрессия транскрипционных факторов OCT4 и SOX2.

Технологии получения иПСК создают уникальную возможность для изучения молекулярных механизмов развития различных заболеваний *in vitro*. На сегодняшний день на основе клеточных моделей полученных из иПСК изучаются механизмы и возможности фармакологической коррекции таких нейродегенеративных заболеваний ассоциированных со старением как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера. В частности, ряду научных групп удалось получить из иПСК дофаминэргические нейроны, и эти нейроны были успешно трансплантированы лабораторным крысам с моделью болезни Паркинсона. Также на модели дифференцированных нейронов получен эффективный ингибитор фермента - BACE (beta-site APP cleaving enzyme), ответственного за образование

амилоидного белка из белка предшественника амилоида (APP - amyloid precursor protein).

Доказана в эксперименте эффективность высоких доз гентамицина, а также инсулинподобного фактора роста (IGF-1) в лечении синдрома Ретта. Интересные данные были получены Brennand K.J. с коллегами: у пациентов, страдающих шизофренией, из кожи были выделены фибробласты, в дальнейшем фибробласты через экспрессию транскрипционных факторов приобретали свойства плюрипотентных клеток. Последние, в свою очередь были подвергнуты дифференцировке в нейрональном направлении, также как и iPSC здоровых людей. Было отмечено, что в опытной группе образующиеся нейроны имели меньшее количество отростков и меньшее количество синапсов. Авторами работы был исследован механизм действия используемого на сегодняшний день препарата Локсапин в лечении данной патологии.

Было доказано, что механизм действия препарата заключается в увеличении межнейрональных связей. Японскими учеными предложен инновационный подход в лечении пигментного ретинита. Это наследственное заболевание характеризуется прогрессирующей гибелью фоторецепторных клеток (палочек и колбочек) с последующим сужением поля зрения и в итоге слепотой. Исследователям удалось из фибробластов кожи больных пигментным ретинитом, используя четыре ключевых фактора транскрипции, перепрограммировать зрелые соматические клетки в iPSC. В дальнейшем полученные iPSC были дифференцированы в фоторецепторные клетки (палочки и колбочки), которые были утрачены пациентами. Фоторецепторные клетки обладали типичными иммунохимическими и электрофизиологическими свойствами. Особое внимание обращает на себя то, что в культуре содержание клеток с генетическим дефектом уменьшалось. Данное исследование свидетельствует, что получение iPSC может помочь расшифровать механизм развития пигментного ретинита, определить новые методы лечения данного заболевания.

На сегодняшний день отработаны методики дифференцировки iPSC в кардиомиоциты и гепатоциты. Введение дифференцированных в кардиогенном

направлении иПСК человека лабораторным крысам в перинфарктную зону миокарда оказывало терапевтический эффект. На модели гепатоцитоподобных клеток, полученных из иПСК изучена возможность коррекции активности гена АТР7В. При дефекте этого гена развивается болезнь Вильсона-Коновалова вследствие нарушения выработки соответствующего белка (АТР7В) и последующего нарушения в организме метаболизма меди с поражением различных органов и систем. В исследованиях *in vitro* куркумин восстанавливал активность гена АТР7В. Также на модели дифференцированных гепатоцитов проведены исследования по изучению жизненного цикла возбудителя вирусного гепатита С и изучены механизмы развития противовирусного воспалительного ответа.

Введение ключевых факторов транскрипции в соматическую клетку и последующее приобретение ею плюрипотентных свойств сопряжено с изменениями ядерного генома. Немецких ученых заинтересовало состояние генома митохондрий в иПСК. Так как мутации митохондриального генома могут быть причиной ряда серьезных заболеваний. Авторами было доказано, что при перепрограммировании фибробластов кожи в клетке уменьшается содержание митохондриальной ДНК, в то же время увеличивается экспрессия генов, ответственных за биогенез митохондрий. Для эмбриональных стволовых клеток характерно преобладание анаэробного гликолиза над аэробным. Подобные изменения были выявлены и в иПСК, где выявлено снижение содержания реактивных форм кислорода и экспрессии генов, обеспечивающих антиоксидантный потенциал, уменьшалось образование АТФ, увеличивался синтез лактата. Последующая дифференцировка иПСК способствовала переходу углеводного обмена на энергетически более выгодный – аэробный и, в целом, отмечалась обратная зависимость ранее установленных изменений.

Несмотря на то, что протоколы получения иПСК значительно усовершенствованы этот процесс остается довольно медленным и низкоэффективным. Используя транскрипционные факторы удается получить путем перепрограммирования из  $10^5$  зрелых клеток всего 20 иПСК. Учитывая недостатки указанного метода, разработаны способы получения иПСК с

использованием микро РНК. В этом случае выход целевого продукта (иПСК) на два порядка превышает количество иПСК полученных с использованием транскрипционных факторов. Впервые в 2009г. R. Velloch с коллегами удалось доказать, что повышение уровня характерных для ЭСК кластеров микро РНК 200 и микро РНК 205 в соматической клетке существенно повышает количество образующихся иПСК (рис. 1.1).

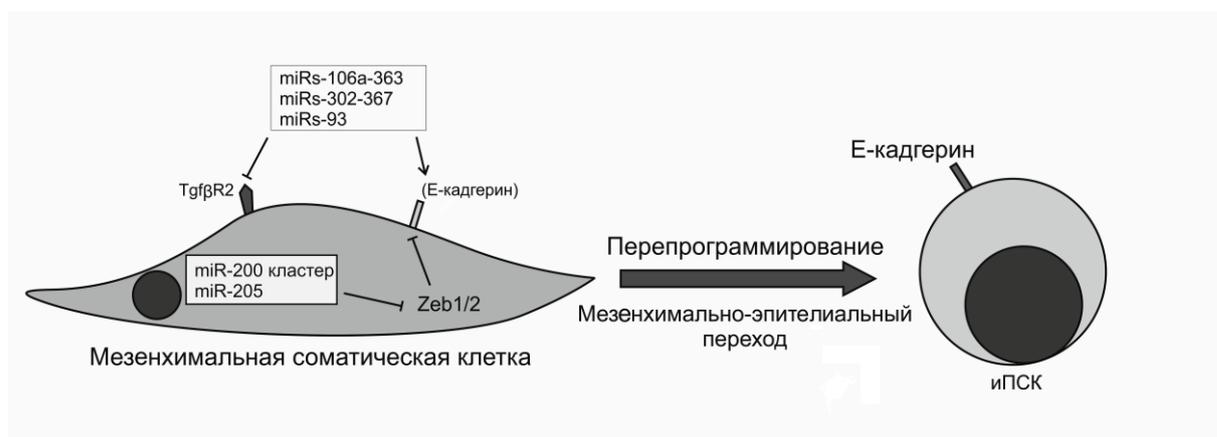


Рисунок 1.1

Механизм действия этих микро РНК заключается в ингибировании факторов транскрипции *Zeb 1* и *Zeb 2*, которые в свою очередь ингибируют экспрессию *E-кадгерина* (основной маркер эпителиальной клетки) на поверхности эпителиальной клетки. ЭСК и иПСК фенотипически схожи с эпителиальными клетками. Таким образом, гиперэкспрессия *E-кадгерина* на мембране мезенхимальной клетки отражает репрограммирование и мезенхимально-эпителиальный переход. В свою очередь, активация рецептора  $TGF-\beta 2$  на мембране мезенхимальной клетки препятствует их перепрограммированию, так как это способствует снижению уровня микро РНК 200 и 205 и, как следствие, ингибированию транскрипции гена *E-кадгерина* [206, 350]. Кластеры микро РНК (miRNA)- 106a-363, miRNA- 302-367, а также miRNA-93 также способствуют мезенхимально – эпителиальному переходу, однако механизм их действия остается до конца неизученным. Тем не менее, показано их ингибирующее действие на экспрессию рецептора  $TGF-\beta 2$  и активирующее на *E-кадгерин*. Различные кластеры микро РНК ответственны не только за поддержание плюрипотентных свойств и за программы самообновления стволовых клеток, но и за

образование плюрипотентных клеток из зрелой соматической. Микро РНК - 130b, - 301b, - посредством специфического связывания с матричной РНК способны снижать образование транскрипционного фактора Meox2, который через активацию белков Cdkn2a/p16 и Cdkn1a/p21 снижает образование комплексов соответственно циклин D - циклин-зависимая киназа 4,6 (cyclin-dependent kinases, CDK) и циклин E – CDK2 (рис. 1.2.).

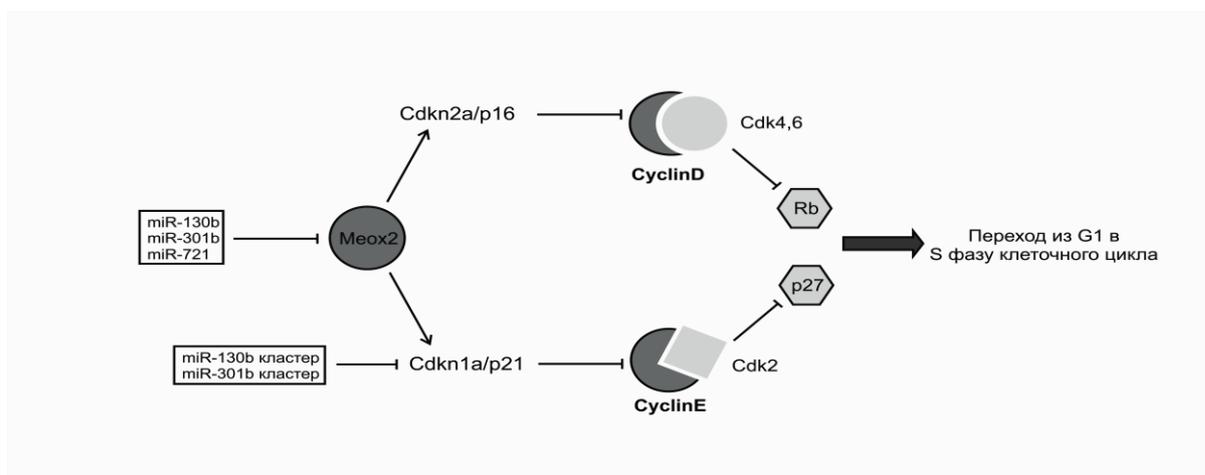


Рисунок 1.2.

Указанные изменения, в конечном счете, приводят к блоку G1/S клеточного цикла. Продемонстрирована связь между характерными для ЭСК транскрипционными факторами и микро – РНК. Так, установлено, что транскрипционные факторы Oct4, Sox2 и Nanog увеличивают экспрессию специфических для иПСК микро РНК: кластеры miRNA -290 (miR-290, miR-291a, miR-291b, miR-292, miR-293, miR-294, and miR-295) и miRNA -302–367 miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d и miR-367.

Таким образом, учитывая способности микро РНК регулировать клеточный цикл, индуцировать образование плюрипотентных стволовых клеток, регуляция их дифференцировки представляется весьма перспективным для нужд регенеративной медицины.

Приведенные данные свидетельствуют, что клеточная терапия представляет собой новый подход к восстановлению функции поврежденных тканей. При этом в настоящее время актуальным является получение стволовых клеток из таких

источников, которые позволяли бы получить достаточное их количество для эффективной терапии. Важным является обеспечение безопасности проведения данной трансплантации. Используемые в современной практической медицине аллогенные трансплантации костного мозга сопряжены с серьезным осложнением – реакцией «трансплантат против хозяина». Клетки, выделенные из фетальных тканей, характеризуются иммунологической незрелостью, что снижает вероятность развития иммунологических конфликтов. В этом отношении обращает на себя возможность выделения стволовых клеток из гемопозитического органа - плаценты.

Исследования, проведенные в последние годы, свидетельствуют о возможности выделения из ткани зрелой плаценты мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопозитических стволовых клеток. ММСК, обладая выраженными иммуносупрессивными свойствами при совместном введении с ГСК могут обеспечить защиту введенных клеток от иммунной системы реципиента. Способность ММСК вырабатывать факторы, обеспечивающие направленную миграцию ГСК, повышающие их жизнеспособность, а также возможность формировать микроокружение для ГСК может обеспечить лучшее приживание трансплантата. Проведение сочетанной трансплантации ММСК и ГСК для активации регенерации тканей представляется возможным путем использования меньших доз ГСК.

При старении процессы регенерации протекают на ином, отличном от зрелого организма уровне. С возрастом происходит прогрессирующее снижение количества и качества стволовых клеток. Использование заместительной клеточной терапии могло бы способствовать восстановлению регенерации тканей.

В литературе отсутствуют работы, посвященные совместному использованию сочетанной трансплантации ММСК и ГСК для активации регенерации быстрообновляющихся тканей в физиологических условиях, а также в условиях воздействия экстремальных факторов с учетом возрастной инволюции организма.

## ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Общая характеристика лабораторных животных, использованных в исследованиях

Экспериментальные исследования выполнены на 162 зрелых лабораторных мышах-самцах возраста 3-4 месяца, массой 25-30 г и 108 старых мышах-самцах возраста 20-22 месяца, массой 35 – 40 г. Эксперименты по получению культуры ММСК и ГСК выполнены на 58 лабораторных животных мышах-самках возраста 3–4 месяца, массой 25-30 г, при сроке гестации 14 дней. Животные содержались в стандартных условиях лабораторного вивария, предусмотренных «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и Приказом МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983 «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения». Манипуляции с экспериментальными животными выполнялись в соответствии с положениями Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, методическими рекомендациями по выведению из опыта и эвтаназии.

Количество экспериментальных животных и распределение их по сериям экспериментов представлены в таблицах 2.1. и 2.2.

А) Изучение влияния сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на регенерацию быстрообновляющихся тканей зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях, а также после воздействия ионизирующего излучения.

Изучалось воздействие ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр (мощность поглощенной дозы 20 сГр/мин) на лабораторных животных зрелого и старого возраста. Старые и зрелые лабораторные животные были разделены на две группы соответственно. В каждой группе были выделены опытная и контрольная подгруппы. Животным опытной подгруппы внутривенно вводились ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн. клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг,

суспендированные в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Контрольной подгруппе вводили 0,9 % раствор NaCl – 0,2 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после облучения однократно в указанных выше дозах. Контрольную группу составили животные, не подвергшиеся облучению. Забой животных осуществлялся на 1 и 7 сутки после облучения (таблица 2.1).

Таблица 2.1

## Распределение животных по сериям экспериментов

Доза ИИ	Животные	Препарат	Путь введения	Доза препарата	Время проведения аутопсии органов	
					24 часа	7 сутки
0 Гр	зрелые	ММСК и ГСК	в/в	6 млн. кл./кг и 330 тыс.кл./кг	9 шт.	9 шт.
		ММСК и ГСК	в/в	6 млн. кл./кг и 300 тыс.кл./кг	-	9 шт.
		ММСК и ГСК	в/в	6 млн. кл./кг и 250 тыс.кл./кг	-	9 шт.
		0,9 % р-р NaCl	в/в	0,2 мл	9 шт.	9 шт.
	старые	ММСК и ГСК	в/в	6 млн. кл./кг и 330 тыс.кл./кг	9 шт.	9 шт.
		0,9 % р-р NaCl	в/в	0,2 мл	9 шт.	9 шт.
4,0 Гр	зрелые	ММСК и ГСК	в/в	6 млн. кл./кг и 330 тыс.кл./кг	9 шт.	9 шт.
		ММСК и ГСК	в/в	6 млн. кл./кг и 300 тыс.кл./кг	-	9 шт.
		ММСК и ГСК	в/в	6 млн. кл./кг и 250 тыс.кл./кг	-	9 шт.
		0,9 % р-р NaCl	в/в	0,2 мл	9 шт.	9 шт.
	старые	ММСК и ГСК	в/в	6 млн. кл./кг и 330 тыс.кл./кг	9 шт.	9 шт.
		0,9 % р-р NaCl	в/в	0,2 мл	9 шт.	9 шт.

Б) Изучение влияния сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на регенерацию быстрообновляющихся тканей зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях, а также после острой кровопотери.

Массивную кровопотерю вызывали кровопусканием из хвостовой вены мыши в объеме 2 % от массы тела, что составляет 25 – 35 % от объема циркулирующей крови. В зависимости от возраста животные были разделены на 2 группы (старые и зрелые). Внутри каждой группы было выделено две подгруппы (опытная и контрольная) по 9 животных в каждой. Животным опытной подгруппы внутривенно вводились ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн. клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг, суспендированные в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Контрольной подгруппе вводили 0,9 % раствор NaCl – 0,2 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после кровопускания однократно в указанных выше дозах (таблица 2.2).

Таблица 2.2

## Распределение животных по сериям экспериментов

Условия	Животные	Препарат	Путь введения	Доза препарата	Время проведения аутопсии органов
					5 сутки
Физиологические условия	зрелые	ММСК и ГСК	в/в	6 млн. кл./кг и 330 тыс.кл./кг	9 шт.
		0,9 % р-р NaCl	в/в	0,2 мл	9 шт.
	старые	ММСК и ГСК	в/в	6 млн. кл./кг и 330 тыс.кл./кг	9 шт.
		0,9 % р-р NaCl	в/в	0,2 мл	9 шт.
Острая кровопотеря	зрелые	ММСК и ГСК	в/в	6 млн. кл./кг и 330 тыс.кл./кг	9 шт.
		ММСК и ГСК	в/в	6 млн. кл./кг и 300 тыс.кл./кг	9 шт.
		ММСК и ГСК	в/в	6 млн. кл./кг и 250 тыс.кл./кг	9 шт.
		0,9 % р-р NaCl	в/в	0,2 мл	9 шт.
	старые	ММСК и ГСК	в/в	6 млн. кл./кг и 330 тыс.кл./кг	9 шт.
		0,9 % р-р NaCl	в/в	0,2 мл	9 шт.

В) Влияние различных доз ГСК при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных в физиологических условиях и в условиях воздействия экстремальных факторов.

Было изучено влияние ГСК в дозах 250 тыс. клеток/кг, 300 тыс. клеток/кг, 330 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК в дозе 6 млн.кл./кг. Клетки перед сочетанной трансплантацией были суспендированы в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после воздействия экстремального фактора (таблицы 2.1 и 2.2).

## **2.2. Экспериментальное планирование беременности**

С целью определения фертильного периода у лабораторных мышей был проведен анализ фаз эстрального цикла. Для этого были получены влагалищные мазки лабораторных мышей.

Методика изготовления влагалищных мазков лабораторных мышей.

Влагалищные смывы лабораторных мышей были получены с помощью глазной пипетки. Влагалищные смывы были помещены на предметное стекло, где и был изготовлен мазок.

В эстральном цикле лабораторных мышей выделено 4 фазы: проэструс, эструс, метаэструс, диэструс. Каждая фаза характеризуется типичной цитологической картиной.

В фазу проэструс влагалищный мазок состоит почти исключительно из эпителиальных клеток, имеющих крупное ядро и расположенных поодиночке или небольшими группами. Одиночные клетки имеют овальную форму, а расположенные группами – многоугольную форму. Лейкоциты в мазке отсутствуют.

В фазу эструс влагалищный мазок состоит из ороговевших безъядерных клеток, имеющих вид чешуек. Лейкоциты и эпителиальные клетки с ядрами в мазке отсутствуют. Именно в эту фазу самка мыши фертильна. В фазу эструс самку подсаживали к самцам в соотношении 1:3. Мазки у подсаженной самки были взяты на следующий день и, в том случае, если в мазке были обнаружены сперматозоиды (фазово-контрастная микроскопия), то данное лабораторное животное было отсажено в отдельную клетку и этот день условно принимали за первый день беременности.

В фазу метаэструс во влагалищном мазке содержится незначительное количество ороговевших чешуек и много лейкоцитов.

Фаза диэструс характеризуется наличием во влагалищном мазке большого количества слизи, лейкоцитов и небольшим числом эпителиальных клеток с ядрами.

Окраска влагалищных мазков осуществлялась по методу Леффлера.

Изучение препарата проводилось с использованием микроскопа Micros MC 300 (x100, x400).

### **2.3. Выделение мононуклеарной фракции клеток из плодной части плаценты**

1. Забой лабораторных животных мышей – самок в сроке беременности 14 дней осуществляли методом цервикальной дислокации.

2. Стерилизация лабораторных мышей в 30° спирте проводилась в течение 5 минут. Для получения 30° спирта 1000 объемов 95 % спирта было разведено в 2239 объемах дистиллированной воды.

3. Оперативным путем была вскрыта передняя брюшная стенка с последующим вскрытием полости матки. Произведено отделение плаценты от полости матки.

4. Материнская часть плаценты (децидуальная оболочка) и амниотическая оболочка были удалены оперативным способом.

5. С целью удаления крови плодная часть плаценты (хорион) была промыта в Первичном растворе.

Состав Первичного раствора: стерильный фосфатный буфер pH 7,2 - Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; StemCell Technologies, Канада), содержащем раствор пенициллина 50 ед/мл, стрептомицина 50 мкг/мл (StemCell Technologies, Канада), 2 % FBS (Fetal Bovine Serum; StemCell Technologies, Канада).

6. Хорион плаценты был помещен в чашку Петри диаметром 10 см с находящимся в ней раствором аккутазы (8,5 мл; Millipore, США). Механическое измельчение ткани осуществлялось маленькими ножницами.

7. Полученная суспензия была инкубирована на шейкере при медленном покачивании в течение 7 минут при температуре 37 °С. Раствор аккутазы обеспечивает разрушение межклеточных контактов, не повреждая при этом мембрану клеток.

8. С целью удаления дебриса суспензия клеток была профильтрована через фильтры с размером пор 70 мкм (Millipore, США).

9. Для отмывки клеток от раствора аккутазы было проведено центрифугирование при 300 g в течение 10 минут в стерильном фосфатном буфере pH 7,2 (DPBS; StemCell Technologies, Канада).

10. После удаления супернатанта осадок был ресуспендирован в 6 мл DPBS.

11. Суспензия клеток была нанесена на раствор лимфолайт-М (StemCell Technologies, Канада) в соотношении 1:1 и центрифугирована при 1000g в течение 20 минут.

12. С целью отмывки клеток от лимфолайта-М было проведено центрифугирование при 300 g в течение 10 минут в двойном объеме стерильного фосфатного буфера pH 7,2 (StemCell Technologies, США).

13. Клетки были ресуспендированы в специализированной среде для культивирования ММСК.

14. Количество выделенных клеток было подсчитано в камере Горяева.

15. Нулевой пассаж (первичная культура клеток) осуществляли в чашки Петри диаметром 10 см (площадью 78,5 см<sup>2</sup>) в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток на 1 см<sup>2</sup>.

## 2.4. Культивирование и субкультивирование ММСК

Культивирование ММСК проводилось в условиях CO<sub>2</sub> – инкубатора (Termo Scientific) при температуре 37 °С с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90 % [47, 50]. Через 24 часа инкубации нулевого пассажа не прикрепленные к пластику (дну чашки Петри) клетки смывали стерильным Dulbecco's phosphate buffered saline (StemCell Technologies, Канада) и добавляли специализированную среду для культивирования ММСК (рис. 2.1). Замена среды в объеме ½ от первоначального производилась каждые 3 – 4 суток до достижения клетками 70 – 80 % конfluence. При формировании соответствующего монослоя осуществлялся пересев клеток. Для этого после удаления специализированной среды к клеткам был добавлен раствор аккутазы. Данный раствор позволяет разрушить межклеточные контакты и отделить клетки от дна чашки Петри, не нарушая при этом целостность мембраны клетки. В дальнейшем, клетки были суспендированы в специализированной среде для культивирования ММСК и подсчитаны в камере Горяева. Минимальное количество клеток, снимаемых после нулевого пассажа –  $1,0 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>.

Таким образом, в первичной культуре выход смешанной популяции клеток, содержащей помимо ММСК также и гемопоэтические клетки, составляет 1 % от содержания клеток при нулевом пассаже.

Первый, а в дальнейшем (после формирования 70 – 80 % монослоя) второй и третий пассажи клеток осуществлялись в чашки Петри в концентрации  $1,0 \times 10^4$  клеток на 1 см<sup>2</sup>.

Для трансплантации лабораторным животным были использованы клетки третьего пассажа (рис. 2.1, 2.2, 2.3, 2.4). Минимальное количество клеток, снимаемых после третьего пассажа –  $2,0 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>.

Состав специализированной среды для культивирования ММСК:

MesenCult MSC Basal Medium Mouse («StemCell Technologies», Канада) и MesenCult™ Proliferation Supplements Mouse («StemCell Technologies», Канада) в соотношении 4 : 1. Также в состав данной среды входило 2 ммоль раствора L-

глутамин («StemCell Technologies», Канада) и антибиотики – пенициллин 50 ед./мл и стрептомицин 50 мкг/мл («StemCellTechnologies», Канада).

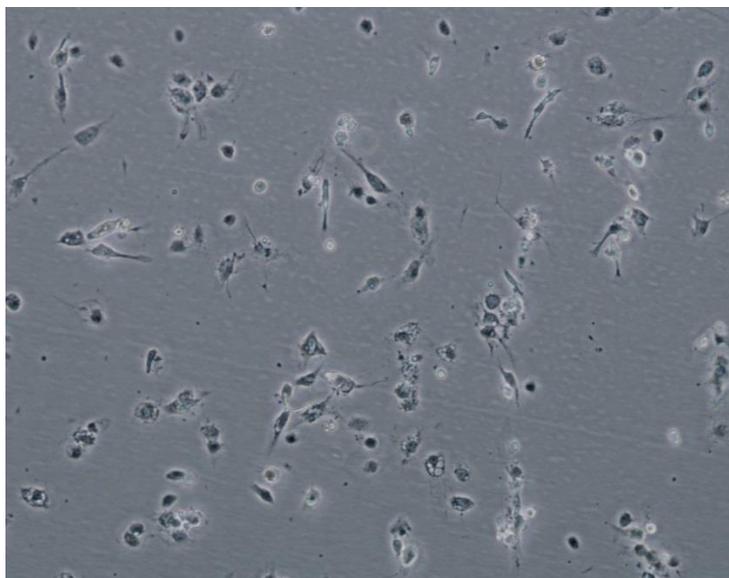


Рисунок 2.1. Нулевой пассаж культивирования, 1 сутки (ув. x200).

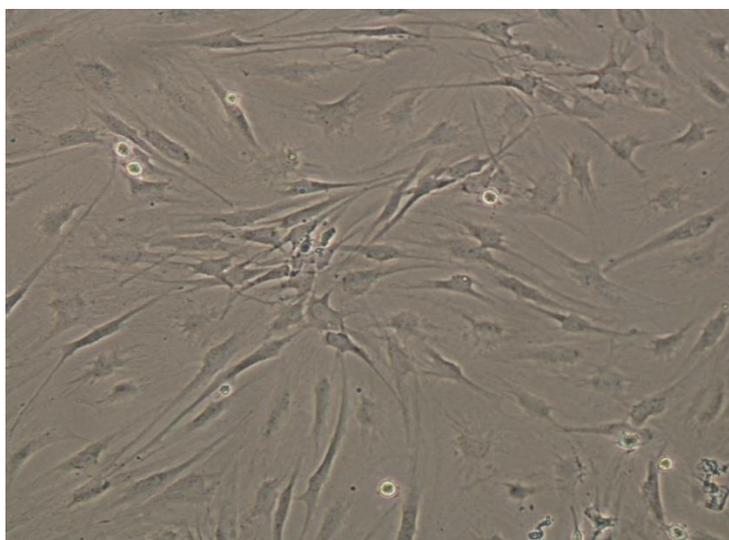


Рисунок 2.2. ММСК третьего пассажа культивирования, 7 сутки (ув. x200).

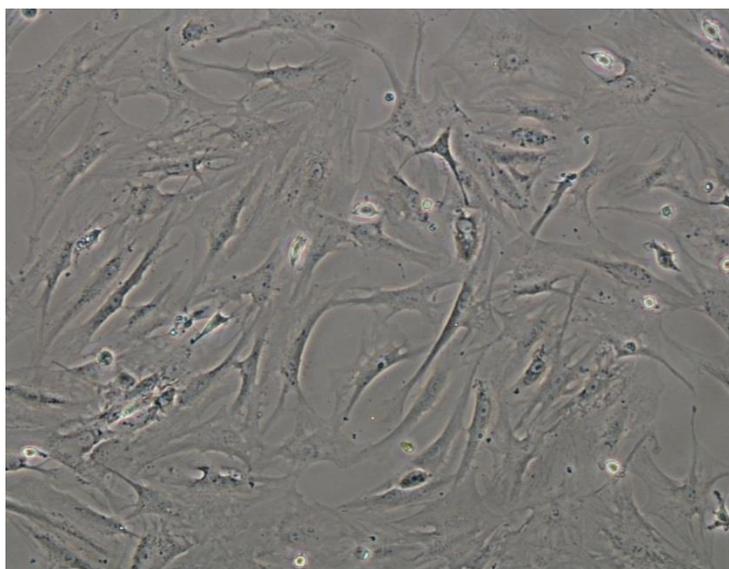


Рисунок 2.3. ММСК третьего пассажа культивирования, 14 сутки (ув. x200)

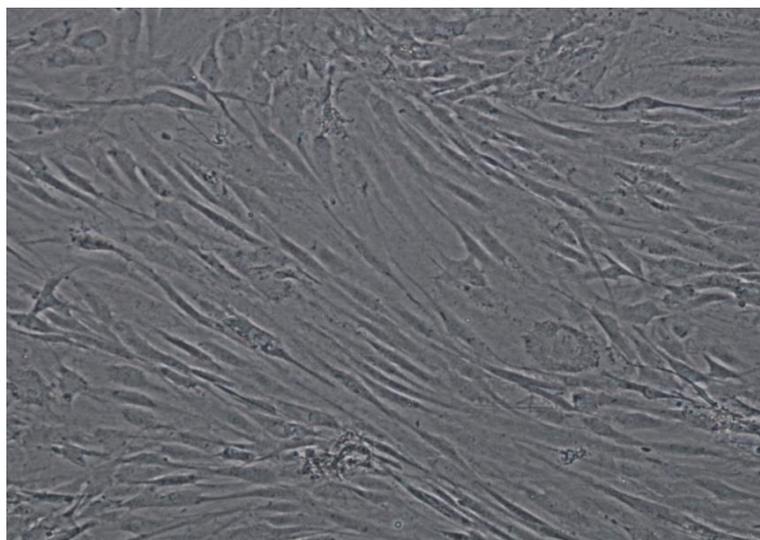


Рисунок 2.4. ММСК третьего пассажа культивирования, 21 сутки (ув. x200)

## **2.5. Идентификация ММСК**

### **2.5.1. Дифференцировка в остеогенном направлении**

Дифференцировка ММСК в остеогенном направлении включала следующую последовательность действий:

1. ММСК третьего пассажа были высеяны в 6 – камерные планшеты (площадь лунки 9,6 см<sup>2</sup>; «Nunc», Германия) в концентрации  $1,0 \times 10^5$  клеток на лунку в специализированную среду для культивирования ММСК (состав указан выше).

2. Культивирование продолжалось до достижения 70-80% конфлюэнтности.
3. Аспирация специализированной среды для культивирования ММСК и замена ее на раствор, индуцирующий дифференцировку ММСК в остеогенном направлении.

Приготовление раствора, индуцирующего дифференцировку ММСК в остеогенном направлении: 10 мл среды, содержащей стимуляторы остеогенной дифференцировки - MesenCult™ Osteogenic Stimulatory Supplement («StemCell Technologies», Канада) добавляли к 40 мл основного раствора - MesenCult™ MSC Basal Medium (Mouse) («StemCell Technologies», Канада). К полученному раствору также было добавлено 0,5 мл (200 ммоль) раствора L-глутамин («StemCell Technologies», Канада). Таким образом, конечная концентрация L-глутамин составляла 2 ммоль.

4. Культивирование продолжалось в течение 2 недель с заменой среды каждые трое суток.

Факт остеогенной дифференцировки подтвержден гистохимическим методом регистрации увеличения экспрессии щелочной фосфатазы, а также с помощью окраски von Kossa, выявляющей наличие минерализованного фосфата кальция.

### **Окраска на щелочную фосфатазу**

Клетки трехкратно промывали 1xPBS и фиксировали 4%-ным раствором формальдегида (Sigma, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Фиксированные клетки промывали PBS три раза по 5 мин, после чего окрашивали на щелочную фосфатазу смесью BCIP-NBT (5-бром-4-хлор-индолил фосфат, тетразолевый синий) (Sigma, США) в течение 20-40 мин в темноте при комнатной температуре. Окрашенные препараты 3-4 раза промывали дистиллированной водой и высушивали (рисунок 2.5).

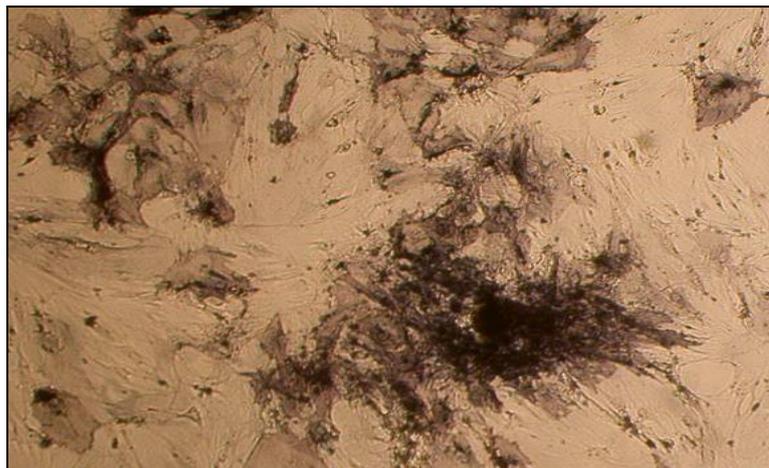


Рисунок 2.5. ММСК третьего пассажа, подвергнутые остеогенной дифференцировке. Окраска на щелочную фосфатазу. (ув. х 200).

### Реакция von Kossa

ММСК фиксировали в метаноле 2 мин при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . В течение 1 ч проводили окраску 2%-ным раствором нитрата серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) (Вектон, Россия) под 60W лампой. Окрашенные клетки быстро промывали дистиллированной водой и на 5 мин помещали в 2,5%-ный раствор тиосульфата натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ). Окрашенные клетки повторно промывали дистиллированной водой и высушивали (рисунок 2.6). Данная окраска позволяет выявлять нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве.

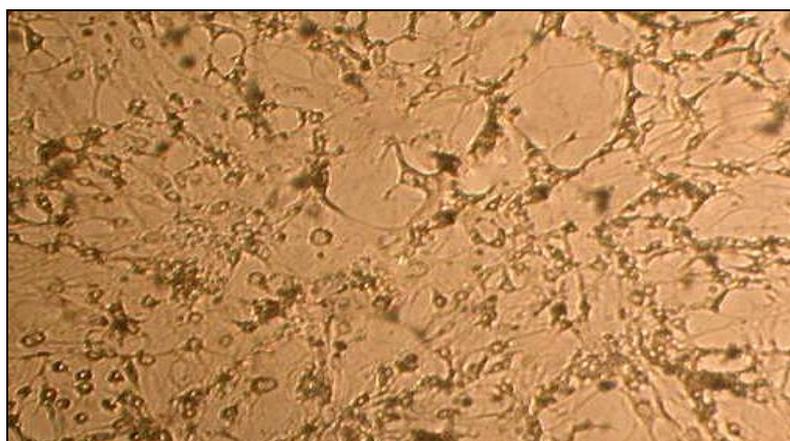


Рисунок 2.6. Определяются нерастворимые соли кальция в культуре ММСК третьего пассажа, после остеогенной дифференцировки.

Реакция von Kossa (ув. х 200).

### 2.5.2. Дифференцировка в адипоцитарном направлении

Дифференцировка ММСК в адипоцитарном направлении включала следующую последовательность действий:

1. ММСК третьего пассажа были высеяны в 6 – камерные планшеты («Nunc», Германия) в концентрации  $1 \cdot 10^5$  клеток на лунку в специализированную среду для культивирования ММСК (состав указан выше).

2. Культивирование продолжалось до достижения 70-80 % конfluence.

3. Аспирация специализированной среды для культивирования ММСК и замена ее на раствор, индуцирующий дифференцировку ММСК в адипоцитарном направлении.

Приготовление раствора, индуцирующего дифференцировку ММСК в адипоцитарном направлении: 10 мл среды, содержащей стимуляторы адипоцитарной дифференцировки - MesenCult™ Adipogenic Stimulatory Supplement («StemCell Technologies», Канада) добавляли к 40 мл основного раствора - MesenCult™ MSC Basal Medium (Mouse) («StemCell Technologies», Канада). К полученному раствору также было добавлено 0,5 мл 200 ммоль раствора L-глутамин («StemCell Technologies», Канада). Таким образом, конечная концентрация L-глутамин составляла 2 ммоль.

4. Культивирование продолжалось в течение 2 недель с заменой среды каждые трое суток.

Факт адипоцитарной дифференцировки подтвержден гистохимическим методом регистрации нейтральных липидных вакуолей, окрашивающихся красителем Oil Red O («Sigma», США).

#### **Окраска жировым красным (Oil Red O)**

1. Рабочий раствор Oil Red O приготовлен следующим образом: используя изопропанол был получен 0,5% раствор Oil Red O (Sigma, США) с последующим добавлением дистиллированной воды в соотношении 3:2.

2. Полученный раствор был профильтрован через фильтры 0,2 мкм.

3. Культура клеток была фиксирована в метаноле в течение 2 минут.

6. Фиксированные клетки промывали 50%-ным этанолом и окрашивали раствором жирогового красного в течение 10 мин.

7. Окрашенные клетки промывали 50%-ным этанолом (рисунок 2.7).

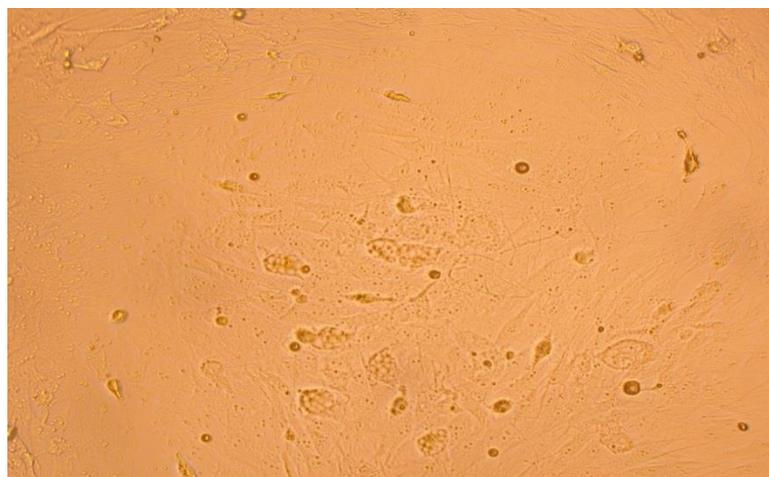


Рисунок 2.7. ММСК третьего пассажа, подвергнутые адипоцитарной дифференцировке. Окраска с использованием Oil Red O. (ув. x200).

### **2.5.3. Идентификация ММСК иммуноцитохимическим методом**

Идентификация ММСК иммуноцитохимическим методом проводилась с использованием набора - MILLIPORE®'s Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit. MILLIPORE®'s Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit содержит панель позитивных и негативных маркеров, характеризующих популяцию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Позитивные маркеры включают антитела, направленные против антигенов, расположенных на поверхности клеток – интегрин- $\beta 1$ , CD 54, а также антитела к молекулам внеклеточного матрикса, формирующихся в культуре ММСК – фибронектину и коллагену I типа. К негативным маркерам для мезенхимальных стволовых клеток относятся специфичные антигены гемопоэтических клеток - CD 14 и CD45.

Протокол действий по определению ММСК иммуноцитохимическим методом:

1. ММСК третьего пассажа были высеяны в 8 – камерные планшеты («Nunc», Германия) в концентрации  $1 \times 10^5$  с использованием специализированной среды

для культивирования ММСК (состав см. выше). Культивирование продолжалось до достижения 70-80 % конfluenceности.

2. Питательная среда, в которой культивировались ММСК была аспирирована.

3. Культуру клеток фиксировали, используя 4% раствор формальдегида в течение 5-10 минут при комнатной температуре.

4. Осторожно аспирировали 4% раствор формальдегида и промывали три раза по 5-10 минут фосфатным буфером (pH 7,4).

5. Был добавлен блокирующий раствор к клеткам не менее, чем на 2 часа при комнатной температуре или на 12 - 16 часов при 4°C. Блокирующих растворов было 2 разновидности: блокирующий раствор и непроницающий блокирующий раствор.

Состав блокирующего раствора: 5% нормальная ослиная сыворотка с 0,3% раствора TritonX-100 в фосфатном буфере. Данный раствор был добавлен в лунки к клеткам, где в дальнейшем будет определяться наличие фибронектина, коллагена I типа и интегрин- $\beta 1$ .

Состав непроницающего блокирующего раствора: 5% нормальная ослиная сыворотка в фосфатном буфере. Данный раствор был добавлен в лунки к клеткам, где в дальнейшем будет определяться наличие следующих кластеров дифференцировки: CD54, CD45 и CD14.

6. Рабочая концентрация первичных антител была приготовлена путем разведения:

а) кроличьи антитела к интегрину- $\beta 1$  (20 мкл): 1/500.

б) мышьиные антитела к CD 54 (100 мкл): 1/100.

в) кроличьи антитела к коллагену I типа (исходно содержание антител в 20 мкл - 20 мкг): 1/500 – итоговая концентрация антител - 2 нг/мкл.

г) кроличьи антитела к фибронектину (исходно содержание антител в 10 мкл – 10 мкг): 1/1500 - итоговая концентрация антител 0,66 нг/мкл.

д) мышинные антитела к CD 14 (исходно содержание антител в 10 мкл - 10 мкг): 1/1000 - используемая при иммуноцитохимическом исследовании концентрация антител 1 нг/мкл.

е) мышинные антитела к CD 45 (исходно содержание антител в 100 мкл - 100 мкг): 1/100 - используемая при иммуноцитохимическом исследовании концентрация антител 10 нг/мкл.

7. С целью исключения неспецифического связывания были проведены исследования с IgG мыши и IgG кролика. Для этого в лунки, которые служат контролем, были добавлены PBS и указанные IgG в количествах, соответствующих объемам фосфатного буфера и первичных антител в опытных лунках.

8. Инкубирование клеток с антителами в течение 12 - 16 часов при 4 °С.

9. С целью удаления несвязанных антител к клеточным культурам был добавлен фосфатный буфер (500 мкл) и, в последующем, аспирирован через 5-10 минут. Эту процедура была повторена четыре раза.

10. В качестве вторичных антител были использованы меченные флюорохромом Cy3 ослиные антитела к IgG мыши и IgG кролика (Millipore, США). Указанные вторичные антитела были предварительно разведены в фосфатном буфере в соотношении 1:250.

11. После добавления соответствующих вторичных антител к первичным антителам инкубирование продолжалось в течение 2 часов в темной комнате.

12. С целью удаления несвязанных антител к клеточным культурам добавлен фосфатный буфер (500 мкл) и, в последующем, аспирирован через 5-10 минут. Эту процедура была повторена четыре раза.

13. Визуализация ядер клеток обеспечивается применением раствора DAPI / Antifade solution (Millipore, США).

14. С целью удаления избытка флюорохрома DAPI добавлен фосфатный буфер (500 мкл) и, в последующем, аспирирован через 5-10 минут. Эта процедура была повторена четыре раза.

15. Визуализация клеток с использованием флуоресцентного микроскопа.

Проведенные исследования с использованием набора антител позволили доказать принадлежность полученной культуры к ММСК.

## **2.6. Морфологический анализ культур клеток**

Культуры клеток исследовали на инвертированном микроскопе (UNICO, США) с использованием цифровой фотокамеры Cam V400 (Vision, Австрия).

## **2.7. Выделение ГСК методом позитивной иммуномагнитной сепарации**

### **2.7.1. Методика SCA-1 позитивной иммуномагнитной сепарации:**

1. Полученная первичная клеточная суспензия суспендирована в рекомендованном растворе в концентрации 100 млн. клеток в 1 мл буфера для иммуномагнитной сепарации (StemCell Technologies, Канада). Состав рекомендованного раствора: фосфатный буфер без ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (pH 7,4), 2% фетальной бычьей сыворотки (FBS) с 1ммоль ЭДТА.

2. Клетки помещены в пробирку 5 мл из полистирена.

3. Добавлены первичные биотинилированные антитела – SCA-1 PE Labeling Reagent (StemCell Technologies, Канада) в концентрации 50 мкл на 1 мл клеточной суспензии. Суспензия была пипетирована и, в дальнейшем, инкубирована при комнатной температуре в течение 15 минут.

4. Добавлены вторичные антитела – Easy Sep PE Selection Cocktail (StemCell Technologies, Канада) в концентрации 70 мкл на 1 мл клеточной суспензии, способные специфически связываться с биотином первичных антител. Суспензия была пипетирована и, в дальнейшем, инкубирована при комнатной температуре в течение 15 минут.

5. Добавлены покрытые декстраном наночастицы железа (StemCell Technologies, США) в концентрации 50 мкл на 1 мл клеточной суспензии, способные связываться с вторичными антителами. Суспензия была пипетирована и, в дальнейшем, инкубирована при комнатной температуре в течение 10 минут.

6. Клеточная суспензия была доведена до объема 2,5 мл с использованием буфера для иммуномагнитной сепарации. После проведенного пипетирования данная пробирка была помещена в магнит (StemCell Technologies, Канада). Время инкубации в магните составило 5 минут.

7. Перевернув магнит с находящейся в нем пробиркой и, удерживая его в таком положении 2-3 секунды, была удалена из пробирки SCA-1 отрицательная фракция клеток.

8. Поставив магнит и вынув из него пробирку, повторно было добавлено в нее 2,5 мл буфера для иммуномагнитной сепарации. После проведенного пипетирования данная пробирка была помещена в магнит. Время инкубации в магните составило 5 минут.

9. Этапы позитивной иммуномагнитной сепарации № 6 и № 7 были повторены дважды.

Выделенная, таким образом, фракция клеток, положительная по маркеру гемопоэтических стволовых SCA-1 была подвергнута дальнейшим исследованиям.

### **2.7.2. Методика CD 117 позитивной иммуномагнитной сепарации**

1. Полученная первичная клеточная суспензия суспендирована в рекомендованном растворе в концентрации 100 млн. клеток в 1 мл буфера для иммуномагнитной сепарации (StemCell Technologies, Канада). Состав рекомендованного раствора: Фосфатный буфер без ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (pH 7,4), 2% Фетальной бычьей сыворотки (FBS) с 1ммоль ЭДТА.

2. Клетки помещены в пробирку 5 мл из полистирена.

3. Добавлены первичные биотинилированные антитела – CD 117 PE Labeling Reagent (StemCell Technologies, Канада) в концентрации 50 мкл на 1 мл клеточной суспензии. Суспензия была пипетирована и, в дальнейшем, инкубирована при комнатной температуре в течение 15 минут.

4. Добавлены вторичные антитела – Easy Sep PE Selection Cocktail (StemCell Technologies, Канада) в концентрации 70 мкл на 1 мл клеточной суспензии, способные специфически связываться с биотином первичных антител. Суспензия

была пипетирована и, в дальнейшем, инкубирована при комнатной температуре в течение 15 минут.

5. Добавлены покрытые декстраном наночастицы железа (StemCell Technologies, США) в концентрации 50 мкл на 1 мл клеточной суспензии, способные связываться с вторичными антителами. Суспензия была пипетирована и, в дальнейшем, инкубирована при комнатной температуре в течение 10 минут.

6. Клеточная суспензия была доведена до объема 2,5 мл с использованием буфера для иммуномагнитной сепарации. После проведенного пипетирования данная пробирка была помещена в магнит (StemCell Technologies, США). Время инкубации в магните составило 5 минут.

7. Перевернув магнит с находящейся в нем пробиркой и, удерживая его в таком положении 2-3 секунды, была удалена из пробирки CD 117 отрицательная фракция клеток.

8. Поставив магнит и вынув из него пробирку, повторно было добавлено в нее 2,5 мл буфера для иммуномагнитной сепарации. После проведенного пипетирования данная пробирка была помещена в магнит. Время инкубации в магните составило 5 минут.

9. Этапы прямой иммуномагнитной сепарации № 6 и № 7 были повторены дважды.

Выделенная, таким образом, фракция клеток, положительная по маркеру гемопоэтических стволовых клеток CD 117 была подвергнута дальнейшим исследованиям.

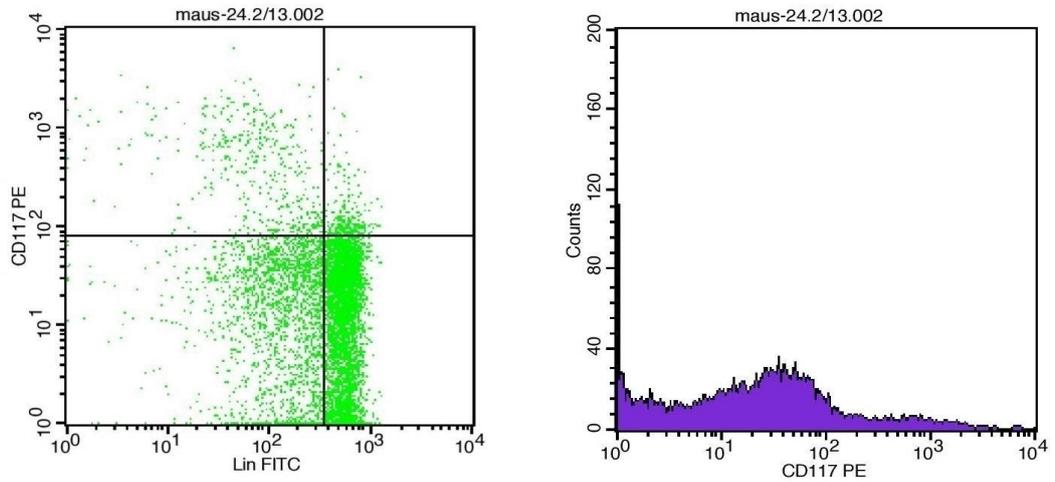
## **2.8. Иммунофенотипирование ГСК**

Иммунофенотипирование суспензии ГСК было проведено методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами (Becton Dickinson, США). Во фракции трансплантируемых клеток оценивалось содержание ГСК с иммунофенотипом положительных по CD117+ (рисунок 2.7, рисунок 2.8), Sca-1+ (рисунок 2.9, рисунок 2.10) и отрицательных по Lin- на проточном цитометре BD FACS Calibur.

В качестве изотипического контроля для первичных антител, использованных в наборе на позитивную иммуномагнитную сепарацию по SCA-1 и CD117, были использованы антитела PE labeled Rat IgG2a, kappa isotype control (Becton Dickinson, США). С целью определения Lin- антигенов на поверхности клеток (до и после иммуномагнитной сепарации) был использован набор антител – FITC anti-mouse Lineage Cocktail with isotype control (Biolegend, США). Указанный набор позволяет оценить содержание клеток с антигенами, характерными для лимфоцитов (С3е), гранулоцитов (Ly-6G), макрофагов (M1/70), а также экспрессию общего лейкоцитарного антигена (CD45) и выраженность антигена, характерного для эритроцитов (Ter-119).

Проведенные исследования позволили установить, что содержание клеток после иммуномагнитной сепарации с иммунофенотипом CD117+, Sca-1+, Lin- составило 70-93%. Жизнеспособность клеток, определенная с использованием трипанового синего составила 95-97 %.

## Содержание CD117+ клеток до иммуномагнитной сепарации



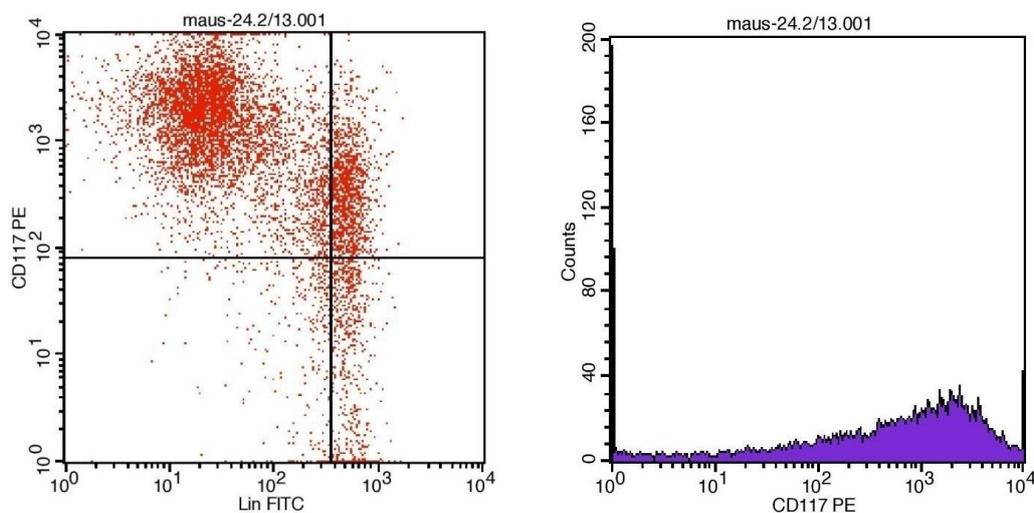
Sample ID: maus-24.2/13  
 Tube: kontrol  
 Gate: G2  
 Gated Events: 7466  
 Total Events: 10000  
 X Parameter: Lin FITC (Log)  
 Y Parameter: CD117 PE (Log)  
 Quad Location: 343, 79

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	435	5.83	4.35
UR	241	3.23	2.41
LL	2036	27.27	20.36
LR	4754	63.68	47.54

Рис. 2.7. Результаты проточной цитофлуориметрии.

Количество CD117+ и Lin- клеток в суспензии до позитивной иммуномагнитной сепарации по антигену CD117.

## Содержание CD117+ клеток после иммуномагнитной сепарации

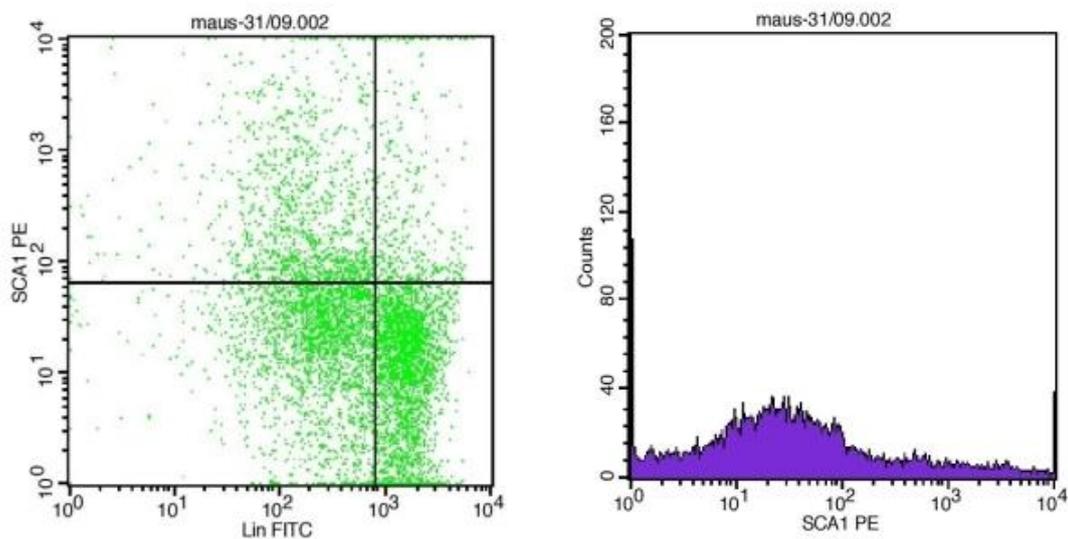


Sample ID: maus-24.2/13  
 Tube: opit  
 Gate: G1  
 Gated Events: 7463  
 Total Events: 10000  
 X Parameter: Lin FITC (Log)  
 Y Parameter: CD117 PE (Log)  
 Quad Location: 343, 79

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	5226	70.03	52.26
UR	1225	16.41	12.25
LL	319	4.27	3.19
LR	693	9.29	6.93

Рис. 2.8. Результаты проточной цитофлуориметрии.  
 Количество CD117+ и Lin- клеток в суспензии после позитивной  
 иммуномагнитной сепарации по антигену CD117.

### Содержание SCA-1 клеток до иммуномагнитной сепарации



Sample ID: maus-31/09  
 Tube: kontrol  
 Gate: G2  
 Gated Events: 6411  
 Total Events: 10000  
 X Parameter: Lin FITC (Log)  
 Y Parameter: SCA1 PE (Log)  
 Quad Location: 799, 63

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1217	18.98	12.17
UR	342	5.33	3.42
LL	2315	36.11	23.15
LR	2537	39.57	25.37

Рис. 2.9. Результаты проточной цитофлуориметрии.

Количество SCA-1 + и Lin- клеток в суспензии до положительной иммуномагнитной сепарации по антигену SCA-1.

### Содержание SCA-1 клеток после иммуномагнитной сепарации

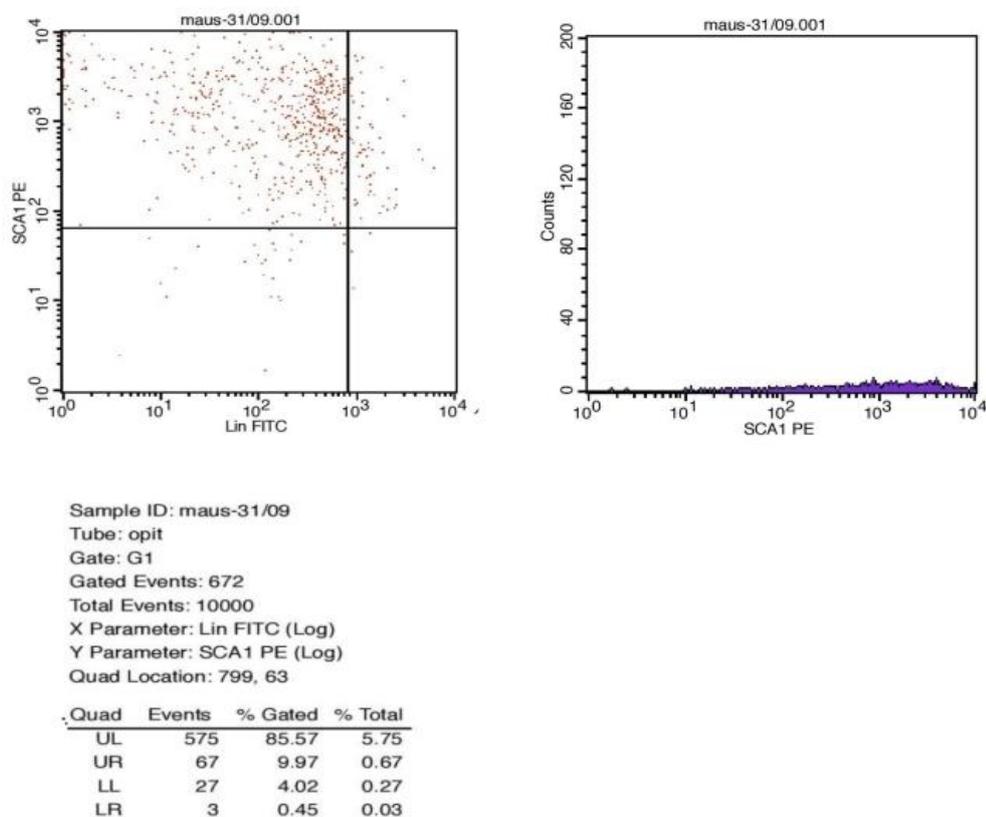


Рис. 2.10. Результаты проточной цитофлуориметрии.

Количество SCA-1 + и Lin- клеток в суспензии после позитивной иммуномагнитной сепарации по антигену SCA-1.

### 2.9. Подсчет и определение жизнеспособности клеток

Методика подсчета клеток:

1. Суспензия клеток была тщательно перемешана, после чего, 20 мкл этой суспензии было перенесено в отдельную пробирку.

2. Было проведено разведение 1/20: 20 мкл клеточной суспензии было добавлено к 380 мкл 3% уксусной кислоты с метиленовым синим («StemCell Technologies», Канада). При этом 3% уксусная кислота разрушает цитоплазматическую мембрану клетки, оставляя ядро клетки интактным. Краситель метиленовый синий, в свою

очередь, облегчает визуализацию ядер.

3. Суспензия клеток хорошо перемешана.

4. Подсчет клеток в камере Горяева был проведен по следующей формуле:

$$X=A * 50 * 10^{3(1)} \dots\dots\dots (1)$$

где:

A – число клеток в 100 больших квадратах камеры Горяева;

X- число клеток в 1 мл.

Жизнеспособность клеток была определена с помощью суправитальной окраски раствором трипанового синего. Использование трипанового синего позволяет обнаружить мертвые и поврежденные клетки, в то время как жизнеспособные клетки данным раствором не окрашиваются.

Методика определения жизнеспособности клеток с помощью трипанового синего:

1. Суспензия клеток была тщательно перемешана, после чего, 100 мкл этой суспензии было перенесено в отдельную пробирку.

2. 100 мкл 0,2 % раствор трипанового синего («StemCell Technologies», Канада) было добавлено к суспензии клеток (соотношение 1:1).

3. Суспензия клеток была хорошо перемешана.

4. Инкубирование клеток с трипановым синим было проведено при комнатной температуре в течение 10 минут. Так как инкубирование более 15 минут приводит к реализации токсического эффекта трипанового синего на клетки, что выражается в повреждении цитоплазматической мембраны клетки и последующему прокрашиванию всех клеток трипановым синим.

5. Подсчет клеток в 5 больших квадратах камеры Горяева (или  $\geq 100$  клеток). При этом мертвые клетки в связи с нарушением целостности цитоплазматической мембраны прокрашиваются синим цветом. Жизнеспособные клетки не прокрашиваются трипановым синим.

Содержание жизнеспособных клеток определялось по формуле:

Жизнеспособные клетки, % = Количество клеток без трипанового синего \* 100 % / Общее количество подсчитанных клеток (прокрашенных и не прокрашенных трипановым синим). Жизнеспособность выделенных клеток перед трансплантацией составляла 95 – 97 %.

### 2.10. Тест колониобразования

С целью определения функциональной способности клеток (с фенотипом Sca1+, CD 117+, Lin-), выделенных из плаценты лабораторных животных с помощью позитивной иммуномагнитной сепарации был проведен стандартный тест колониобразования. Данный тест позволяет установить способность полученных клеток формировать различные типы гемопоэтических колоний.

Настоящая методика включала следующие этапы:

1. Популяция клеток, выделенная с помощью позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам SCA1 и CD117 была помещены в раствор DMEM с содержанием 2% раствора FBS.

2. Произведен подсчет выделенных клеток в гемоцитометре.

3. В нагретую до комнатной температуры среду MethoCult (StemCell Technologies, Канада) были внесены клетки (100 мкл суспензии на 1 мл MethoCult) и тщательно перемешаны на шейкере.

4. В 100 мкл суспензии содержалось от 500 до 2000 клеток.

Состав среды MethoCult:

- Метилцеллюлоза (содержание – 1 %) в Iscove'sMDM.
- Фетальная бычья сыворотка – 15 %
- Бычий сывороточный альбумин – 1 %
- Инсулин – 10 мкг/мл
- Человеческий трансферрин – 200 мкг/мл
- 2-меркаптоэтанол –  $10^{-4}$  М
- Фактор стволовой клетки 50 нг/мл
- Ил 3 - 10 нг/мл

- Ил 6 - 10 нг/мл
- Эритропоэтин – 3 Ед/мл
- L-глутамин - 2 мМ

5. В течение 5 минут клетки оставляли при комнатной температуре до исчезновения пузырьков.

6. Полученную суспензию аккуратно без пузырьков разливали в лунки 24-луночного планшета («Sarstedt», Германия) в количестве 0,6 мл/лунку.

7. Планшет ставили на 2 недели в CO<sub>2</sub> инкубатор.

8. Образование колоний было зарегистрировано под инвертированным микроскопом.

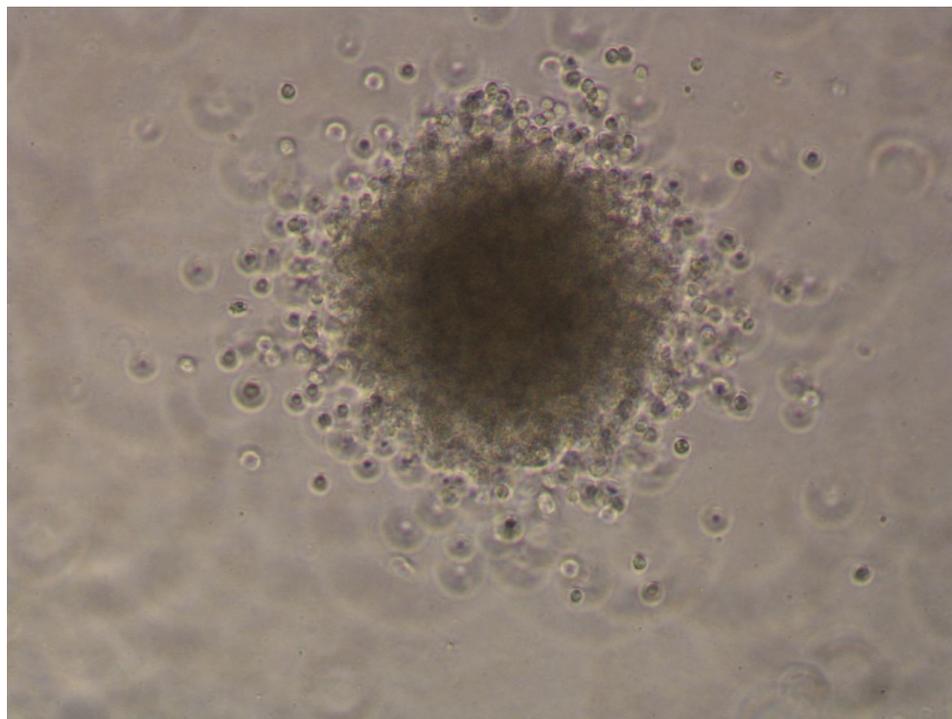


Рисунок 2.11. Колониеобразование в метилцеллюлозной среде, 14-е сутки культивирования. КОЕ- М. Микрофотография ув. x 100.



Рисунок 2.12. Колониеобразование в метилцеллюлозной среде, 14-е сутки культивирования. КОЕ- ГМ. Микрофотография ув. x100.

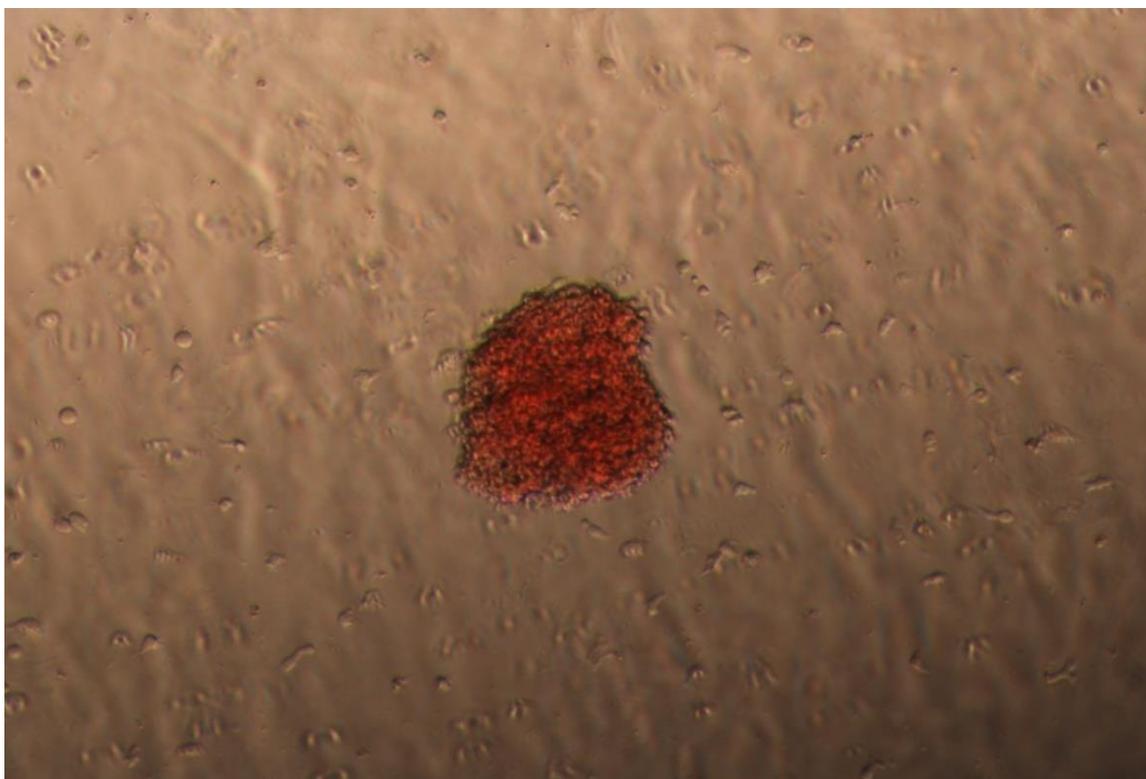


Рисунок 2.13. Колониеобразование в метилцеллюлозной среде, 14-е сутки культивирования. БОЕ- Е. Микрофотография ув. x100.

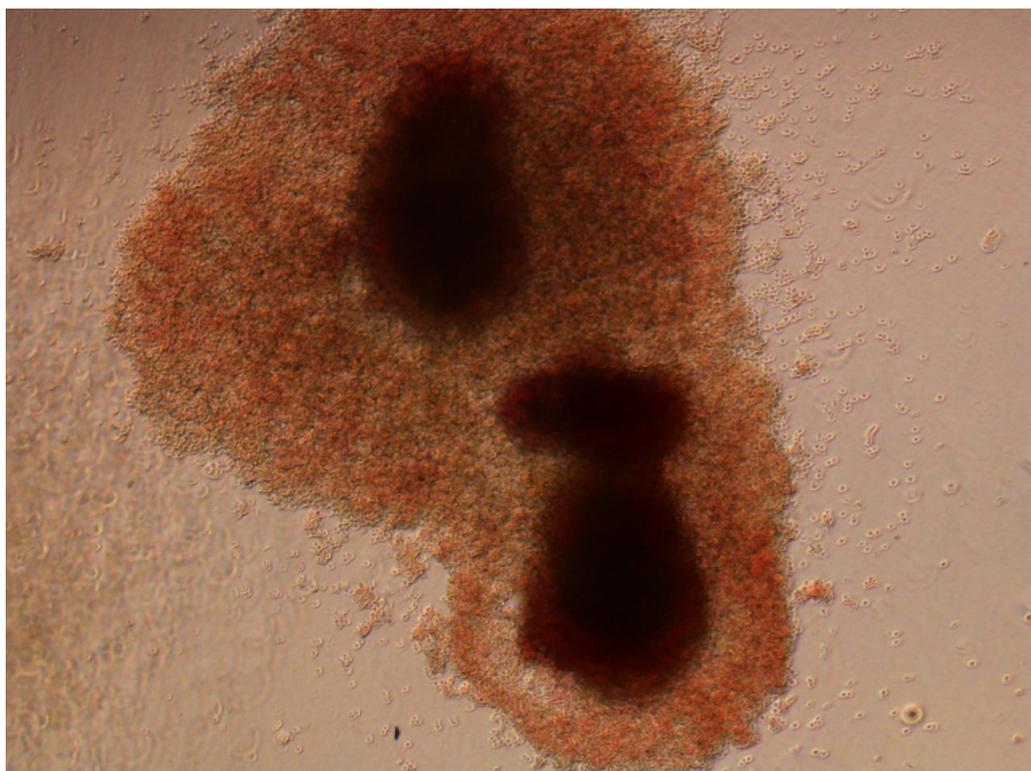


Рисунок 2.14. Колониеобразование в метилцеллюлозной среде, 14-е сутки культивирования. КОЕ- ГЭММ (два центра).  
Микрофотография ув. x100.

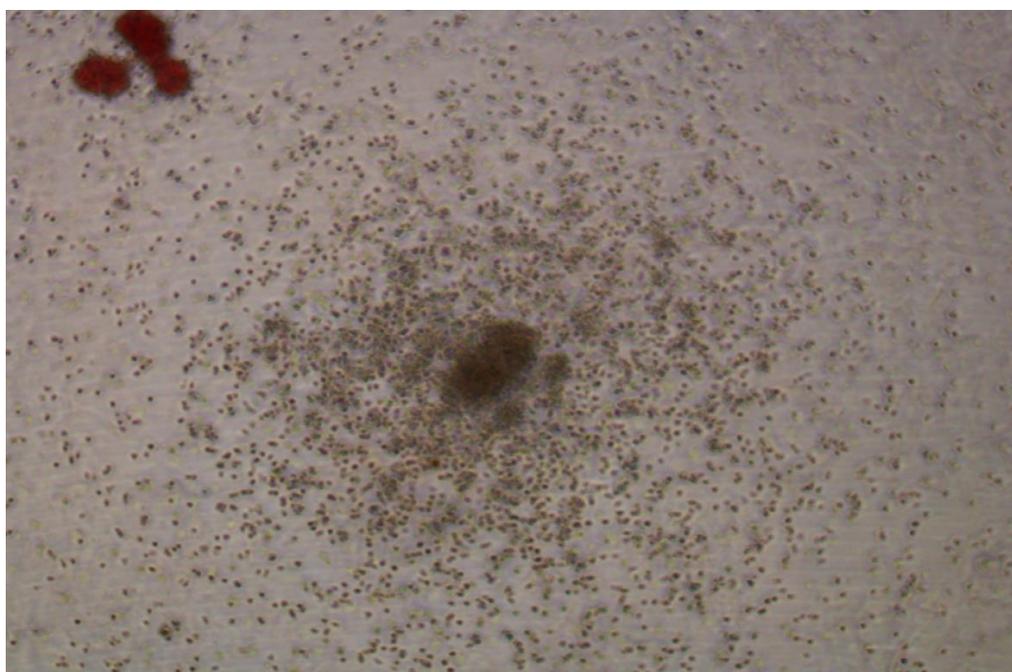


Рисунок 2.15. Колониеобразование в метилцеллюлозной среде, 14-е сутки культивирования. Два типа колоний: БОЕ-Е, КОЕ- ГМ (в центре).  
Микрофотография ув. x100.

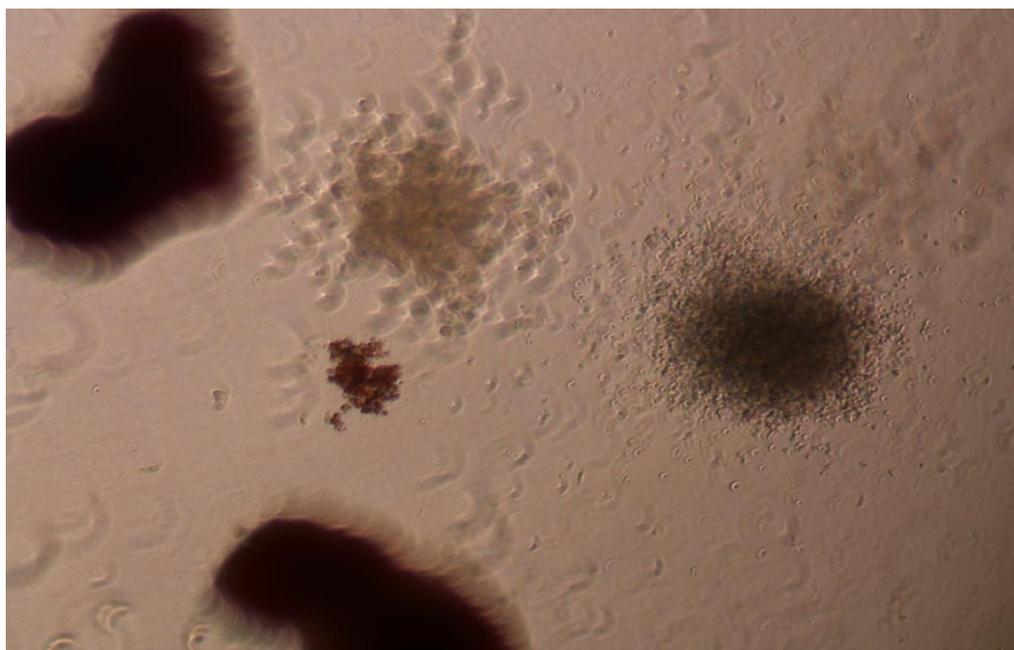


Рисунок 2.16. Колониеобразование в метилцеллюлозной среде, 14-е сутки культивирования. Три типа колоний: 2 БОЕ-Е (большие), 1 (маленькая в центре) БОЕ-Е, КОЕ-М (в центре), КОЕ- ГМ (справа).  
Микрофотография ув. x100.

### 2.11. Облучение лабораторных животных на гамма-терапевтической установке

В данном эксперименте облучение животных проводилось на гамма – терапевтическая установке типа АГАТ – С с радионуклидным источником  $Co - 60$  типа ГИК –8 – 4.

Радионуклид  $Co - 60$  на основе, которого изготовлен источник ионизирующего излучения имеет следующие радиационно – физические характеристики:

- период полураспада  $T_{1/2} = 5,2709$  года
- энергия гамма квантов:  $E_{\gamma_1} = 1, 25$ МэВ (100 %).

Схема эксперимента и расчет поглощенных доз.

В настоящем эксперименте мыши располагались в фиксирующем их передвижение «домике». Облучение животных производилось по отдельности.

Соответствующая схема эксперимента приведена на рис. 2.17.

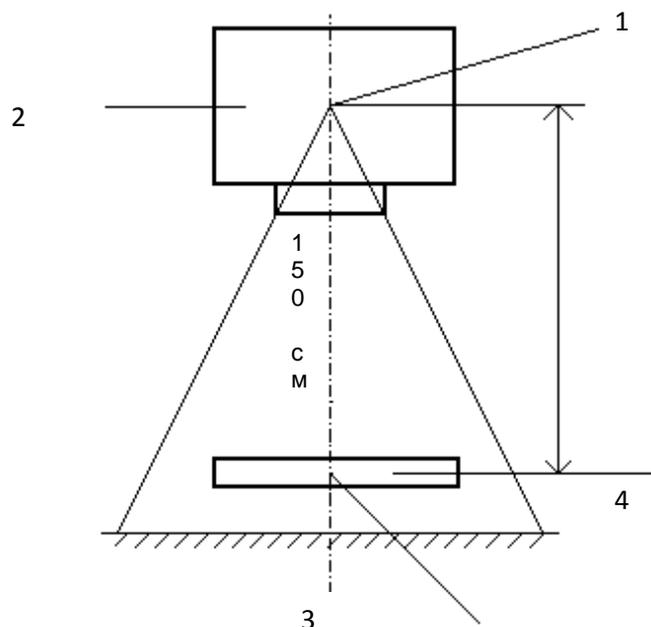


Рис. 2.17. Схема облучения подопытных мышей на гамма – терапевтической установке типа АГАТ – С.

1. Источник.
2. Радиационная головка.
3. Детектор.
4. Экспериментальное животное

Расчет поглощенной дозы в месте расположения животного проводился на основании проведенной дозиметрии с помощью клинического дозиметра UNIDOS и ионизационной камеры (детектор) типа Farmer, стандартно применяемых в медицинской радиологии. Ионизационная камера располагалась на уровне  $\frac{1}{2}$  высоты мыши, с камеры информация считывается на дозиметр UNIDOS, сеанс облучения останавливался при наборе необходимой дозы. Расстояние источник – мышь было выбрано достаточно большим (150 см). Это расстояние определялось для создания меньшего градиента поглощенной дозы в месте расположения мыши.

Так как облучение производилось с одного прямо падающего поля облучения, то в связи с законом ослабления излучения с расстоянием (интенсивность излучения обратно пропорциональна квадрату расстояния от источника излучения  $I \sim 1/R^2$ ) и рассеянием в тканях мыши с глубиной, ожидаемо, что на верхней части мыши (спинка) и на нижней части (брюшко) поглощенные дозы будут отличаться. Учитывая большое расстояние источник –

мышь и небольшую длину животного оцененная разность «верхней» и «нижней» поглощенной дозы составляет менее 1%.

Также существует погрешность измерительной аппаратуры – она составляет 3%.

## **2.12. Методы исследования кроветворной ткани**

### **2.12.1. Морфологическое исследование крови и костного мозга**

Кровь для исследования брали у мышей из хвостовой вены.

Подсчет количества лейкоцитов проводили в счетной камере Горяева.

При определении числа ретикулоцитов их подсчитывали в окрашенных бриллиант – крезил – блау мазках крови на 2000 эритроцитов.

Мазки периферической крови окрашивали по Романовскому. Подсчет лейкоцитарной формулы проводили на 200 клеток.

Для исследования морфологии костного мозга его извлекали из бедренной кости. Мазки костного мозга окрашивали по Паппенгейму.

Подсчет миелограммы производили на 1000 клеток.

Определяли общее количество миелокариоцитов в костном мозге бедренной кости [43].

Оценка пролиферативной активности элементов гранулоцитарного и эритроидного ростков производилась в цитологических мазках костного мозга при окраске по Паппенгейму. Пролиферативную активность эритроидного и гранулоцитарного ростков оценивали с помощью определения митотического индекса (МИ) соответствующих дифферонов. Подсчитывали элементы с четырьмя морфологически выделяемыми стадиями митоза встречаемых на 1000 клеток, полученный результат выражали в промилях.

$$\text{МИ} = \frac{\text{Количество митотически делящихся элементов изучаемого ростка}}{1000 \text{ подсчитанных клеток костного мозга}} * 1000 \% \dots\dots\dots (2)$$

Приготовление, окраска, микроскопия и подсчет микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей:

1. Забой животных осуществляли методом цервикальной дислокации, после чего извлекали бедренную кость.

2. Кожа над коленом задней конечности была собрана в складку, после чего производился надрез ножницами. Стянутую под коленом кожу и мышцы протыкали вблизи сустава одной браншей ножниц и, в дальнейшем разрезали их. Задние конечности были отделены от тела вместе с частью тазовых костей. Растягивая коленный сустав и осторожно вывертывая его, производилось вычленение дистальной части бедренной кости из коленного сустава. Скальпелем производилось удаление мягких тканей бедра. Вывертывая из вертлужной впадины тазобедренного сустава проксимальный конец, осуществлялось окончательное отделение бедренной кости. Марлевой салфеткой удалялись остатки мягких тканей, сгустки крови. 3. На обезжиренное оптическое стеклышко наносилась сыворотка АВ<sub>0</sub> (IV) группы крови человека.

4. Срезая эпифизы бедренной кости, производили открытие костномозгового канала. На проксимальный конец бедренной кости натягивали резиновую трубочку (длина 15 см), другой конец которой сообщался с резиновой грушей. Резкое сжатие груши приводило к выбросу костного мозга из костномозгового канала на оптическое стеклышко.

5. Далее стеклянной палочкой, круговыми движениями готовили суспензию клеток костного мозга, она должна быть определенной плотности - иметь беловатую опалесцирующую окраску.

6. После приготовления, каплю этой суспензии наносили на край обезжиренного предметного стекла. Распределение материала по стеклу осуществляли перемещением позади шлифованного стекла под углом 45°. Оптимальная длина мазка 2-3 см.

7. Мазок высушивался на воздухе в течение суток.

8. Окрашивание мазков по Паппенгейму (производилось на следующий день).

Микроскопия осуществлялась в проходящем свете под объективом с масляной иммерсией. Анализировались отдельно лежащие полихроматофильные эритроциты с микроядрами. МЯТ был рассчитан как отношение числа полихроматофильных эритроцитов с микроядрами к 1000 подсчитанных полихроматофильных эритроцитов, выраженное в промилле (Методические рекомендации по оценке мутагенной активности химических веществ микроядерным тестом, подготовлены Всесоюзным научно – исследовательским институтом дезинфекции и стерилизации Министерства здравоохранения СССР, Москва 1984).

Микроядра - в абсолютном большинстве случаев округлой формы, реже овальной или кольцевой. Расположены центрально или эксцентрично; представляют собой гомогенно окрашенные в красно-фиолетовый цвет - хроматиновые тельца. Не преломляют свет, размером не более  $\frac{1}{4}$  диаметра эритроцита. В одной клетке крайне редко встречаются два и более микроядер.

Число полихроматофильных эритроцитов с микроядрами  
 МЯТ =  $\frac{\text{-----}}{1000 \text{ полихроматофильных эритроцитов}} * 1000 \text{ ‰} \dots\dots\dots(3)$

Цитологические препараты костного мозга и периферической крови анализировались с помощью микроскопа Micros MC - 50 (Австрия) при увеличении 100 x 15.

### **2.12.2. Морфологическое исследование селезенки**

1. После цервикальной дислокации лабораторное животное было помещено на операционный столик, на правый бок, после чего левый бок был обработан спиртом.

2. В районе «талии» животного ножницами был сделан поперечный разрез кожи длиной 2–2,5 см слева от середины туловища, затем рассеченные ткани были раздвинуты пинцетом. При этом через тонкий мышечный слой проглядывается темно – бордовая селезенка.

3. Мышцы были рассечены и, в дальнейшем, пинцетом извлечена селезенка.

4. После удаления ножницами соединительнотканых тяжей селезенка была взвешена.

#### **2.12.2.1. Исследование клеточного состава селезенки**

1. Образец ткани селезенки с целью удаления крови был промыт в стерильном фосфатном буфере pH 7,2 - Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; StemCell Technologies, США).

2. Образец ткани селезенки был помещен в стерильную чашку Петри диаметром 6 см с 3,8 мл раствора Аккутазы (Millipore, США). Раствор аккутазы обеспечивает ферментативное разрушение межклеточных контактов не разрушая при этом мембрану клеток.

3. Ткань органа была измельчена с помощью маленьких ножниц.

4. Дополнительно мягким раздавливанием осуществлялась гомогенизация селезенки.

5. Полученная суспензия была инкубирована на шейкере при медленном покачивании в течение 7 минут при температуре 37<sup>0</sup>С.

6. С целью удаления дебриса суспензия клеток была профильтрована через фильтры на 70 мкм (Millipore, США).

7. Для выделения моноклеарной фракции настоящая суспензия была нанесена на раствор лимфолайт-М (StemCell Technologies, США) в соотношении 1:1 и центрифугирована при 1000g в течение 20 минут.

8. С целью отмывки клеток от лимфолайта-М проведено центрифугирование при 300 g в течение 10 минут.

9. Количество выделенных клеток было подсчитано в камере Горяева и был сделан перерасчет на общую клеточность селезенки.

10. Из полученного осадка были изготовлены мазки на предметном стекле, аналогично мазку крови.

11. Мазок был высушен.

12. Окраска проводилась по методу Паппенгейма. Использование данного метода окраски позволяет наиболее четко дифференцировать структуру ядер и зернистость лейкоцитов.

13. Морфологическое исследование было проведено при увеличении  $\times 1000$  с использованием масляной иммерсии, подсчитывая в 1000 клеток процент клеток разных рядов кроветворения.

#### **2.12.2.2. Определение основных морфометрических показателей селезенки**

Для проведения гистологического исследования селезенки материал был фиксирован в 10% нейтральном формалине. Заливку проводили в парафин и готовили срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрическое исследование проводили с использованием программы Biovision 4.0. Было исследовано не менее 3 срезов каждого органа, полученных с разного уровня тканевого блока.

Были определены следующие показатели: Площадь лимфоидного фолликула = Суммарная площадь лимфоидных фолликулов/количество лимфоидных фолликулов.

Площадь В-зоны лимфоидного фолликула = Суммарная площадь В-зоны лимфоидных фолликулов/количество лимфоидных фолликулов.

Площадь герминативного центра лимфоидного фолликула = Суммарная площадь герминативных центров лимфоидных фолликулов/количество лимфоидных фолликулов.

Площадь Т-зоны лимфоидного фолликула = Суммарная площадь Т-зоны лимфоидных фолликулов/количество лимфоидных фолликулов.

Расстояние между центрами фолликулов = сумма расстояний между ближайшими фолликулами / количество подсчитанных расстояний. Клеточность красной пульпы определялось как среднее содержание клеток в красной пульпе в  $0,01 \text{ мм}^2$ .

Для каждой мыши было проведено по 10 измерений в случайно выбранных срезах из разных отделов органа.

### **2.13. Методы оценки регенераторных процессов**

#### **в слизистой оболочке тощей кишки**

Для изучения обзорной гистологической картины и морфометрического анализа во всех сериях экспериментов для исследования производилась аутопсия тощей кишки.

Операция производилась под эфирным наркозом. По средней линии передней брюшной стенки производился разрез длиной 2-3 см, извлекались петли тонкой кишки. Резекции подвергалась верхняя треть тощей кишки.

Материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине. Заливку проводили в парафин и готовили срезы с соблюдением строгой ориентации ворсин и крипт толщиной 5 мкм.

Пролиферативная активность кишечного эпителия была определена путем подсчета пролиферативного индекса (ИП) с использованием набора первичных и вторичных антител на гистологических срезах продольной ориентации по идентификации белка Ki-67. Белок Ki-67 – надежный маркер пролиферативной активности клеток. Концентрация данного белка нарастает в ядре клетки начиная с  $G_1$  периода митотического цикла и достигает максимальных значений к митозу. Период распада Ki-67 составляет 1,5-2 часа. В клетках не пролиферирующих, находящихся в стадии  $G_0$  указанный белок не определяется.

Верификация пролиферативной активности эпителиоцитов по обнаружению белка Ki-67:

## 1. Депарафинизация тканевых срезов

1.1. Образец был погружен в ксилол 3 раза по 5 минут.

1.2. Образец был погружен в 95 % этиловый спирт 3 раза по 5 минут и 1 раз в 70% этиловый спирт на 5 минут.

1.3. Образец был погружен в PBS pH 7,2 (StemCell Technologies, Канада) однократно в течение 5 минут.

## 2. Предварительная подготовка препарата

2.1. Свежеприготовленный раствор в рабочей концентрации 50 мкг/мл Протеиназы К был добавлен к гистологическому препарату. Инкубирование Протеиназы К с гистологическим срезом составляла 15 минут при комнатной температуре. Раствор Протеиназы К в объеме 1,5 мкл (5 мг/мл) был разведен в 150 мкл PBS. Указанный объем рабочей концентрации фермента был нанесен на площадь гистологического препарата в 5 см<sup>2</sup>.

2.2. Гистологический препарат, располагая вертикально, был осторожно промыт раствором PBS. Раствор PBS при этом был направлен поверх гистологического среза.

2.3. Образец был погружен 2 раза в дистиллированную воду каждый раз на 2 минуты.

3. Гистологический препарат был инкубирован с 10% козьей сывороткой (Santa Cruz Biotech, США) в фосфатном буфере в течение 20 минут для исключения неспецифического связывания IgG.

4. Препарат был погружен в PBS на 2 минуты.

5. Инкубирование с первичными антителами в течение 60 минут.

Первичные антитела- Ki-67 (Santa Cruz Biotech, USA). Флакон содержит 200 мкг IgG в 1 мл PBS. Производителем рекомендовано использовать разведение данных антител в 50 – 500 раз в PBS с содержанием козьей сыворотки 1,5 % (Santa Cruz Biotech, USA). С целью получения рабочей концентрации первичных антител на 1 срез было израсходовано: 2 мкл Ki-67 в 96,5 мкл PBS с добавлением 1,5 мкл 100 % козьей сыворотки.

6. Гистологический препарат был погружен 3 раза по 5 минут в PBS.

7. Осторожно был удален избыток жидкости с гистологического препарата.
8. Инкубирование в темноте с вторичными антителами в течение 45 минут. Вторичные антитела - donkey anti-goat IgG-FITC (Santa Cruz Biotech, USA). Флакон содержит 200 мкг IgG. Производителем рекомендовано использовать разведение данных антител в 100-400 раз. С целью получения рабочей концентрации вторичных антител на 1 срез было израсходовано: 1 мкл donkey anti-goat IgG-FITC в 97,5 мкл PBS с добавлением 1,5 мкл 100 % ослиной сыворотки.
9. Гистологический препарат был погружен 3 раза по 5 минут в PBS.
10. Осторожно был удален избыток жидкости с гистологического препарата.
11. С целью визуализации ядер эпителиоцитов был добавлен краситель DAPI – 15 мкл.
12. Фиксация покровного стекла
13. Визуализация препарата.

Количество иммунопозитивных ядер эпителиоцитов к белку Ki-67  
 ИП =  $\frac{\text{-----}}{3000 \text{ подсчитанных эпителиоцитов}} * 100\% \text{ .....(4)}$

Для флуорохромов DAPI и FITC были использованы длины волн возбуждения соответственно 365 нм и 470 нм. Гистологические препараты тощей кишки анализировались с помощью флуоресцентного микроскопа Carl zeiss (Германия) при увеличении x 400.

Верификация выраженности апоптоза с использованием метода ApopTag® Peroxidase In Situ Oligo Ligation (ISOL).

Процесс апоптоза сопряжен с разрывами нитей ДНК. При этом эти разрывы не являются хаотичными, а характеризуются появлением в межнуклеосомных участках. И, что особенно важно, эти разрывы в обеих нитях происходят на одном и том же уровне либо есть единичное выступающее азотистое основание с 3'- конца цепочки молекулы ДНК. Использование методики ISOL для идентификации апоптоза позволяет четко дифференцировать клетки в гистологическом срезе находящиеся в состоянии запрограммированной гибели от клеток в некрозе.

Последние характеризуются хаотичными разрывами нитей ДНК. Верификация апоптоза при использовании метода ISOL начинается со специфического взаимодействия синтетических биотинилированных олигонуклеотидов как с одинаковыми разрывами ДНК (Oligo B), так и с выступающим азотистым основанием на 3'-конце цепочки молекулы ДНК (Oligo A).

Указанные взаимодействия идут в присутствии фермента ДНК – лигаза. После добавления конъюгата стрептавидин-пероксидаза происходит его связывание с олигонуклеотидами. Конечным этапом является добавление диаминобензидина – хромогенного субстрата пероксидазы, образующего коричневый преципитат, который хорошо визуализируется с помощью светлопольной микроскопии.

#### I. Депарафинизация тканевых срезов

1. Образец был погружен в ксилол 3 раза по 5 минут.
2. Образец был погружен в 95 % этиловый спирт 3 раза по 5 минут и 1 раз в 70% этиловый спирт на 5 минут.
3. Образец был погружен в PBS pH 7,2 (StemCell Technologies, Канада) однократно в течение 5 минут.

#### II. Инактивация эндогенной пероксидазы.

1. Образец был погружен в 3 % перекись водорода в PBS на 5 минут при комнатной температуре.
2. Гистологический препарат, располагая вертикально, был осторожно промыт раствором PBS. Раствор PBS при этом был направлен поверх гистологического среза.
3. Образец был погружен 2 раза в дистиллированную воду каждый раз на 2 минуты.

### III. Предварительная подготовка препарата

1. Свежеприготовленный раствор Протеиназы К в рабочей концентрации 50 мкг/мл был добавлен к гистологическому препарату. Инкубирование Протеиназы К с гистологическим срезом составляло 15 минут при комнатной температуре. Раствор Протеиназы К в объеме 1,5 мкл (5 мг/мл) был разведен в 150 мкл PBS. Указанный объем рабочей концентрации фермента был нанесен на площадь гистологического препарата в 5 см<sup>2</sup>.

2. Гистологический препарат, располагая вертикально, был осторожно промыт раствором PBS. Раствор PBS при этом был направлен поверх гистологического среза.

3. Образец был погружен 2 раза в дистиллированную воду каждый раз на 2 минуты.

### IV. Применение уравнивающего буфера - Equilibration Buffer.

1. Осторожно был удален избыток жидкости с гистологического препарата.

2. Сразу же был нанесен однократный Equilibration Buffer непосредственно на срез (60 мкл/5 см<sup>2</sup>). Инкубирование продолжалось не менее 10 секунд при комнатной температуре.

### V. Применение ДНК-лигазы совместно с Oligo-A и Oligo-B.

1. Осторожно был удален избыток жидкости с гистологического препарата.

2. Был приготовлен рабочий раствор ДНК-лигазы и нанесен на поверхность среза (60 мкл/5 см<sup>2</sup>).

Методика получения рабочего раствора ДНК лигазы:

2.1. К 54 мкл Oligo-A и Oligo-B добавить 6 мкл ДНК-лигазы до общего объема 60мкл.

2.2. Пипетируя полученную смесь необходимо вымыть из наконечника дозатора оставшуюся на его стенках ДНК-лигазу.

2.3. Тщательно перемешать полученный раствор (3 раза по 2 секунды). Пробирка с рабочим раствором ДНК-лигазы все время должна находиться во льду.

3. Инкубировать во влажной камере при температуре  $16^{\circ}$  -  $22^{\circ}$  C в течение 10 - 16 часов.

#### VI. Удаление несвязанных олигонуклеотидов.

1. Гистологический препарат, располагая вертикально, был осторожно промыт раствором PBS. Раствор PBS при этом был направлен поверх гистологического среза.

2. Образец был погружен 3 раза в дистиллированную воду каждый раз на 10 минут.

#### VII. Применение конъюгата Стрептавидин-пероксидазы.

1. Стрептавидин-пероксидаза была нанесена на гистологический препарат в количестве 50-60 мкл/5 см<sup>2</sup>.

2. Инкубирование во влажной камере 30 минут при комнатной температуре.

#### VIII. Удаление несвязанной Стрептавидин-пероксидазы.

1. Гистологический препарат, располагая вертикально, был осторожно промыт раствором PBS. Раствор PBS при этом был направлен поверх гистологического среза.

2. Образец был погружен 3 раза в PBS каждый раз на 5 минут.

#### IX. Окраска гистологического препарата субстратом пероксидазы.

1. Осторожно был удален избыток жидкости с гистологического препарата.

2. Был использован рабочий раствор субстрата пероксидазы (3,3 диаминобензидина) в количестве 75 – 100 мкл/5 см<sup>2</sup>.

#### Методика получения раствора 3,3 диаминобензидина в рабочей концентрации

Исходно в наборе 3,3 диаминобензидин представлен в 50X концентрации. Для приготовления однократного раствора субстрата пероксидазы следует использовать буфер разводящий раствор: 147 мкл соответствующего буфера добавить к 3 мкл 3,3 диаминобензидина. Полученного количества однократного раствора 3,3 диаминобензидина достаточно для обработки 2 гистологических препаратов площадью по 5 см<sup>2</sup>.

3. Инкубировать в течение 10 минут при комнатной температуре.

#### Х. Удаление несвязанного 3,3-диаминобензидина.

1. Гистологический препарат, располагая вертикально, был осторожно промыт раствором PBS. Раствор PBS при этом был направлен поверх гистологического среза.

2. Образец был погружен 2 раза в дистиллированную воду каждый раз на 2 минуты.

#### ХІ. Окраска ядер клеток гистологического препарата.

1. Гистологический срез был погружен в 0,5% раствор метиленового зеленого на 10 минут при комнатной температуре.

2. Промыть образец в дистиллированной воде 3 раза. При этом погружая образец в воду по 10 раз при первых двух промываниях. Во время третьего промывания не следует взбалтывать препарат в дистиллированной воде, а необходимо его там оставить на 30 секунд.

3. Промыть образец в бутаноле 100% 3 раза. При этом погружая образец в воду по 10 раз при первых двух промываниях. Во время третьего промывания не следует взбалтывать препарат в растворе бутанола, а необходимо его там оставить на 30 секунд.

#### ХІІ. Фиксация и анализ гистологического среза на предметном стекле.

1. Дегидратация препарата осуществлялась путем его помещения поочередно в 3 ванночки с ксилолом (время инкубации в каждой – 2 мин).

2. Осторожно был удален избыток жидкости с гистологического препарата.

3. Не давая образцу высохнуть, с использованием среды Biomount (BD Biosciences, США) покровное стекло было зафиксировано поверх гистологического среза.

4. Анализ препарата при световой микроскопии (рисунки 2.13, 2.14, 2.15, 2.16).

Уровень запрограммированной гибели эпителиоцитов был определен путем подсчета апоптотического индекса:

$$\text{АИ} = \frac{\text{Количество эпителиоцитов в состоянии апоптоза}}{3000 \text{ подсчитанных эпителиоцитов}} * 100\% \dots\dots\dots(5)$$

С целью получения достоверных данных о выраженности апоптоза в эпителии тощей кишки лабораторных животных были проведены отрицательные контроли:

1. Замена уравнивающего буфера на фосфатный буфер.
2. Рабочий раствор ДНК-лигазы был предварительно помещен в термостат на 20 минут при + 65 °С для разрушения данного фермента.
3. Проведение методики ISOL без использования стрептавидин-пероксидазы.

При использовании каждого из трех подходов в гистологических препаратах кишечника коричневый преципитат выявлен не был.

Среднюю клеточность в одной крипте определяли, как отношение общего числа подсчитанных криптальных эпителиоцитов к количеству анализированных крипт, выраженное в процентах.

Гистологические препараты тощей кишки анализировались с помощью микроскопа Micros MC – 50 (Австрия) при увеличении x400, x1000.

#### **2.14. Методы статистической обработки полученных результатов**

Для каждого ряда значений показателя вычисляли среднюю арифметическую, стандартную ошибку среднего. Достоверность отличий в сравниваемых выборках проведено по критерию Манна – Уитни (U). В некоторых случаях для вычисления статистической значимости полученных результатов использовался критерий хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17.0). Вероятность различий считалась достоверной при значениях  $p < 0,05$ .

Сравнение изучаемых показателей лабораторных животных, которым вводились препараты, проводилось с контролем и контрольной подгруппой. В качестве контроля были выбраны лабораторные животные, не подвергшиеся воздействию экстремального фактора и которым вводился физиологический раствор. Контрольной подгруппе соответствовали подопытные животные, подвергшиеся воздействию экстремального фактора. Животным контрольной подгруппы вводился физиологический раствор.

### **ГЛАВА 3.**

## **ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ГСК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ С ММСК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ МИЕЛОИДНОЙ ТКАНИ ЗРЕЛЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ И В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ**

С целью определения минимальной терапевтической дозы ГСК при проведении сочетанной трансплантации с ММСК изучалось воздействие ГСК в дозе 250 тыс. клеток/кг, 300 тыс. клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг. При этом эффективность трансплантируемых количеств ГСК оценивалась по изменению количества цитогенетически измененных клеток в костном мозге, а также по данным миелограммы и периферической крови. Действие сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в указанных выше дозах изучалось в физиологических условиях, после воздействия ионизирующего излучения, а также после острой кровопотери.

### **3.1. Влияние ГСК в количестве 250 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 7 сутки в физиологических условиях**

Для изучения влияния ГСК в количестве 250 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 7 сутки в физиологических условиях были проведены исследования на интактных животных (таблицы 3.1, 3.2, 3.3).

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости интактных лабораторных мышей,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро)
Миелокариоциты (общее число)		12,33±1,67
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,21±0,05
	промиелоциты	0,17±0,03
	миелоциты	0,24±0,04
	метамиелоциты	0,61±0,07
	палочкоядерные и сегментоядерные	5,10±0,59
Эозинофилы (всех генераций)		0,22±0,05
Все гранулоцитарные элементы		6,53±0,67
Эритробласты		0,03±0,01
Нормобласты	базофильные	0,52±0,08
	полихроматофильные	1,53±0,07
	оксифильные	0,09±0,03
Все эритроидные элементы		2,17±0,14
Лимфоциты		3,44±0,34
Прочие		0,37±0,06
Индекс созревания нейтрофилов		0,24±0,02
Индекс созревания эритронормобластов		0,75±0,02
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		3,03±0,41

Таблица 3.2

Показатели периферической крови интактных лабораторных мышей,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Ретикулоциты (Г/л)	Лейкоциты (общее содержание) (Г/л)	Гранулоциты (Г/л)	Лимфоциты (Г/л)	Моноциты (Г/л)
146,83±9,89	11,80±1,07	2,78±0,35	8,02±0,58	0,48±0,05

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани интактных лабораторных мышей,

$M \pm m, n = 9$

Параметры	Значения, ‰
Митотический индекс эритроидного дифферона	5,05±1,10
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	3,56±0,90
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	2,37±0,50

На 7 сутки после трансплантации ГСК в дозе 250 тыс. клеток/кг и ММСК у зрелых лабораторных животных в физиологических условиях отмечено отсутствие существенных изменений данных миелограммы (таблица 3.4) и периферической крови (таблица 3.5) относительно контроля.

При анализе содержания цитогенетически измененных клеток в костном мозге установлено, что изучаемый показатель соответствовал значению СУМ (таблица 3.6).

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (250 тыс. клеток/кг),  $M \pm m, n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро)
1		2
Миелокарициты (общее число)		12,97±0,87
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,19±0,04
	промиелоциты	0,14±0,08
	миелоциты	0,22±0,04
	метамиелоциты	0,63±0,02
	палочкоядерные и сегментоядерные	5,62±0,08
Эозинофилы (всех генераций)		0,16±0,04
Все гранулоцитарные элементы		6,97±0,66

Продолжение таблицы 3.4

1		2
Эритробласты		0,04±0,01
Нормобласты	базофильные	0,48±0,06
	полихроматофильные	1,48±0,12
	оксифильные	0,07±0,05
Все эритроидные элементы		2,07±0,18
Лимфоциты		3,59±0,04
Прочие		0,35±0,08
Индекс созревания нейтрофилов		0,22±0,04
Индекс созревания эритронормобластов		0,75±0,01

Таблица 3.5

Показатели периферической крови лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (250 тыс. клеток/кг),

$M \pm m, n = 9$

Ретикулоциты (Г/л)	Лейкоциты (общее содержание) (Г/л)	Гранулоциты (Г/л)	Лимфоциты (Г/л)	Моноциты (Г/л)
155,17±9,22	10,61±0,99	2,57±0,27	7,63±0,83	0,41±0,08

Таблица 3.6

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК

(250 тыс. клеток/кг),  $M \pm m, n = 9$

Параметры	Значения, ‰
Митотический индекс эритроидного дифферона	4,45±1,21
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	2,84±0,68
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	2,66±0,50

**3.2. Влияние ГСК в количестве 250 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения**

При анализе миелограммы зрелых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения в гранулоцитарном ростке установлено восстановление содержания миелобластов до значений нормы. Однако содержание других элементов данного ростка (промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов) оставалось сниженным. Общее содержание гранулоцитов в костном мозге было на 33,4 % меньше, чем в группе контроля. В то же время в эритроидном ростке выявлено сниженное содержание эритробластов, базофильных, полихроматофильных и оксифильных нормобластов. Отмечено угнетение эритропоэза – общее содержание эритроидных элементов было на 32,1 % меньше, чем в контроле (таблица 3.7).

Данные периферической крови дополняют изменения в миелоидной ткани: отмечено уменьшение содержания всех изучаемых показателей (таблица 3.8).

В костном мозге содержание цитогенетически измененных клеток оставалось значительно выше показателей СУМ (МЯТ:  $7,87 \pm 0,95$  %,  $p < 0,05$ ) (таблица 3.9).

Таблица 3.7

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),
1		2
Миелокариоциты (общее число)		$7,98 \pm 1,35^*$
Нейтрофильные клетки	миелобласты	$0,15 \pm 0,03$
	промиелоциты	$0,11 \pm 0,02^*$
	миелоциты	$0,15 \pm 0,03^*$
	метамиелоциты	$0,42 \pm 0,02^*$
	палочкоядерные и сегментоядерные	$3,40 \pm 0,06^*$

Продолжение таблицы 3.7

1		2
Эозинофилы (всех генераций)		0,14±0,02*
Все гранулоцитарные элементы		4,35±0,40*
Эритробласты		0,022±0,004*
Нормобласты	базофильные	0,30±0,07*
	полихроматофильные	1,15±0,04*
	оксифильные	0*
Все эритроидные элементы		1,48±0,08*
Лимфоциты		1,67±0,33*
Прочие		0,21±0,02*
Индекс созревания нейтрофилов		0,25±0,03
Индекс созревания эритронормобластов		0,78±0,03
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		2,95±0,21

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

Таблица 3.8.

Показатели периферической крови зрелых лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Ретикулоциты (Г/л)	Лейкоциты (общее содержание) (Г/л)	Гранулоциты (Г/л)	Лимфоциты (Г/л)	Моноциты (Г/л)
98,83±9,50*	7,47±1,20*	1,82±0,38*	5,80±0,67*	0,37±0,05*

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

Таблица 3.9

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани интактных лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, %
Митотический индекс эритроидного дифферона	3,98±0,48
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	2,81±0,39
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	7,87±0,95*

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

На 7 сутки после воздействия ИИ в костном мозге на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК (250 тыс. клеток/кг) отмечено восстановление до

значений нормы митотической активности клеток эритроидного и гранулоцитарного ростков. Также установлено восстановление до значений нормы количества миелобластов, однако остальные элементы данного ростка оставались существенно меньше нормы, что привело, в свою очередь, к низкой клеточности костного мозга (таблица 3.10).

При анализе содержания цитогенетически измененных клеток в костном мозге установлено отсутствие значимого эффекта от проведенной трансплантации ММСК и ГСК. При этом показатель МЯТ значительно превышал значения нормы (таблица 3.11).

Таблица 3.10

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (250 тыс. клеток/кг) после воздействия ИИ в дозе 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро)
Миелокариоциты (общее число)		8,00±0,76*
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,14±0,03
	промиелоциты	0,10±0,02*
	миелоциты	0,14±0,03*
	метамиелоциты	0,43±0,02*
	палочкоядерные и сегментоядерные	3,55±0,07*
Эозинофилы (всех генераций)		0,12±0,03*
Все гранулоцитарные элементы		4,48±0,52*
Эритробласты		0,025±0,002*
Нормобласты	базофильные	0,31±0,07*
	полихроматофильные	0,98±0,30*
	оксифильные	0
Все эритроидные элементы		1,31±0,27*
Лимфоциты		1,97±0,40*
Прочие		0,25±0,03*
Индекс созревания нейтрофилов		0,24±0,04
Индекс созревания эритронормобластов		0,68±0,17

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

Таблица 3.11

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (250 тыс. клеток/кг) после воздействия ИИ в дозе 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰
Митотический индекс эритроидного дифферона	4,30±0,75
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	3,15±0,59
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	7,20±1,17*

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При изучении данных периферической крови выявлено низкое содержание ретикулоцитов и лейкоцитов по сравнению с контролем. При этом обнаруженные изменения соответствовали данным полученным при анализе клеточного состава костного мозга (таблица 3.12).

Таблица 3.12

Показатели периферической крови лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (250 тыс. клеток/кг) после воздействия ИИ в дозе 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Ретикулоциты (Г/л)	Лейкоциты (общее содержание) (Г/л)	Гранулоциты (Г/л)	Лимфоциты (Г/л)	Моноциты (Г/л)
96,17±6,83*	7,89±0,55*	1,87±0,33*	5,67±0,76*	0,36±0,07*

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

### **3.3. Влияние ГСК в количестве 250 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери**

Со стороны миелоидной ткани костного мозга и периферической крови отмечается типичная реакция на данное экстремальное воздействие.

При анализе миелограммы в эритроидном диффероне отмечено существенное увеличение эритробластов (+45,2%,  $p < 0,05$ ), базофильных (+35,2%,  $p < 0,05$ ), полихроматофильных нормобластов (+44,6%,  $p < 0,05$ ) по сравнению с

контролем. Выявленные изменения нашли свое отражение в увеличении общего содержания эритроидных элементов в костном мозге (+ 42,7%).

При анализе миелограммы в гранулоцитарном диффероне установлено достоверное уменьшение содержания элементов изучаемого ростка относительно контроля: миелоцитов ( $0,15 \pm 0,03$  млн. клеток/бедро, - 26,9%,  $p < 0,05$ ) и метамиелоцитов ( $0,43 \pm 0,05$  млн. клеток/бедро, -31,2%,  $p < 0,05$ ), палочкоядерных и сегментоядерных форм лейкоцитов ( $4,57 \pm 0,39$  млн. клеток/бедро, -20,4%,  $p < 0,05$ ). Указанные изменения привели к уменьшению общего содержания гранулоцитарных элементов на 20,8 % по сравнению с контролем. Таким образом, следует отметить, что к 5 суткам после острой кровопотери не произошло восстановления содержания гранулоцитов в миелоидной ткани (таблица 3.13).

Таблица 3.13

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости лабораторных мышей на 5 сутки после острой кровопотери,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),
Миелокарициты (общее число)		$12,90 \pm 0,40$
Нейтрофильные клетки	миелобласты	$0,17 \pm 0,03$
	промиелоциты	$0,13 \pm 0,03$
	миелоциты	$0,15 \pm 0,03^*$
	метамиелоциты	$0,43 \pm 0,05^*$
	палочкоядерные и сегментоядерные	$4,57 \pm 0,39^*$
Эозинофилы (всех генераций)		$0,15 \pm 0,03$
Все гранулоцитарные элементы		$5,58 \pm 0,36^*$
Эритробласты		$0,04 \pm 0,0004^*$
Нормобласты	базофильные	$0,65 \pm 0,08^*$
	полихроматофильные	$2,22 \pm 0,31^*$
	оксифильные	$0,11 \pm 0,02^*$
Все эритроидные элементы		$3,02 \pm 0,34^*$
Лимфоциты		$4,17 \pm 0,58$
Прочие		$0,32 \pm 0,06$
Индекс созревания нейтрофилов		$0,19 \pm 0,03$
Индекс созревания эритронормобластов		$0,78 \pm 0,03$
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		$1,88 \pm 0,26^*$

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При подсчете числа митозов в эритроидном диффероне выявлено увеличение значения данного показателя по сравнению с контролем на 33,6 %. При этом в гранулоцитарном диффероне установлено отсутствие значимых различий по сравнению со значениями нормы. Содержание полихроматофильных эритроцитов после острой кровопотери существенно превышало показатель СУМ (таблица 3.14).

Таблица 3.14

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани лабораторных мышей на 5 сутки после острой кровопотери,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰
Митотический индекс эритроидного дифферона	6,47±0,67*
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	3,51±0,65
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	4,53±0,44*

Примечание: \*отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе данных периферической крови выявлено достоверное увеличение содержания ретикулоцитов (+76,4 %  $p < 0,05$ ), что дополняет данные полученные при анализе эритроидного ростка в миелоидной ткани. В то время как содержание лейкоцитов достоверно не отличалось от контрольных значений (таблица 3.15).

Таблица 3.15

Показатели периферической крови лабораторных мышей на 5 сутки после острой кровопотери,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Ретикулоциты (Г/л)	Лейкоциты (общее содержание)	Гранулоциты (Г/л)	Лимфоциты (Г/л)	Моноциты (Г/л)
252,50±10,67*	12,77±0,98	2,96±0,25	8,78±0,65	0,46±0,04

Примечание: \* отличие от группы интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ .

После проведения сочетанной трансплантации ММСК и ГСК (250 тыс. клеток/кг) при анализе данных миелограммы и результатов МЯТ установлено увеличение количества митозов в эритроидном ростке на 36,9% относительно значений нормы. При этом в эритроидном диффероне отмечено увеличение количества всех клеточных элементов: эритробластов, базофильных и полихроматофильных нормобластов. Что

привело к увеличению общего количества эритроидных элементов. Эти изменения существенно отличаются от значений нормы, но не отличаются от изменений в костном мозге у лабораторных животных после кровопотери, которым не проводилось введение ММСК и ГСК. При изучении данных в гранулоцитарном ростке обнаружено восстановление митотической активности, увеличение количества миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов относительно значений нормы, табл. 3.16, 3.17).

Тем не менее, проводя сравнительный анализ с данными в контрольной подгруппе, следует отметить отсутствие значимого влияния сочетанной трансплантации ММСК и ГСК (250 тыс. клеток/кг) на регенераторные процессы в костном мозге после острой кровопотери.

Таблица 3.16

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости лабораторных мышей на 5 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (250 тыс. клеток/кг) после острой кровопотери,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),
Миелокариоциты (общее число)		12,74±0,69
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,18±0,02
	промиелоциты	0,14±0,04
	миелоциты	0,14±0,03*
	метамиелоциты	0,42±0,06*
	палочкоядерные и сегментоядерные	4,43±0,23*
Эозинофилы (всех генераций)		0,14±0,03
Все гранулоцитарные элементы		5,45±0,23*
Эритробласты		0,04±0,006*
Нормобласты	базофильные	0,64±0,09*
	полихроматофильные	2,28±0,36*
	оксифильные	0,09±0,03*
Все эритроидные элементы		3,05±0,37*
Лимфоциты		3,93±0,67
Прочие		0,30±0,05
Индекс созревания нейтрофилов		0,20±0,02
Индекс созревания эритронормобластов		0,77±0,04

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

Таблица 3.17

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых лабораторных мышей на 5 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (250 тыс. клеток/кг) после острой кровопотери,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰
Митотический индекс эритроидного дифферона	6,63±0,66*
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона.	4,10±1,20
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	4,69±0,44*

Примечание: \*отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе данных периферической крови выявлено отсутствие существенных отличий по сравнению с данными в контрольной подгруппе (таблица 3.18).

Таблица 3.18

Показатели периферической крови лабораторных мышей на 5 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (250 тыс. клеток/кг) после острой кровопотери,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Ретикулоциты (Г/л)	Лейкоциты (общее содержание) (Г/л)	Гранулоциты (Г/л)	Лимфоциты (Г/л)	Моноциты (Г/л)
249,33±13,00*	12,09±0,91	3,07±0,36	8,57±0,63	0,45±0,05

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

#### **3.4. Влияние ГСК в количестве 300 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 7 сутки в физиологических условиях**

При изучении данных миелограммы (таблица 3.19), периферической крови (таблица 3.20), а также данных МЯТ (таблица 3.21), установлено отсутствие значимого действия на изучаемые показатели трансплантации ММСК и ГСК в физиологических условиях соответственно в дозе 6 млн. клеток/кг и 300 тыс. клеток/кг.

Таблица 3.19

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн.клеток/кг) и ГСК (300 тыс. клеток/кг),  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро)
Миелокарициты (общее число)		13,28±1,11
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,18±0,03
	промиелоциты	0,13±0,06
	миелоциты	0,23±0,03
	метамиелоциты	0,67±0,03
	палочкоядерные и сегментоядерные	5,81±0,07
Эозинофилы (всех генераций)		0,14±0,05
Все гранулоцитарные элементы		7,16±0,80
Эритробласты		0,04±0,01
Нормобласты	базофильные	0,49±0,07
	полихроматофильные	1,51±0,12
	оксифильные	0,06±0,04
Все эритроидные элементы		2,09±0,18
Лимфоциты		3,67±0,02
Прочие		0,36±0,06
Индекс созревания нейтрофилов		0,21±0,03
Индекс созревания эритронормобластов		0,75±0,02

Таблица 3.20

Показатели периферической крови лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (300 тыс. клеток/кг),  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Ретикулоциты (Г/л)	Лейкоциты (общее содержание) (Г/л)	Гранулоциты (Г/л)	Лимфоциты (Г/л)	Моноциты (Г/л)
141,17±18,11	11,31±0,69	2,78±0,28	8,08±0,62	0,44±0,08

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (300 тыс. клеток/кг),  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰
Митотический индекс эритроидного дифферона.	3,09±0,73
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона.	3,16±1,26
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами.	4,73±1,20

**3.5. Влияние ГСК в количестве 300 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения**

При анализе регенераторной активности клеток костного мозга зрелых лабораторных животных после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК (300 тыс. клеток/кг) выявлен ответ на проведенную трансплантацию. Установлено увеличение количества митозов в эритроидном ростке на 34,6 % относительно данных в контрольной подгруппе. Однако это не привело на 7 сутки к увеличению количества отдельных фракций клеток эритроидного ростка, а также к существенному изменению общего количества эритроидных клеток. В гранулоцитарном ростке пролиферативная активность клеток была увеличена на 37,9 % по сравнению с контрольной подгруппой. Тем не менее, это не вызвало существенного изменения количества гранулоцитов. Общее содержание гранулоцитов и эритроидных клеток на 7 сутки после воздействия ИИ не восстановилось и было значительно меньше нормы (таблица 3.22). При изучении микроядерного теста отмечено отсутствие значимого эффекта от проведенной

трансплантации ММСК и ГСК. При этом уровень клеток с микроядрами существенно превышал значения МЯТ (таблица.3.23).

Таблица 3.22

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (300 тыс. клеток/кг) после воздействия ИИ в дозе 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),
Миелокариоциты (общее число)		8,61±0,33*
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,16±0,03
	промиелоциты	0,10±0,02*
	миелоциты	0,15±0,03*
	метамиелоциты	0,44±0,02*
	палочкоядерные и сегментоядерные	3,73±0,05*
Эозинофилы (всех генераций)		0,11±0,02*
Все гранулоцитарные элементы		4,69±0,39*
Эритробласты		0,022±0,004*
Нормобласты	базофильные	0,30±0,06*
	полихроматофильные	1,02±0,30*
	оксифильные	0*
Все эритроидные элементы		1,31±0,30*
Лимфоциты		2,35±0,38*
Прочие		0,27±0,04*
Индекс созревания нейтрофилов		0,23±0,02
Индекс созревания эритронормобластов		0,69±0,17

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

Таблица 3.23

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (300 тыс. клеток/кг) после воздействия ИИ в дозе 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰
Митотический индекс эритроидного дифферона	5,99±1,37*
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	3,91±0,61*
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	7,04±1,08*

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

Данные периферической крови подтверждают изменения в костном мозге: отмечено низкое содержание всех изучаемых показателей (таблица 3.24).

Таблица 3.24

Показатели периферической крови зрелых лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (300 тыс. клеток/кг) после воздействия ИИ в дозе 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Ретикулоциты (Г/л)	Лейкоциты (общее содержание)	Гранулоциты (Г/л)	Лимфоциты (Г/л)	Моноциты (Г/л)
110,00±16,67*	7,72±0,69*	1,87±0,33*	5,53±0,84*	0,32±0,04*

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

### **3.6. Влияние ГСК в количестве 300 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери**

При анализе дынных регенераторной активности клеток костного мозга в эритроидном диффероне отмечено увеличение пролиферативной активности клеток данного ростка на 26,3 %. В то же время при изучении миелограммы лабораторных животных установлено, что содержание эритроидных элементов не

отличалось от данных в контрольной подгруппе. При изучении гранулоцитарного ростка отмечено, что митотическая активность клеток, а также количество клеток значительно не отличалось от результатов в контрольной подгруппе (таблица 3.25). Содержание полихроматофильных эритроцитов после острой кровопотери существенно превышало показатель СУМ и не отличалось от данных в контрольной подгруппе (таблица 3.26).

Таблица 3.25

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости лабораторных мышей на 5 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (300 тыс. клеток/кг) после острой кровопотери,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),
Миелокариоциты (общее число)		12,95±1,44
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,20±0,02
	промиелоциты	0,16±0,05
	миелоциты	0,15±0,03*
	метамиелоциты	0,44±0,04*
	палочкоядерные и сегментоядерные	4,42±0,49*
Эозинофилы (всех генераций)		0,16±0,03
Все гранулоцитарные элементы		5,53±0,48*
Эритробласты		0,037±0,004*
Нормобласты	базофильные	0,62±0,08*
	полихроматофильные	2,13±0,27*
	оксифильные	0,07±0,05*
Все эритроидные элементы		2,86±0,33*
Лимфоциты		4,27±0,74
Прочие		0,31±0,05
Индекс созревания нейтрофилов		0,22±0,03
Индекс созревания эритронормобластов		0,77±0,03

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

Таблица 3.26

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани лабораторных мышей на 5 сутки после острой кровопотери,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметр	Значение, ‰
Митотический индекс эритроидного дифферона, ‰	8,17±1,09*
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона, ‰	3,59±1,12
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	4,74±0,65*

Примечание: \*отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

Данные периферической крови на 5 сутки после острой кровопотери свидетельствуют об отсутствии эффекта от трансплантации ММСК и ГСК (300 тыс. клеток/кг) (таблица 3.27).

Таблица 3.27

Показатели периферической крови лабораторных мышей на 5 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (300 тыс. клеток/кг) после острой кровопотери,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Ретикулоциты (Г/л)	Лейкоциты (общее содержание)	Гранулоциты (Г/л)	Лимфоциты (Г/л)	Моноциты (Г/л)
254,33±9,67*	11,92±1,07	3,16±0,45	8,27±0,93	0,50±0,07

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

### **3.7. Влияние ГСК в количестве 330 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 7 сутки в физиологических условиях**

При анализе миелограммы лабораторных животных на 7 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в эритроидном ростке выявлено увеличение содержания базофильных ( $0,67 \pm 0,05$ ,  $p < 0,05$ ; + 27,5%) и полихроматофильных нормобластов ( $2,30 \pm 0,35$  млн. кл/бедро,  $p < 0,05$ ; + 49,8%). Указанное изменение привело к увеличению общего содержания эритроидных элементов на 41,55% относительно контроля. При анализе гранулоцитарного

дифферона не отмечено существенных отличий относительно контрольной группы (таблица 3.27).

При подсчете количества митозов в эритроидном ростке костного мозга после проведенной сочетанной трансплантации клеток обнаружено увеличение изучаемого показателя на 30,94 %. В то же время в гранулоцитарном ростке не установлено значимого изменения пролиферативной активности. Содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани соответствовало значению СУМ (таблица 3.28).

Таблица 3.27

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн.клеток/кг) и ГСК (330 тыс. клеток/кг),  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),
Миелокарициты (общее число)		14,33±2,00
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,24±0,04
	промиелоциты	0,20±0,06
	миелоциты	0,27±0,04
	метамиелоциты	0,62±0,04
	палочкоядерные и сегментоядерные	5,84±0,04
Эозинофилы (всех генераций)		0,22±0,05
Все гранулоцитарные элементы		7,39±0,60
Эритробласты		0,05±0,01
Нормобласты	базофильные	0,67±0,05*
	полихроматофильные	2,30±0,35*
	оксифильные	0,07±0,03
Все эритроидные элементы		3,08±0,35*
Лимфоциты		3,42±0,04
Прочие		0,35±0,06
Индекс созревания нейтрофилов		0,23±0,04
Индекс созревания эритронормобластов		0,76±±0,04
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		2,44±0,35*

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (330 тыс. клеток/кг),

$$M \pm m, n = 9$$

Параметры	Значения, ‰
Митотический индекс эритроидного дифферона	6,61±0,68*
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	4,05±0,85
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	2,49±0,48

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

Выявленные изменения в костном мозге соответствовали установленным изменениям в периферической крови, где отмечено увеличение содержания ретикулоцитов (178,50±6,00 Г/л,  $p < 0,05$ ; + 21,6 %). Содержание лейкоцитов в периферической крови не отличалось от контрольных значений.

Показатели периферической крови лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (330 тыс. клеток/кг),

$$M \pm m, n = 9$$

Ретикулоциты (Г/л)	Лейкоциты (общее содержание) (Г/л)	Гранулоциты (Г/л)	Лимфоциты (Г/л)	Моноциты (Г/л)
178,50±6,00*	12,90±0,73	2,90±0,47	8,58±0,48	0,47±0,03

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

### **3.8. Влияние ГСК в количестве 330 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения**

При анализе миелограммы лабораторных животных на 7 сутки после воздействия повреждающего фактора на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК выявлено увеличение содержания миелобластов, миелоцитов, а также палочкоядерных и сегментоядерных форм лейкоцитов соответственно на 75,3 %, 51,1 % и 21,7 % относительно контрольной подгруппы. Указанные изменения

привели к активации гранулоцитопоеза и увеличению общего содержания гранулоцитов на 23,6 % (Гр. эл.:  $5,38 \pm 0,19$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ).

В эритроидном диффероне выявлено увеличение содержания полихроматофильных нормобластов ( $1,34 \pm 0,06$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ). При этом отмечено увеличение общего содержания эритроидных элементов на 22,1 %. В костном мозге отмечено восстановление содержания лимфоцитов до значений нормы (таблица 3.30).

Таблица 3.30

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр (330 тыс. клеток/кг),  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),
Миелокарициты (общее число)		$10,07 \pm 0,83$ **
Нейтрофильные клетки	миелобласты	$0,26 \pm 0,03$ **
	промиелоциты	$0,13 \pm 0,02$ *
	миелоциты	$0,22 \pm 0,03$ **
	метамиелоциты	$0,47 \pm 0,02$ *
	палочкоядерные и сегментоядерные	$4,14 \pm 0,05$ **
Эозинофилы (всех генераций)		$0,16 \pm 0,02$
Все гранулоцитарные элементы		$5,38 \pm 0,19$ **
Эритробласты		$0,02 \pm 0,01$ *
Нормобласты	базофильные	$0,40 \pm 0,04$ *
	полихроматофильные	$1,34 \pm 0,06$ **
	оксифильные	$0,05 \pm 0,05$
Все эритроидные элементы		$1,80 \pm 0,08$ **
Лимфоциты		$1,93 \pm 0,14$
Прочие		$0,24 \pm 0,04$ *
Индекс созревания нейтрофилов		$0,26 \pm 0,01$
Индекс созревания эритрономобластов		$0,77 \pm 0,02$
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		$2,99 \pm 0,16$

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . \*\* отличие от контрольной подгруппы животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ .

В то же время при подсчете числа митозов в эритроидном и гранулоцитарном дифферонах обнаружено увеличение данных показателей на 37,42 % и 29,78 % соответственно.

Выявлен эффект от трансплантации ММСК и ГСК у животных зрелого возраста в виде снижения содержания цитогенетически измененных клеток. При этом содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами не только снизилось относительно контрольной подгруппы, но и соответствовало значениям СУМ (таблица 3.31).

Таблица 3.31

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (330 тыс. клеток/кг) после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰
Митотический индекс эритроидного дифферона	5,46±0,92 **
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	3,65±0,37 **
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	2,91±0,38 **

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . \*\* отличие от контрольной подгруппы животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе данных периферической крови выявлены изменения, соответствующие ранее установленным в костном мозге. Так, отмечено увеличение содержания ретикулоцитов (123,17±9,50 Г/л,  $p < 0,05$ ) на 24,6 %, лейкоцитов (9,72±0,49 Г/л,  $p < 0,05$ ) на 30,1 % относительно контрольной подгруппы (таблица 3.32).

Показатели периферической крови лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (330 тыс. клеток/кг) после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Ретикулоциты (Г/л)	Лейкоциты (общее содержание) (Г/л)	Гранулоциты (Г/л)	Лимфоциты (Г/л)	Моноциты (Г/л)
123,17±9,50 **	9,72±0,49 **	2,52±0,29 **	7,17±0,34**	0,43±0,05

Примечание: \*\*отличие от контрольной подгруппы животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ .

### **3.9. Влияние ГСК в количестве 330 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК на регенерацию миелоидной ткани зрелых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери**

При анализе миелограммы зрелых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери на фоне трансплантации ММСК и ГСК в эритроидном диффероне установлено увеличение содержания полихроматофильных нормобластов на 48,1 % по сравнению с контрольной подгруппой. Содержание других изучаемых элементов эритроидного дифферона достоверно не отличалось от значений в контрольной подгруппе. Тем не менее, общее содержание эритроидных клеток относительно контрольной подгруппы было повышенным, что свидетельствует об активации эритропоэза.

В гранулоцитарном диффероне выявлено повышение содержания миелобластов ( $0,27 \pm 0,04$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ), миелоцитов ( $0,25 \pm 0,02$  млн. кл/бедро,  $p < 0,05$ ), метамиелоцитов ( $0,57 \pm 0,04$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ), а также палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов ( $5,87 \pm 0,43$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ). Указанные изменения привели к активации гранулоцитопоэза, при этом общее содержание гранулоцитов в диффероне было на 29,1 % больше относительно контрольной подгруппы (таблица 3.33).

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости лабораторных мышей на 5 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (330 тыс. клеток/кг) после острой кровопотери,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. кл/бедро),
Миелокариоциты (общее число)		15,25±0,88
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,27±0,04**
	промиелоциты	0,13±0,03
	миелоциты	0,25±0,02**
	метамиелоциты	0,57±0,04**
	палочкоядерные и сегментоядерные	5,87±0,43**
Эозинофилы (всех генераций)		0,14±0,04
Все гранулоцитарные элементы		7,21±0,44**
Эритробласты		0,04±0,006
Нормобласты	базофильные	0,64±0,07*
	полихроматофильные	3,28±0,46* **
	оксифильные	0,10±0,02
Все эритроидные элементы		4,06±0,44* **
Лимфоциты		3,75±0,35
Прочие		0,28±0,04
Индекс созревания нейтрофилов		0,21±0,02
Индекс созревания эритронормобластов		0,83±0,04
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		1,84±0,35

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . \*\* отличие от подгруппы животных (после острой кровопотери), достоверно с  $p < 0,05$ .

При подсчете числа митозов в эритроидном диффероне обнаружен ответ на проведенную сочетанную трансплантацию ММСК и ГСК в условиях острой кровопотери. Этот ответ был выражен в увеличении числа митозов в данном диффероне на 27,4 % по сравнению с контрольной подгруппой.

В то же время в гранулоцитарном ростке также выявлено увеличение числа делящихся клеток на 30,9 % по сравнению с контрольной подгруппой.

При подсчете цитогенетически измененных клеток установлено, что содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами было на 23,3 % ниже, чем в контрольной подгруппе. В то же время уровень клеток с микроядрами оставался выше значений СУМ (таблица 3.34).

Таблица 3.34

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани лабораторных мышей на 5 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (330 тыс. клеток/кг) после острой кровопотери,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰
Митотический индекс эритроидного дифферона	8,24±0,81* **
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	4,60±0,80* **
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	3,47±0,20* **

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . \*\* отличие от подгруппы животных (после острой кровопотери), достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе данных периферической крови выявлено соответствие полученным ранее данным в костном мозге. Так, установлен выраженный ретикулоцитоз, а также повышенное содержания лейкоцитов в периферической крови, обусловленное увеличенным содержанием гранулоцитов и лимфоцитов (таблица 3.35).

Таблица 3.35

Показатели периферической крови лабораторных мышей на 5 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (330 тыс. клеток/кг) после острой кровопотери,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Ретикулоциты (Г/л)	Лейкоциты (общее содержание)	Гранулоциты (Г/л)	Лимфоциты (Г/л)	Моноциты (Г/л)
294,00±6,00 * **	15,43±0,48 * **	3,83±0,27 * **	11,13±0,57 * **	0,44±0,07

Примечание: \* отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . \*\* отличие от подгруппы зрелых животных (после острой кровопотери), достоверно с  $p < 0,05$ .

### 3.10. Заключение

Проведенные исследования позволили определить минимальную терапевтическую дозу ГСК, эффективную при аллогенной сочетанной трансплантации с ММСК. Эксперименты проводились как в физиологических условиях, так и после воздействия экстремальных факторов – ионизирующее излучение, кровопотеря. Был изучен эффект на гемопоэз выделенных из плодной части плаценты следующих доз ГСК: 250 тыс. клеток/кг, 300 тыс. клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг. Полученные результаты свидетельствуют, что введение при сочетанной трансплантации ГСК в дозе 250 тыс. клеток/кг не оказывает существенного влияния на регенерацию миелоидной ткани и на содержание цитогенетически измененных клеток. В этом случае ответ на трансплантацию ММСК и ГСК не проявляется ни в физиологических условиях, ни в условиях воздействия экстремальных факторов.

Эффект от трансплантации ГСК в дозе 300 тыс. клеток/кг зависит от условий в которых действуют стволовые клетки. В физиологических условиях существенного ответа на введение ММСК и ГСК в костном мозге и периферической крови не происходит. Иная картина наблюдается при трансплантации ГСК после воздействия ИИ. В этом случае ответ выражен в увеличении количества митозов в эритроидном ростке и гранулоцитарном диффероне. Однако в ранние сроки это не приводит к значительному изменению количества клеток изучаемых ростков и, как следствие, к изменению активности эритро- и гранулоцитопоэза. Уровень полихроматофильных эритроцитов с микроядрами также остается без изменений.

В условиях острой кровопотери вновь имеет место эффект от трансплантации ГСК в дозе 300 тыс. клеток/кг. Однако этот эффект ограничен увеличением количества митозов в эритроидном ростке и не приводит к существенным изменениям количества эритроидных клеток, а также к изменению содержания цитогенетически измененных клеток в костном мозге.

Указанные эффекты от трансплантации различных доз ГСК коррелируют с уровнем повреждения ткани. Известно, что поврежденные ткани способны

вырабатывать хемоаттрактант для ММСК и ГСК – SDF-1 (Stromalcell-derivedfactor-1). Этот хемоаттрактант связывается с рецепторами на поверхности ГСК и ММСК и обеспечивает их направленный хоуминг в участки тканей, которые подверглись наибольшему повреждению. Большое повреждение кроветворной ткани при воздействии ИИ определяет наличие эффекта от трансплантированных ММСК и ГСК. Введенные ММСК в свою очередь способны усиливать миграцию не только аллогенных, но и аутологичных ГСК вырабатывая SDF-1. Свойство ММСК синтезировать компоненты внеклеточного матрикса: коллаген I, III, IV, V типов, фибронектин, протеогликаны обеспечивают лучшее приживание трансплантированных клеток. Синтез ММСК таких факторов как Flt-3 лиганд, ИЛ3, SCF, а также Ил 11, Ил 12, Г-КСФ обеспечивают направленную дифференцировку мигрировавших и собственных ГСК соответственно в эритроидном и гранулоцитарном направлениях.

Трансплантация ГСК в дозе 330 тыс. клеток/кг при совместном введении с ММСК в физиологических условиях у зрелых животных обеспечивает активацию эритропоэза. Повышение общего количества эритроидных клеток на 41,6 % ( $p < 0,05$ ) было вызвано увеличением содержания базофильных и полихроматофильных нормобластов соответственно на 27,5 % и 49,8 % (рис. 3.1).

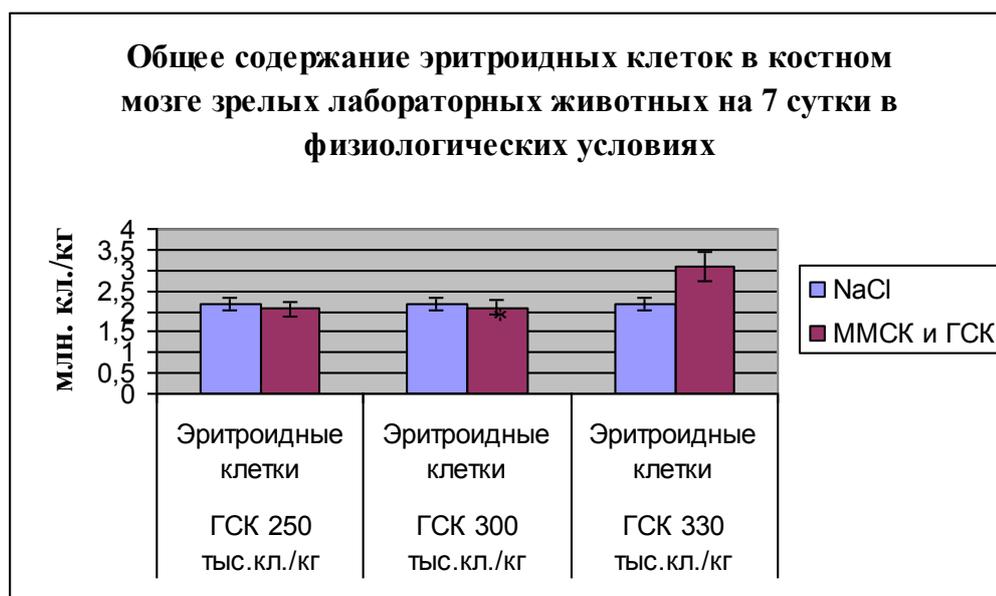


Рисунок 3.1.

Зависимость эффекта при проведении сочетанной трансплантации ММСК и ГСК от условий подтвердилось после воздействия ИИ, а также после острой кровопотери. Так, было обнаружено, что после трансплантации ГСК в дозе 330 тыс. клеток/кг в условиях воздействия ИИ происходит активация эритропоэза и гранулоцитопоэза. Общее количество эритроидных клеток (+ 22,1 %,  $p < 0,05$ ) было увеличено за счет повышения содержания полихроматофильных нормобластов на 16,0 %. Общее количество гранулоцитарных элементов (+23,6 %) было увеличено за счет миелобластов (+75,3%), миелоцитов (51,1%), палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов (+ 21,7%). Указанные изменения привели к увеличению содержания ретикулоцитов (+ 24,6%) и лейкоцитов (+30,1%) в периферической крови (рис. 3.2). При анализе МЯТ выявлено существенное снижение количества цитогенетически измененных клеток (- 63,0%). Снижение количества полихроматофильных эритроцитов с микроядрами можно объяснить способностью ММСК индуцировать выработку белков теплового шока в условиях действия экстремальных факторов в других клетках. В свою очередь, белки теплового шока, поддерживая структуру белков, сохраняют способность ферментов репарации исправлять повреждения в молекуле ДНК. Уменьшение количества повреждений в ДНК приводит к снижению индуцированного мутагенеза и, как следствие, к снижению количества цитогенетически измененных клеток (рис.3.3).

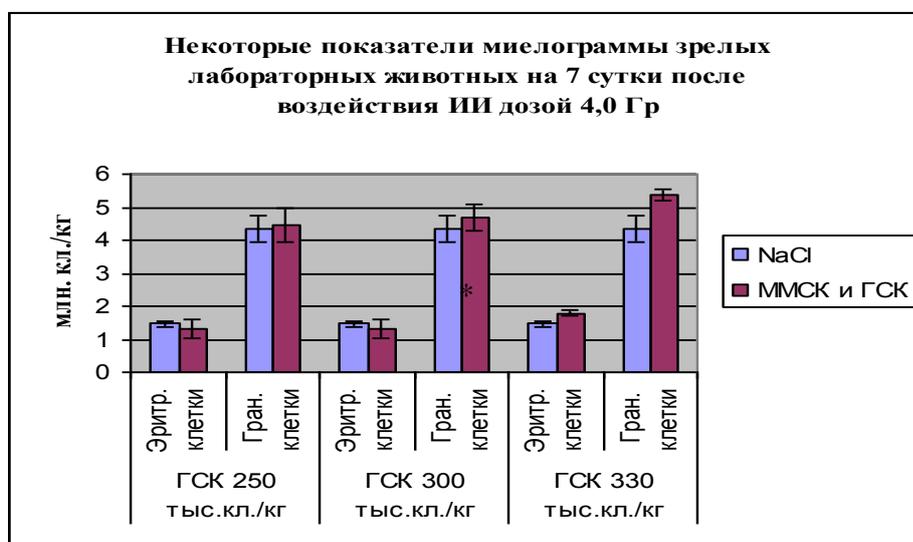


Рисунок 3.2

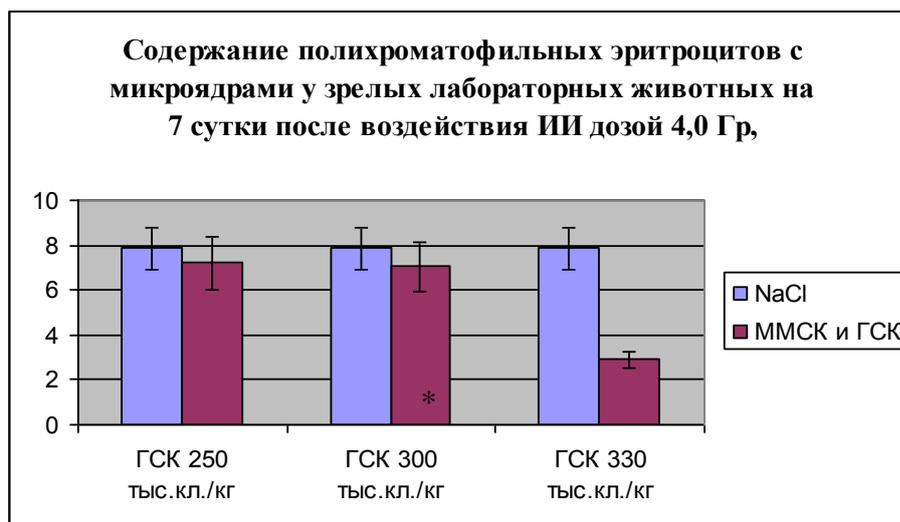


Рисунок 3.3

После острой кровопотери трансплантация ГСК в дозе 330 тыс. клеток/кг при совместном введении с ММСК обеспечивает активацию эритропоэза и гранулоцитопоэза. Активация эритропоэза обусловлена существенным увеличением количества полихроматофильных нормобластов на 48,1 %. Увеличение количества гранулоцитов на 29,4 % вызвано существенным увеличением содержания миелобластов, миелоцитов, метамиелоцитов, а также палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов. Так же, как и после воздействия ИИ, установлено значительное снижение количества цитогенетически измененных клеток в костном мозге (- 23,3 %,  $p < 0,05$ ) (рис. 3.4; рис. 3.5).

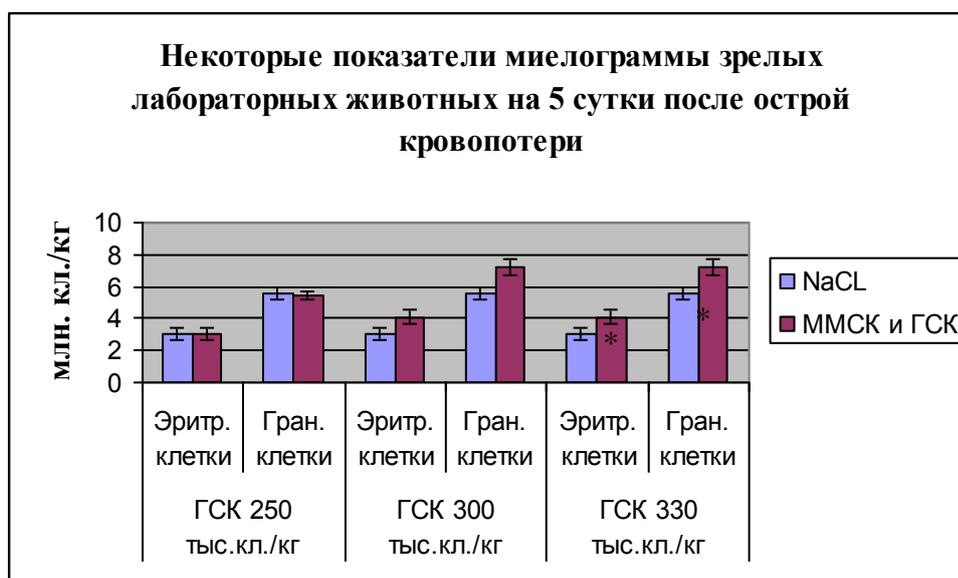


Рисунок 3.4

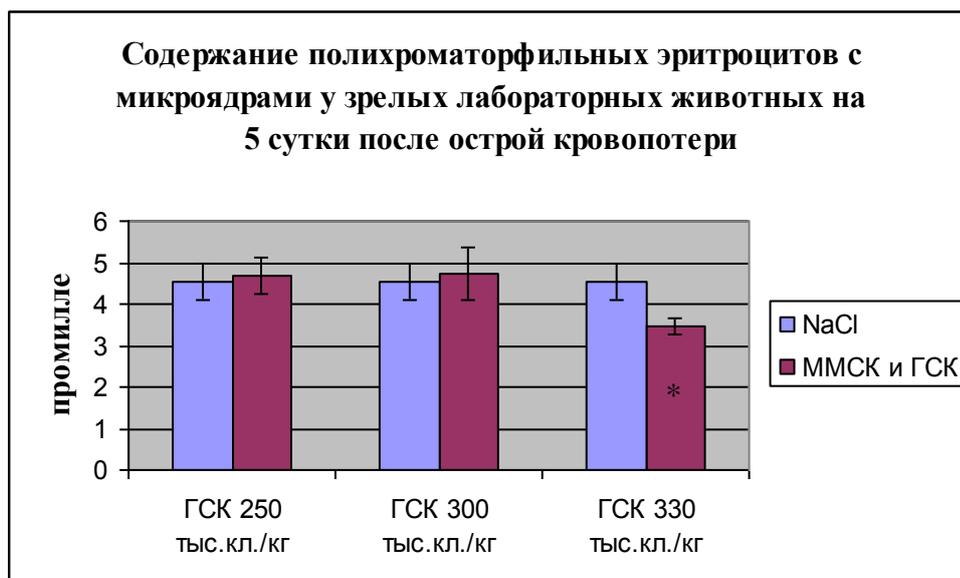


Рисунок 3.5

Таким образом, проведенные исследования позволили обнаружить не только дозозависимый эффект трансплантированных ГСК, но и выявить минимальную терапевтическую дозу, которая бы позволила при совместном введении с MMCK активировать регенерацию тканей. Также проведенные эксперименты свидетельствуют о различном механизме действия трансплантированных клеток в зависимости от условий, в которых проводится трансплантация.

## **ГЛАВА 4.**

### **ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЛАЦЕНТАРНЫХ ММСК И ГСК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ МИЕЛОИДНОЙ ТКАНИ ЗРЕЛЫХ И СТАРЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ И В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ**

Изучение регенерации быстрообновляющихся тканей лабораторных животных зрелого и старого возраста осуществлялось в физиологических условиях, а также после воздействия ионизирующего излучения и острой кровопотери на фоне аллогенной трансплантации ММСК и ГСК, выделенных из плаценты. С целью оценки действия мутагенных факторов был проведен цитогенетический анализ путем определения микроядер. Учет микроядер объективно отражает частоту aberrаций и отставших хромосом. При этом спонтанный уровень микроядер (СУМ) представляет собой достаточно устойчивую величину.

#### **4.1. Состояние миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных на 1 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях**

С целью изучения регенерации миелоидной ткани зрелых и старых животных после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях были проведены исследования на интактных лабораторных животных (таблицы 4.1, 4.2, 4.3).

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости зрелых и старых интактных лабораторных мышей на 1 сутки,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро)	
		Зрелые	Старые
Миелокариоциты (общее число)		13,17±1,83	9,82±0,92
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,23±0,06	0,11±0,03
	промиелоциты	0,18±0,04	0,08±0,02
	миелоциты	0,23±0,05	0,12±0,03
	метамиелоциты	0,65±0,07	0,30±0,03
	палочкоядерные и сегментоядерные	5,28±0,41	4,63±0,47
Эозинофилы (всех генераций)		0,20±0,05	0,12±0,02
Все гранулоцитарные элементы		6,76±0,39	5,35±0,43
Эритробласты		0,03±0,01	0,03±0,01
Нормобласты	базофильные	0,55±0,11	0,30±0,05
	полихроматофильные	1,55±0,09	0,85±0,10
	оксифильные	0,09±0,04	0,02±0,01
Все эритроидные элементы		2,22±0,19	1,19±0,11
Лимфоциты		3,52±0,45	2,43±0,27
Прочие		0,38±0,05	0,28±0,05
Индекс созревания нейтрофилов		0,25±0,03	0,13±0,02
Индекс созревания эритронормобластов		0,74±0,03	0,73±0,04
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		3,09±0,34	4,54±0,34

Таблица 4.2

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых и старых интактных лабораторных мышей на 1 сутки,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰	
	Зрелые	Старые
Митотический индекс эритроидного дифферона, ‰	4,94±0,99	4,33±1,30
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона, ‰	3,63±1,22	2,61±0,84
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	2,64±0,58	3,32±0,25

Показатели периферической крови зрелых и старых интактных лабораторных мышей на 1 сутки,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Название клеточных элементов	Содержание клеток, Г/л	
	Зрелые	Старые
Ретикулоциты	144,33±12,00	103,33±10,11
Лейкоциты (общее содержание)	11,35±0,97	8,47±1,13
Гранулоциты	2,78±0,34	2,28±0,06
Лимфоциты	8,02±0,62	6,15±0,68
Моноциты	0,45±0,05	0,32±0,08

При анализе миелограммы и периферической крови зрелых и старых лабораторных животных на 1 сутки после проведения сочетанной трансплантации ММСК и ГСК отмечено, что изучаемые показатели кроветворения не отличались от контроля (таблицы 4.4, 4.5).

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости зрелых и старых лабораторных мышей на 1 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),	
		Зрелые	Старые
Миелокариоциты (общее число)		14,50±1,67	0,31±0,04
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,20±0,04	0,13±0,02
	промиелоциты	0,16±0,06	0,09±0,02
	миелоциты	0,27±0,04	0,13±0,02
	метамиелоциты	0,60±0,02	0,26±0,03
	палочкоядерные и сегментоядерные	5,60±0,06	4,73±0,57
Эозинофилы (всех генераций)		0,22±0,03	0,12±0,02
Все гранулоцитарные элементы		7,04±0,50	5,46±0,54
Эритробласты		0,04±0,01	0,04±0,02
Нормобласты	базофильные	0,50±0,06	0,33±0,03
	полихроматофильные	1,57±0,03	0,89±0,07
	оксифильные	0,10±0,03	0
Все эритроидные элементы		2,20±0,07	1,26±0,07
Лимфоциты		3,87±0,49	2,53±0,37
Прочие		0,39±0,06	0,31±0,04
Индекс созревания нейтрофилов		0,22±0,04	0,13±0,02
Индекс созревания эритронормобластов		0,76±0,02	0,71±0,03
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		3,20±0,24	4,40±0,66

Таблица 4.5

Показатели периферической крови зрелых и старых лабораторных мышей на 1 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Название клеточных элементов	Содержание клеток, Г/л	
	Зрелые	Старые
Ретикулоциты	149,17±10,50	95,17±7,83
Лейкоциты (общее содержание)	11,55±0,90	8,42±1,08
Гранулоциты	2,85±0,30	2,31±0,09
Лимфоциты	7,88±0,52	5,55±0,55
Моноциты	0,48±0,05	0,33±0,06

При анализе пролиферативной активности клеток эритроидного и гранулоцитарного дифферонов после трансплантации ММСК и ГСК в обеих возрастных группах установлено отсутствие существенных различий относительно значений нормы.

При изучении содержания полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в миелоидной ткани у зрелых и старых животных установлено, что их содержание не отличалось от контрольных значений (таблица 4.6).

Таблица 4.6

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных мышей на 1 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,

$M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰	
	Зрелые	Старые
Митотический индекс эритроидного дифферона, ‰	4,63±0,69	4,13±1,14
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона, ‰	3,96±0,97	2,76±0,78
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	2,31±0,27	3,37±0,30

#### 4.2. Состояние миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК

При анализе миелограммы на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения в обеих возрастных группах выявлено существенное угнетение эритропоэза и гранулоцитопоэза. Так, в гранулоцитарном диффероне отмечено существенное уменьшение содержания миелобластов, промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов, а также палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов. Общее содержание гранулоцитарных элементов у зрелых животных (Гр.эл.:  $3,68 \pm 0,54$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ) было на 45,6 %, а у старых животных (Гр.эл.:  $2,00 \pm 0,40$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ) на 62,6 % меньше по сравнению с контролем.

В то же время в эритроидном ростке отмечено выраженное уменьшение содержания эритробластов, базофильных, полихроматофильных и оксифильных элементов. Указанные изменения привели к снижению общего содержания эритроидных элементов у зрелых (Эр. эл.:  $1,24 \pm 0,05$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ) и старых животных (Эр. эл.:  $0,41 \pm 0,05$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем соответственно на 44,3 % и 65,4 % (таблица 4.7).

Таблица 4.7

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости зрелых и старых лабораторных мышей на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),	
		Зрелые	Старые
1		2	2
Миелокарициты (общее число)		$5,82 \pm 0,75^*$	$3,55 \pm 0,38^\circ$
Нейтрофильные клетки	миелобласты	$0,05 \pm 0,01^*$	$0,03 \pm 0,01^\circ$
	промиелоциты	$0,08 \pm 0,03^*$	$0,03 \pm 0,01^\circ$
	миелоциты	$0,11 \pm 0,01^*$	$0,04 \pm 0,02^\circ$
	метамиелоциты	$0,29 \pm 0,03^*$	$0,12 \pm 0,02^\circ$
	палочкоядерные и сегментоядерные	$3,03 \pm 0,04^*$	$1,73 \pm 0,40^\circ$

Продолжение таблицы 4.7

1	2	2
Эозинофилы (всех генераций)	0,01±0,03*	0,05±0,03°
Все гранулоцитарные элементы	3,68±0,54*	2,00±0,40°
Эритробласты	0,012±0,005*	0,013±0,006°
Нормобласты	базофильные	0,16±0,05*
	полихроматофильные	1,07±0,01*
	оксифильные	0*
Все эритроидные элементы	1,24±0,05*	0,41±0,05°
Лимфоциты	1,12±0,28*	0,62±0,18°
Прочие	0,18±0,04*	0,13±0,02°
Индекс созревания нейтрофилов	0,18±0,04	0,14±0,04
Индекс созревания эритронормобластов	0,86±0,04*	0,75±0,07
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение	2,99±0,47	5,05±1,39

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе митотической активности элементов эритроидного и гранулоцитарного ростков у зрелых животных установлено снижение данных показателей на 73,1 % и 65,7 % соответственно. При этом у животных старого возраста изучаемые показатели были снижены соответственно на 70,4 % и 54,7 %. При определении содержания цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани в обеих возрастных группах выявлено существенное увеличение полихроматофильных эритроцитов (таблица 4.8).

Таблица 4.8

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных мышей на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰	
	Зрелые	Старые
Митотический индекс эритроидного дифферона	1,33±0,34*	1,28±0,32°
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	1,24±0,35*	1,18±0,29°
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	13,15±1,07*	11,55±1,32°

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе данных периферической крови зрелых животных установлено увеличение содержания ретикулоцитов в периферической крови ( $165,50 \pm 5,83$  Г/л,  $p < 0,05$ ), уменьшение общего содержания лейкоцитов на 42,3 % за счет выраженного уменьшения содержания лимфоцитов ( $2,32 \pm 0,49$  Г/л,  $p < 0,05$ ; - 71,1 %). При этом содержание гранулоцитов в периферической крови на 1 сутки после воздействия ИИ оставалось существенно выше нормы ( $3,88 \pm 0,44$  Г/л,  $p < 0,05$ ; + 39,9 %). Появление выраженного ретикулоцитоза и увеличение гранулоцитов можно объяснить развитием стресс-реакции со стороны системы крови на экстремальное воздействие и выбросом указанных форм из депо (в том числе костного мозга) в периферическую кровь.

Данные, полученные при анализе периферической крови старых животных также дополняют ранее выявленные изменения в миелоидной ткани костного мозга. Так, в периферической крови установлено значимое снижение общего содержания лейкоцитов на 49,4%, лимфоцитов на 75,9%, моноцитов на 45,5%. В то же время уровень ретикулоцитов был существенно больше, а содержание гранулоцитов достоверно не отличалось от значений нормы. Эти изменения также можно объяснить развитием стресс реакции, приводящей к увеличению незрелых форм эритроцитов в крови. В отличие от зрелых у старых животных не наблюдалось столь выраженной стресс реакции в отношении выброса гранулоцитов, и их уровень на 1 сутки после воздействия ИИ уже снизился до значений нормы (таблица 4.9).

Таблица 4.9

Показатели периферической крови зрелых и старых лабораторных мышей на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Название клеточных элементов	Содержание клеток, Г/л	
	Зрелые	Старые
Ретикулоциты	$165,50 \pm 5,83^*$	$123,17 \pm 3,83^\circ$
Лейкоциты (общее содержание)	$6,55 \pm 0,71^*$	$4,29 \pm 0,53^\circ$
Гранулоциты	$3,88 \pm 0,42^*$	$2,63 \pm 0,20$
Лимфоциты	$2,32 \pm 0,49^*$	$1,48 \pm 0,38^\circ$
Моноциты	$0,35 \pm 0,06^*$	$0,17 \pm 0,03^\circ$

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе миелограммы, данных периферической крови лабораторных животных обеих возрастных групп на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения в дозе 4,0 Гр на фоне проведения сочетанной трансплантации ММСК и ГСК не выявлено существенных различий по сравнению с контрольной подгруппой. В то же время в обеих возрастных группах установлено наличие выраженного ретикулоцитоза, что может быть вызвано развитием стресс реакции на лучевую нагрузку и выбросом в кровь из костного мозга ретикулоцитов. В периферической крови также отмечено существенное уменьшение содержания лимфоцитов и моноцитов (таблица 4.10). Содержание гранулоцитов у зрелых животных превышало значения нормы, что вызвано миграцией данных элементов в периферический кровоток из костного мозга (таблица 4.11). Однако у старых животных данный показатель существенно не отличался от контрольных значений, что может свидетельствовать о меньшей выраженности стресс-реакции у данной группы животных.

Таблица 4.10

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости зрелых и старых лабораторных мышей на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),	
		Зрелые	Старые
1		2	3
Миелокариоциты (общее число)		7,87±1,23*	3,50±0,30°
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,07±0,03*	0,04±0,01°
	промиелоциты	0,09±0,02*	0,05±0,02°
	миелоциты	0,18±0,03*	0,04±0,01°
	метамиелоциты	0,40±0,02*	0,13±0,02°
	палочкоядерные и сегментоядерные	3,05±0,04*	1,92±0,22°
Эозинофилы (всех генераций)		0,13±0,02*	0,04±0,02°
Все гранулоцитарные элементы		4,60±0,36*	2,22±0,21°
Эритробласты		0,01±0,004*	0,02±0,007°
Нормобласты	базофильные	0,26±0,05*	0,11±0,02°
	полихроматофильные	0,17±0,05*	0,28±0,04°
	оксифильные	0*	0,01±0,01°

Продолжение таблицы 4.10

1	2	3
Все эритроидные элементы	0,45±0,05*	0,41±0,04°
Лимфоциты	1,73±0,04*	0,55±0,12°
Прочие	0,22±0,03*	0,10±0,01°
Индекс созревания нейтрофилов	0,25±0,04	0,14±0,02
Индекс созревания эритронормобластов	0,39±0,11*	0,69±0,03
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение	3,15±0,25*	5,53±0,59

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

Таблица 4.11

Показатели периферической крови зрелых и старых лабораторных мышей на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Название клеточных элементов	Содержание клеток, Г/л	
	Зрелые	Старые
Ретикулоциты	168,50±7,17*	135,17±13,50*
Лейкоциты (общее содержание)	7,22±1,32*	3,90±0,37*
Гранулоциты	3,60±0,37*	2,86±0,39
Лимфоциты	5,53±0,84*	1,83±0,41*
Моноциты	0,36±0,06*	0,18±0,02*

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе митотического индекса в обеих изучаемых возрастных группах эритроидного и гранулоцитарного дифферонов отмечено отсутствие существенной разницы в значении данных показателей в опытных группах относительно контрольных подгрупп.

При изучении содержания полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в эритроидном ростке костного мозга после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК у зрелых и старых животных обнаружен эффект от введения стволовых клеток. В обеих возрастных группах произошло снижение содержания цитогенетически измененных клеток.

У зрелых животных данный показатель был снижен на 25,0 %, в то время как у старых животных на 23,8%. Тем не менее, содержание цитогенетически измененных клеток было выше значений СУМ (таблица 4.12).

Таблица 4.12

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных мышей на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰	
	Зрелые	Старые
Митотический индекс эритроидного дифферона	1,39±0,28*	1,38±0,25°
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	1,17±0,32*	1,20±0,17°
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	9,86±0,75* **	8,80±0,83°°°

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . \*\* отличие от контрольной подгруппы зрелых животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ . ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . °° отличие от контрольной подгруппы старых животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ .

#### **4.3. Состояние миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях**

Проведенные исследования позволили определить содержание клеточных элементов в костном мозге (таблица 4.13), периферической крови у зрелых и старых интактных лабораторных животных (таблица 4.14). Также было изучено содержание цитогенетически измененных клеток (таблица 4.15)

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости зрелых и старых интактных лабораторных мышей на 7 сутки,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),	
		Зрелые	Старые
Миелокариоциты (общее число)		12,33±1,67	9,42±0,68
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,21±0,05	0,12±0,02
	промиелоциты	0,17±0,03	0,09±0,02
	миелоциты	0,24±0,04	0,13±0,02
	метамиелоциты	0,61±0,07	0,29±0,02
	палочкоядерные и сегментоядерные	5,10±0,59	4,37±0,47
Эозинофилы (всех генераций)		0,22±0,05	0,13±0,03
Все гранулоцитарные элементы		6,53±0,67	5,12±0,46
Эритробласты		0,03±0,01	0,04±0,013
Нормобласты	базофильные	0,52±0,08	0,27±0,04
	полихроматофильные	1,53±0,07	0,82±0,09
	оксифильные	0,09±0,03	0,02±0,01
Все эритроидные элементы		2,17±0,14	1,15±0,10
Лимфоциты		3,44±0,34	2,72±0,22
Прочие		0,37±0,06	0,26±0,04
Индекс созревания нейтрофилов		0,24±0,02	0,14±0,02
Индекс созревания эритронормобластов		0,75±0,02	0,73±0,04
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		3,03±0,41	4,49±0,52

Таблица 4.14

Показатели периферической крови зрелых и старых интактных лабораторных мышей на 7 сутки,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Название клеточных элементов	Содержание клеток, Г/л	
	Зрелые	Старые
Ретикулоциты	146,83±9,89	108,33±9,00
Лейкоциты (общее содержание)	11,80±1,07	8,62±1,01
Гранулоциты	2,78±0,35	2,30±0,04
Лимфоциты	8,02±0,58	6,30±0,53
Моноциты	0,48±0,05	0,28±0,07

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых и старых интактных лабораторных мышей на 7 сутки,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰	
	Зрелые	Старые
Митотический индекс эритроидного дифферона	5,05±1,10	4,17±1,26
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	3,56±0,90	2,53±0,75
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	2,37±0,50	3,50±0,33

При анализе миелограммы на 7 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в эритроидном диффероне у зрелых животных отмечено увеличение содержания базофильных (+ 27,5 %) и полихроматофильных нормобластов (+ 49,8 %). В то же время у старых животных установлено существенное увеличение содержания полихроматофильных нормобластов ( $1,13 \pm 0,17$  млн. кл/бедро,  $p < 0,05$ ) на 37,04 %. Указанные изменения привели к увеличению общего содержания эритроидных элементов в костном мозге соответственно на 41,6 % и 25,8 % по сравнению с контролем.

В то же время в гранулоцитарном диффероне в обеих возрастных группах не установлено существенного эффекта от сочетанной трансплантации клеток (таблица 4.16).

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости зрелых и старых лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации

ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),	
		Зрелые	Старые
Миелокарициты (общее число)		14,33±2,00	9,57±0,61
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,24±0,04	0,13±0,02
	промиелоциты	0,20±0,06	0,11±0,02
	миелоциты	0,27±0,04	0,14±0,02
	метамиелоциты	0,62±0,04	0,27±0,04
	палочкоядерные и сегментоядерные	5,84±0,04	4,70±0,33
Эозинофилы (всех генераций)		0,22±0,05	0,12±0,02
Все гранулоцитарные элементы		7,39±0,60	5,47±0,29
Эритробласты		0,05±0,01	0,06±0,01
Нормобласты	базофильные	0,67±0,05*	0,24±0,04
	полихроматофильные	2,30±0,35*	1,13±0,17 °
	оксифильные	0,07±0,03	0,02±0,09
Все эритроидные элементы		3,08±0,35*	1,45±0,18 °
Лимфоциты		3,42±0,04	2,68±0,25
Прочие		0,35±0,06	0,26±0,03
Индекс созревания нейтрофилов		0,23±0,04	0,14±0,01
Индекс созревания эритронормобластов		0,76±±0,04	0,74±0,03
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		2,44±0,35*	3,56±0,35

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При подсчете числа митозов в эритроидном диффероне обнаружено увеличение их количества у зрелых и старых животных сорответственно на 30,9% и 28,42%. При подсчете числа митозов в гранулоцитарном диффероне обеих возрастных групп установлено отсутствие значимых различий по сравнению с контролем.

При анализе микроядерного теста старых животных обнаружено уменьшение содержания полихроматофильных эритроцитов с микроядрами относительно

контроля на 30,0 % ( $2,45 \pm 0,30\%$ ,  $p < 0,05$ ) (таблица 4.17). При этом у зрелых животных изучаемый показатель достоверно не отличался от данных интактных животных.

Таблица 4.17

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰	
	Зрелые	Старые
Митотический индекс эритроидного дифферона	$6,61 \pm 0,68^*$	$5,36 \pm 0,75^\circ$
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	$4,05 \pm 0,85$	$3,26 \pm 0,69$
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	$2,49 \pm 0,48$	$2,45 \pm 0,30^\circ$

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе данных периферической крови зрелых и старых животных отмечено увеличение содержания ретикулоцитов в изучаемых группах соответственно на 21,6 и 20,6 % относительно контроля. В то же время содержание других изучаемых показателей существенно не отличалось от значений контроля (таблица 4.18).

Таблица 4.18

Показатели периферической крови зрелых и старых лабораторных мышей на 7 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Название клеточных элементов	Содержание клеток, Г/л	
	Зрелые	Старые
Ретикулоциты	$178,50 \pm 6,00^*$	$130,67 \pm 7,00^\circ$
Лейкоциты (общее содержание)	$12,90 \pm 0,73$	$8,85 \pm 0,62$
Гранулоциты	$2,90 \pm 0,47$	$2,23 \pm 0,09$
Лимфоциты	$8,58 \pm 0,48$	$6,17 \pm 0,40$
Моноциты	$0,47 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,05$

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

#### 4.4. Состояние миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК

На 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения при анализе миелограммы у зрелых животных отмечено восстановление количества миелобластов до значений нормы. В то же время у старых лабораторных животных в гранулоцитарном ростке выявлено восстановление содержания миелобластов и промиелоцитов до значений нормы. Однако не произошло восстановления содержания миелоцитов, метамиелоцитов, а также палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов. В результате общее содержание гранулоцитов в обеих возрастных группах было меньше, чем в контроле соответственно 33,4 % и 27 %. У старых животных установлено восстановление содержания эритробластов в миелоидной ткани. При этом отмечено, что не произошло восстановления до контрольных значений базофильных и полихроматофильных нормобластов. Общее содержание миелокариоцитов в обеих возрастных группах не восстановилось до значений нормы (соответственно: - 35,3 % и - 33,3 %) (таблица 4.19).

Таблица 4.19

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости зрелых и старых лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),	
		Зрелые	Старые
1		2	3
Миелокариоциты (общее число)		7,98±1,35*	6,28±0,72°
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,15±0,03	0,09±0,03
	промиелоциты	0,11±0,02*	0,07±0,02
	миелоциты	0,15±0,03*	0,09±0,02°
	метамиелоциты	0,42±0,02*	0,21±0,02°
	палочкоядерные и сегментоядерные	3,40±0,06*	3,18±0,38°

Продолжение таблицы 4.19

1		2	3
Эозинофилы (всех генераций)		0,14±0,02*	0,09±0,02°
Все гранулоцитарные элементы		4,35±0,40*	3,74±0,39°
Эритробласты		0,022±0,004*	0,028±0,005
Нормобласты	базофильные	0,30±0,07*	0,19±0,04°
	полихроматофильные	1,15±0,04*	0,59±0,07°
	оксифильные	0*	0,01±0,006
Все эритроидные элементы		1,48±0,08*	0,82±0,10°
Лимфоциты		1,67±0,33*	1,90±0,20°
Прочие		0,21±0,02*	0,19±0,03°
Индекс созревания нейтрофилов		0,25±0,03	0,15±0,03
Индекс созревания эритронормобластов		0,78±0,03	0,73±0,04
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		2,95±0,21	4,67±0,89

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При подсчете числа митозов в эритроидном и гранулоцитарном дифферонах установлено, что изучаемые показатели у зрелых и старых животных на 7 сутки после воздействия ИИ восстановились до значений нормы. В то же время при исследовании микроядерного теста обнаружено сохраняющееся повышенное содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами. Показатель МЯТ в обеих возрастных группах был существенно больше значений СУМ (таблица 4.20).

Таблица 4.20

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰	
	Зрелые	Старые
Митотический индекс эритроидного дифферона	3,98±0,48	2,69±0,56
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	2,81±0,39	2,49±0,47
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	7,87±0,95*	6,10±0,50°

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе данных периферической крови зрелых и старых лабораторных животных установлено сниженное содержание ретикулоцитов, гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов относительно контроля (таблица 4.21).

Таблица 4.21

Показатели периферической крови зрелых и старых лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Название клеточных элементов	Содержание клеток, Г/л	
	Зрелые	Старые
Ретикулоциты	98,83±9,50*	85,50±10,50°
Лейкоциты (общее содержание)	7,47±1,20*	6,40±0,33°
Гранулоциты	1,82±0,38*	1,72±0,36°
Лимфоциты	5,80±0,67*	4,83±0,40°
Моноциты	0,37±0,05*	0,20±0,02°

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе миелограммы старых животных на 7 сутки после воздействия ИИ в дозе 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в эритроидном диффероне отмечено увеличение содержания эритробластов (+37,9%), базофильных (+42,1%), полихроматофильных нормобластов (+32,3%) по сравнению с контрольной подгруппой. Указанные изменения привели к увеличению общего содержания эритроидных элементов на 35,6% (Эр.эл.:  $1,11 \pm 0,06$  млн. кл./бедро,  $p < 0,05$ ). У зрелых животных в изучаемом ростке отмечено существенное увеличение полихроматофильных нормобластов. Указанные изменения привели к увеличению общего содержания эритроидных элементов в обеих возрастных группах соответственно на 35,6% (Эр.эл.:  $1,11 \pm 0,06$  млн. кл./бедро,  $p < 0,05$ ) и 22,1% (Эр.эл.:  $1,80 \pm 0,08$  млн. кл./бедро,  $p < 0,05$ ).

В гранулоцитарном диффероне у зрелых животных обнаружено увеличение количества миелобластов, миелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов. При этом у старых животных выявлено увеличение содержания миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов относительно контрольной подгруппы. Описанные изменения

соответствовали увеличению общего содержания гранулоцитарных элементов в обеих изучаемых возрастных группах.

При подсчете содержания лимфоцитов в костном мозге у старых животных обнаружено увеличение их содержания относительно контрольной подгруппы на 23,7%. Следует отметить, что настоящий показатель не только увеличился относительно контрольной подгруппы, но и соответствовал значениям нормы (таблица 4.22).

Таблица 4.22

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости зрелых и старых лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),	
		Зрелые	Старые
Миелокарициты (общее число)		10,07±0,83 **	7,82±0,95
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,26±0,03**	0,12±0,03
	промиелоциты	0,13±0,02*	0,10±0,02
	миелоциты	0,22±0,03**	0,15±0,02 <sup>oo</sup>
	метамиелоциты	0,47±0,02*	0,26±0,02 <sup>oo</sup>
	палочкоядерные и сегментоядерные	4,14±0,05**	4,13±0,30 <sup>oo</sup>
Эозинофилы (всех генераций)		0,16±0,02	0,11±0,02
Все гранулоцитарные элементы		5,38±0,19 **	4,86±0,31 <sup>oo</sup>
Эритробласты		0,02±0,01*	0,04±0,003 <sup>oo</sup>
Нормобласты	базофильные	0,40±0,04*	0,27±0,02 <sup>oo</sup>
	полихроматофильные	1,34±0,06**	0,78±0,04 <sup>oo</sup>
	оксифильные	0,05±0,05	0,02±0,01
Все эритроидные элементы		1,80±0,08 **	1,11±0,06 <sup>oo</sup>
Лимфоциты		1,93±0,14	2,35±0,35 <sup>oo</sup>
Прочие		0,24±0,04*	0,21±0,02
Индекс созревания нейтрофилов		0,26±0,01	0,15±0,01
Индекс созревания эритронормобластов		0,77±0,02	0,72±0,02
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		2,99±0,16	4,37±0,34

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . \*\* отличие от контрольной подгруппы зрелых животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ . <sup>oo</sup> отличие от контрольной подгруппы старых животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ .

В то же время у зрелых и старых животных при подсчете митозов в эритроидном и гранулоцитарном ростках обнаружено, что изучаемые показатели были достоверно больше, чем в контрольной подгруппе.

При анализе микроядерного теста отмечено, что уровень цитогенетически измененных клеток у зрелых (-63,0 %) и старых животных (-38,5 %) был существенно меньше, чем в контрольной подгруппе. При этом показатель МЯТ восстановился до значений нормы и соответствовал СУМ (таблица 4.23).

Таблица 4.23

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰	
	Зрелые	Старые
Митотический индекс эритроидного дифферона	5,46±0,92**	5,07±0,54 <sup>°°</sup>
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	3,65±0,37**	4,19±0,70 <sup>°°</sup>
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	2,91±0,38 **	3,75±0,32 <sup>°°</sup>

Примечание: \*\* отличие от контрольной подгруппы зрелых животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ . <sup>°°</sup> отличие от контрольной подгруппы старых животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ .

Данные периферической крови дополняют и подтверждают ранее описанные изменения в костном мозге. Так, выявлено увеличение содержания ретикулоцитов, повышение общего содержания лейкоцитов по сравнению с лабораторными животными, которым не проводилась сочетанная трансплантация ММСК и ГСК (таблица 4.24).

Показатели периферической крови зрелых и старых лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Название клеточных элементов	Содержание клеток, Г/л	
	Зрелые	Старые
Ретикулоциты	123,17±9,50 **	111,00±9,33 <sup>oo</sup>
Лейкоциты (общее содержание)	9,72±0,49 **	7,72±0,39 <sup>oo</sup>
Гранулоциты	2,52±0,29 **	2,48±0,28 <sup>oo</sup>
Лимфоциты	7,17±0,34**	5,83±0,54 <sup>oo</sup>
Моноциты	0,43±0,05	0,20±0,04

Примечание: \*\* отличие от контрольной подгруппы зрелых животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ . <sup>oo</sup> отличие от контрольной подгруппы старых животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ .

#### **4.5. Состояние миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях**

С целью изучения действия сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК на состояние миелоидной ткани зрелых и старых животных в физиологических условиях на 5 сутки в обеих возрастных группах были проведены исследования на интактных животных по определению клеточного состава костного мозга (таблица 4.25), периферической крови (таблица 4.26). Также было изучено содержание цитогенетически измененных клеток в эритроидном ростке миелоидной ткани (таблица 4.27).

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости зрелых и старых  
интактных лабораторных мышей на 5 сутки,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),	
		Зрелые	Старые
Миелокариоциты (общее число)		13,83±0,83	10,42±0,82
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,19±0,02	0,08±0,03
	промиелоциты	0,15±0,01	0,06±0,02
	миелоциты	0,20±0,03	0,10±0,02
	метамиелоциты	0,63±0,05	0,33±0,05
	палочкоядерные и сегментоядерные	5,73±0,20	4,90±0,37
Эозинофилы (всех генераций)		0,16±0,02	0,11±0,02
Все гранулоцитарные элементы		7,05±0,20	5,58±0,33
Эритробласты		0,03±0,003	0,02±0,009
Нормобласты	базофильные	0,48±0,04	0,27±0,02
	полихроматофильные	1,53±0,04	0,93±0,11
	оксифильные	0,07±0,03	0,03±0,01
Все эритроидные элементы		2,11±0,07	1,24±0,09
Лимфоциты		3,54±0,34	2,60±0,23
Прочие		0,34±0,05	0,26±0,05
Индекс созревания нейтрофилов		0,20±0,01	0,12±0,02
Индекс созревания эритронормобластов		0,76±0,01	0,77±0,05
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		3,34±0,18	4,55±0,57

Таблица 4.26

Показатели периферической крови зрелых и старых  
интактных лабораторных мышей на 5 сутки,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Название клеточных элементов	Содержание клеток, Г/л	
	Зрелые	Старые
Ретикулоциты	143,17±7,72	107,83±5,50
Лейкоциты (общее содержание)	11,83±0,51	8,93±1,17
Гранулоциты	2,86±0,29	2,24±0,06
Лимфоциты	8,30±0,40	6,38±0,62
Моноциты	0,45±0,06	0,36±0,08

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых и старых интактных лабораторных мышей на 5 сутки,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰	
	Зрелые	Старые
Митотический индекс эритроидного дифферона	4,84±0,68	3,30±0,93
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	3,76±1,09	1,86±0,35
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	2,51±0,38	3,54±0,39

При анализе миелограммы на 5 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в эритроидном ростке зрелых животных установлено существенное увеличение эритробластов ( $0,05 \pm 0,01$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ). При этом у старых лабораторных животных обнаружено увеличение содержания как эритробластов ( $0,04 \pm 0,007$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ), так и базофильных нормобластов ( $0,34 \pm 0,03$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ). Несмотря на выявленные изменения в обеих возрастных группах в виде увеличения отдельных фракций клеток это не привело к изменению общего содержания эритроидных элементов.

При анализе миелограммы установлено, что активность гранулоцитопоеза, содержание лимфоцитов у зрелых и старых лабораторных животных существенно не отличались от контрольных значений (таблица 4.28).

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости зрелых и старых лабораторных мышей на 5 сутки на фоне сочетанной трансплантации

ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),	
		Зрелые	Старые
Миелокариоциты (общее число)		13,25±1,30	11,76±1,13
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,21±0,02	0,09±0,04
	промиелоциты	0,17±0,02	0,08±0,03
	миелоциты	0,21±0,03	0,12±0,02
	метамиелоциты	0,66±0,05	0,35±0,06
	палочкоядерные и сегментоядерные	6,13±0,32	4,65±0,38
Эозинофилы (всех генераций)		0,16±0,02	0,13±0,02
Все гранулоцитарные элементы		7,54±0,33	5,37±0,36
Эритробласты		0,05±0,01*	0,04±0,007°
Нормобласты	базофильные	0,53±0,12	0,34±0,03°
	полихроматофильные	1,51±0,08	1,00±0,23
	оксифильные	0,08±0,02	0,02±0,01
Все эритроидные элементы		2,16±0,12	1,39±0,31
Лимфоциты		3,25±0,57	2,91±0,36
Прочие		0,29±0,03	0,29±0,04
Индекс созревания нейтрофилов		0,20±0,01	0,13±0,02
Индекс созревания эритронормобластов		0,74±0,05	0,72±0,06
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		3,51±0,35	4,12±0,99

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При подсчете числа митозов в эритроидном диффероне у зрелых и старых животных установлено увеличение пролиферативной активности соответственно на 23,9 % и 28,8 % по сравнению с интактными животными. При подсчете числа митозов в гранулоцитарном ростке не выявлено значимых различий по сравнению с данными в контроле.

При анализе микроядерного теста выявлен различный ответ со стороны зрелых и старых животных на проведенную трансплантацию ММСК и ГСК. Так, у старых животных обнаружено, что уровень полихроматофильных эритроцитов с микроядрами был на 24,9 % ниже относительно группы контроля. В то же время у зрелых животных данный показатель существенно не изменился (таблица 4.29).

Таблица 4.29

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых лабораторных мышей на 5 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰	
	Зрелые	Старые
Митотический индекс эритроидного дифферона	6,00±0,80*	4,25±0,28°
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	4,03±1,05	2,63±0,68
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	2,61±0,27	2,66±0,19°

При изучении данных периферической крови установлено соответствие изучаемых показателей ранее описанным изменениям в костном мозге. Так, было выявлено, что содержание элементов периферической крови в обеих возрастных группах достоверно не отличалось от соответствующих показателей в группе контроля (таблица 4.30).

Таблица 4.30

Показатели периферической крови зрелых и старых лабораторных мышей на 5 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Название клеточных элементов	Содержание клеток, Г/л	
	Зрелые	Старые
Ретикулоциты	133,00±4,67	114,78±13,36
Лейкоциты (общее содержание)	11,90±0,87	9,48±0,70
Гранулоциты	2,64±0,21	2,20±0,34
Лимфоциты	8,73±0,72	6,21±0,79
Моноциты	0,50±0,04	0,37±0,06

#### **4.6. Состояние миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК**

При анализе данных миелограммы старых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери выявлены схожие качественные изменения с данными миелограммы зрелых лабораторных животных. Так, в гранулоцитарном ростке выявлено достоверное уменьшение содержания миелобластов ( $0,03 \pm 0,02$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ; - 60,1 %), промиелоцитов ( $0,02 \pm 0,01$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ; - 61,1 %), миелоцитов ( $0,06 \pm 0,02$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ; - 37,7 %), метамиелоцитов ( $0,26 \pm 0,03$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ; - 21,7 %), палочкоядерных и сегментоядерных форм лейкоцитов ( $3,83 \pm 0,42$ ,  $p < 0,05$  млн. клеток/бедро; - 21,77 %). Что привело к снижению общего содержания гранулоцитарных элементов относительно контроля на 22,2 % ( $4,34 \pm 0,41$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ). У зрелых лабораторных животных за счет уменьшения количества миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных форм гранулоцитов общее содержание клеток изучаемого дифферона было на 20,8 % меньше, по сравнению с интактными животными.

В то же время при анализе данных эритроидного ростка старых животных отмечено увеличение содержания эритробластов ( $0,042 \pm 0,009$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ; + 92,31 %), базофильных ( $0,34 \pm 0,04$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ; + 27,67 %), полихроматофильных нормобластов ( $1,58 \pm 0,12$  млн. клеток/бедро,  $p < 0,05$ ; + 27,70 %). Указанные изменения привели к стимуляции эритропоэза, при этом общее содержание эритроидных элементов было на 27,4 % больше, чем в контроле (таблица 4.31). У зрелых животных также отмечено увеличение общего содержания элементов эритроидного ростка на 42,7 % за счет повышения количества эритробластов, базофильных и полихроматофильных нормобластов.

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости зрелых и старых лабораторных мышей на 5 сутки после острой кровопотери,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),	
		Зрелые	Старые
Миелокариоциты (общее число)		12,90±0,40	9,43±0,50
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,17±0,03	0,03±0,02°
	промиелоциты	0,13±0,03	0,02±0,01°
	миелоциты	0,15±0,03*	0,06±0,02°
	метамиелоциты	0,43±0,05*	0,26±0,03°
	палочкоядерные и сегментоядерные	4,57±0,39*	3,83±0,42°
Эозинофилы (всех генераций)		0,15±0,03	0,13±0,02
Все гранулоцитарные элементы		5,58±0,36*	4,34±0,41°
Эритробласты		0,04±0,0004*	0,042±0,009°
Нормобласты	базофильные	0,65±0,08*	0,34±0,04°
	полихроматофильные	2,22±0,31*	1,18±0,12°
	оксифильные	0,11±0,02	0,02±0,01
Все эритроидные элементы		3,02±0,34*	1,58±0,12°
Лимфоциты		4,17±0,58	2,78±0,22
Прочие		0,32±0,06	0,31±0,05
Индекс созревания нейтрофилов		0,19±0,03	0,10±0,02
Индекс созревания эритронормобластов		0,78±0,03	0,76±0,02
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		1,88±0,26*	2,77±0,38°

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При подсчете числа митозов в эритроидном диффероне у зрелых и старых животных выявлено значительное увеличение содержания митотически делящихся клеток по сравнению с контролем.

При подсчете числа митозов в гранулоцитарном диффероне в обеих возрастных группах установлено отсутствие существенных различий по сравнению со значениями интактных животных.

При анализе микроядерного теста обнаружено увеличение количества цитогенетически измененных клеток в эритроидном диффероне у зрелых

(+80,1 %,  $p < 0,05$  %) и старых животных (+ 75,3 %,  $p < 0,05$ ) относительно значений СУМ (таблица 4.32).

Таблица 4.32

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных мышей на 5 сутки после острой кровопотери,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰	
	Зрелые	Старые
Митотический индекс эритроидного дифферона	6,47±0,67*	5,06±0,65°
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	3,51±0,65	2,01±0,44
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	4,53±0,44*	6,20±0,66°

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе данных периферической крови зрелых и старых животных установлено увеличение количества ретикулоцитов соответственно на 76,4 % и 21,0 %. В то время как содержание других изучаемых элементов достоверно от значений нормы не отличалось.

Уменьшение содержания гранулоцитарных элементов в миелоидной ткани костного мозга и нормальное содержание лейкоцитов в периферической крови можно объяснить выбросом лейкоцитов из депо в периферическую кровь (таблица 4.33).

Таблица 4.33

Показатели периферической крови зрелых и старых лабораторных мышей на 5 сутки после острой кровопотери,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Название клеточных элементов	Содержание клеток, Г/л	
	Зрелые	Старые
Ретикулоциты	252,50±10,67*	130,83±9,83°
Лейкоциты (общее содержание)	12,77±0,98	8,58±0,72
Гранулоциты	2,96±0,25	2,20±0,08
Лимфоциты	8,78±0,65	6,25±0,48
Моноциты	0,46±0,04	0,34±0,05

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе миелограммы зрелых и старых лабораторных животных после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в эритроидном диффероне выявлено увеличение количества полихроматофильных нормобластов соответственно на 48,1 % и 31,0 % по сравнению с контрольной подгруппой. Указанное изменение привело к увеличению на 34,6 % и 25,4 % общего содержания эритроидных элементов относительно контрольной подгруппы. Эти изменения можно объяснить развивающейся защитно-компенсаторной реакцией организма (активация эритропоэза) на кровопотерю.

В гранулоцитарном диффероне также выявлен эффект на проведенную сочетанную трансплантацию ММСК и ГСК. У зрелых животных обнаружено увеличение количества миелобластов, миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов. Выявленные изменения привели к увеличению общего содержания гранулоцитов на 29,4 % относительно лабораторных животных, которым не проводилась сочетанная итрансплантация ММСК и ГСК.

У старых животных в гранулоцитарном ростке эффект был выражен в увеличении содержания миелобластов, миелоцитов (+ 48,0 %,  $p < 0,05$ ), метамиелоцитов (+ 34,4 %,  $p < 0,05$ ), а также палочкоядерных и сегментоядерных форм гранулоцитов (+ 24,4 %,  $p < 0,05$ ) относительно контрольной подгруппы (лабораторные животные после острой кровопотери). Указанные изменения привели к активации гранулоцитопоэза, так как общее количество гранулоцитов в костном мозге было на 24,7 % выше, чем в контрольной подгруппе (таблица 4.34).

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости зрелых и старых лабораторных мышей на 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн. клеток/бедро),	
		Зрелые	Старые
Миелокарициты (общее число)		15,25±0,88	10,64±0,86
Нейтрофильные клетки	миелобласты	0,27±0,04**	0,06±0,01 <sup>°°</sup>
	промиелоциты	0,13±0,03	0,05±0,02
	миелоциты	0,25±0,02**	0,10±0,01 <sup>°°</sup>
	метамиелоциты	0,57±0,04**	0,32±0,03 <sup>°°</sup>
	палочкоядерные и сегментоядерные	5,87±0,43**	4,77±0,24 <sup>°°</sup>
Эозинофилы (всех генераций)		0,14±0,04	0,14±0,02
Все гранулоцитарные элементы		7,21±0,44**	5,41±0,26 <sup>° °</sup>
Эритробласты		0,04±0,006	0,05±0,01 <sup>°</sup>
Нормобласты	базофильные	0,64±0,07*	0,37±0,04 <sup>°</sup>
	полихроматофильные	3,28±0,46* **	1,55±0,15 <sup>° °</sup>
	оксифильные	0,10±0,02	0,02±0,01
Все эритроидные элементы		4,06±0,44* **	1,99±0,14 <sup>° °</sup>
Лимфоциты		3,75±0,35	2,54±0,29
Прочие		0,28±0,04	0,29±0,06
Индекс созревания нейтрофилов		0,21±0,02	0,11±0,01
Индекс созревания эритронормобластов		0,83±0,04	0,79±0,02
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		1,84±0,35	2,74±0,18

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . \*\* отличие от подгруппы зрелых животных (после острой кровопотери), достоверно с  $p < 0,05$ . <sup>°</sup> отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . <sup>°°</sup> отличие от подгруппы старых животных (после острой кровопотери), достоверно с  $p < 0,05$ .

При подсчете числа митозов в эритроидном и гранулоцитарном ростках в обеих возрастных группах лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК выявлено увеличение содержания митотически делящихся клеток в изучаемых дифферонах по сравнению с контрольными подгруппами.

При анализе микроядерного теста у зрелых и старых животных установлено снижение количества цитогенетически измененных клеток в эритроидном диффероне по сравнению с контрольной подгруппой соответственно на 23,3 % и 19,6 %. В то же время не произошло восстановления содержания полихроматофильных эритроцитов с микроядрами до значений нормы (СУМ) (таблица 4.35).

Таблица 4.35

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных мышей на 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения, ‰	
	Зрелые	Старые
Митотический индекс эритроидного дифферона	8,24±0,81* **	6,24±1,02° °°
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	4,60±0,80* **	2,89±0,57° °°
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	3,47±0,20* **	4,99±0,33° °°

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . \*\* отличие от подгруппы зрелых животных (после острой кровопотери), достоверно с  $p < 0,05$ . ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . °° отличие от подгруппы старых животных (после острой кровопотери), достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе данных периферической крови выявлены изменения, соответствующие ранее обнаруженным в костном мозге. Так, в обеих изучаемых возрастных группах отмечено увеличение содержания ретикулоцитов и общего содержания лейкоцитов за счет гранулоцитов относительно данных в контрольной подгруппе (таблица 4.36). У зрелых животных также установлено повышение количества лимфоцитов.

Показатели периферической крови зрелых и старых лабораторных мышей на 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации

ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Название клеточных элементов	Содержание клеток, Г/л	
	Зрелые	Старые
Ретикулоциты	294,00±6,00* **	156,00±11,00° °°
Лейкоциты (общее содержание)	15,43±0,48* **	10,24±0,78°°
Гранулоциты	3,83±0,27* **	2,82±0,28°°
Лимфоциты	11,13±0,57* **	6,35±0,55
Моноциты	0,44±0,07	0,38±0,04

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . \*\* отличие от подгруппы зрелых животных (после острой кровопотери), достоверно с  $p < 0,05$ . ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . °° отличие от подгруппы старых животных (после острой кровопотери), достоверно с  $p < 0,05$ .

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что в физиологических условиях на 5 сутки у зрелых и старых лабораторных животных сочетанная трансплантация ММСК и ГСК в костном мозге обеспечивает увеличение митотической активности клеток эритроидного дифферона, а также повышение содержания отдельных элементов данного ростка. У зрелых животных происходит увеличение количества эритробластов, у старых животных - эритробластов и базофильных нормобластов. Тем не менее, указанные изменения не приводят к существенной стимуляции эритропоэза в целом. На фоне сочетанной трансплантации в миелоидной ткани происходит снижение содержания цитогенетически измененных клеток.

В условиях острой кровопотери на 5 сутки сочетанная трансплантация ММСК и ГСК в обеих изучаемых возрастных группах приводит к активации эритропоэза и гранулоцитопоэза. У старых животных повышение общего содержания эритроидных элементов происходит за счет увеличения полихроматофильных нормобластов. Активация гранулоцитов обусловлена увеличением количества миелобластов, миелоцитов, метамиелоцитов, а также

сегментоядерных и палочкоядерных форм нейтрофилов. Сочетанная трансплантация ММСК и ГСК на 5 сутки после острой кровопотери у старых лабораторных животных вызывает снижение содержания цитогенетически измененных клеток в костном мозге.

#### 4.7. Заключение

Проведенные экспериментальные исследования позволили установить влияние сочетанной трансплантации стволовых клеток ММСК и ГСК, выделенных из плаценты на регенерацию миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях, а также в условиях воздействия экстремальных факторов (ионизирующее излучение и острая кровопотеря).

В физиологических условиях на 1 сутки сочетанная трансплантация ММСК и ГСК не приводит к существенным изменениям красного костного мозга зрелых и старых лабораторных животных, а также не приводит к изменению содержания цитогенетически измененных клеток.

На 1 сутки после воздействия ИИ у зрелых и старых лабораторных животных выявлено уменьшение общей клеточности костного мозга бедренной кости. Данные миелограммы свидетельствуют об ингибировании эритроидного и гранулоцитарного дифференцирования. В периферической крови отмечены типичные для лучевого повреждения изменения: увеличение содержания ретикулоцитов и гранулоцитов, за счет их выхода из костного мозга, а также развивающееся снижение содержания лимфоцитов. При этом по данным цитогенетического анализа выявлен мутагенный эффект действия ИИ.

В обеих изучаемых возрастных группах выявлен ответ на проведенную сочетанную трансплантацию ММСК и ГСК. Этот ответ был выражен в уменьшении содержания цитогенетически измененных клеток как у зрелых (- 25,0 %), так и у старых лабораторных животных (- 23,81 %) по сравнению с уровнем МЯТ у животных без сочетанной трансплантации клеток (рисунок 4.1).

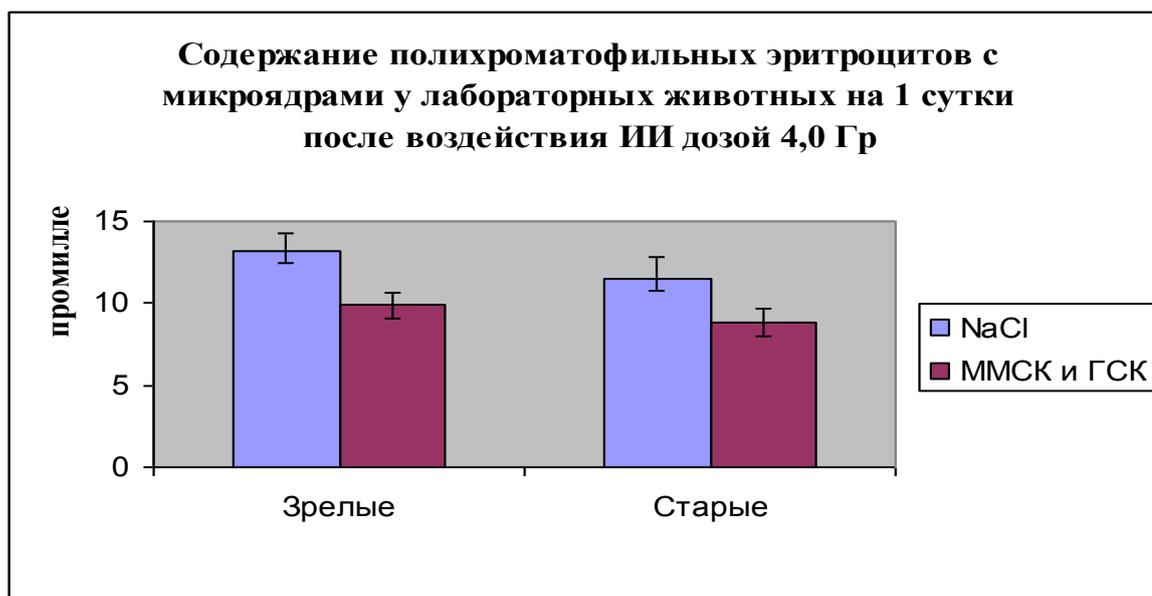


Рисунок 4.1

В физиологических условиях на 7 сутки у зрелых и старых лабораторных животных выявлены изменения на проведенную трансплантацию в миелоидной ткани. Эти изменения были выражены в активации эритропоэза. При этом у зрелых животных активация эритропоэза была обусловлена увеличением содержания базофильных и полихроматофильных нормобластов соответственно на 27,5 % и 49,8 %, а у старых животных за счет увеличения полихроматофильных нормобластов на 37,0 %. Общее содержание эритроидных элементов было увеличено у зрелых и старых животных соответственно на 41,6 % и 25,8 %. В периферической крови в обеих возрастных группах после проведенной сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК зарегистрировано увеличенное содержание ретикулоцитов. В то же время, значимого действия на активность гранулоцитопоэза в физиологических условиях сочетанная трансплантация плацентарных ММСК и ГСК не оказала. У старых лабораторных животных в отличие от зрелых животных установлен эффект на проведенную трансплантацию клеток, выражающийся в изменении содержания цитогенетически измененных клеток. Содержание данных клеток было на 30 % меньше, чем в контрольной подгруппе (рисунок 4.2).

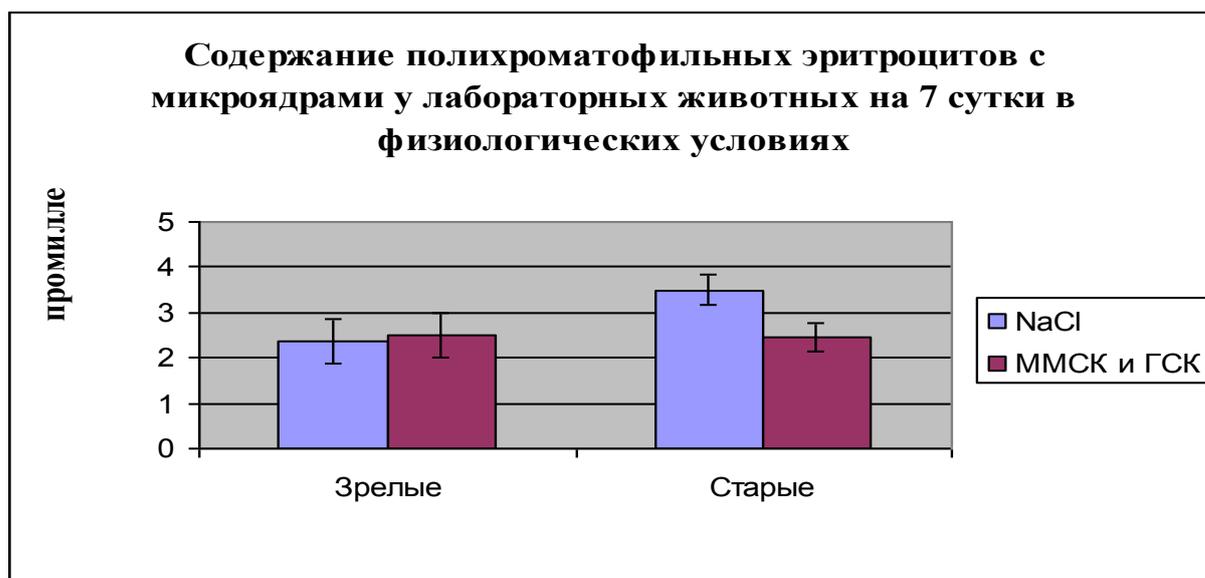


Рисунок 4.2

На 7 сутки после воздействия ИИ в обеих изучаемых возрастных группах не произошло восстановления активности эритропоэза и гранулоцитопоэза. Общее содержание эритроидных и гранулоцитарных элементов, а также общая клеточность в бедренной кости у зрелых и старых животных были существенно меньше значений нормы. При этом уровень индуцированного мутагенеза превышал значения СУМ.

После трансплантации плацентарных ММСК и ГСК на 7 сутки после воздействия ИИ у зрелых и старых лабораторных животных обнаружена активация эритропоэза и гранулоцитопоэза. У зрелых лабораторных животных активация эритропоэза произошла за счет увеличения полихроматофильных нормобластов, а у старых за счет увеличения эритробластов, базофильных и полихроматофильных нормобластов (рисунок 4.3.). Активность гранулоцитопоэза была увеличена после трансплантации клеток у зрелых животных за счет увеличения миелобластов, миелоцитов, а также палочкоядерных и сегментоядерных форм, в то время как у старых животных повышение активности данного ростка было достигнуто за счет увеличения миелоцитов, метамиелоцитов, а также палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов (рисунок 3.4). Указанные изменения в обеих изучаемых возрастных группах привели к увеличению содержания миелокариоцитов в бедренной кости.

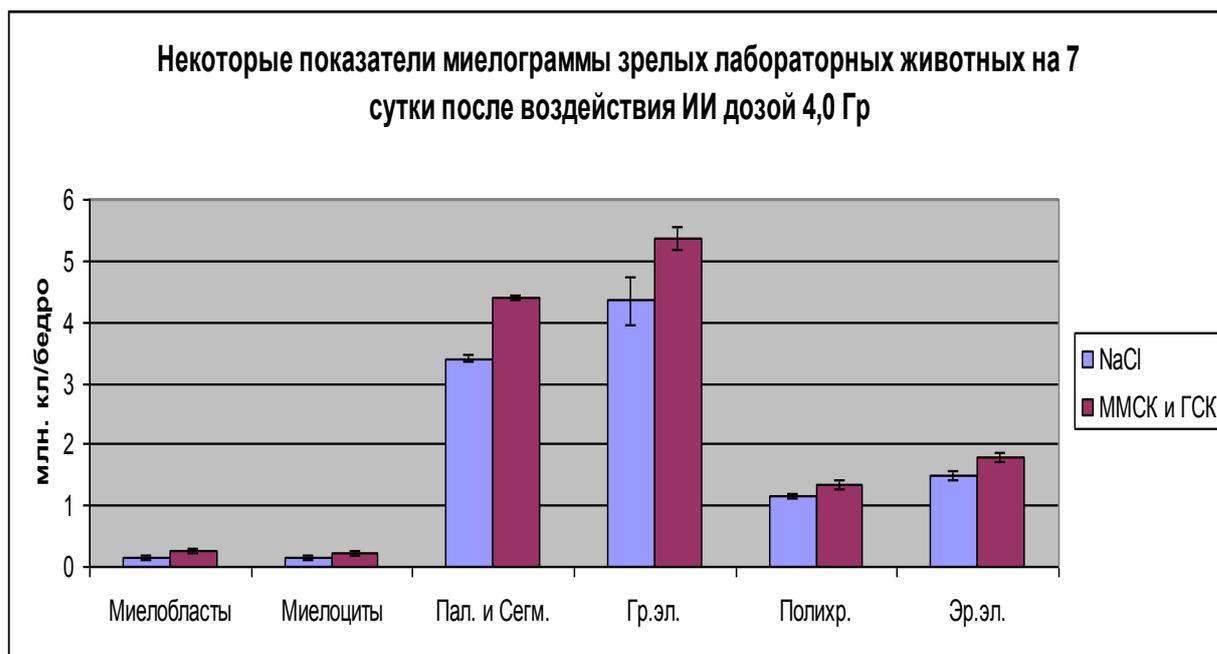


Рисунок 4.3

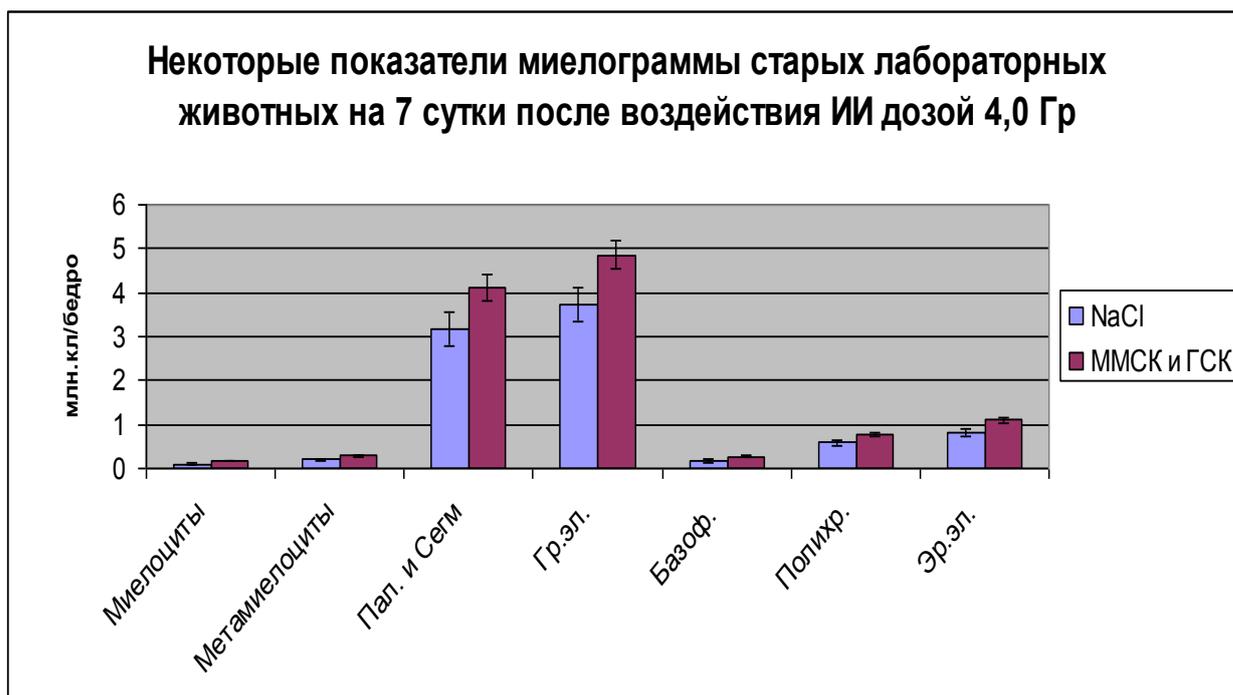


Рисунок 4.4

Следует также отметить в обеих возрастных группах снижение количества цитогенетически измененных клеток после трансплантации плацентарных ММСК и ГСК. При этом показатель МЯТ зрелых животных восстановился до значений нормы (рисунок 4.5).

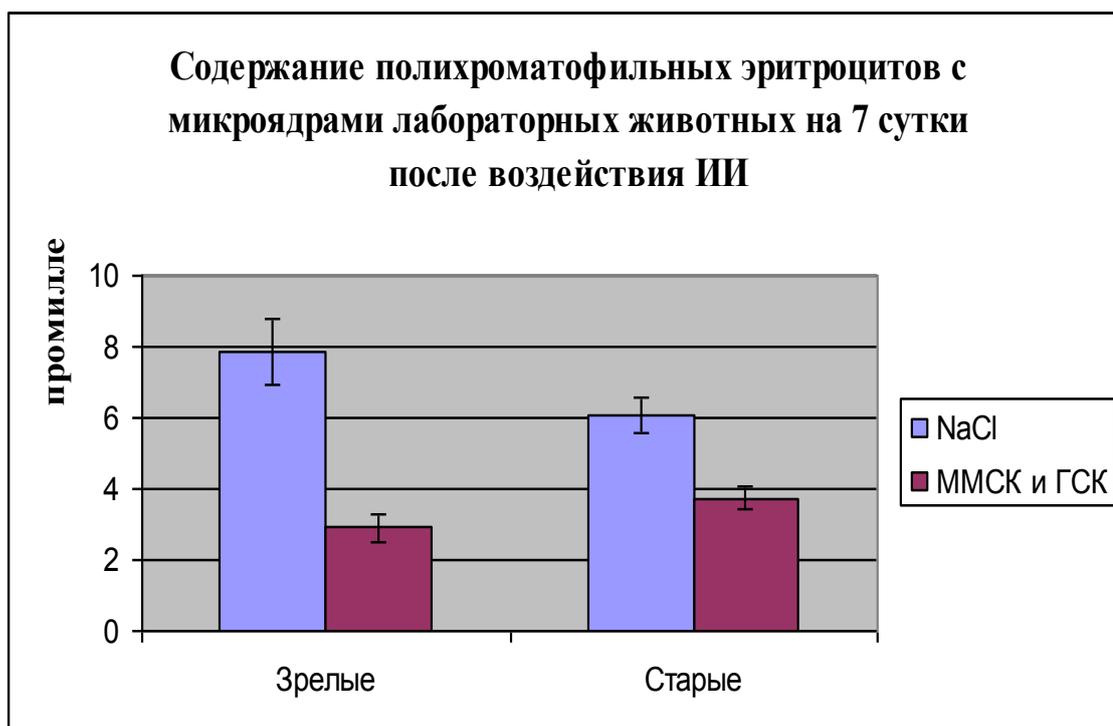


Рисунок 4.5

При изучении регенерации миелоидной ткани лабораторных животных зрелого и старого возраста в физиологических условиях на 5 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в эритроидном ростке обнаружено увеличение содержания эритробластов, у старых лабораторных животных - увеличение содержания базофильных нормобластов.

Однако указанные изменения не привели к активации эритропоэза в целом. Так как общее содержание эритроидных элементов существенно не отличалось от контрольных значений (рисунок 4.6). Значимого влияния на гранулоцитарный росток в физиологических условиях в обеих возрастных группах на фоне введения стволовых клеток, как и в другие изучаемые сроки (первые и седьмые сутки), установлено не было.

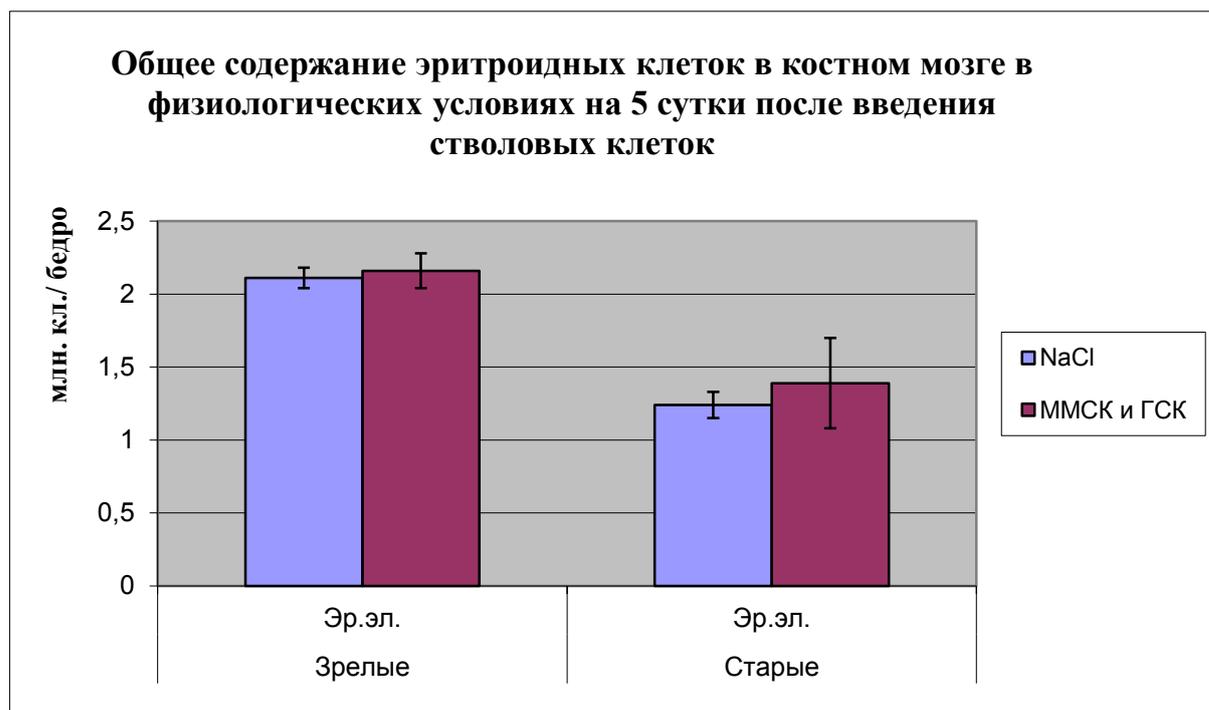


Рисунок 4.6

При изучении индуцированного мутагенеза выявлено снижение цитогенетически измененных клеток у старых животных, в то время как у зрелых лабораторных животных изучаемый показатель не отличался от данных в контрольной подгруппе (рисунок 4.7).

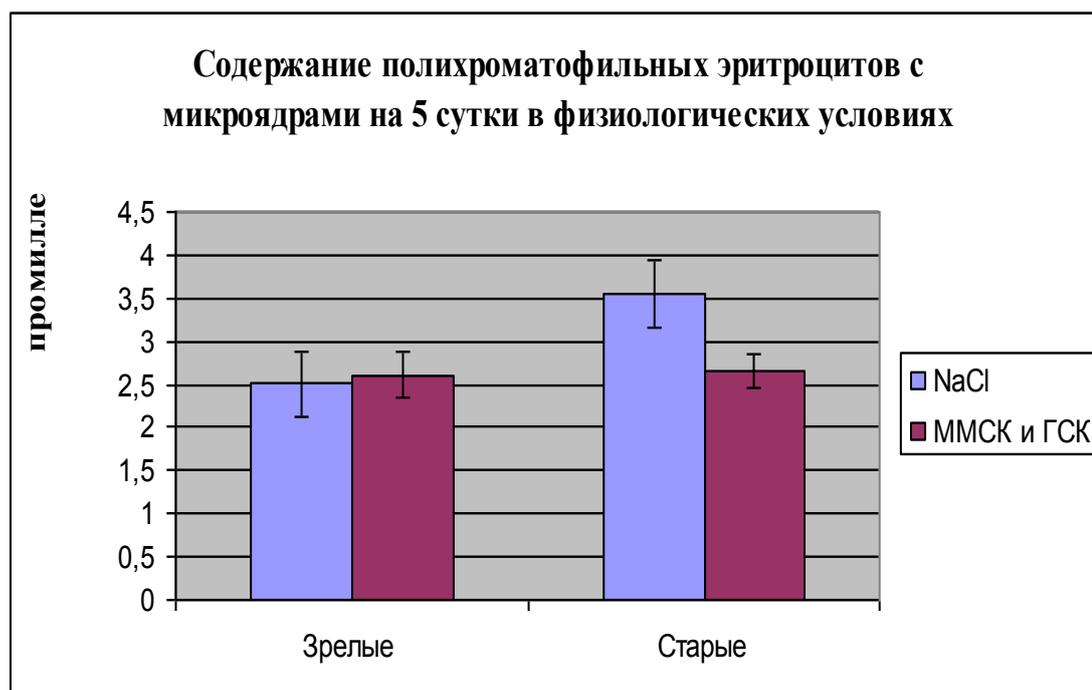


Рисунок 4.7

На 5 сутки после острой кровопотери в обеих изучаемых группах не произошло восстановление активности гранулоцитопоэза. При этом у зрелых и старых животных в эритроидном диффероне установлено повышение количества эритробластов, базофильных и полихроматофильных нормобластов, что привело к повышению общего содержания элементов изучаемого ростка.

В то же время на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК у зрелых и старых лабораторных животных установлено повышение активности эритропоэза и гранулоцитопоэза. При этом в обеих возрастных группах активация эритропоэза реализована за счет увеличения количества полихроматофильных нормобластов. Общее содержание эритроидных элементов было увеличено соответственно на 34,4 % и 25,4 %. У зрелых и старых животных также отмечено увеличение активности гранулоцитопоэза. Активация гранулоцитопоэза у зрелых и старых лабораторных животных обеспечена увеличением содержания миелобластов, миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов (рисунок 4.8, рисунок 4.9).

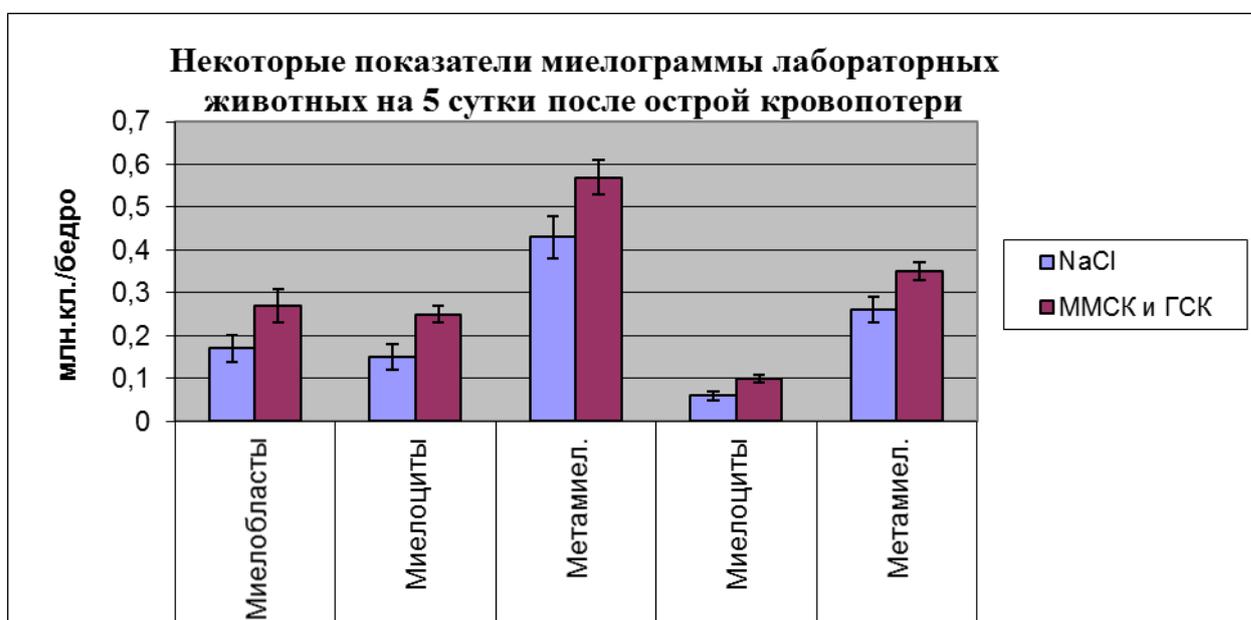


Рисунок 4.8

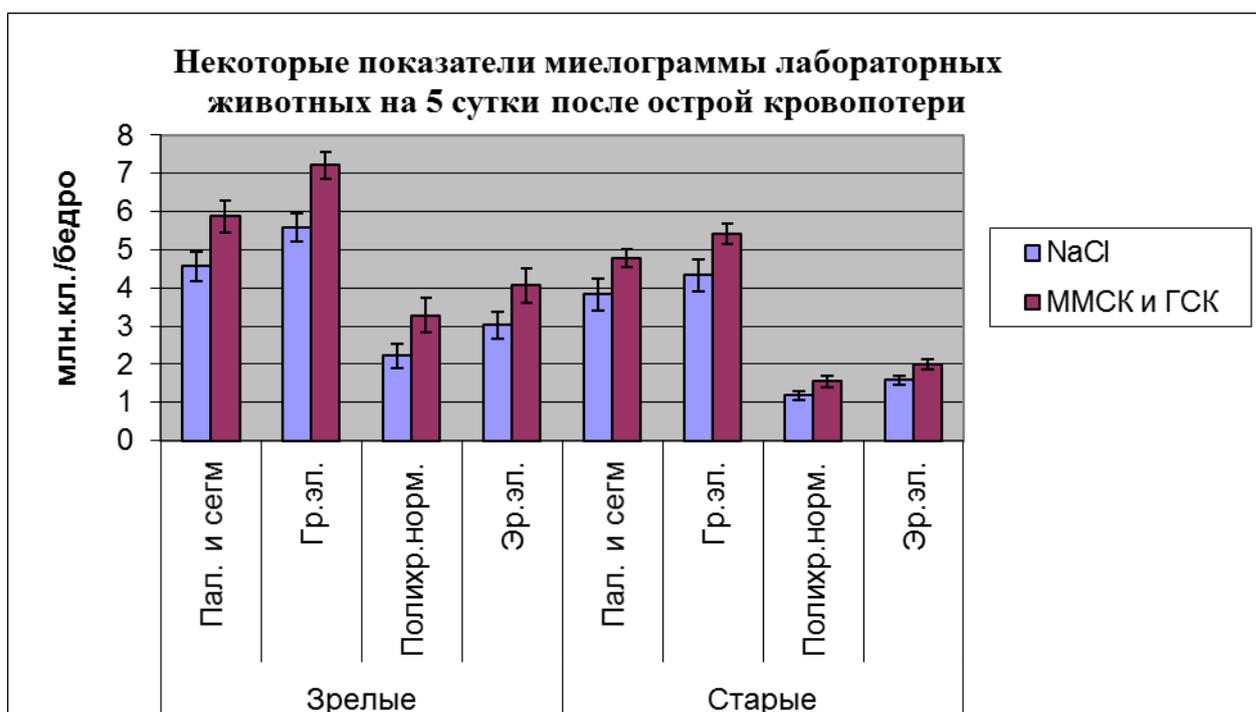


Рисунок 4.9

Уровень цитогенетически измененных клеток на фоне введения плацентарных ММСК и ГСК в обеих изучаемых возрастных группах был ниже, чем в контрольной подгруппе соответственно на 23,3% и 19,6% (рисунок 4.10).

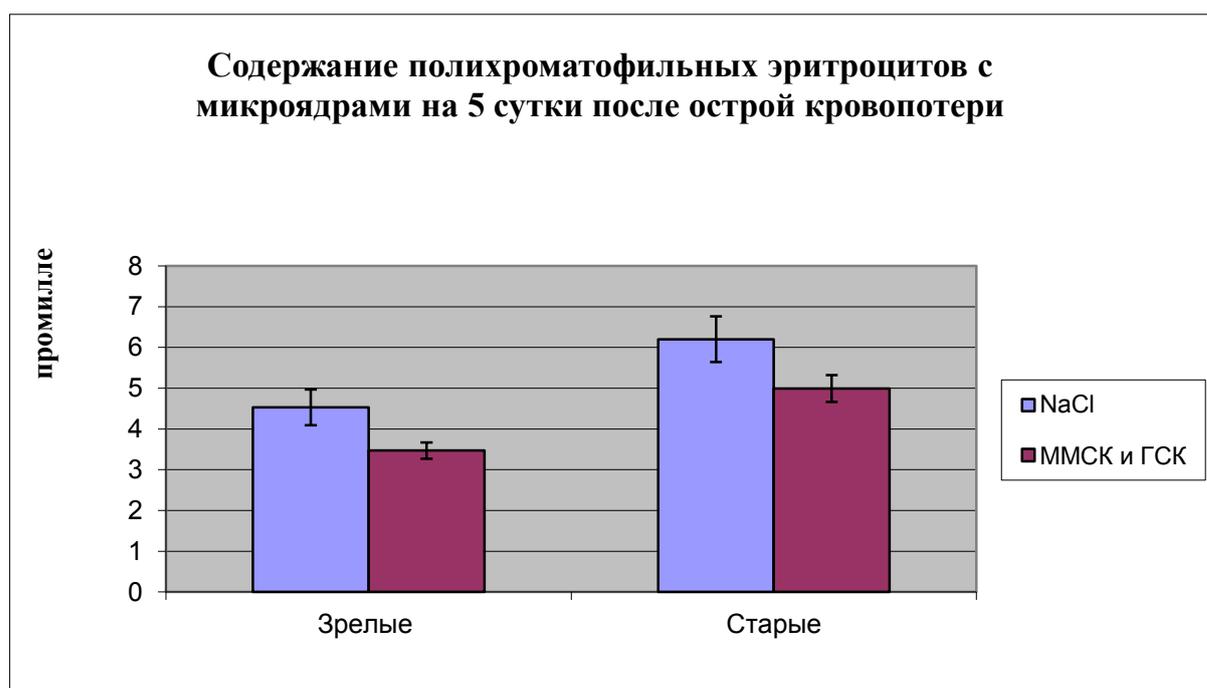


Рисунок 4.10

## ГЛАВА 5.

### **ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЛАЦЕНТАРНЫХ ММСК И ГСК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ КРАСНОЙ И БЕЛОЙ ПУЛЬПЫ СЕЛЕЗЕНКИ ЗРЕЛЫХ И СТАРЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ И В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ**

С целью оценки состояния регенерации красной и белой пульпы селезенки в физиологических условиях, а также после воздействия ионизирующего излучения и острой кровопотери проводилось определение основных морфометрических показателей селезенки: общей площади лимфоидного фолликула, площади В-зоны лимфоидного фолликула, площади герминативного центра лимфоидного фолликула, площади Т-зоны лимфоидного фолликула, общей клеточность красной пульпы, расстояния между центрами лимфоидных фолликулов. Также были изучены цитологические параметры данного органа: содержание лимфобластов – клеточных элементов герминативного центра, содержание пролимфоцитов – одних из основных элементов мантийной зоны лимфатического фолликула, общее содержание лимфоцитов, содержание гранулоцитарных и эритроидных элементов, а также производился подсчет количества моноцитов и макрофагов.

#### **5.1. Морфометрические и цитологические показатели селезенки зрелых и старых лабораторных животных на 1 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях**

С целью определения эффективности проводимой аллогенной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в отношении активации регенерации белой и красной пульпы селезенки были проведены эксперименты на интактных зрелых и старых лабораторных животных (таблица 5.1, таблица 5.2).

Морфометрические параметры селезенки интактных зрелых и старых мышей  
на 1 сутки ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Площадь лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	1,09 $\pm$ 0,06	0,63 $\pm$ 0,05
Площадь В-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	1,00 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,04
Площадь герминативной зоны лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	0,17 $\pm$ 0,022	0,12 $\pm$ 0,0085
Площадь Т-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	0,09 $\pm$ 0,005	0,055 $\pm$ 0,006
Расстояние между центрами фолликулов, мкм.	379,86 $\pm$ 9,55	285,43 $\pm$ 7,80
Общая клеточность красной пульпы в 0,01мм <sup>2</sup>	244,29 $\pm$ 7,76	184,29 $\pm$ 10,98

Таблица 5.2

Клеточный состав селезенки интактных зрелых и старых мышей на 1 сутки  
( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Название клеточных элементов	Содержание клеток, 10 <sup>6</sup>	
	Зрелые	Старые
Общее число клеток	217,99 $\pm$ 8,42	157,93 $\pm$ 3,59
Лимфобласты	1,99 $\pm$ 0,05	1,51 $\pm$ 0,07
Пролимфоциты	9,17 $\pm$ 0,58	6,56 $\pm$ 0,56
Лимфоциты	151,86 $\pm$ 7,31	109,20 $\pm$ 3,31
Плазматические клетки	0,61 $\pm$ 0,10	0,40 $\pm$ 0,06
Макрофаги	6,63 $\pm$ 0,55	4,37 $\pm$ 0,35
Моноциты	2,61 $\pm$ 0,27	1,75 $\pm$ 0,19
Гранулоцитарные клетки	11,70 $\pm$ 0,74	9,41 $\pm$ 0,38
Эритроидные клетки	25,53 $\pm$ 0,68	18,24 $\pm$ 0,44
Прочие	7,89 $\pm$ 0,58	6,49 $\pm$ 0,47

В физиологических условиях на 1 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК у зрелых и старых животных при проведении морфометрического исследования селезенки лабораторных мышей установлено, что изучаемые показатели: общая площадь лимфоидного фолликула, площадь герминативного центра, площадь В-зоны лимфоидного фолликула, площадь Т-зоны лимфоидного фолликула, общая клеточность красной пульпы существенно не отличались от данных, полученных в группе контроля (таблица 5.3).

Таблица 5.3

Морфометрические параметры селезенки зрелых и старых мышей на 1 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Площадь лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$1,06 \pm 0,05$	$0,60 \pm 0,07$
Площадь В-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,98 \pm 0,05$	$0,53 \pm 0,04$
Площадь герминативной зоны лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,16 \pm 0,025$	$0,12 \pm 0,0063$
Площадь Т-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,09 \pm 0,006$	$0,055 \pm 0,01$
Расстояние между центрами фолликулов, мкм.	$375,00 \pm 6,00$	$282,00 \pm 9,43$
Общая клеточность красной пульпы в $0,01 \text{мм}^2$	$240,71 \pm 9,67$	$175,14 \pm 8,45$

В то же время анализ цитологической картины селезенки в обеих возрастных группах свидетельствует об отсутствии эффекта от проведенной сочетанной трансплантации клеток (таблица 5.4).

Клеточный состав селезенки зрелых и старых мышей на 1 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Название клеточных элементов	Содержание клеток, $10^6$	
	Зрелые	Старые
Общее число клеток	$219,25 \pm 9,51$	$159,86 \pm 4,77$
Лимфобласты	$2,02 \pm 0,06$	$1,48 \pm 0,06$
Пролимфоциты	$9,41 \pm 0,44$	$6,40 \pm 0,51$
Лимфоциты	$153,57 \pm 7,35$	$111,43 \pm 3,92$
Плазматические клетки	$0,56 \pm 0,13$	$0,43 \pm 0,05$
Макрофаги	$6,34 \pm 0,47$	$4,54 \pm 0,42$
Моноциты	$2,49 \pm 0,39$	$1,84 \pm 0,22$
Гранулоцитарные клетки	$11,96 \pm 0,88$	$9,11 \pm 0,50$
Эритроидные клетки	$24,76 \pm 1,31$	$18,59 \pm 0,56$
Прочие	$8,14 \pm 0,58$	$6,04 \pm 0,39$

## 5.2. Морфометрические и цитологические показатели селезенки зрелых и старых лабораторных животных на 1 сутки после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК

При проведении морфометрического исследования селезенки на 1 сутки после воздействия ИИ в дозе 4,0 Гр у зрелых и старых лабораторных животных выявлено существенное уменьшение площади лимфоидного фолликула по сравнению с интактными животными соответственно на 33,9 % ( $0,71 \pm 0,04$   $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ ,  $p < 0,05$ ) и 26,8 % ( $0,46 \pm 0,05$   $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ ,  $p < 0,05$ ). Площадь зоны роста фолликула у зрелых животных была уменьшена на 45,7 % ( $p < 0,05$ ), в то время как у старых на 27,8 % ( $p < 0,05$ ). При этом также установлено в обеих возрастных группах уменьшение площади тимуснезависимой и тимусзависимой зон фолликула на 30,2 %, 28,2 % и 26,5 %, 28,0 % соответственно.

При определении расстояния между центрами лимфоидных фолликулов выявлено значительное уменьшение данного показателя относительно значений нормы. У зрелых животных данный показатель был снижен на 26,4 %, у старых животных на 24,6 % относительно значений интактных животных.

Существенные изменения в обеих возрастных группах обнаружены и в плотности клеток в красной пульпе. Так, у животных зрелого возраста плотность клеток в красной пульпе селезенки уменьшается на 28,2 % по сравнению с интактными животными. В то время как у старых животных данный показатель был снижен на 28,9 % (таблица 5.5).

Таблица 5.5

Морфометрические параметры селезенки зрелых и старых мышей на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Площадь лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,71 \pm 0,04^*$	$0,46 \pm 0,05^\circ$
Площадь В-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,70 \pm 0,03^*$	$0,42 \pm 0,05^\circ$
Площадь герминативной зоны лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,09 \pm 0,011^*$	$0,09 \pm 0,005^\circ$
Площадь Т-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,067 \pm 0,006^*$	$0,039 \pm 0,006^\circ$
Расстояние между центрами фолликулов, мкм.	$279,43 \pm 11,80^*$	$215,14 \pm 10,41^\circ$
Общая клеточность красной пульпы в $0,01 \text{мм}^2$	$175,43 \pm 8,20^*$	$131,00 \pm 8,00^\circ$

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

Данные цитологического исследования у зрелых и старых животных свидетельствуют об уменьшении общей клеточности селезенки на 40,6 % и 33,2 % соответственно, а также о снижении содержания лимфоцитов на 45,4 % и 35,4 %, гранулоцитов на 28,1 % и 27,8 %, эритроидных элементов на 31,7% и 29,4 % (таблица 5.6).

Клеточный состав селезенки зрелых и старых мышей на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Название клеточных элементов	Содержание клеток, $10^6$	
	Зрелые	Старые
Общее число клеток	$129,43 \pm 2,75^*$	$105,52 \pm 3,26^\circ$
Лимфобласты	$1,20 \pm 0,20^*$	$1,01 \pm 0,16^\circ$
Пролимфоциты	$5,66 \pm 0,53^*$	$4,39 \pm 0,33^\circ$
Лимфоциты	$82,97 \pm 3,05^*$	$70,49 \pm 2,15^\circ$
Плазматические клетки	$0,49 \pm 0,04^*$	$0,31 \pm 0,02^\circ$
Макрофаги	$5,20 \pm 0,29^*$	$3,57 \pm 0,25^\circ$
Моноциты	$1,93 \pm 0,24^*$	$1,29 \pm 0,16^\circ$
Гранулоцитарные клетки	$8,41 \pm 0,39^*$	$6,80 \pm 0,60^\circ$
Эритроидные клетки	$17,44 \pm 0,56^*$	$12,87 \pm 1,00^\circ$
Прочие	$6,13 \pm 0,40^*$	$4,79 \pm 0,53^\circ$

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При проведении морфометрического исследования селезенки зрелых животных на 1 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК отмечено, что площадь лимфоидного фолликула не отличалась от показателя в контрольной подгруппе. В то же время выявлено уменьшение изучаемого показателя по сравнению с нормой.

При анализе площади зоны роста, тимусзависимой и тимуснезависимой зон фолликула установлено, что изучаемые показатели были существенно меньше, чем у интактных животных и, в то же время, достоверно не отличались от данных в контрольной подгруппе. Расстояние между центрами лимфоидных фолликулов было меньше, чем в норме, однако значимо не отличалось от аналогичного параметра в контрольной подгруппе. При определении плотности клеток в красной пульпе отмечен эффект от введенных стволовых клеток, что было выражено в увеличении данного показателя по сравнению с контрольной подгруппой. Тем не менее, содержание клеток в красной пульпе было значительно меньше значений нормы (таблица 5.7).

При изучении влияния сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на 1 сутки после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр на основные морфометрические показатели селезенки старых животных, следует отметить, что в этот период времени не происходит существенного изменения анализируемых показателей (общая площадь лимфоидного фолликула, площадь герминативного центра, площадь Т-зоны лимфоидного фолликула, площадь В-зоны лимфоидного фолликула, общая клеточность красной пульпы) относительно контрольной подгруппы (таблица 5.8).

Таблица 5.7

Морфометрические параметры селезенки зрелых и старых мышей на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Площадь лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,71 \pm 0,03^*$	$0,48 \pm 0,08^\circ$
Площадь В-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,72 \pm 0,054^*$	$0,41 \pm 0,078^\circ$
Площадь герминативной зоны лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,10 \pm 0,01^*$	$0,09 \pm 0,002$
Площадь Т-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,063 \pm 0,01^*$	$0,04 \pm 0,008^\circ$
Расстояние между центрами фолликулов, мкм.	$275,14 \pm 10,16^*$	$219,57 \pm 13,22^\circ$
Общая клеточность красной пульпы в $0,01 \text{мм}^2$	$200,29 \pm 7,76^* **$	$126,71 \pm 7,76^\circ$

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; \*\* отличие от контрольной подгруппы зрелых животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ ;  $^\circ$  отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе данных цитологического исследования селезенки зрелых и старых лабораторных животных на 1 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК установлено отсутствие существенного влияния трансплантированных клеток на клеточный состав

селезенки относительно контрольной подгруппы. В данном случае отмечено снижение общей клеточности селезенки, а также уменьшение содержания отдельных фракций: лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов и эритроидных клеток.

Таблица 5.8

Клеточный состав селезенки зрелых и старых мышей на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Название клеточных элементов	Содержание клеток, $10^6$	
	Зрелые	Старые
Общее число клеток	$131,36 \pm 4,06^*$	$106,85 \pm 3,99^\circ$
Лимфобласты	$1,09 \pm 0,24^*$	$1,11 \pm 0,07^\circ$
Пролимфоциты	$5,90 \pm 0,49^*$	$4,24 \pm 0,37^\circ$
Лимфоциты	$84,01 \pm 3,93^*$	$71,71 \pm 3,44^\circ$
Плазматические клетки	$0,47 \pm 0,04^*$	$0,29 \pm 0,04^\circ$
Макрофаги	$5,20 \pm 0,29^*$	$3,32 \pm 0,36^\circ$
Моноциты	$1,93 \pm 0,24^*$	$1,34 \pm 0,04^\circ$
Гранулоцитарные клетки	$8,84 \pm 0,60^*$	$6,67 \pm 0,37^\circ$
Эритроидные клетки	$18,13 \pm 0,63^*$	$12,87 \pm 1,00^\circ$
Прочие	$6,03 \pm 0,32^*$	$4,79 \pm 0,53^\circ$

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .  $^\circ$  отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

### 5.3. Морфометрические и цитологические показатели селезенки зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после сочетанной

#### трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях

С целью изучения действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на морфометрические и цитологические показатели селезенки зрелых и старых животных на 7 сутки в физиологических условиях были получены данные интактных мышей (таблица 5.9; таблица 5.10).

Морфометрические параметры селезенки интактных зрелых и старых мышей  
на 7 сутки ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Площадь лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	1,11 $\pm$ 0,06	0,60 $\pm$ 0,04
Площадь В-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	0,97 $\pm$ 0,10	0,55 $\pm$ 0,04
Площадь герминативной зоны лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	0,18 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,008
Площадь Т-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	0,08 $\pm$ 0,01	0,058 $\pm$ 0,007
Расстояние между центрами фолликулов, мкм.	376,00 $\pm$ 11,14	281,43 $\pm$ 8,49
Общая клеточность красной пульпы в 0,01мм <sup>2</sup>	237,14 $\pm$ 10,16	179,43 $\pm$ 8,08

Таблица 5.10

Клеточный состав селезенки интактных зрелых и старых мышей  
на 7 сутки ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Название клеточных элементов	Содержание клеток, 10 <sup>6</sup>	
	Зрелые	Старые
Общее число клеток	217,89 $\pm$ 4,52	156,71 $\pm$ 2,81
Лимфобласты	1,98 $\pm$ 0,05	1,49 $\pm$ 0,05
Пролимфоциты	9,26 $\pm$ 0,42	6,49 $\pm$ 0,50
Лимфоциты	152,43 $\pm$ 4,08	108,34 $\pm$ 2,28
Плазматические клетки	0,62 $\pm$ 0,09	0,39 $\pm$ 0,05
Макрофаги	6,46 $\pm$ 0,48	4,34 $\pm$ 0,32
Моноциты	2,55 $\pm$ 0,30	1,79 $\pm$ 0,15
Гранулоцитарные клетки	11,69 $\pm$ 0,82	9,46 $\pm$ 0,42
Эритроидные клетки	25,26 $\pm$ 0,91	18,06 $\pm$ 0,58
Прочие	7,66 $\pm$ 0,54	6,36 $\pm$ 0,59

В физиологических условиях на 7 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК при проведении морфометрического исследования селезенки зрелых и старых лабораторных мышей установлено, что изучаемые показатели: общая площадь лимфоидного фолликула, площадь Т-зоны лимфоидного фолликула, площадь В-зоны лимфоидного фолликула, площадь герминативного центра, общая клеточность красной пульпы существенно не отличались от данных, полученных в группе контроля (таблица 5.11).

Таблица 5.1

Морфометрические параметры селезенки зрелых и старых мышей на 7 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Площадь лимфоидного фолликула, (мкм <sup>2</sup> *10 <sup>5</sup> )	1,12±0,07	0,63±0,06
Площадь В-зоны (мкм <sup>2</sup> *10 <sup>5</sup> )	1,12±0,07	0,52±0,04
Площадь герминативной зоны лимфоидного фолликула, (мкм <sup>2</sup> *10 <sup>5</sup> )	0,17 ± 0,015	0,11 ± 0,009
Площадь Т-зоны (мкм <sup>2</sup> *10 <sup>5</sup> )	0,09±0,006	0,060±0,009
Расстояние между центрами фолликулов, мкм.	382,57±13,80	276,43±9,63
Общая клеточность красной пульпы в 0,01мм <sup>2</sup>	243,00±12,29	188,71±15,10

Анализ клеточного состава селезенки в обеих возрастных группах свидетельствует об отсутствии достоверных изменений изучаемых показателей после аллогенной трансплантации ММСК и ГСК (таблица 5.12).

Клеточный состав селезенки зрелых и старых мышей на 7 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Название клеточных элементов	Содержание клеток, $10^6$	
	Зрелые	Старые
Общее число клеток	$222,01 \pm 9,52$	$162,76 \pm 6,32$
Лимфобласты	$2,03 \pm 0,09$	$1,56 \pm 0,07$
Пролимфоциты	$9,43 \pm 0,53$	$6,63 \pm 0,15$
Лимфоциты	$156,29 \pm 7,67$	$113,29 \pm 5,10$
Плазматические клетки	$0,58 \pm 0,10$	$0,46 \pm 0,06$
Макрофаги	$6,53 \pm 0,46$	$4,67 \pm 0,53$
Моноциты	$2,43 \pm 0,29$	$1,73 \pm 0,23$
Гранулоцитарные клетки	$11,94 \pm 0,68$	$90,31 \pm 0,85$
Эритроидные клетки	$24,73 \pm 1,08$	$18,84 \pm 1,71$
Прочие	$8,04 \pm 0,55$	$6,28 \pm 0,78$

#### **5.4. Морфометрические и цитологические показатели селезенки зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК**

При проведении морфометрических исследований в селезенке на 7 сутки после воздействия ИИ в контрольной подгруппе выявлены схожие изменения. Так, было установлено, что площадь лимфоидного фолликула у зрелых и старых животных была соответственно на 27,9 % ( $p < 0,05$ ) и 25,1 % ( $p < 0,05$ ) меньше, чем в контрольной группе. При этом площадь герминативного центра оставалась соответственно на 30,4 % ( $p < 0,05$ ) и 27,9 % ( $p < 0,05$ ) ниже значений нормы.

При анализе площади тимуснезависимой зоны селезенки зрелых и старых животных установлено, что изучаемый показатель был на 18,4 % ( $p < 0,05$ ) и 22,0 % ( $p < 0,05$ ) меньше по сравнению с нормой. В то же время при изучении площади

T - зоны лимфоидного фолликула выявлено, что данный показатель был на 17,0 % ( $p < 0,05$ ) и 21,0% ( $p < 0,05$ ) меньше контрольных значений.

При изучении расстояния между центрами лимфоидных фолликулов зрелых и старых животных отмечено уменьшение этого расстояния на 19,0 % ( $p < 0,05$ ) и 19,4 % ( $p < 0,05$ ) относительно интактных животных.

При анализе общей клеточности красной пульпы в обеих возрастных группах выявлено существенное уменьшение изучаемого показателя относительно контроля соответственно на 21,3 % ( $p < 0,05$ ) и 18,2 % ( $p < 0,05$ ) (таблица 5.13).

Таблица 5.13

Морфометрические параметры селезенки зрелых и старых мышей на 7 сутки после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Площадь лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,80 \pm 0,04^*$	$0,45 \pm 0,07^\circ$
Площадь В-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,79 \pm 0,06^*$	$0,43 \pm 0,057^\circ$
Площадь герминативной зоны лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,12 \pm 0,02^*$	$0,09 \pm 0,009^\circ$
Площадь Т-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,07 \pm 0,07^*$	$0,045 \pm 0,007^\circ$
Расстояние между центрами фолликулов, мкм.	$304,57 \pm 10,33^*$	$226,71 \pm 3,67^\circ$
Общая клеточность красной пульпы в $0,01 \text{мм}^2$	$186,71 \pm 5,47^*$	$146,71 \pm 10,82^\circ$

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

Данные клеточного состава селезенки зрелых и старых животных подтверждают результаты, полученные при морфометрии селезенки. При этом было отмечено как снижение общего количества клеток в селезенке, так низкое содержание отдельных клеточных фракций (таблица 5.14).

Клеточный состав селезенки зрелых и старых мышей на 7 сутки  
после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ ).

Название клеточных элементов	Содержание клеток, $10^6$	
	Зрелые	Старые
Общее число клеток	$130,84 \pm 2,78^*$	$116,87 \pm 3,21^\circ$
Лимфобласты	$1,54 \pm 0,11^*$	$1,10 \pm 0,09^\circ$
Пролимфоциты	$6,34 \pm 0,29^*$	$4,65 \pm 0,30^\circ$
Лимфоциты	$82,97 \pm 3,05^*$	$79,17 \pm 3,40^\circ$
Плазматические клетки	$0,49 \pm 0,04^*$	$0,31 \pm 0,02^\circ$
Макрофаги	$5,20 \pm 0,29^*$	$3,60 \pm 0,20^\circ$
Моноциты	$1,93 \pm 0,24^*$	$1,46 \pm 0,04^\circ$
Гранулоцитарные клетки	$8,41 \pm 0,39^*$	$7,23 \pm 0,31^\circ$
Эритроидные клетки	$17,44 \pm 0,56^*$	$14,30 \pm 0,34^\circ$
Прочие	$6,13 \pm 0,40$	$5,04 \pm 0,35^\circ$

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .  $^\circ$  отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При проведении морфометрических исследований в селезенке зрелых животных на 7 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК установлено, что площадь лимфоидного фолликула была достоверно больше ( $1,06 \pm 0,05 \text{ мкм}^2 \cdot 10^5$ ,  $p < 0,05$ ), чем в контрольной подгруппе. При этом данный показатель восстановился до значений нормы. При анализе площади герминативного центра выявлен эффект от проведенной трансплантации ММСК и ГСК. Этот эффект был выражен в увеличении по сравнению с контрольной подгруппой изучаемого показателя до значений нормы (+ 33,1%,  $p < 0,05$ ). При анализе площади В-зоны обнаружено увеличение данного показателя после введения клеток ( $0,97 \pm 0,05 \text{ мкм}^2 \cdot 10^5$ ,  $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной подгруппой. Проводя сравнительный анализ с площадью В-зоны у интактных животных следует отметить, что произошло восстановление данного

показателя до значений нормы. При анализе площади Т-зоны в опытной подгруппе выявлено отсутствие эффекта от трансплантации стволовых клеток. При этом площадь Т-зоны достоверно не отличалась от значения в контрольной подгруппе и оставалась ниже значений нормы.

При анализе расстояния между центрами лимфоидных фолликулов установлено увеличение данного показателя относительно контрольной подгруппы ( $338,00 \pm 6,86$  мкм,  $p < 0,05$ ). В то же время данный показатель был меньше, чем у интактных животных.

При анализе плотности клеток в красной пульпе обнаружено увеличение изучаемого показателя по сравнению с контрольной подгруппой ( $224,57 \pm 6,65$  в  $0,01 \text{ мм}^2$ ,  $p < 0,05$ ). При этом данный показатель восстановился до значений нормы.

При проведении морфометрических исследований у старых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК выявлено, что площадь лимфоидного фолликула была достоверно меньше значений нормы.

При анализе площади В-зоны лимфоидного фолликула установлено, что не произошло восстановление изучаемого показателя до значений нормы и он был снижен на 20,4 % ( $p < 0,05$ ). Площадь герминативного центра лимфоидного фолликула восстановилась до значений нормы.

При анализе площади Т-зоны лимфоидного фолликула отмечено, что значение этого показателя существенно не отличалось от данных в контрольной подгруппе.

При анализе расстояния между центрами лимфоидных фолликулов отмечено увеличение данного показателя на 26,1% ( $p < 0,05$ ) относительно контрольной подгруппы и восстановление тем самым до значений нормы.

При анализе плотности клеток в красной пульпе селезенки обнаружен эффект от введения стволовых клеток, что было выражено в увеличении изучаемого показателя на 23,0 % по сравнению с контрольной подгруппой (до значений нормы) (таблица 5.15).

Морфометрические параметры селезенки зрелых и старых мышей на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Площадь лимфоидного фолликула, (мкм <sup>2</sup> *10 <sup>5</sup> )	1,06±0,05 **	0,50±0,05°
Площадь В-зоны (мкм <sup>2</sup> *10 <sup>5</sup> )	0,97±0,05**	0,44±0,044°
Площадь герминативной зоны лимфоидного фолликула, (мкм <sup>2</sup> *10 <sup>5</sup> )	0,17 ± 0,006 **	0,10 ± 0,01
Площадь Т-зоны (мкм <sup>2</sup> *10 <sup>5</sup> )	0,067±0,0079 *	0,046±0,005°
Расстояние между центрами фолликулов, мкм.	338,00±6,86* **	285,86±14,20°°
Общая клеточность красной пульпы в 0,01мм <sup>2</sup>	224,57±6,65 **	180,4±5,35°°

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . \*\* отличие от контрольной подгруппы зрелых животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ . ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . °° отличие от контрольной подгруппы старых животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе цитологического состава селезенки зрелых животных обнаружено увеличение общего количества клеток в данном органе на 56,4 % ( $p < 0,05$ ). Это увеличение было достигнуто за счет существенного повышения содержания лимфобластов (+ 28,7 %), пролимфоцитов (+ 32,66 %), лимфоцитов (+ 77,0 %), а также гранулоцитарных (+ 23,6 %) и эритроидных элементов (+ 29,4 %). При этом содержание плазматических клеток, моноцитов и макрофагов существенно не отличалось от значений нормы.

При анализе клеточности селезенки старых животных установлено, что данный показатель не восстановился и был снижен на 19,3 % ( $p < 0,05$ ). При изучении цитограммы селезенки обнаружено восстановление содержания до значений нормы лимфобластов, что в свою очередь подтверждает данные полученные при определении площади герминативного центра. В то же время

следует отметить, что содержание лимфоцитов, пролимфоцитов, плазматических клеток, макрофагов и моноцитов оставалось меньше значений нормы.

При определении количества гранулоцитов установлено восстановление этого показателя до значений нормы. Выраженный эффект от проведенной трансплантации ММСК и ГСК старым лабораторным животным наблюдался при определении количества эритроидных клеток. Их содержание существенно превышало аналогичный показатель в контрольной подгруппе (+19,6%) (таблица 5.16).

Таблица 5.16

Клеточный состав селезенки зрелых и старых мышей на 7 сутки после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК

( $M \pm m$ , n = 9)

Название клеточных элементов	Содержание клеток, $10^6$	
	Зрелые	Старые
Общее число клеток	$204,66 \pm 7,10^{**}$	$123,99 \pm 7,40^{\circ}$
Лимфобласты	$1,99 \pm 0,16^{**}$	$1,21 \pm 0,09$
Пролимфоциты	$8,41 \pm 0,72^{**}$	$5,17 \pm 0,16^{\circ}$
Лимфоциты	$146,86 \pm 6,98^{**}$	$81,10 \pm 6,91^{\circ}$
Плазматические клетки	$0,53 \pm 0,05$	$0,32 \pm 0,03^{\circ}$
Макрофаги	$5,41 \pm 0,26$	$3,67 \pm 0,20^{\circ}$
Моноциты	$2,04 \pm 0,24$	$1,46 \pm 0,08^{\circ}$
Гранулоцитарные клетки	$10,40 \pm 0,91^{**}$	$8,37 \pm 0,45$
Эритроидные клетки	$22,57 \pm 1,62^{**}$	$17,10 \pm 0,69^{\circ\circ}$
Прочие	$6,59 \pm 0,41$	$5,59 \pm 0,16$

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . \*\* отличие от контрольной подгруппы зрелых животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ .  $^{\circ}$  отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .  $^{\circ\circ}$  отличие от контрольной подгруппы старых животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ .

Таким образом, проведенные исследования по изучению действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК у зрелых животных выявили наличие определенных изменений в селезенке. Эти изменения были выражены в увеличении размеров лимфоидного фолликула за счет площади В-зоны фолликула, в том числе за счет увеличения площади герминативного центра фолликула. Эти изменения, установленные при проведении морфометрического исследования, соответствуют данным цитологического исследования. Так было отмечено восстановление содержания лимфобластов, пролимфоцитов и лимфоцитов. В изучаемые сроки происходит восстановление данных показателей до значений нормы. На фоне трансплантации ММСК и ГСК в условиях повреждающего фактора (ИИ) выявлены изменения и со стороны красной пульпы селезенки. Установлено увеличение плотности клеток в красной пульпе селезенки и, как следствие увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов. При этом, несмотря на наличие эффекта от проведения сочетанной трансплантации на 7 сутки не происходит полного восстановления показателя, характеризующего расстояние между центрами лимфоидных фолликулов до значений нормы. Увеличение плотности клеток в красной пульпе происходит как за счет увеличения содержания эритроидных клеток, так и за счет увеличения гранулоцитов.

Выявленные изменения могут быть обусловлены способностью ММСК вырабатывать антиапоптогенные факторы (NIF-1 $\alpha$ ), а также стимулировать экспрессию этих факторов другими клетками. Другой механизм действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК может быть обусловлен стимулирующим действием на гемопоэз в миелоидной ткани, что было показано нами ранее в проведенных исследованиях. Способность ММСК к выработке хемоаттрактанта для аллогенных и аутологичных ГСК (SDF-1) может усиливать миграцию последних в селезенку и индуцировать, таким образом, формирование различных типов колоний. Восстановление клеточного состава крови и последующая миграция этих элементов в селезенку может способствовать восстановлению клеточного состава органа.

У старых животных также обнаружены изменения на проведенную аллогенную трансплантацию ММСК и ГСК на 7 сутки после лучевой нагрузки. Эти изменения проявляются преимущественно со стороны красной пульпы. В белой пульпе происходит восстановление до значений нормы площади герминативного центра, а по данным цитологического метода восстановление абсолютного количества лимфобластов. Существенный эффект от трансплантации ММСК и ГСК проявляется в увеличении плотности клеток в красной пульпе. При этом по данным цитологического исследования отмечается значительное увеличение содержания эритроидных клеток в селезенке. Результатом обнаруженных изменений было увеличение диаметра лимфоидного фолликула.

Известно, что с возрастом происходит уменьшение способности к миграции, а также способности к дифференцировке КОЕс, расположенных в костном мозге. Усилить миграцию аллогенных и собственных КОЕс способны трансплантированные ММСК за счет выработки ими хемоаттрактанта для ГСК – SDF-1. Возможности трансплантированных ММСК усиливать синтез антиапоптогенных факторов (HIF-1 $\alpha$ ) может определить сохранение клеток в красной пульпе, что выявлялось как повышение плотности клеток в красной пульпе селезенки. Таким образом, через усиление хоуминга КОЕс, последующей активации экстрамедуллярного кроветворения в селезенке и реализацией антиапоптогенного действия ММСК можно объяснить восстановление некоторых морфометрических и цитологических показателей в селезенке у старых лабораторных животных в условиях лучевой нагрузки.

### 5.5. Морфометрические и цитологические показатели селезенки зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях

С целью изучения действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на морфометрические и цитологические показатели селезенки зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки в физиологических условиях были проведены исследования на интактных мышах (таблица 5.17, 5.18).

Таблица 5.17

Морфометрические параметры селезенки интактных зрелых и старых мышей на 5 сутки ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Площадь лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$1,11 \pm 0,05$	$0,61 \pm 0,04$
Площадь В-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$1,01 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,03$
Площадь герминативной зоны лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,18 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,008$
Площадь Т-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,09 \pm 0,003$	$0,05 \pm 0,007$
Расстояние между центрами фолликулов, мкм.	$382,57 \pm 9,06$	$284,43 \pm 6,94$
Общая клеточность красной пульпы в $0,01 \text{мм}^2$	$242,86 \pm 6,45$	$181,14 \pm 7,84$

Таблица 5.18

Клеточный состав селезенки интактных зрелых и старых мышей на 5 сутки ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Название клеточных элементов	Содержание клеток, $10^6$	
	Зрелые	Старые
Общее число клеток	$215,86 \pm 4,43$	$137,75 \pm 34,44$
Лимфобласты	$2,01 \pm 0,08$	$1,53 \pm 0,06$
Пролимфоциты	$9,49 \pm 0,56$	$6,77 \pm 0,37$
Лимфоциты	$150,86 \pm 4,16$	$109,63 \pm 2,50$
Плазматические клетки	$0,61 \pm 0,09$	$0,42 \pm 0,05$
Макрофаги	$6,40 \pm 0,54$	$4,47 \pm 0,37$
Моноциты	$2,47 \pm 0,31$	$1,85 \pm 0,16$
Гранулоцитарные клетки	$11,87 \pm 0,82$	$9,01 \pm 0,61$
Эритроидные клетки	$24,80 \pm 1,17$	$17,73 \pm 0,63$
Прочие	$7,36 \pm 0,41$	$6,01 \pm 0,59$

В физиологических условиях на 5 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК при проведении морфометрического исследования селезенки у зрелых и старых лабораторных мышей установлено, что изучаемые показатели: общая площадь лимфоидного фолликула, площадь В-зоны лимфоидного фолликула, площадь герминативного центра фолликула, площадь Т-зоны лимфоидного фолликула, общая клеточность красной пульпы существенно не отличались от данных, полученных в группе контроля (таблица 5.29).

Таблица 5.19

Морфометрические параметры селезенки зрелых и старых мышей на 5 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Площадь лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	1,08 $\pm$ 0,05	0,62 $\pm$ 0,05
Площадь В-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	0,94 $\pm$ 0,09	0,51 $\pm$ 0,04
Площадь герминативной зоны лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	0,18 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,009
Площадь Т-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	0,09 $\pm$ 0,005	0,06 $\pm$ 0,008
Расстояние между центрами фолликулов, мкм.	377,57 $\pm$ 6,94	279,00 $\pm$ 8,57
Общая клеточность красной пульпы в $0,01\text{мм}^2$	247,86 $\pm$ 5,63	178,00 $\pm$ 10,29

Анализ цитограммы селезенки зрелых и старых лабораторных животных свидетельствует об отсутствии существенного влияния сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на 5 сутки в физиологических условиях на содержание клеточных элементов в данном органе (таблица 5.20).

Клеточный состав селезенки зрелых и старых мышей на 5 сутки на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Название клеточных элементов	Содержание клеток, $10^6$	
	Зрелые	Старые
Общее число клеток	220,38 ± 8,38	162,10 ± 4,17
Лимфобласты	1,99 ± 0,08	1,55 ± 0,04
Пролимфоциты	9,29 ± 0,53	6,70 ± 0,26
Лимфоциты	154,71 ± 7,10	113,29 ± 2,53
Плазматические клетки	0,60 ± 0,07	0,41 ± 0,04
Макрофаги	6,43 ± 0,37	4,53 ± 0,42
Моноциты	2,37 ± 0,35	1,84 ± 0,23
Гранулоцитарные клетки	12,07 ± 0,75	9,47 ± 0,99
Эритроидные клетки	25,07 ± 1,15	18,19 ± 1,09
Прочие	7,84 ± 0,59	6,14 ± 0,78

### **5.6. Морфометрические и цитологические показатели регенерации селезенки зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК**

При анализе средней площади лимфоидного фолликула зрелых животных на 5 сутки после острой кровопотери в контрольной подгруппе выявлено увеличение изучаемого показателя относительно значений нормы на 25,3 % ( $1,39 \pm 0,04 \cdot 10^5 \text{ мкм}^2$ ,  $p < 0,05$ ). При изучении площади В – зоны лимфоидных фолликулов установлено существенное увеличение данного показателя относительно контроля ( $1,33 \pm 0,05 \cdot 10^5 \text{ мкм}^2$ ,  $p < 0,05$ ; +31,5 %). Также установлено увеличение площади герминативного центра фолликула на 25,4 % ( $p < 0,05$ ). В то же время при изучении площади периартериальной зоны отмечено отсутствие значимых изменений по сравнению с контролем.

При изучении среднего расстояния между центрами лимфоидных фолликулов отмечено, что данный показатель существенно не отличался от контрольных значений.

При анализе общей клеточности красной пульпы отмечено увеличение данного показателя по сравнению с контролем на 16,5 % ( $p < 0,05$ ).

На 5 сутки после острой кровопотери у старых лабораторных животных со стороны белой и красной пульпы селезенки обнаружены схожие изменения с ранее выявленными у зрелых животных. Так, было отмечено увеличение площади лимфоидного фолликула на 19,5 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой контроля (интактными животными).

При анализе площади герминативного центра и В- зоны лимфоидного фолликула установлено, что изучаемые показатели были увеличены соответственно на 21,9 % ( $p < 0,05$ ) и 21,7 % ( $p < 0,05$ ) относительно контроля.

При изучении площади Т- зоны лимфоидного фолликула выявлено отсутствие существенной разницы данного показателя по сравнению с группой контроля.

При анализе расстояния между центрами лимфоидных фолликулов, установлено отсутствие существенных изменений данного показателя по сравнению с контролем. В то же время при изучении общей клеточности красной пульпы показано увеличение данного показателя относительно контроля ( $215,14 \pm 5,88$  в  $0,01 \text{ мм}^2$ ,  $p < 0,05$ ; +20,45 %) (таблица 5.21).

Таблица 5.21

Морфометрические параметры селезенки зрелых и старых мышей  
на 5 сутки после острой кровопотери ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Площадь лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$1,39 \pm 0,04^*$	$0,73 \pm 0,05^\circ$
Площадь В-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$1,33 \pm 0,05^*$	$0,69 \pm 0,03^\circ$
Площадь герминативной зоны лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,23 \pm 0,02^*$	$0,14 \pm 0,007^\circ$
Площадь Т-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,09 \pm 0,008$	$0,06 \pm 0,007$
Расстояние между центрами фолликулов, мкм.	$417,14 \pm 16,12$	$329,86 \pm 10,41$
Общая клеточность красной пульпы в $0,01 \text{ мм}^2$	$283,00 \pm 19,43^*$	$215,14 \pm 5,88^\circ$

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .<sup>o</sup> отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

При изучении цитограммы селезенки зрелых мышей на 5 сутки после острой кровопотери выявлено увеличение содержания одних из основных элементов реактивного центра и мантийной зоны лимфатического фолликула – соответственно лимфобластов ( $2,50 \pm 0,23$ ,  $p < 0,05$ ; + 24,3 %) и пролимфоцитов ( $11,81 \pm 1,01$ ,  $p < 0,05$ ; + 24,5 %). Также доказано существенное увеличение количества эритроидных клеток на 35,4 %. В то же время следует отметить, что общая клеточность селезенки на 5 сутки после кровопотери достоверно не отличалась от контроля.

При анализе цитограммы старых животных после острой кровопотери отмечено увеличение содержания лимфобластов ( $1,89 \pm 0,08$ ,  $p < 0,05$ ; + 23,1 %), пролимфоцитов ( $8,29 \pm 0,49$ ,  $p < 0,05$ ; + 22,4 %), эритроидных клеток ( $22,36 \pm 1,60$ ,  $p < 0,05$ ; + 26,1 %) (таблица 5.22).

Таблица 5.22

Клеточный состав селезенки зрелых и старых мышей на 5 сутки после острой кровопотери ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Название клеточных элементов	Содержание клеток, $10^6$	
	Зрелые	Старые
Общее число клеток	$230,74 \pm 5,64$	$167,98 \pm 2,73$
Лимфобласты	$2,50 \pm 0,23^*$	$1,89 \pm 0,08^\circ$
Пролимфоциты	$11,81 \pm 1,01^*$	$8,29 \pm 0,49^\circ$
Лимфоциты	$152,14 \pm 7,27$	$111,39 \pm 2,04$
Плазматические клетки	$0,65 \pm 0,06$	$0,46 \pm 0,07$
Макрофаги	$7,06 \pm 0,55$	$5,09 \pm 0,78$
Моноциты	$2,74 \pm 0,38$	$1,92 \pm 0,17$
Гранулоцитарные клетки	$12,19 \pm 0,41$	$9,75 \pm 0,68$
Эритроидные клетки	$33,59 \pm 4,33^*$	$22,36 \pm 1,60^\circ$
Прочие	$8,07 \pm 0,65$	$6,84 \pm 1,09$

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .  $^\circ$  отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ .

На 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК при анализе площади лимфоидного фолликула установлен эффект от введения стволовых клеток – отмечено уменьшение изучаемого показателя на 25,72 % по сравнению с контрольной подгруппой. При этом площадь лимфоидного фолликула после введения ММСК и ГСК существенно не отличалась от значений нормы.

При анализе площади герминативного центра и В-зоны лимфоидного фолликула выявлено уменьшение изучаемых показателей относительно контрольной подгруппы соответственно на 32,89 % ( $p < 0,05$ ) и 19,98 % ( $p < 0,05$ ). В то же время данные показатели не отличались от значений нормы.

При изучении площади тимусзависимой зоны селезенки выявлено отсутствие эффекта от введения клеток.

При анализе расстояния между центрами фолликулов выявлено увеличение данного показателя по сравнению с контрольной подгруппой ( $518,86 \pm 32,73$  мкм; + 24,4 %,  $p < 0,05$ ).

При изучении клеточности красной пульпы отмечено увеличение данного показателя на 27,86 % относительно контрольной подгруппы.

У старых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК при анализе общей площади лимфоидного фолликула, а также площади его В-зоны установлено, что изучаемые показатели существенно не отличались от данных в контрольной подгруппе. При анализе площади тимусзависимой зоны не выявлено значимых различий по сравнению с контрольной подгруппой.

При анализе расстояния между герминативными центрами лимфоидных фолликулов отмечено увеличение данного показателя на 19,3 % ( $p < 0,05$ ). При анализе общей клеточности красной пульпы выявлен эффект от трансплантации ММСК и ГСК в виде увеличения изучаемого показателя относительно контрольной подгруппы на 20,5 % ( $p < 0,05$ ) (таблица 5.23).

Морфометрические параметры селезенки зрелых и старых мышей на 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК

( $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Параметр	Значение	
	Зрелые	Старые
Площадь лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$1,04 \pm 0,08^{**}$	$0,71 \pm 0,05$
Площадь В-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$1,07 \pm 0,10^{**}$	$0,66 \pm 0,05$
Площадь герминативной зоны лимфоидного фолликула, ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,15 \pm 0,013^{**}$	$0,13 \pm 0,005$
Площадь Т-зоны ( $\text{мкм}^2 \cdot 10^5$ )	$0,08 \pm 0,008$	$0,05 \pm 0,007$
Расстояние между центрами фолликулов, мкм.	$518,86 \pm 32,73^{* **}$	$392,29 \pm 14,33^{\circ \circ \circ}$
Общая клеточность красной пульпы в $0,01 \text{мм}^2$	$340,00 \pm 21,43^{* **}$	$259,14 \pm 12,20^{\circ \circ \circ}$

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . \*\* отличие от подгруппы зрелых животных (после острой кровопотери), достоверно с  $p < 0,05$ . ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . °° отличие от подгруппы старых животных (после острой кровопотери), достоверно с  $p < 0,05$ .

При анализе цитологической картины селезенки зрелых животных получены данные, подтверждающие результаты морфометрического метода исследования. Было отмечено снижение содержания лимфобластов и пролимфоцитов соответственно на 34,86 % ( $p < 0,05$ ) и 25,25 % ( $p < 0,05$ ). В то же время доказано увеличение количества гранулоцитов и эритроидных клеток соответственно на 32,36 % ( $p < 0,05$ ) и 46,6 % ( $p < 0,05$ ). При этом содержание моноцитов не отличалось от контрольных значений. Общая клеточность селезенки соответствовала значениям нормы.

У старых лабораторных животных при изучении клеточного состава селезенки выявлено повышение содержания эритроидных элементов на 32,2 % относительно контроля. При этом общая клеточность селезенки и содержание отдельных фракций клеток достоверно не отличалось от значений нормы (таблица 5.24).

Клеточный состав селезенки зрелых и старых мышей на 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК

( $M \pm m$ , n = 9)

Название клеточных элементов	Содержание клеток, $10^6$	
	Зрелые	Старые
Общее число клеток	244,93 ± 3,05	171,24 ± 2,38
Лимфобласты	1,63 ± 0,17 **	1,67 ± 0,04
Пролимфоциты	8,83 ± 0,40 **	7,39 ± 0,33
Лимфоциты	150,43 ± 4,50	110,31 ± 2,23
Плазматические клетки	0,62 ± 0,05	0,44 ± 0,04
Макрофаги	6,51 ± 0,69	4,64 ± 0,08
Моноциты	2,65 ± 0,06	1,86 ± 0,14
Гранулоцитарные клетки	16,13 ± 0,78**	8,60 ± 1,05
Эритроидные клетки	49,23 ± 3,28 **	29,56 ± 2,00 <sup>°°</sup>
Прочие	8,90 ± 0,72	6,76 ± 0,38

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . \*\* отличие от подгруппы зрелых животных (после острой кровопотери), достоверно с  $p < 0,05$ . ° отличие от группы старых интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ . °° отличие от подгруппы старых животных (после острой кровопотери), достоверно с  $p < 0,05$ .

Таким образом, полученные данные при проведении морфометрических исследований в селезенке зрелых и старых животных после острой кровопотери на фоне трансплантации ММСК и ГСК свидетельствуют о наличии эффекта от трансплантации клеток. Это действие у зрелых животных выражается в уменьшении площади лимфоидного фолликула за счет уменьшения площади В-зоны селезенки, так как площадь тимусзависимой зоны существенно не отличалась от данных в контрольной подгруппе. Данный эффект можно объяснить иммуносупрессивными способностями ММСК через выработку ряда факторов (iNO-синтетаза, ЦОГ-2, TGFβ), снижающих способность Т и В лимфоцитов к пролиферации. У старых лабораторных животных иммуносупрессивный эффект не был выражен в такой степени как у зрелых животных. Это может быть обусловлено снижением способности аллогенных и

аутологичных стволовых клеток с возрастом к хоумингу. Со стороны красной пульпы ответ на трансплантацию был более выражен у зрелых животных. При этом увеличение плотности клеток в красной пульпе было обусловлено повышением содержания лейкоцитов и эритроидных элементов. У старых животных повышение плотности клеток в красной пульпе вызвано увеличением количества преимущественно эритроидных клеток. Восстановление клеточности селезенки в обеих возрастных группах вызвано как миграцией трансплантированных стволовых клеток, так и хоумингом собственных клеток с последующей стимуляцией экстрамедуллярного кроветворения.

### 5.7. Заключение

Проведенные исследования позволили установить влияние сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК на регенерацию селезенки зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях, а также в условиях воздействия ионизирующего излучения и острой кровопотери.

В проведенных исследованиях, было доказано, что совместное внутривенное введение стволовых плацентарных клеток ММСК и ГСК в физиологических условиях на 1, 5 и 7 сутки не приводит к изменению основных морфометрических и цитологических показателей селезенки. После облучения зрелых и старых лабораторных животных в дозе 4,0 Гр установлено уменьшение изучаемых морфометрических показателей селезенки: общей площади лимфоидного фолликула, площади Т-зоны лимфоидного фолликула, площади герминативного центра, площади В-зоны лимфоидного фолликула, расстояния между центрами лимфоидных фолликулов, общей клеточности красной пульпы. Данные цитограммы также свидетельствуют, что в обеих возрастных группах на 1 сутки происходит снижение содержания всех клеточных элементов. Это приводит в свою очередь к снижению общей клеточности селезенки. Уменьшение количества клеточных элементов в селезенке происходит как вследствие прямого цитотоксического действия ИИ, так и в результате развития стресс-реакции на воздействие экстремального фактора. Полученные данные в селезенке

согласуются с описанными ранее изменениями в миелоидной ткани и периферической крови.

В этих условиях на 1 сутки после трансплантации ММСК и ГСК зрелым животным выявлено увеличение клеточности красной пульпы. При этом у старых лабораторных животных на 1 сутки после лучевой нагрузки эффекта от трансплантации ММСК и ГСК не отмечено (рисунок 5.1).

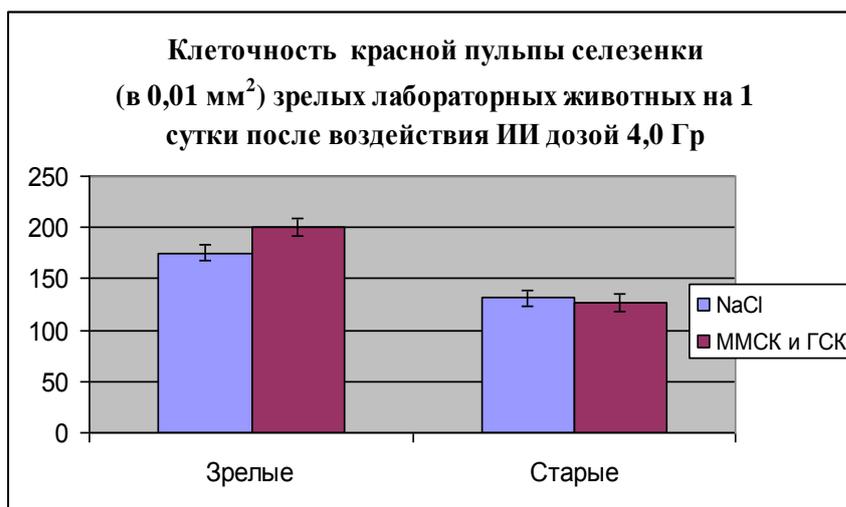


Рисунок 5.1

Значительные изменения в белой и красной пульпе селезенки в обеих возрастных группах происходят на 7 сутки после облучения на фоне трансплантации ММСК и ГСК. Со стороны белой пульпы у зрелых животных увеличивается площадь лимфоидного фолликула за счет увеличения площади герминативного центра фолликула, увеличения площади В-зоны. Реакция со стороны реактивного центра фолликула свидетельствует о том, что увеличение площади лимфоидного фолликула может быть обусловлена не только за счет миграции клеток крови в селезенку с последующим заселением ими соответствующих зон, но и за счет стимуляции пролиферативных процессов в белой пульпе. Это подтверждают данные цитологического исследования, согласно которым увеличивается количество лимфобластов, пролимфоцитов и лимфоцитов.

В красной пульпе зрелых животных значительно увеличивается плотность клеток. При этом данные цитологического исследования свидетельствуют о

существенном увеличении количества эритроидных клеток и гранулоцитов. Указанные показатели восстанавливаются на фоне введения ММСК и ГСК до значений нормы. Содержание моноцитов и макрофагов в этот период также достоверно не отличается от значений нормы. Эти изменения в итоге приводят к увеличению общей клеточности селезенки. Следствием описанных изменений становится увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов. Однако данный показатель не достигает к 7 суткам значений нормы.

У старых лабораторных животных по данным морфометрического метода и цитограммы селезенки наблюдается иная от зрелых животных картина регенерации селезенки. Так, в белой пульпе установлено менее выраженное действие сочетанной трансплантации на состояние белой пульпы селезенки. В данном случае площадь лимфоидного фолликула, а также площадь тимусзависимой и тимуснезависимой зон не отличается от значений в контрольной подгруппе (рисунок 5.2, рисунок 5.3). При этом при анализе клеточного состава селезенки установлено низкое содержание пролимфоцитов, лимфоцитов и лимфобластов. Однако следует отметить восстановление до значений нормы площади герминативного центра и восстановление до значений нормы количества лимфобластов, что может свидетельствовать об активации пролиферативных процессов в белой пульпе. В красной пульпе селезенки старых животных увеличивается плотность клеток, что обусловлено существенным увеличением эритроидных клеток. Увеличение количества эритроидных клеток и восстановление количества лимфобластов на фоне снижения остальных клеточных элементов не привело к восстановлению общей численности клеток в селезенке, и она оставалась достоверно меньше значений нормы (рисунок 5.4, рисунок 5.5).

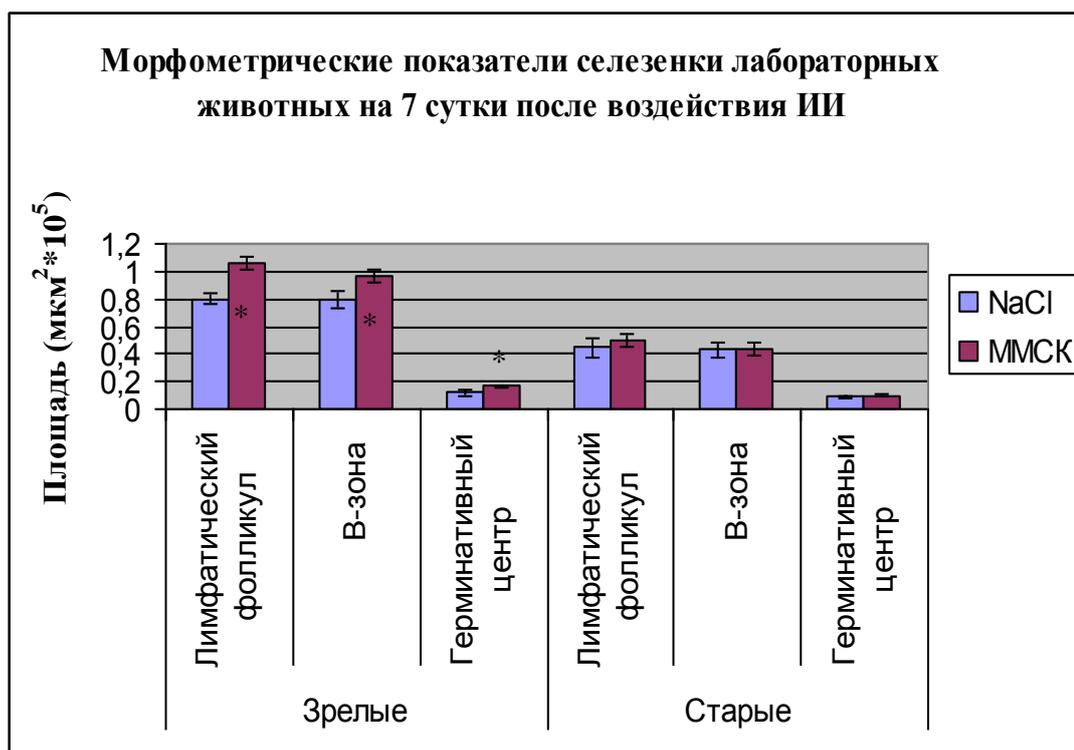


Рисунок 5.2

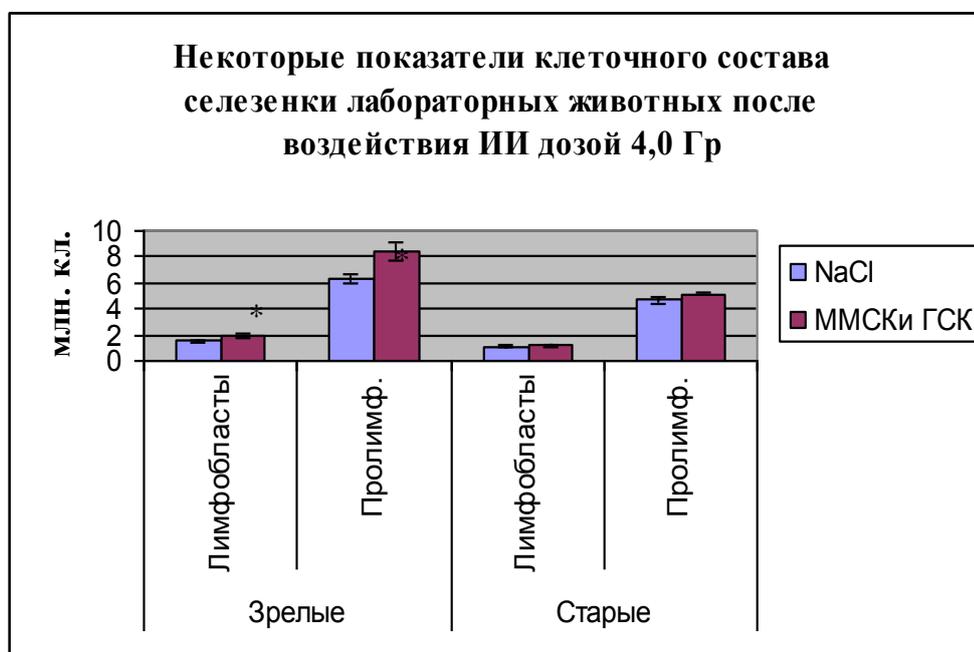


Рисунок 5.3

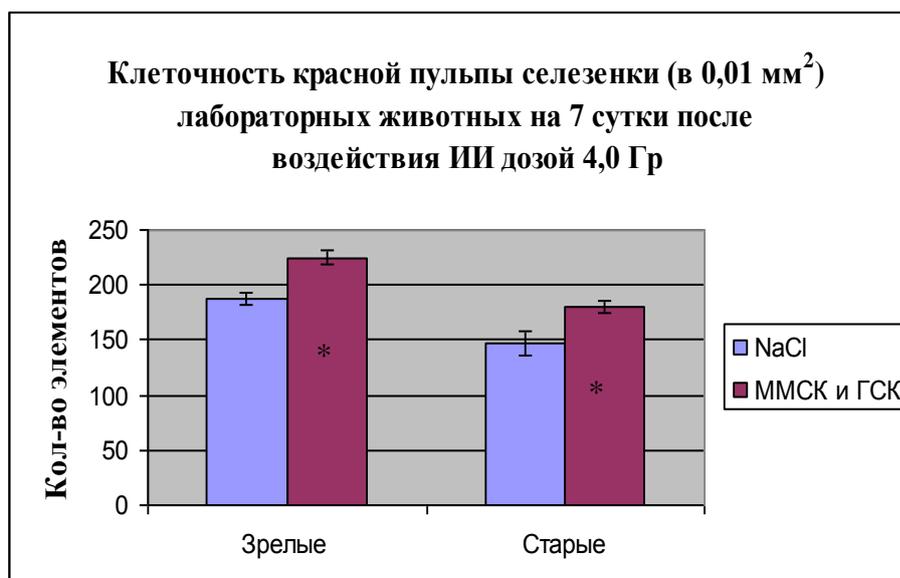


Рисунок 5.4

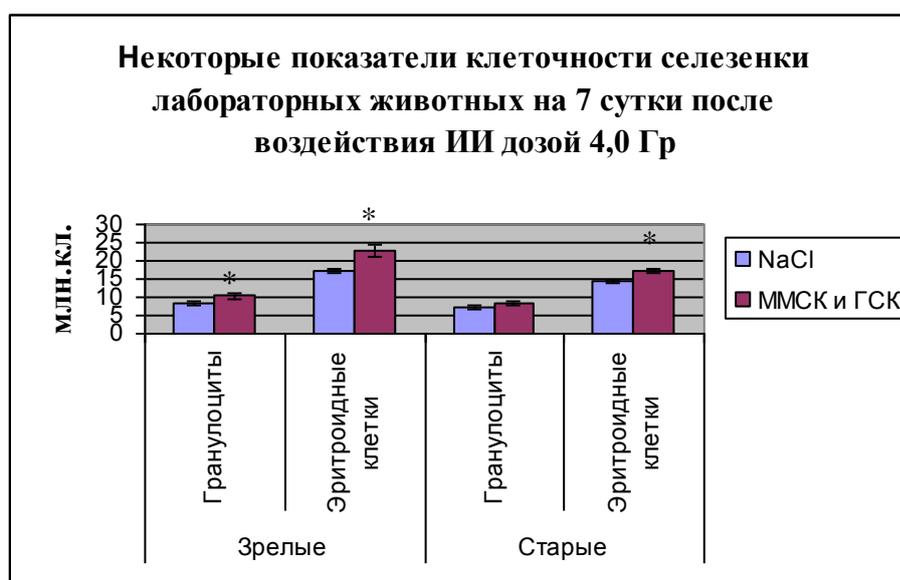


Рисунок 5.5

После моделирования острой кровопотери на 5 сутки у зрелых и старых лабораторных животных выявлено увеличение площади лимфоидного фолликула, площади зоны роста фолликула, а также площади тимуснезависимой зоны фолликула. При этом площадь Т-зоны восстановилась до значений нормы. Обнаружено увеличение общей клеточности красной пульпы. Это обусловлено по данным цитогаммы селезенки увеличением содержания лимфобластов, пролимфоцитов и эритроидных клеток. Данные изменения можно объяснить

процессами миграции форменных элементов крови в селезенку, а также активацией гемопоэза в данном органе. В условиях повреждения в ответ на выброс гормонов первой и второй стадии стресса усиливается миграция из костного мозга стволовых клеток крови (КОЕс) запускающих формирование колоний у данных лабораторных животных. Указанные механизмы определяют выявленные нами морфометрические изменения в селезенке в условиях острой кровопотери и, в целом, согласуются с данными ранее полученными другими авторами.

Установлены различия морфометрических показателей селезенки белой пульпы зрелых и старых животных после трансплантации плацентарных ММСК и ГСК. Так, у зрелых в отличие от старых животных общая площадь лимфоидного фолликула, площадь герминативного центра и площадь В-зоны были достоверно меньше, чем в группе животных, которым не проводилась трансплантация ММСК и ГСК (рисунок 5.6). У старых животных не выявлено значимого действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в условиях острой кровопотери на данные показатели. Эти изменения можно объяснить иммуносупрессивными свойствами трансплантированных ММСК. Возможность более выраженного иммуносупрессивного эффекта у зрелых животных относительно старых можно объяснить снижением способности к хоумингу трансплантированных клеток в старом организме. По данным цитограммы селезенки у зрелых лабораторных животных отмечалось снижение количества лимфобластов, пролимфоцитов в органе (рисунок 5.7).



Рисунок 5.6

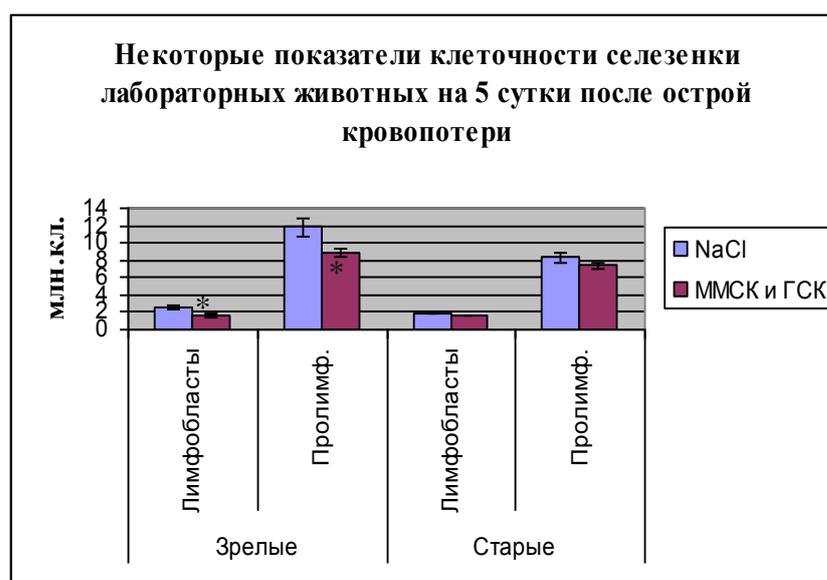


Рисунок 5.7

Изменения в красной пульпе селезенки в обеих возрастных группах характеризовались увеличением расстояния между центрами лимфоидных фолликулов, увеличением плотности клеток. В то же время в красной пульпе установлены возраст зависимые различия на проведенную трансплантацию MMCK и ГСК (рисунок 5.8). У зрелых животных по данным цитограммы значительно увеличилось количество, как гранулоцитов, так и эритроидных

клеток (рисунок 5.9). У старых животных доказано увеличение содержания эритроидных клеток без изменений со стороны количества других фракций клеток.

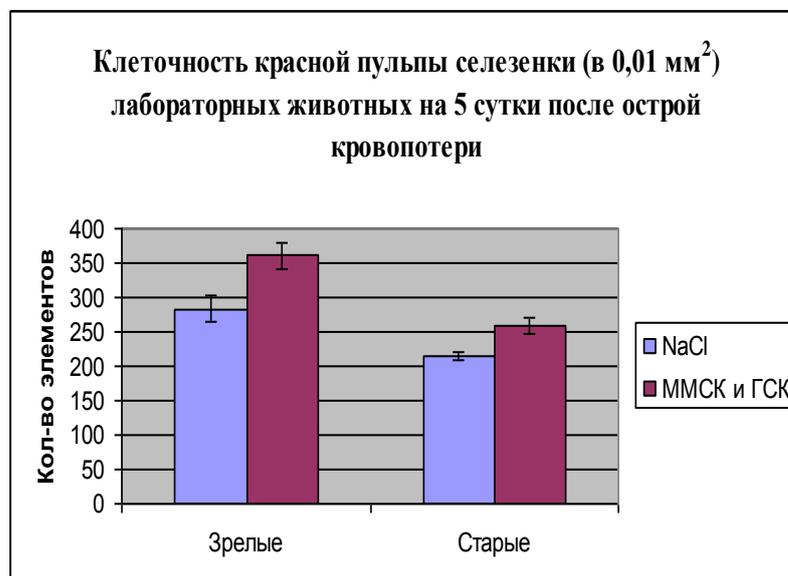


Рисунок 5.8

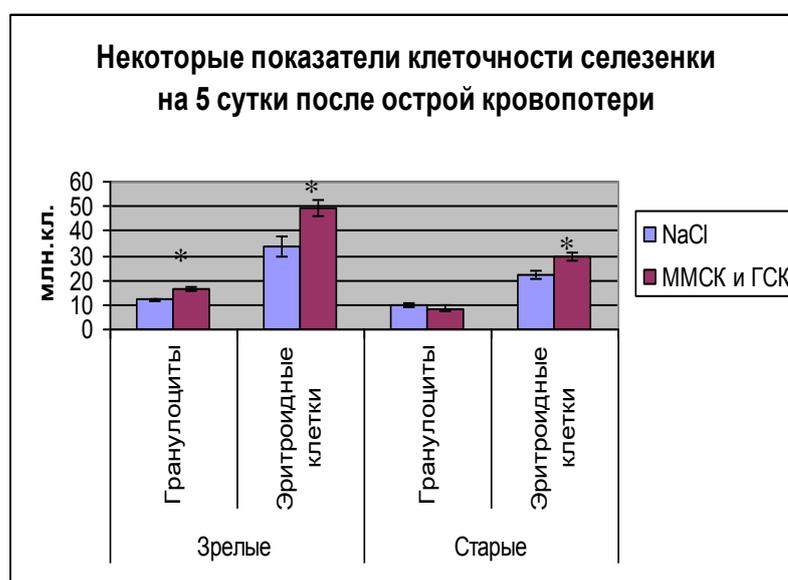


Рисунок 5.9

Важно учитывать, что способность к миграции и дифференцировке аутологичных КОЕс у старых лабораторных животных существенно ниже, чем в зрелом возрасте (А.В. Сидоренко, 1985). Трансплантируемые ММСК способны усиливать миграцию ГСК (в данном случае КОЕс) в ткань селезенки из костного мозга за счет секреции хемоаттрактанта (SDF-1). Это действие может развиваться

как в отношении собственных КОЕс, так и трансплантированных ГСК, что определяет включение более выраженных компенсаторных механизмов в селезенке старых животных в ответ на острую кровопотерю. Иммуносупрессивный эффект ММСК, позволяет проводить аллогенную трансплантацию стволовых клеток с уменьшением вероятности развития иммунологических конфликтов.

## ГЛАВА 6.

### ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЛАЦЕНТАРНЫХ ММСК И ГСК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ЭПИТЕЛИЯ ТОЩЕЙ КИШКИ ЗРЕЛЫХ И СТАРЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ И В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ.

С целью оценки состояния регенерации эпителия тощей кишки в физиологических условиях, а также после воздействия ионизирующего излучения и острой кровопотери проводилось определение пролиферативной активности криптального эпителия тощей кишки, запрограммированной гибели эпителиоцитов, а также среднее содержание эпителиоцитов в 1 крипте.

#### 6.1. Состояние регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 1 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях

С целью изучения действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на регенерацию эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях были определены показатели интактных мышей (таблица 6.1).

Таблица 6.1

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки зрелых и старых интактных лабораторных мышей,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Пролиферативный индекс, %	22,67±1,78	15,50±2,17
Апoptотический индекс, %	14,50±1,83	17,00±3,33
Средняя клеточность 1 крипты	40,40±4,10	27,78±2,08

Проведенные морфометрические исследования препаратов слизистой оболочки кишечника зрелых и старых лабораторных животных показали

отсутствие значимых изменений в пролиферативной активности эпителиоцитов крипт, выраженности запрограммированной клеточной гибели эпителиоцитов тощей кишки, а также в содержании эпителиоцитов крипт относительно контроля (таблица 6.2).

Таблица 6.2

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных мышей на 1 сутки на фоне сочетанной трансплантации

ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Пролиферативный индекс, %	22,67±2,00	14,50±2,17
Апоптотический индекс, %	14,83±1,17	16,50±3,35
Средняя клеточность 1 крипты	41,38±3,88	28,95±3,33

### **6.2. Состояние регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 1 сутки после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК**

При анализе пролиферативного индекса Ki-67 в эпителиоцитах крипт зрелых лабораторных животных выявлено угнетение пролиферативной активности (ИП: 14,43±1,50 %,  $p < 0,05$ ) на 36,3 % относительно контроля. В то же время зафиксировано существенное увеличение уровня запрограммированной гибели клеток (АИ: 40,14±2,33 %,  $p < 0,05$ ). Указанные изменения соответствовали снижению значения показателя, характеризующего среднюю клеточность 1 крипты (СКК: 20,56±1,17,  $p < 0,05$ ), данный показатель был на 49,1 % меньше контрольных значений.

У старых животных при гистологическом исследовании слизистой оболочки кишечника на 1 сутки после воздействия ИИ в дозе 4,0 Гр выявлено снижение индекса пролиферации Ki-67 (- 43,01%,  $p < 0,05$ ), обнаружено существенное увеличение выраженности апоптоза. Следствием выявленных нарушений было снижение количества клеток в криптах (- 35,45 %,  $p < 0,05$ ) (таблица 6.3).

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки зрелых лабораторных мышей на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Пролиферативный индекс, %	14,43±1,50*	8,83±1,61°
Апоптотический индекс, %	40,14±2,33*	43,83±5,17°
Средняя клеточность 1 крипты	20,56±1,17*	17,93±1,37°

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ . ° отличие от группы старых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ .

При проведении морфометрического исследования выявлен эффект от проведенной сочетанной трансплантации у старых лабораторных животных на 1 сутки после лучевой нагрузки. Этот эффект был выражен в угнетении запрограммированной клеточной гибели на 21,67 % относительно контрольной подгруппы. Тем не менее, выраженность апоптоза оставалась существенно выше значений нормы. Несмотря на антиапоптогенное действие сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на 1 сутки после воздействия ИИ общее содержание эпителиоцитов крипт не отличалось от аналогичного показателя в контрольной подгруппе, и было меньше значений нормы.

У зрелых животных при определении пролиферативного индекса Ki-67 в эпителиоцитах крипт, подсчете эпителиоцитов в состоянии апоптоза, подсчете средней клеточности в 1 крипте не выявлено значимых отличий изучаемых показателей относительно контрольной подгруппы (таблица 6.4).

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки зрелых лабораторных мышей на 1 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Пролиферативный индекс, %	14,14±1,56*	9,33±1,33°
Апоптотический индекс, %	40,71±3,00*	34,33±3,22°°
Средняя клеточность 1 крипты	19,67±1,17*	17,62±2,08°

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ . ° отличие от группы старых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ . °° отличие от контрольной подгруппы старых животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ .

Таким образом, проведенные исследования на зрелых и старых лабораторных мышах выявили эффект от проведенной трансплантации ММСК и ГСК на 1 сутки. У старых животных этот эффект реализуется в условиях воздействия ИИ и выражается в угнетении запрограммированной клеточной гибели клеток. В то же время в физиологических условиях в обеих возрастных группах в эпителии тощей кишки не выявлено значимого действия от проведенной сочетанной трансплантации клеток (рис.6.1, 6.2).

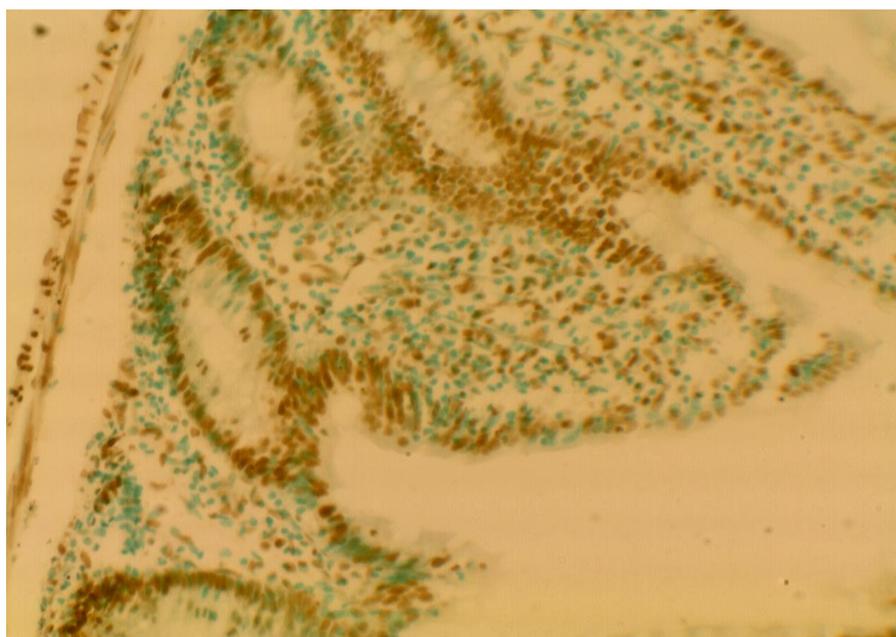


Рисунок 6.1. Апоптоз эпителия тощей кишки старых мышей на 1 сутки после воздействия ИИ. Микрофотография ув. x100.

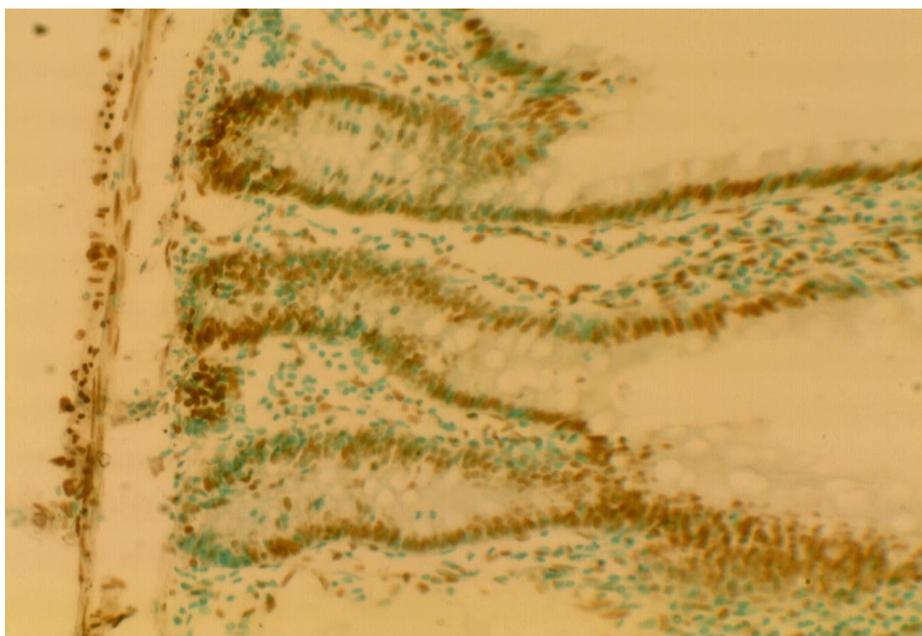


Рисунок. 6.2. Апоптоз эпителия тощей кишки зрелых мышей на 1 сутки после воздействия ИИ. Микрофотография ув. x100.

### **6.3. Состояние регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях**

С целью изучения действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на регенерацию эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях были определены показатели интактных мышей (таблица 6.5).

Таблица 6.5

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки зрелых и старых интактных лабораторных животных,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Прорлиферативный индекс, %	23,00±2,00	16,25±3,06
Апоптотический индекс, %	13,67±1,33	17,88±2,16
Средняя клеточность 1 крипты	43,02±3,28	27,39±1,90

При изучении обзорной гистологической картины стенки тощей кишки зрелых лабораторных животных на 5 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК установлено повышение пролиферативной активности по Ki-67 на

22,5 % относительно группы контроля. При этом количество клеток в состоянии апоптоза и средняя клеточность крипты существенно не изменились относительно значений нормы.

Иная картина наблюдалась при изучении гистологических препаратов тощей кишки старых лабораторных животных. Так, при определении величины апоптотического индекса на 5 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК обнаружено его достоверное снижение по сравнению с уровнем контрольных значений на 21,7 %. При подсчете индекса пролиферации Ki-67, а также при определении средней клеточности 1 крипты выявлено отсутствие значимой разницы изучаемых показателей по сравнению с контролем (таблица 6.6).

Таблица 6.6

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и

ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Пролиферативный индекс, %	28,17±3,22*	14,86±1,88
Апоптотический индекс, %	14,00±1,67	14,00±0,86°
Средняя клеточность 1 крипты	41,97±3,00	26,44±4,20

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ . ° отличие от группы старых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ .

#### **6.4. Состояние регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в физиологических условиях**

С целью изучения действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на регенерацию эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях были определены показатели интактных мышей (таблица 6.7).

Таблица 6.7

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки зрелых и старых интактных лабораторных мышей,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения	
	Зрелые	Старые
Пролиферативный индекс, %	22,00±2,00	17,17±2,17
Апоптотический индекс, %	14,83±1,50	16,17±1,17
Средняя клеточность 1 крипты	41,58±3,88	25,68±2,49

При проведении морфометрических исследований в тощей кишке на 7 сутки после трансплантации ММСК и ГСК у зрелых животных выявлен пролиферативный эффект на проведенную сочетанную трансплантацию клеток (ИП: 30,33±3,11%,  $p < 0,05$ ). Также установлено повышение количества эпителиоцитов крипт на 27,8% относительно контрольной группы. При этом уровень апоптоза оставался в пределах значений нормы.

У старых животных проведенные морфометрические исследования препаратов слизистой оболочки тощей кишки показали, что число клеток в состоянии апоптоза существенно уменьшилось (- 22,7%; АИ: 12,50±0,83%,  $p < 0,05$ ). В то же время пролиферативная активность достоверно не отличалась от контрольных значений. При определении средней клеточности 1 крипты выявлено увеличение данного показателя относительно контроля на 38,9% (СКК: 35,57±3,04%,  $p < 0,05$ ) (таблица 6.8).

Таблица 6.8

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значение	
	Зрелые	Старые
Пролиферативный индекс, %	30,33±3,11*	16,17±2,56
Апоптотический индекс, %	14,17±0,89	12,50±0,83°
Средняя клеточность 1 крипты	53,13±4,37*	35,57±3,04°

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ . ° отличие от группы старых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ .

### 6.5. Состояние регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК

При морфометрическом исследовании слизистой оболочки тощей кишки зрелых мышей на 7 сутки после воздействия ИИ выявлено восстановление до значений нормы пролиферативной активности эпителиоцитов. Однако уровень запрограммированной гибели клеток оставался повышенным (АИ:  $34,29 \pm 4,50$  %,  $p < 0,05$ ). Содержание эпителиоцитов крипт было на 34,3 % (СКК:  $27,34 \pm 2,43$ ,  $p < 0,05$ ) меньше, чем в контроле.

В то же время у старых животных при проведении морфометрического исследования гистологических препаратов тощей кишки также отмечено восстановление индекса пролиферации эпителиоцитов крипт до значений нормы и повышенное содержание клеток в состоянии апоптоза (АИ:  $34,67 \pm 3,67$  %,  $p < 0,05$ ). К 7 суткам после воздействия ИИ не произошло восстановления количества клеток в криптах, их содержание было на 18,2 % меньше значений интактных животных (таблица 6.9).

Таблица 6.9

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значения	
	Зрелых	Старых
Пролиферативный индекс, %	$25,00 \pm 2,50$	$15,50 \pm 1,83$
Апоптотический индекс, %	$34,29 \pm 4,50^*$	$34,67 \pm 3,67^\circ$
Средняя клеточность 1 крипты	$27,34 \pm 2,43^*$	$21,02 \pm 1,18$

Примечание: \* отличие от группы зрелых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ . ° отличие от группы старых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ .

При морфометрическом исследовании слизистой оболочки тощей кишки зрелых животных на 7 сутки после ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК установлен пролиферативный ответ со стороны эпителиоцитов

крипт на сочетанную трансплантацию клеток (ИП:  $33,86 \pm 3,11$  %,  $p < 0,05$ ; + 35,4 % по сравнению с контрольной подгруппой). При подсчете клеток в состоянии апоптоза выявлено, что содержание таких клеток восстановилось до значений нормы и на 46,7 % было меньше, чем в контрольной подгруппе. Указанные изменения соответствовали восстановлению содержания эпителиоцитов крипт до значений нормы.

В то же время у старых животных на фоне введения ММСК и ГСК при гистологическом исследовании слизистой оболочки кишечника выявлено восстановление пролиферативной активности эпителиоцитов крипт до значений нормы. При подсчете клеток в состоянии апоптоза установлено снижение уровня запрограммированной клеточной гибели до значений нормы. При этом уровень апоптоза был на 50,5 % ниже, чем в контрольной подгруппе. Следует отметить, что произошло восстановление содержания эпителиоцитов крипт до значений нормы. Данный показатель был на 38,5 % больше, чем в контрольной подгруппе (таблица 6.10), (рис. 6.3, 6.4).

Таблица 6.10

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значение	
	Зрелые	Старые
Пролиферативный индекс, %	$33,86 \pm 3,11^{**}$	$17,33 \pm 3,44$
Апоптотический индекс, %	$18,29 \pm 4,56^{**}$	$17,17 \pm 2,83^{**}$
Средняя клеточность 1 крипты	$34,69 \pm 2,48^{**}$	$27,50 \pm 1,77^{**}$

Примечание: \*\* отличие от подгруппы зрелых лабораторных животных (после воздействия ИИ) дозой 4,0 Гр, достоверно с  $p < 0,05$ . ° отличие от контрольной подгруппы старых животных (после воздействия ИИ), достоверно с  $p < 0,05$ .

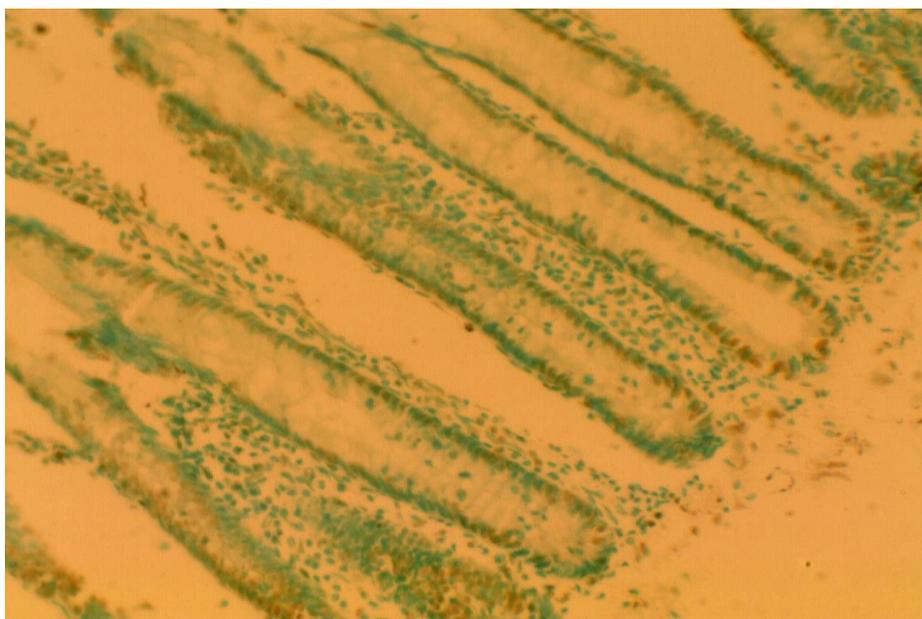


Рисунок. 6.3. Апоптоз эпителия тощей кишки старых мышей на 7 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (330 тыс. клеток/кг). Микрофотография ув. x100.

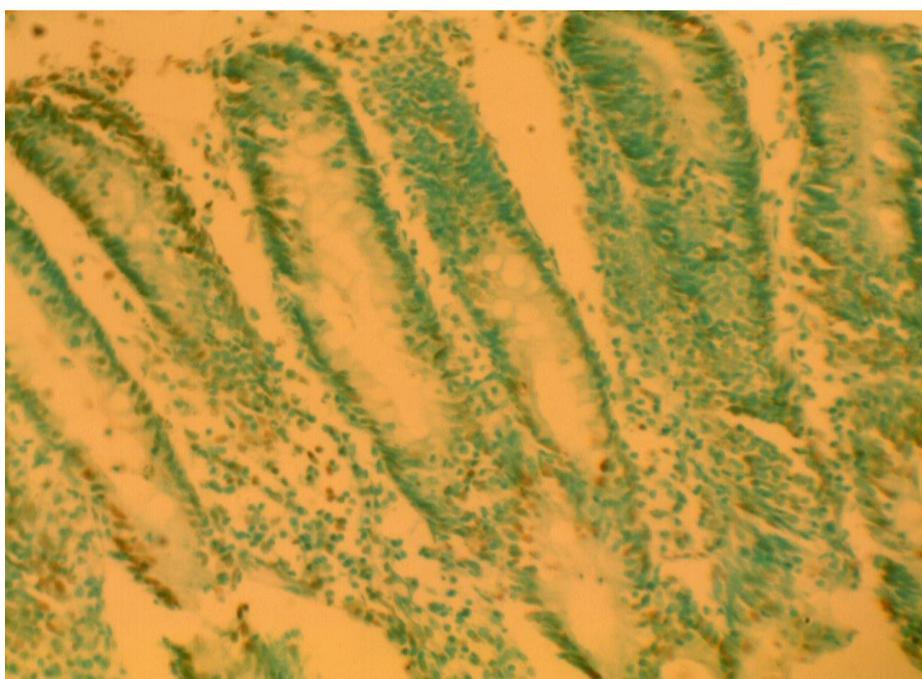


Рис. 6.4. Апоптоз эпителия тощей кишки зрелых мышей на 7 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК (6 млн.клеток/кг) и ГСК (330 тыс. клеток/кг). Микрофотография ув. x100.

### 6.6. Состояние регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК

При проведении морфометрических исследований слизистой оболочки тощей кишки на 5 сутки после острой кровопотери у зрелых и старых лабораторных мышей установлено достоверное снижение индекса пролиферации криптального эпителия в ответ на острую кровопотерю соответственно на 29,2 % и 24,4 %. В обеих изучаемых возрастных группах при подсчете клеток в состоянии апоптоза выявлено, что их содержание превышало значения нормы. Указанные изменения привели к изменению клеточности крипт. Так, было отмечено, что средняя клеточность 1 крипты у зрелых животных была на 35,7 %, а у старых животных на 26,7 % меньше, чем в контроле (таблица 6.11).

Таблица 6.11

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери,

$$M \pm m, n = 9$$

Параметры	Значение	
	Зрелые	Старые
Пролиферативный индекс, %	16,29±0,90*	12,29±2,53°
Апоптотический индекс, %	35,29±4,24*	37,00±2,86°
Средняя клеточность 1 крипты	27,67±1,82*	20,07±2,31°

Примечание: \*отличие от группы зрелых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ . °отличие от группы старых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ .

При проведении морфометрического исследования гистологических препаратов тощей кишки у зрелых животных на 5 сутки после острой кровопотери обнаружен пролиферативный ответ на проведенную трансплантацию клеток. При этом пролиферативный индекс был существенно больше, чем в контрольной подгруппе и соответствовал значениям нормы. В то же время при подсчете клеток в состоянии апоптоза выявлено, что апоптотический индекс был существенно меньше, чем в контрольной подгруппе. Тем не менее, содержание клеток в состоянии апоптоза к 5 суткам не восстановилось и было выше значений

нормы. Указанные изменения привели к увеличению количества эпителиоцитов крипт относительно контрольной подгруппы на 30,1 %.

В то же время у старых животных на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК при проведении морфометрических исследований в гистологических срезах тощей кишки отмечено увеличение содержания эпителиоцитов крипт на + 34,16 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной подгруппой. При подсчете пролиферативного индекса установлено восстановление митотической активности до значений нормы, подобный эффект был обнаружен и в контрольной подгруппе. При подсчете клеток в состоянии апоптоза отмечено антиапоптогенное действие сочетанной трансплантации клеток, что было выражено в существенном уменьшении значения апоптотического индекса на 29,3 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной подгруппой (таблица 6.12).

Таблица 6.12

Показатели регенераторной активности эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК,  $M \pm m$ ,  $n = 9$

Параметры	Значение	
	Зрелые	Старые
Пролиферативный индекс, %	23,29±3,00**	15,14±2,67
Апоптотический индекс, %	23,43±3,67* **	26,14±3,50°°
Средняя клеточность 1 крипты	36,00±1,53**	26,93±1,82°°

Примечание: \*отличие от группы зрелых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ . \*\* отличие от подгруппы зрелых животных (после острой кровопотери), достоверно с  $p < 0,05$ . °отличие от группы старых интактных животных (контрольная группа), достоверно с  $p < 0,05$ . °° отличие от подгруппы старых животных (после острой кровопотери), достоверно с  $p < 0,05$ .

### 6.7. Заключение

Проведенные исследования позволили установить влияние сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК на регенерацию эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных в физиологических условиях, а также в условиях воздействия ионизирующего излучения и острой кровопотери.

Было установлено, что в физиологических условиях на 1 сутки аллогенная трансплантация плацентарных ММСК и ГСК у зрелых и старых лабораторных животных не оказывает существенного влияния на пролиферативную активность эпителиоцитов крипт, на уровень запрограммированной гибели эпителия тощей кишки и, как следствие, на количество эпителиоцитов крипт.

После воздействия ИИ в дозе 4,0 Гр на 1 сутки у зрелых и старых лабораторных животных отмечается существенное угнетение пролиферативного индекса, повышение выраженности апоптоза эпителиоцитов. Содержание эпителиоцитов крипт в обеих изучаемых группах было меньше значений нормы. В то же время, после трансплантации плацентарных ММСК и ГСК в условиях воздействия данного экстремального фактора старым животным происходит угнетение запрограммированной клеточной гибели эпителия тощей кишки (- 21,7 %,  $p < 0,05$ ) (рисунок 6.5). При этом пролиферативная активность эпителия оставалась без изменений, также, как и содержание эпителиоцитов крипт (рисунок 6.6). Трансплантация аллогенных ММСК и ГСК на 1 сутки после воздействия ИИ зрелым лабораторным животным не приводит к существенному изменению регенерации слизистой оболочки тощей кишки.

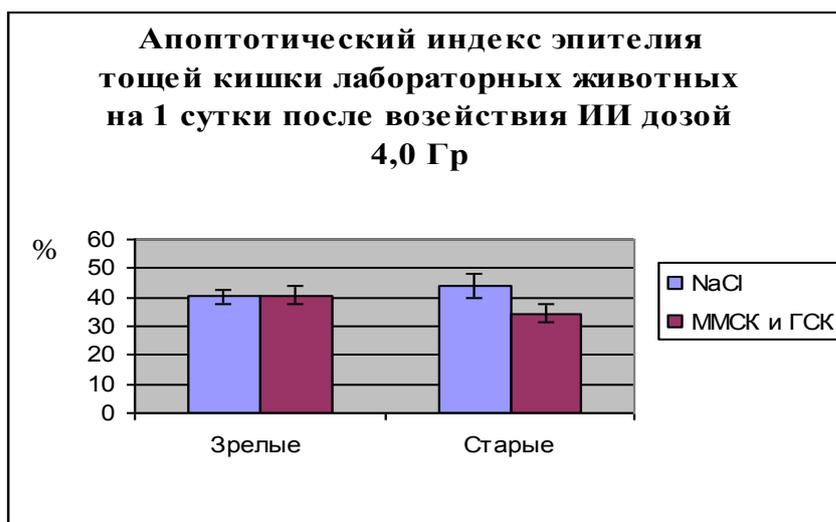


Рисунок 6.5

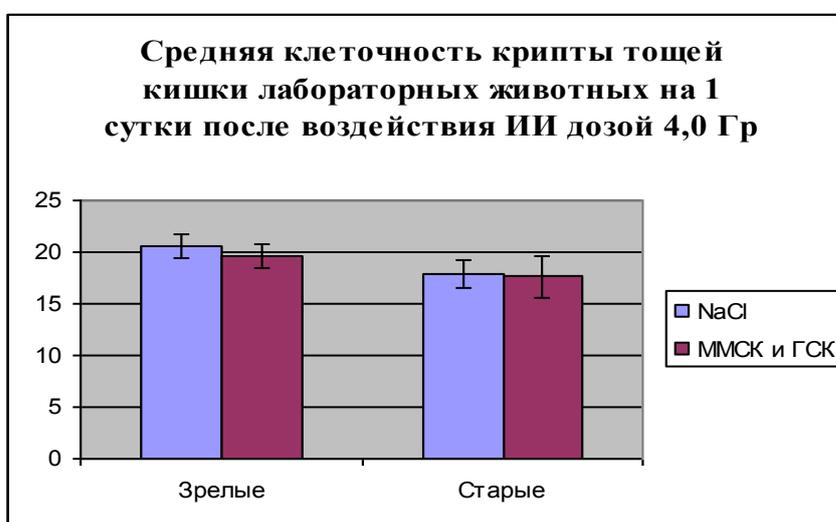


Рисунок 6.6

В физиологических условиях на 7 сутки у зрелых и старых животных выявлен ответ на проведенную трансплантацию плацентарных ММСК и ГСК. Так у животных зрелого возраста происходит увеличение пролиферативной активности в криптах на 27,8 % (рисунок 6.7). Выраженность апоптоза при этом остается без изменений. Содержание эпителиоцитов крипт существенно увеличивается (+ 27,8 %) по сравнению с животными, которым не проводилась трансплантация клеток. У старых животных также обнаружено увеличение содержания эпителиоцитов крипт (+ 38,9 %,  $p < 0,05$ ) (рисунок 6.9). Однако этот эффект реализуется не за счет влияния на пролиферативную активность клеток, а через регулирование выраженности апоптоза (рисунок 6.8). Данный показатель снижается на 22,7 %.

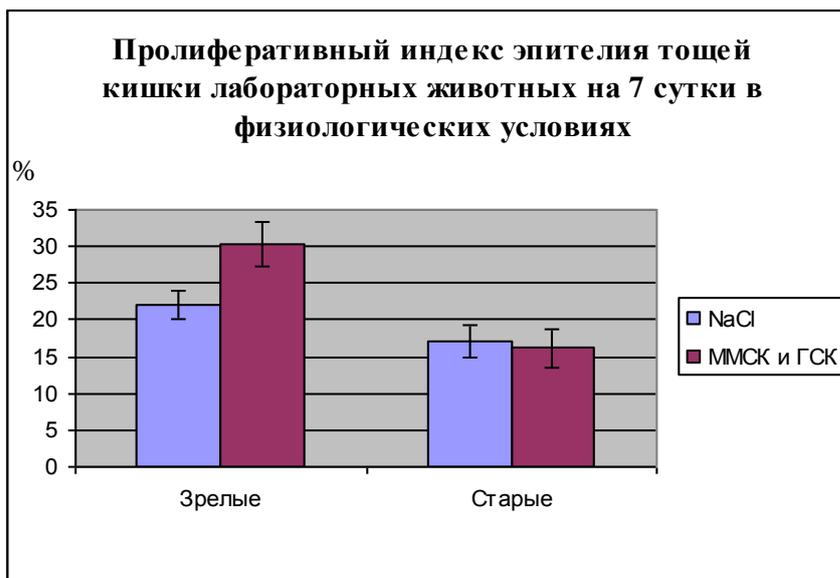


Рисунок 6.7

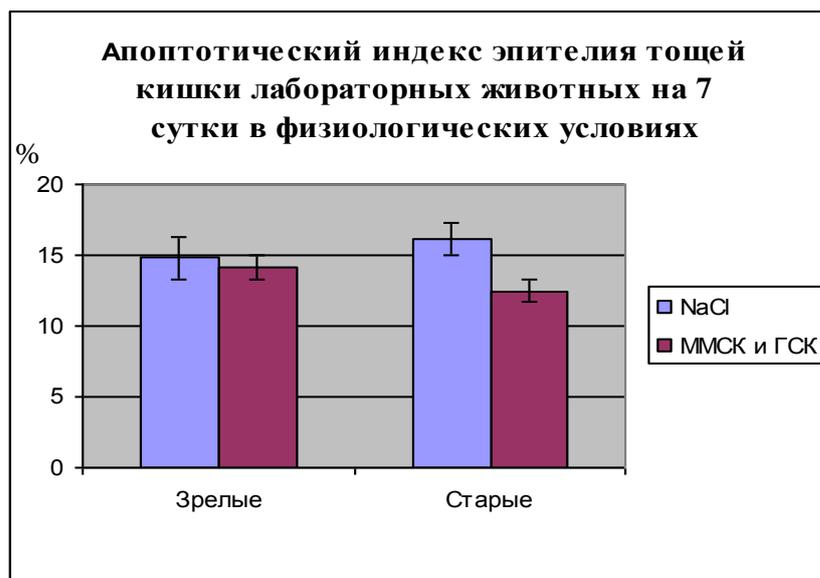


Рисунок 6.8

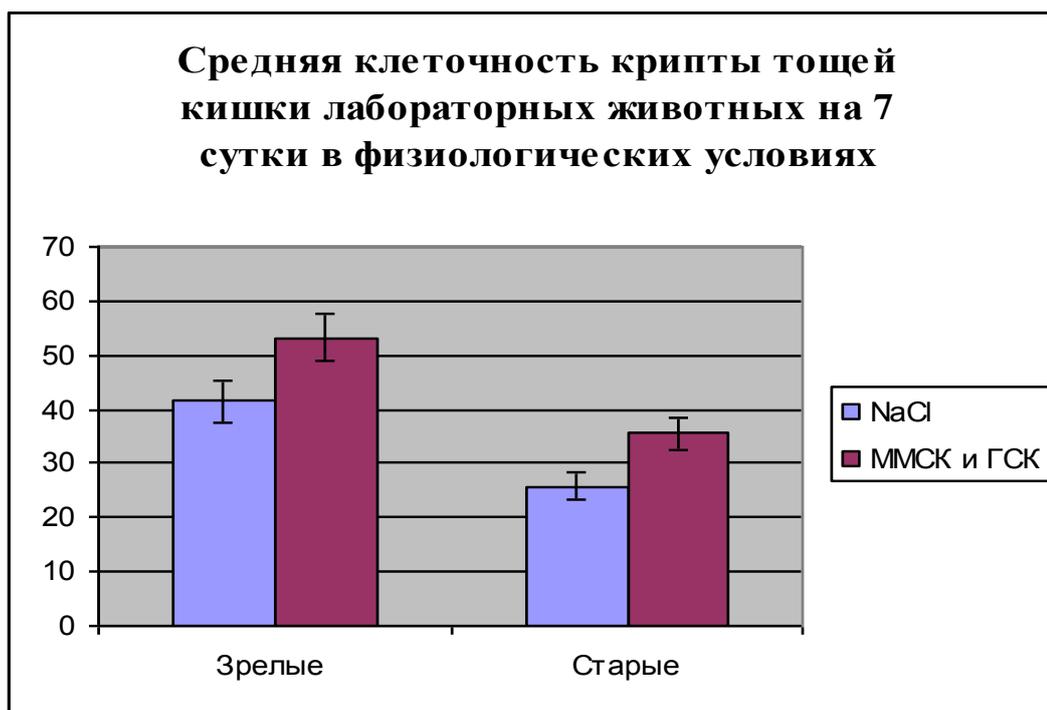


Рисунок 6.9

На 7 сутки после воздействия ИИ введение плацентарных ММСК и ГСК зрелым и старым лабораторным животным способствует восстановлению содержания эпителиоцитов крипт до значений нормы (рисунок 6.12). При этом механизм восстановления содержания криптального эпителия у зрелых и старых животных различный. У зрелых животных это достигается за счет увеличения пролиферативной активности эпителия (+ 35,4 %) (рисунок 6.10), снижения выраженности апоптоза (- 46,7 %,  $p < 0,05$ ) (рисунок 6.11). В то время как у старых животных пролиферативный индекс существенно не изменяется, а ключевым фактором в восстановлении регенерации является ингибирование апоптоза (- 50,5 %,  $p < 0,05$ ).

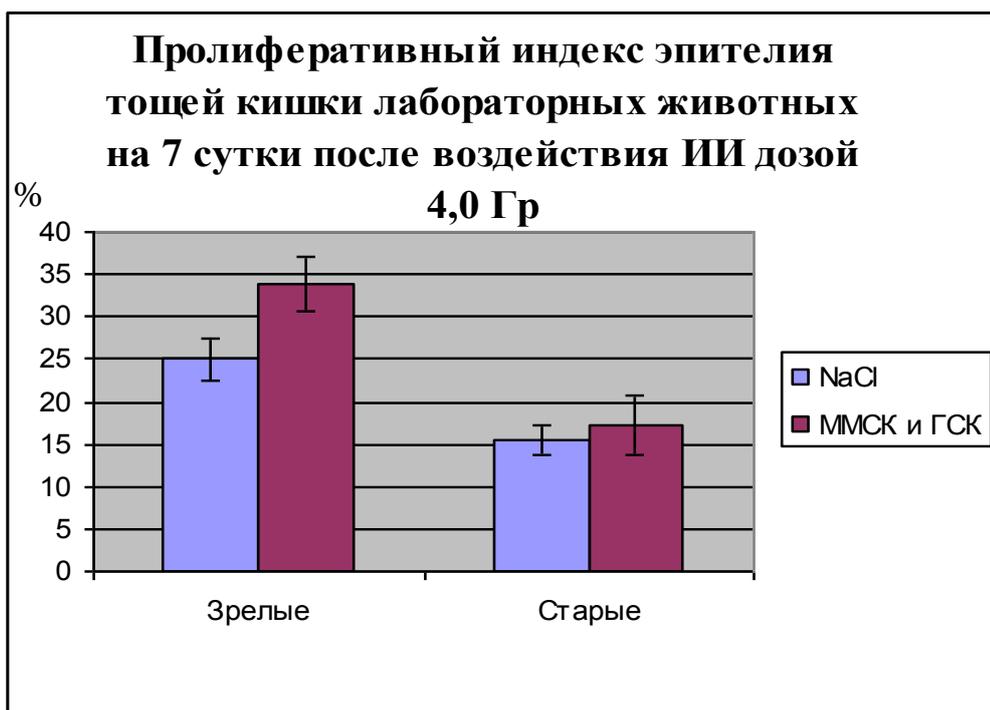


Рисунок 6.10

7.

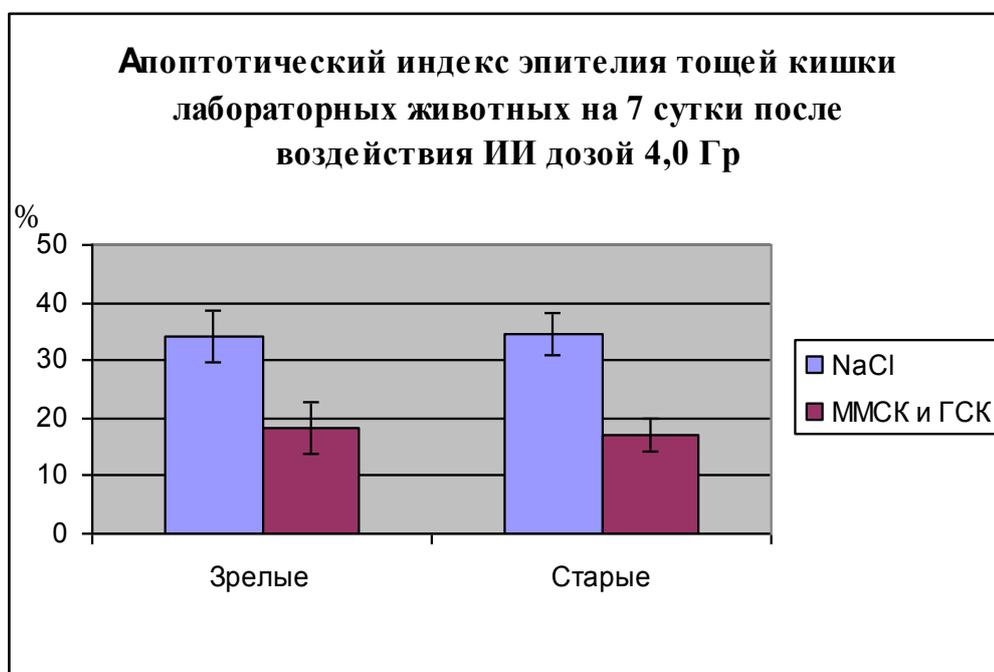


Рисунок 6.11

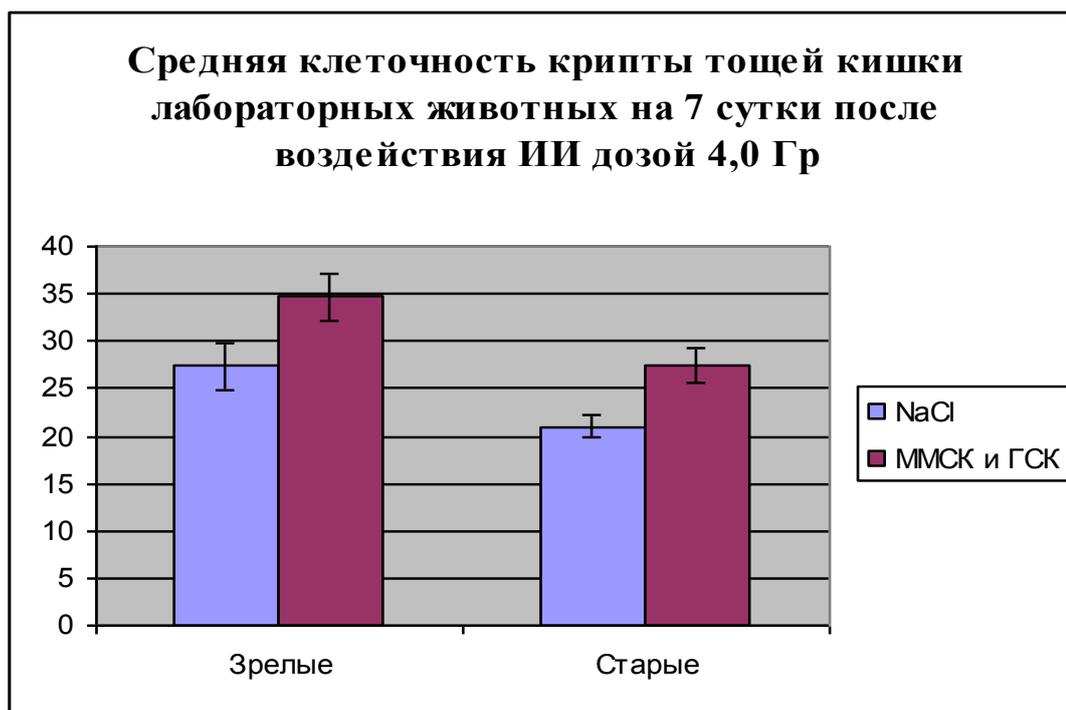


Рисунок 6.12

Исследования по моделированию острой кровопотери, проведенные на лабораторных животных обеих возрастных групп дополняют полученные ранее данные полученные в условиях воздействия ИИ. Так, доказано, что в физиологических условиях на 5 сутки зрелые и старые животные реагируют на трансплантацию плацентарных ММСК и ГСК изменением активности разнонаправленных процессов – пролиферативной активности и апоптоза. У зрелых животных происходит увеличение пролиферативной активности на 22,7 %, у старых животных снижение апоптоза на 21,7 %. Однако, указанных изменений недостаточно для увеличения содержания эпителиоцитов крипт в обеих изучаемых группах.

На 5 сутки после острой кровопотери у зрелых и старых животных не происходит естественного восстановления численности клеток в криптах. В обеих возрастных группах остается повышенным уровень апоптоза и остается меньше значений нормы пролиферативный индекс (рисунок 6.13, рисунок 6.14).

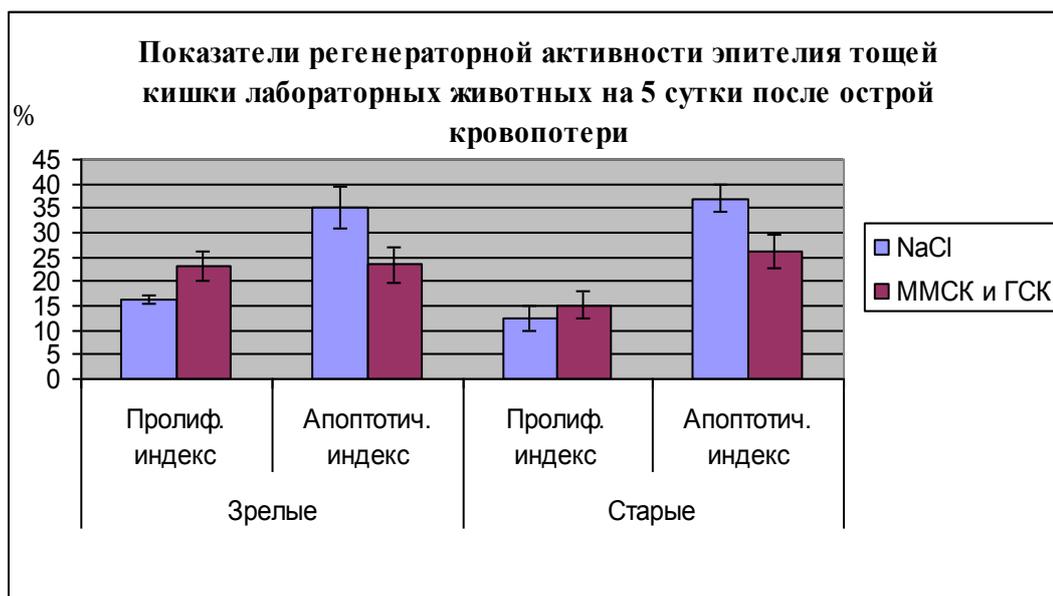


Рисунок 6.13

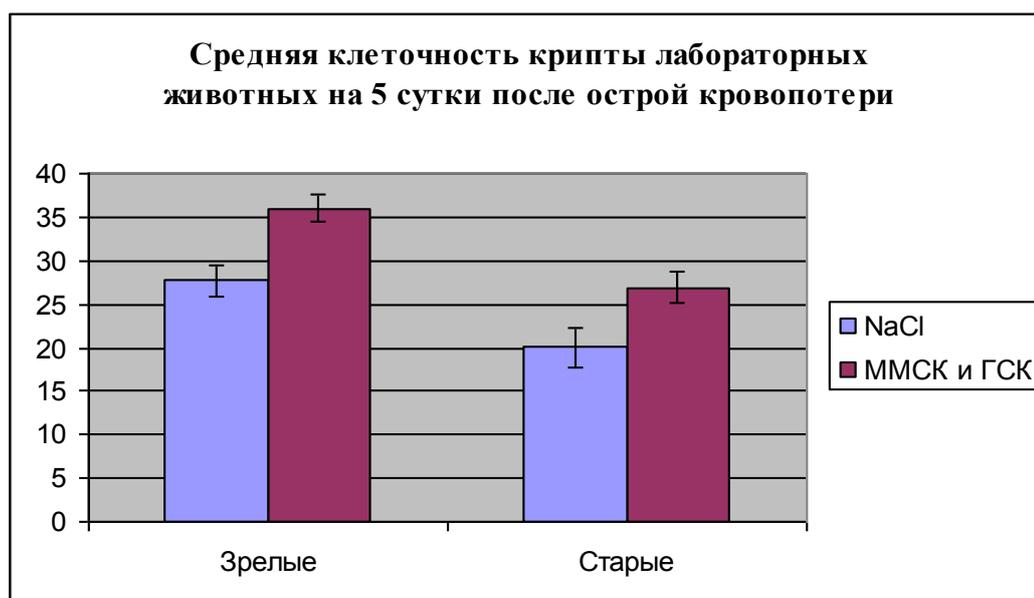


Рисунок 6.14.

На фоне проведенной аллогенной трансплантации в обеих возрастных группах происходит восстановление содержания эпителиоцитов крипт до значений нормы. Но если у зрелых лабораторных животных этот эффект реализуется через повышение пролиферативной активности криптального эпителия и через угнетение апоптоза. То у старых животных, только через снижение запрограммированной гибели клеток.

## ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили установить особенности процессов регенерации в миелоидной ткани, эпителии кишечника, в красной и белой пульпе селезенки в физиологических условиях и после воздействия экстремальных факторов. Особенности регенерации быстрообновляющихся тканей зрелого и старого организма на фоне проведения трансплантации стволовых клеток изучались в условиях воздействия ионизирующего излучения, а также после острой кровопотери.

В настоящем исследовании была изучена возможность активации регенерации быстрообновляющихся тканей в условиях старения проведением сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических стволовых клеток. Трансплантация стромальных клеток здорового донора способна ускорить процесс приживания ГСК и, соответственно, процесс восстановления гемопоэза.

В ранее проведенных нами исследованиях была доказана эффективность ММСК в дозе 6 млн. клеток/кг в отношении активации регенерации быстрообновляющихся тканей. Это количество соответствует терапевтической дозе ММСК определенной и в других лабораториях. Однако нет единого мнения о минимальной терапевтической дозе ГСК. По данным разных авторов значение минимальной терапевтической дозы ГСК имеет размах от 100 тыс. клеток/кг до 5 млн. клеток/кг. Использование при трансплантации больших доз ГСК способствует лучшему приживлению трансплантата. Проблема заключается именно в получении необходимого количества ГСК для трансплантации, а также в том, чтобы эта трансплантация не была сопряжена с развитием осложнений. В течение последних лет к наиболее важным потенциальным источникам ГСК относят пуповинную кровь. Несмотря на сравнительно небольшое количество пуповинной крови, остающейся в плаценте после родов (50-150 мл) концентрация стволовых и прогениторных клеток является достаточной для успешного приживания трансплантата детям с массой до 40 кг. Актуальным является

проведение такой клеточной терапии, которая бы обладала низкими иммуногенными свойствами (источник – фетальные ткани) и в то же время обеспечивала приживание трансплантата с последующим восстановлением регенерации поврежденной ткани.

Учитывая способность ММСК обеспечивать направленный хоуминг ГСК, а также повышать их жизнеспособность через выработку биологически активных веществ и через формирование соответствующих «ниш», в настоящем исследовании при проведении сочетанной трансплантации клеток было изучено действие минимальных доз ГСК. Было изучено действие следующих доз ГСК вводимых совместно с ММСК: 250 тыс. клеток/кг, 300 тыс. клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг. Экспериментальным путем было доказано, что минимальная терапевтическая доза ГСК обеспечивающая усиление регенерации быстрообновляющихся тканей при сочетанном введении с ММСК составляет 330 тыс. клеток/кг. Следует отметить, что эффект от трансплантации определяется не только количеством введенных клеток, но и зависит от условий в которых проводится их введение. Проведенные исследования на животных зрелого возраста позволили установить, что доза ГСК 250 тыс. клеток/кг при совместном введении с ММСК не оказывает существенного влияния на гемопоэз. Однако доза ГСК 300 тыс. клеток/кг при сочетанной трансплантации с ММСК в условиях воздействия ионизирующего излучения обуславливает повышение митотической активности клеток эритроидного и гранулоцитарного ростков. В ранние сроки это не приводит к изменению количества как отдельных фракций клеток, так и в целом к изменению активности эритро- и гранулоцитопоэза. После острой кровопотери трансплантация ММСК и ГСК (300 тыс. клеток/кг) в костном мозге обуславливает увеличение пролиферативной активности в эритроидном ростке. Но при этом в ранние сроки также не изменяется клеточный состав миелоидной ткани. В физиологических условиях митотическая активность в костном мозге при вышеуказанных дозах оставалась без изменений. Введение ГСК в дозе 330 тыс. клеток/кг вызывает изменения в физиологических условиях и в условиях воздействия экстремального фактора. В физиологических условиях помимо

пролиферативного ответа на трансплантацию ММСК и ГСК увеличивается общее количество эритроидных клеток, что свидетельствует об активации эритропоэза. После воздействия ионизирующего излучения эффект от введенных клеток более выраженный. В этом случае активируется и эритропоэз и гранулоцитопоэз. Различный механизм действия сочетанной трансплантации ММСК и ГСК определяется свойствами этих клеток. Именно под действием провоспалительных факторов ММСК способны существенно увеличивать выработку хемоаттрактанта для ГСК – SDF-1, а также значительно увеличивать на своей поверхности количество молекул адгезии для ГСК. Также под действие провоспалительных факторов ММСК индуцируют выработку белков теплового шока в клетках, что обеспечивает их выживание. Таким образом, оказывая иммуносупрессивное действие, усиливая миграцию ГСК, формируя микроокружение для клеток ММСК способны обеспечивать эффект при меньших вводимых дозах ГСК.

С возрастом происходят не только количественные, но и качественные изменения со стороны стволовых клеток. При старении способность стволовых клеток к самообновлению и дифференцировке снижается. Это ведёт, с одной стороны, к истощению пула стволовых клеток, а с другой – к уменьшению количества выделяемых ими факторов. В связи с этим представлялось важным изучить возможность активации регенерации тканей не только в условиях воздействия на организм экстремальных факторов, но и в условиях возрастной инволюции.

В настоящем исследовании было изучено влияние сочетанной трансплантации ММСК (6 млн. клеток/кг) и ГСК (330 тыс. клеток/кг), выделенных из ткани плаценты на регенерацию миелоидной ткани, белой и красной пульпы селезенки и эпителия тощей кишки в физиологических условиях, а также после воздействия ИИ и острой кровопотери. Влияние сочетанной аллогенной трансплантации на регенерацию тканей была изучена в условиях старения, то есть эксперименты были проведены на лабораторных животных зрелого и старого возраста. С целью оценки регенерации миелоидной ткани производилось определение содержания клеток костного мозга, а также

содержание форменных элементов периферической крови. Оценка содержания цитогенетически измененных клеток осуществлялась по микроядерному тестированию в физиологических условиях и после воздействия экстремальных факторов. Учет микроядер отражает частоту aberrаций и отставших хромосом в поздней телофазе из ацентрических фрагментов и целых отставших хромосом. Поскольку эритроидные элементы в костном мозге находятся на разных стадиях созревания, то и определение микроядер возможно на разных стадиях созревания: только в полихроматофильных эритроцитах или отдельно в полихроматофильных и нормохромных эритроцитах. В селезенке производилось определение основных морфометрических показателей: общая площадь лимфоидного фолликула, площадь В-зоны лимфоидного фолликула, площадь герминативного центра фолликула, площадь Т-зоны лимфоидного фолликула, общая клеточность красной пульпы, расстояние между центрами лимфоидных фолликулов. Помимо морфометрического исследования для оценки регенерации селезенки были проведены цитологические исследования. Производился подсчет общей клеточности селезенки и определение абсолютных значений содержания лимфобластов, пролимфоцитов, лимфоцитов, макрофагов, моноцитов, гранулоцитарных и эритроидных клеток. Для определения регенерации в слизистой оболочке тощей кишки производилось определение пролиферативной активности клеток, а также оценивалось выраженность апоптоза эпителиоцитов. С целью определения эффективности указанных процессов было изучено численное содержание эпителиоцитов в крипах.

Проведенные исследования позволили установить, что в физиологических условиях на 1 сутки сочетанное введение ММСК и ГСК зрелым и старым лабораторным животным не приводит к существенным изменениям в изучаемых быстрообновляющихся тканях.

На 5 сутки в физиологических условиях у зрелых и старых животных в изучаемых тканях отмечены изменения на проведенную сочетанную трансплантацию стволовых клеток. В обеих возрастных группах выявлено увеличение пролиферативной активности в эритроидном ростке костного мозга.

При этом у зрелых животных в миелоидной ткани установлено увеличение содержания эритробластов на 71,1 % ( $p < 0,05$ ). У старых животных в миелоидной ткани отмечено увеличение содержания эритробластов и базофильных нормобластов на 69,2 % и 27,2 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Однако это не привело к изменению общего содержания эритроидных элементов в костном мозге животных. Содержание отдельных клеточных элементов и общее содержание клеток в гранулоцитарном ростке у старых и зрелых животных не отличалось от значений нормы. Следует отметить, что у старых животных, в отличие от животных зрелого возраста в костном мозге на 5 сутки обнаружено уменьшение содержания цитогенетически измененных клеток на 24,9 % ( $p < 0,05$ ). Данный эффект можно объяснить способностью трансплантированных ММСК индуцировать выработку цитопротективных факторов – белков теплового шока (HSP 32 и HSP 70). Данные факторы способны поддерживать исходную конформацию белков, повышать устойчивость ферментов репарации, следствием чего будет снижение количества патологических митозов и, как результат, уменьшение содержания цитогенетически измененных клеток.

Изучая состояние быстрообновляющихся тканей зрелых животных на 5 сутки в физиологических условиях, также установлено увеличение пролиферативной активности в эпителии тощей кишки на 22,5 % ( $p < 0,05$ ). У старых животных пролиферативная активность клеток оставалась без изменений. Однако уровень запрограммированной клеточной гибели существенно снизился (-21,7 %,  $p < 0,05$ ). Ингибирование апоптоза в настоящем случае можно также объяснить выработкой ММСК цитопротективных факторов, которые поддерживая работу ферментов репарации, косвенно приводят к снижению запрограммированной клеточной гибели. Несмотря на выявленные изменения, содержание крипталльного эпителия в обеих возрастных группах оставалось без существенных изменений.

В физиологических условиях на 7 сутки после проведения аллогенной сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК у зрелых и старых лабораторных животных обнаружены изменения показателей регенерации

быстрообновляющихся тканей. Так, у зрелых и старых лабораторных животных в костном мозге установлено повышение митотической активности в эритроидном диффероне на 30,9 % ( $p < 0,05$ ) и 28,4 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Указанные изменения в обеих возрастных группах привели к увеличению общего содержания эритроидных элементов в костном мозге на 41,6 % ( $p < 0,05$ ) и 25,8 % ( $p < 0,05$ ). У лабораторных животных зрелого возраста активация эритропоэза достигалась за счет увеличения базофильных и полихроматофильных нормобластов соответственно на 27,5 % и 49,8 %. У животных старого возраста активация эритропоэза была обеспечена увеличением содержания полихроматофильных нормобластов (+ 37,04 %,  $p < 0,05$ ). Данные периферической крови подтверждают ранее установленные изменения в костном мозге. Существенное повышение содержания ретикулоцитов отмечено у зрелых и старых животных. Активацию эритропоэза, наблюдаемую после сочетанной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК, можно объяснить взаимоотношением этих клеток, основанным на их биологических свойствах. В частности, за счет способности ММСК обеспечивать хоуминг как собственных (аутологичных), так и трансплантированных (аллогенных) ГСК в соответствующие ниши. Этот механизм реализуется через выработку SDF-1 (stromal derived factor-1), который взаимодействует со своим рецептором CXCR4 на поверхности ГСК. Процесс приживания ГСК обусловлен способностью ММСК синтезировать экстрацеллюлярный матрикс (коллаген I, III, IV, V типов, фибронектин, протеогликаны), формирующий костномозговое микроокружение, необходимое клеткам гемопоэза. Синтез ММСК таких факторов как SCF, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-11 обеспечивает пролиферацию и дифференцировку стволовых гемопоэтических клеток и клеток предшественников в эритроидном направлении.

На 7 сутки в физиологических условиях показатель МЯТ у зрелых и старых животных сохранил ту же тенденцию, что имела место на 5 сутки. Так, было установлено, что после сочетанной трансплантации клеток показатель МЯТ у старых животных был значительно меньше, чем в контроле (- 30,0 %,  $p < 0,05$ ). В

то же время данный показатель у зрелых животных не изменился и не отличался от контрольных значений.

В то же время при изучении основных морфометрических показателей селезенки у зрелых и старых лабораторных животных установлено отсутствие изменений: общей площади лимфоидного фолликула, площади Т-зоны лимфоидного фолликула, площади В-зоны лимфоидного фолликула, общей клеточности красной пульпы, расстояния между центрами лимфоидного фолликула, а также содержания эритроцитов и лейкоцитов в красной пульпе.

При анализе процессов регенерации в эпителии тощей кишки лабораторных животных выявлен эффект на проведенную сочетанную трансплантацию клеток. У зрелых и старых лабораторных животных произошло увеличение содержания эпителиоцитов крипт. Однако механизмы этого увеличения в изучаемых возрастных группах разные. У зрелых животных это увеличение достигается за счет повышения пролиферативной активности эпителиоцитов на 37,9 % ( $p < 0,05$ ), в то время как у старых животных за счет угнетения выраженности апоптоза на 22,7 % ( $p < 0,05$ ).

При изучении состояния быстрообновляющихся тканей на 1 сутки после воздействия ИИ в дозе 4,0 Гр в обеих возрастных группах обнаружены характерные изменения. Так, в костном мозге произошло уменьшение клеточности костного мозга бедренной кости. Данные миелограммы свидетельствуют об угнетении всех ростков кроветворения. В этот период отмечено существенное ингибирование пролиферативной активности клеток эритроидного и гранулоцитарного дифферендов. Следствием мутагенного действия ионизирующего излучения является повышение содержания полихроматофильных эритроцитов с микроядрами. В селезенке происходит уменьшение диаметров лимфоидных фолликулов, падает плотность клеток в красной пульпе. В периферической крови у зрелых и старых животных установлено увеличение содержания ретикулоцитов и гранулоцитов. В то время как содержание лимфоцитов было меньше значений нормы. Обнаруженные изменения обусловлены развитием стресс - реакции системы крови на

воздействие данного экстремального фактора. Механизмами опустошения кроветворных органов является не только установленное угнетение пролиферации клеток, но также гибель их путем некроза и апоптоза, усиление миграции клеток в периферическую кровь. В случае воздействия ИИ не наблюдается типичное для стресс – реакции увеличение содержания лимфоцитов в костном мозге, что обусловлено гибелью данных клеточных форм. В кишечнике старых и зрелых лабораторных животных установлено угнетение пролиферативной активности клеток и повышение выраженности апоптоза, что привело в обеих возрастных группах к снижению содержания эпителиоцитов крипт.

На 1 сутки после воздействия ИИ в ответ на проведение сочетанной трансплантации ММСК и ГСК у лабораторных животных произошли изменения в быстрообновляющихся тканях. У зрелых животных в костном мозге при подсчете МЯТ установлено снижение содержания цитогенетически измененных клеток на 25, 0 % ( $p < 0,05$ ). У старых животных также обнаружено существенное уменьшение данного показателя на 23,8 % ( $p < 0,05$ ). Показатели миелограммы и основные морфометрические показатели селезенки в этот период не отличались от данных лабораторных животных, которым не проводилось введение ММСК и ГСК. При определении активности апоптоза в эпителии кишечника у старых животных выявлено снижение данного показателя на 21,7 % ( $p < 0,05$ ). Однако это не привело к изменению численного содержания эпителиоцитов крипт. У зрелых животных в отличие от старых на 1 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации клеток существенных изменений в эпителии тощей кишки установлено не было.

На 7 сутки после воздействия ИИ у старых и зрелых животных выявлены изменения в состоянии быстрообновляющихся тканей. В костном мозге общее содержание лимфоцитов, гранулоцитов и эритроидных клеток не восстановилось и оставалось меньше значений нормы. Это привело к тому, что не восстановилась и общая клеточность костного мозга бедренной кости. В то же время уровень митозов в гранулоцитарном и эритроидном дифферонах соответствовал

значениям нормы. При анализе данных периферической крови установлено низкое содержание ретикулоцитов, лимфоцитов, моноцитов. В селезенке в это время отмечено уменьшение диаметров лимфоидных фолликулов, снижение плотности клеток в красной пульпе селезенки. В эпителии тощей кишки к 7 суткам произошло восстановление пролиферативной активности эпителиоцитов крипт. Тем не менее, уровень запрограммированной гибели клеток превышал, а содержание эпителиоцитов в криптах было меньше контрольных значений.

На 7 сутки после воздействия ИИ на фоне проведения сочетанной трансплантации ММСК и ГСК у зрелых и старых животных выявлена активация эритропоэза и гранулоцитопоэза. При этом установлено, увеличение пролиферативной активности клеток данных ростков и увеличение общего количества эритроидных и гранулоцитарных элементов. Активация эритропоэза у старых животных обусловлена увеличением количества эритробластов, базофильных и полихроматофильных нормобластов. У животных зрелого возраста – увеличение полихроматофильных нормобластов. При анализе данных периферической крови в обеих возрастных группах отмечалось увеличение количества ретикулоцитов. Активация гранулоцитопоэза у зрелых животных обусловлена увеличением количества миелобластов (+ 75,3 %,  $p < 0,05$ ), миелоцитов (+ 51,1 %,  $p < 0,05$ ), палочкоядерных и сегментоядерных форм лейкоцитов (+ 21,7 %,  $p < 0,05$ ). Повышенное количество гранулоцитарных лейкоцитов у старых лабораторных животных реализовано за счет увеличения содержания миелоцитов (+ 60,0 %,  $p < 0,05$ ), метамиелоцитов (+ 19,5 %,  $p < 0,05$ ), палочкоядерных и сегментоядерных форм лейкоцитов (+ 29,8,  $p < 0,05$ ). Указанные изменения привели к увеличению общей клеточности костного мозга у зрелых и старых животных соответственно на 26,1 % и 24,4 %. Активацию гранулоцитопоэза можно объяснить способностью трансплантированных ММСК синтезировать ранее описанные факторы, которые обеспечивают направленный хоуминг трансплантированных и аутологичных ГСК в соответствующие ниши. А также выработкой ММСК физиологически активных веществ, способствующих лучшему приживлению ГСК. Синтез ММСК таких факторов как ИЛ-6, ГМ-КСФ,

Г-ГСК, регулирует дифференцировку ГСК в гранулоцитарном направлении. Указанные свойства ММСК в совокупности с ранее описанными их иммуносупрессивными свойствами обеспечивают активацию гранулоцитопоэза. В то же время при подсчете цитогенетически измененных клеток в костном мозге обнаружено существенное снижение количества полихроматофильных эритроцитов с микроядрами. Это свидетельствует о снижении выраженности индуцированного мутагенеза в костном мозге. Обнаружены изменения у зрелых и старых со стороны белой и красной пульпы селезенки. У зрелых лабораторных животных в это время наблюдается восстановление морфометрических и цитологических показателей белой и красной пульпы селезенки. Ответ на проведенную трансплантацию выражен в восстановлении площади лимфоидных фолликулов, площади герминативных центров, площади В-зоны лимфоидных фолликулов. Увеличение площади зоны роста фолликула свидетельствует, что увеличение площади фолликула обусловлено не только миграцией клеток крови в селезенку, но и активацией гемопоэза в самом органе. Это подтверждается увеличением количества лимфобластов при оценке цитологической картины селезенки. Также было доказано восстановление отдельных фракций клеток: лимфобластов, лимфоцитов, эритроидных клеток, гранулоцитов, макрофагов и моноцитов. По сравнению с животными без трансплантации ММСК и ГСК, в опытной группе со стороны красной пульпы отмечено увеличение плотности клеток за счет большего количества эритроидных элементов и гранулоцитов. Указанные изменения привели к увеличению клеточности селезенки. Следствием реакции красной пульпы на сочетанную трансплантацию стало увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов.

В то же время у старых животных в отличие от животных зрелого возраста не происходит выраженного эффекта на регенерацию белой пульпы на фоне трансплантации ММСК и ГСК. Общая площадь фолликула и площадь В – зоны и площадь Т – зоны фолликула остаются существенно меньше нормы и не отличаются от аналогичных параметров животных без трансплантации ММСК и ГСК. Выявлены изменения у старых животных в красной пульпе. Здесь в отличие

от зрелых животных не обнаружено увеличения гранулоцитов и восстановления до значений нормы моноцитов и макрофагов, но также имеет место быть увеличение количества эритроидных клеток. Это приводит к увеличению клеточности красной пульпы и последующему увеличению расстояния между центрами лимфоидных фолликулов. Учитывая, что в костном мозге мышей с возрастом уменьшается не только концентрация ГСК, но и их способность мигрировать в селезенку, полученные результаты свидетельствуют о способности ММСК усиливать регенерацию селезенки при сочетанном введении с ГСК в условиях возрастной инволюции. ММСК за счет выработки хемоаттрактанта обеспечивают направленный хоуминг не только трансплантированных ГСК в селезенку и последующую там активацию гранулоцитопоэза и эритропоэза, но и хоуминг аутологичных ГСК.

Анализ регенерации эпителия тощей кишки также позволил обнаружить ответ лабораторных животных на проведенную трансплантацию. При этом механизм регенерации на введение стволовых клеток в изучаемых возрастных группах различный. Так, у зрелых лабораторных животных увеличение количества эпителиоцитов крипт обеспечивалось увеличением пролиферативной активности клеток крипт на 35,4 % ( $p < 0,05$ ), а также снижением запрограммированной клеточной гибели на 46,7 % ( $p < 0,05$ ). У старых лабораторных животных на 7 сутки после воздействия ИИ трансплантация ММСК и ГСК не приводит к существенному изменению уровня пролиферативной активности. Увеличение эпителиоцитов крипт на 30,8 % ( $p < 0,05$ ) достигалось за счет снижения уровня апоптоза. Выявленное стимулирующее действие трансплантированных ММСК и ГСК у зрелых и старых животных на регенерацию кишечного эпителия можно объяснить биологическими свойствами данных клеток. В частности, возможностью слияния ГСК с данными клетками. Впервые слияние гемопоэтических клеток с клетками кишечного эпителия было изучено исследователями из Oregon StemCell Center (USA). Американскими исследователями была доказана возможность слияния клеток костного мозга с клетками кишечного эпителия, а также изучено в этих условиях содержание

цитогенетически измененных клеток в кишечнике. В эксперименте реципиентам вводили гемопоэтические стволовые клетки. Трансплантированные ГСК были выявлены в криптах и в эпителии ворсинок тонкого кишечника. Слияние ГСК с клетками эпителия тонкого кишечника приводило к морфологически нормальной эпителиальной популяции. Причем интеграцию донорских клеток обнаруживали с разными типами эпителиальных клеток кишечника одной ворсинки. Совместная экспрессия антигенов донора и реципиента была обнаружена во всех четырех типах клеток кишечного эпителия. В связи с этим, исследователи предполагают, что первично ГСК сливаются со стволовыми клетками кишечного эпителия, которые затем дифференцируются в зрелые энтероциты.

В настоящем исследовании было отмечено, что на 5 сутки после острой кровопотери в обеих изучаемых возрастных группах в костном мозге произошло восстановление митотической активности клеток гранулоцитарного ростка до значений нормы и повышение пролиферативной активности клеток в эритроидном диффероне. При подсчете общего количества гранулоцитарных элементов выявлено отсутствие естественного восстановления общего содержания гранулоцитов до контрольных значений. У зрелых животных оставалось сниженным количество миелоцитов (- 26,9 %,  $p < 0,05$ ), метамиелоцитов (- 31,2 %,  $p < 0,05$ ), палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов (- 20,3 %,  $p < 0,05$ ). У старых лабораторных животных не восстановилось содержание миелобластов (- 60,1 %,  $p < 0,05$ ), промиелоцитов (- 61,1 %,  $p < 0,05$ ), миелоцитов (- 37,7 %,  $p < 0,05$ ), метамиелоцитов (- 21,7 %,  $p < 0,05$ ), палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов (- 21,8 %,  $p < 0,05$ ). Содержание лимфоидных клеток в возрастных группах существенно не отличалось от значений интактных животных. Общая клеточность костного мозга в изучаемых возрастных группах существенно не отличалась от значений нормы. Это было обусловлено увеличением количества эритроидных клеток. У зрелых лабораторных животных установлена активация эритропоэза обусловленная увеличением количества эритробластов (+ 45,2 %,  $p < 0,05$ ), базофильных (+ 35,2 %,  $p < 0,05$ ) и полихроматофильных нормобластов (+ 44,6 %,  $p < 0,05$ ). У старых

животных также следует отметить увеличение содержания эритробластов, базофильных и полихроматофильных нормобластов. Описанные изменения привели к увеличению количества эритроидных клеток у зрелых и старых животных соответственно на 42,7 % и 27,4 %. Анализ данных периферической крови подтверждает ранее выявленные изменения в костном мозге. У зрелых и старых животных в крови установлено достоверное увеличение содержания ретикулоцитов соответственно на 76,4 % и 21,3 %.

Анализ основных морфометрических показателей селезенки в обеих возрастных группах позволил установить общую тенденцию в изменении изучаемых параметров. Так, у зрелых и старых лабораторных животных было установлено увеличение площади лимфоидных фолликулов (соответственно на 25,3 % и 19,5 %,  $p < 0,05$ ), площади В-зоны лимфоидных фолликулов (+ 31,5 % и 21,7 %,  $p < 0,05$ ). В изучаемых возрастных группах отмечено достоверное увеличение общей клеточности красной пульпы и расстояния между центрами лимфоидных фолликулов. При этом увеличение общей клеточности было обусловлено как существенным увеличением содержания эритроидных элементов, так и клеток белого ряда. Механизмы описанных изменений заключаются в способности селезенки мышей после острой кровопотери принять большее число как аутологичных КОЕс, так и аллогенных КОЕс, что способствует активации кроветворения в данном органе. К механизмам активации кроветворения в селезенке в условиях острой кровопотери также следует отнести хоуминг форменных элементов крови в этот орган.

На 5 сутки после острой кровопотери в эпителии тощей кишки зрелых и старых животных отмечается снижение пролиферативной активности и повышение выраженности запрограммированной клеточной гибели. Указанные изменения привели к тому, что в этот период средняя клеточность крипты в обеих возрастных группах была соответственно на 35,67 % и 26,7 % меньше, чем в контроле.

Проведение сочетанной трансплантации ММСК и ГСК привело к существенным изменениям в состоянии быстрообновляющихся тканей зрелых и

старых лабораторных животных на 5 сутки после острой кровопотери. В обеих возрастных группах в костном мозге было выявлено снижение содержания цитогенетически измененных клеток. У зрелых животных этот показатель был снижен на 23,3 %, а у старых животных на 19,6 % по сравнению с контролем. В миелограмме зрелых и старых животных обнаружено стимулирующее действие проведенной сочетанной трансплантации клеток на гранулоцитопоз и эритроцитопоз. В гранулоцитарном ростке зрелых и старых животных установлено увеличение содержания миелоцитов (+ 72,4 %,  $p < 0,05$  и + 50,0 %,  $p < 0,05$ ), метамиелоцитов (+ 31,4 %,  $p < 0,05$  и + 34,4 %,  $p < 0,05$ ), а также палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов (+ 28,5 %,  $p < 0,05$  и + 24,4 %,  $p < 0,05$ ). Указанные изменения привели к увеличению общего содержания гранулоцитов на 34,6 % и 25,7 % соответственно. В то же время в эритроидном ростке зрелых и старых животных обнаружено увеличение содержания полихроматофильных нормобластов на 48,1 % и 31,0 % соответственно. Следствием выявленных изменений было увеличение общего содержания эритроидных элементов в костном мозге на 34,6 % и 25,4 % соответственно. Изменения в миелоидной ткани нашли свое подтверждение при анализе данных периферической крови. В периферической крови зрелых и старых лабораторных животных отмечено увеличение содержания ретикулоцитов и лейкоцитов (за счет гранулоцитов).

На 5 сутки после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК при анализе основных морфометрических показателей селезенки зрелых и старых животных выявлены некоторые отличия. В частности, у зрелых животных установлено уменьшение площади лимфоидных фолликулов на 25,72 %, площади В-зоны лимфоидных фолликулов на 19,98 %, площади герминативного центра на 32,89 %. В то же время данные показатели существенно не отличались от значений нормы. При изучении цитологической картины селезенки установлено снижение содержания лимфобластов, пролимфоцитов. Уменьшение указанных показателей у зрелых животных можно объяснить иммуносупрессивными свойствами ММСК. В частности, способностью ММСК вырабатывать ЦОГ-2, TGF- $\beta$  которые являются мощными

ингибиторами клеточного деления В-лимфоцитов, а также снижают секрецию иммуноглобулинов активированными В-лимфоцитами. У старых лабораторных животных не отмечено значительного изменения морфометрических показателей белой пульпы относительно животных, которым не проводилось введение ММСК и ГСК. При этом количество лимфоидных клеток различной степени зрелости также не отличалось от данных в контрольной подгруппе. Это может быть обусловлено уменьшением хоуминга трансплантированных ММСК в селезенку и, как следствие, менее выраженными иммуносупрессивными эффектами ММСК в этом органе. При анализе показателей красной пульпы у зрелых и старых животных доказано увеличение расстояния между центрами лимфоидных фолликулов (+ 22,3 % и + 18,9 %,  $p < 0,05$ ), увеличение общей клеточности красной пульпы (+ 27,9 % и + 20,5 %,  $p < 0,05$ ). При анализе цитограммы селезенки у зрелых и старых лабораторных животных на фоне трансплантации ММСК и ГСК отмечено увеличение количества эритроидных клеток соответственно на 46,6 % ( $p < 0,05$ ) и 32,2 % ( $p < 0,05$ ).

С возрастом способность ГСК к миграции и дифференцировке значительно уменьшается, при этом трансплантируемые ММСК способны усиливать миграцию ГСК (в том числе КОЕс) в ткань селезенки за счет выработки хемоаттрактанта (SDF-1). Этот эффект реализуется как в отношении собственных КОЕс, так и трансплантированных ГСК, что определяет включение более выраженных компенсаторных механизмов в селезенке в ответ на острую кровопотерю.

На 5 сутки после острой кровопотери также отмечены изменения в регенерации эпителия тощей кишки на сочетанную трансплантацию ММСК и ГСК. В обеих возрастных группах на 5 сутки установлено снижение выраженности запрограммированной клеточной гибели соответственно на 33,6 % и 29,3 % ( $p < 0,05$ ). При этом у старых лабораторных животных в отличие от зрелых животных не установлено повышение пролиферативной активности клеток. Пролиферативный индекс у зрелых животных был на 43,0% выше, чем в контрольной подгруппе. Указанные изменения привели к увеличению содержания

криптального эпителия на 30,1% и 34,2% ( $p < 0,05$ ). Таким образом, в изучаемых возрастных группах механизм активации регенерации криптального эпителия различный.

Полученные данные о влиянии сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на быстрообновляющиеся ткани зрелых и старых лабораторных животных свидетельствуют о существенной активации регенерации в этих тканях, о различном механизме восстановления регенерации у зрелых и старых лабораторных животных. Также следует отметить различный ответ быстрообновляющихся тканей на проведенную сочетанную трансплантацию ММСК и ГСК в зависимости от вида экстремального повреждения этих тканей.

Результаты собственных исследований позволили предложить схему, (рисунок) демонстрирующую возможность использования аллогенной сочетанной трансплантации ММСК и ГСК для активации регенерации быстрообновляющихся тканей в возрастном аспекте.

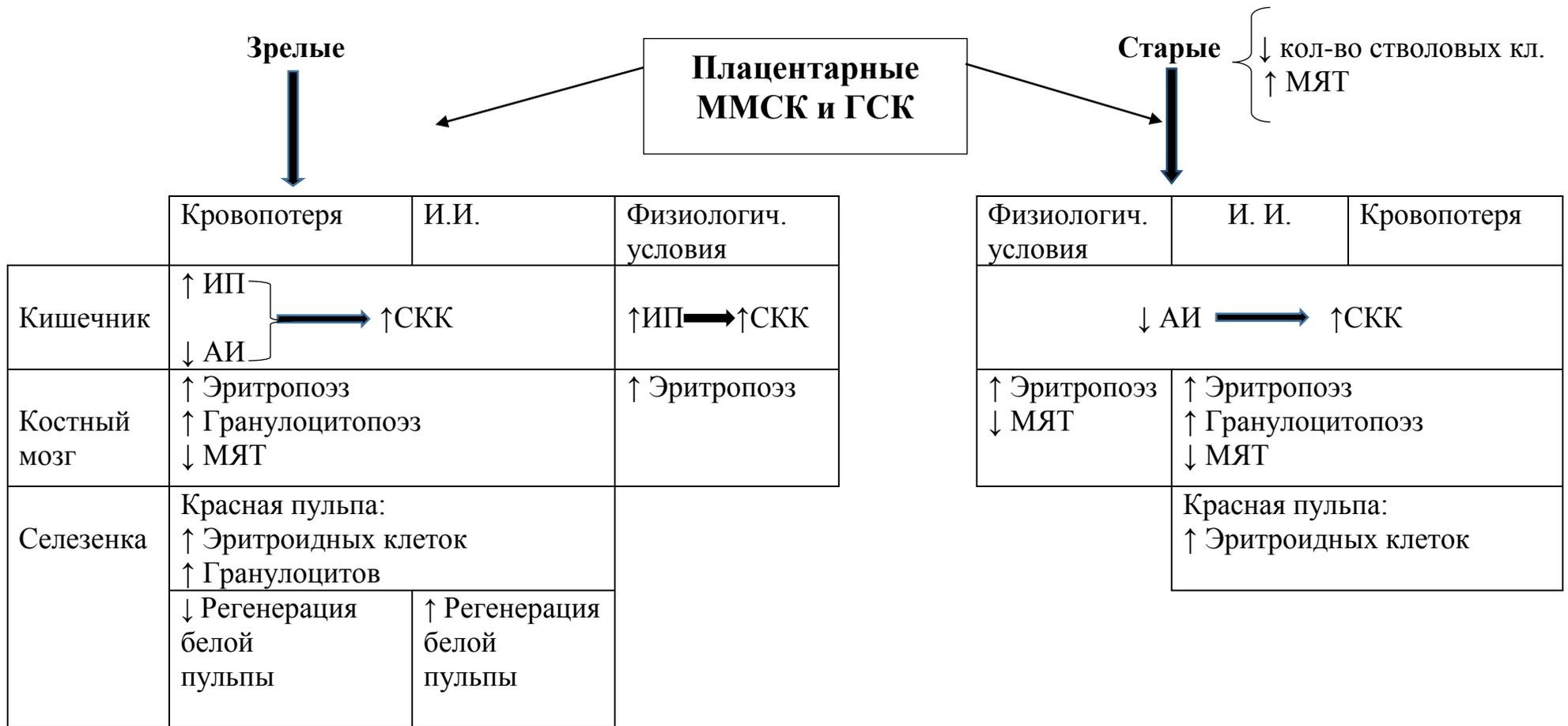


Схема влияния сочетанной аллогенной трансплантации плацентарных ММСК и ГСК  
на регенерацию быстрообновляющихся тканей

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Автандилов, Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г.Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Агрба, В.З. Возможные аспекты использования культур стволовых клеток лабораторных приматов в экспериментальной медицине / В.З.Агрба, В.А.Порханов, А.Г.Коноплянников, С.Ш.Кальсина, Д.Д.Кара-оглы, И.Е.Игнатова, Т.Е.Гвоздик, А.А.Агумава, А.В.Леонтьук, Б.А.Лапин // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. - № 139-143.
3. Айламазян, Э.К. Клетки иммунной системы матери и клетки трофобласта: «конструктивное сотрудничество» ради достижения совместной цели / Э.К.Айламазян, О.И.Степанова, С.А.Сельков, Д.И.Соколов // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. - № 11. – С.12-22.
4. Алчинова, И.Б. Динамика изменения физиологических показателей мышц с различной радиочувствительностью после острого гамма-облучения / И.Б.Алчинова, Е.Н.Архипова, Ю.С.Медведева, А.Б.Черепов, М.Ю.Карганов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. Т.157, № 2. – 150-154.
5. Алексанян, М.Ж. Цитогенетические исследования в гематологии. Организационные аспекты / М.Ж.Алексанян, Е.А.Асеева, А.И.Удовиченко, Е.В.Домрачева // Гематология и трансфузиология. – 2012. – Т.57, № 4. – С.23-27.
6. Анисимов, В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / В.Н.Анисимов. – 2-е изд., доп. – СПб.: Наука, 2008. – 468 с.
7. Архипова, Е.Н. Системные эффекты TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) при остром  $\gamma$ -облучении / Е.Н.Архипова, И.Б.Алчинова, А.Б.Черепов, Д.В.Розанов, Ю.С.Медведева, М.Ю.Карганов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т.156, № 10. – С.438-443.

8. Беляев, Н.Н. Влияние ИЛ-3 на регенеративно – индукционную активность гемопоэтических стволовых клеток костного мозга при экспериментальном инфаркте миокарда / Н.Н.Беляев, М.Р.Рысулы, А.С.Исабекова, Е.А.Северова, Н.М. Поминова, Е.А.Енин, Ю.В. Перфильева, Т.А.Супниязова, Р.Т.Тлеулиева, Э.А.Изахунова, Е.Н. Середа, Г.В.Федотовских, Ю.Д.Денисов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т.4, № 4. – С. 50 - 55.
9. Бочков, Н.П. Статистический анализ клонообразования в культурах стволовых клеток человека / Н.П.Бочков, М.С.Виноградова, И.К.Волков, Е.С.Воронина, Н.П.Кулешов // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 2. – С.63-67.
10. Буяновская, О.А. Частота анеуплоидии в культурах мезенхимных стволовых клеток человека: дис. ...канд. мед. наук: 03.02.07 / Буяновская Ольга Анатольевна. – М., 2010. – 96 с.
11. Валюшкина, М.П. Возрастные различия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крыс / М.П.Валюшкина, Л.Б. Буравкова // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. - №1. – С.11-16.
12. Васильева, В.А. Опыт применения кальция у больных после высокодозной полихимиотерапии и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / В.А.Васильева, Л.А.Кузьмина, Г.А.Клясова, Е.Н.Паровичникова // Гематология и трансфузиология. – 2012. – Т.57, № 3. – С.11-13.
13. Васильева, М.С. Методология оценки токсичности наночастиц / М.С.Васильева, О.Г.Макеев, А.В.Коротков // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2012. - № 3 (40). – С.62-64.
14. Верясов, В.Н. Получение мезенхимальных стромальных клеток из внезародышевых тканей и их характеристика / В.Н.Верясов, А.М.Савилова, О.А.Буяновская, М.М.Чулкина, С.В.Павлович,

- Г.Т.Сухих // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2014. - № 1. – С.3-10.
15. Гланц, С.А. Медико-биологическая статистика / С.А.Гланц. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
16. Гольдберг, Е.Д. Современные взгляды на проблему стволовых клеток и возможности их использования в медицине / Е.Д.Гольдберг, А.М.Дыгай, В.В.Жданов // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. - № 4. – С.184-189.
17. Горизонтов, П.Д. Стресс и система крови / П.Д.Горизонтов, О.И.Белоусова, М.И.Федотова. - М.: Медицина, 1983. – 239 с.
18. Горкун, А.А. Эндотелиальные прогениторные клетки в мезенхимосфероидах пупочного канатика и их участие в процессах ангиогенеза и васкулогенеза при острой печеночной недостаточности / А.А.Горкун, И.Н.Сабурова, Н.В.Кошелева, И.М.Зурина, А.А.Пулин, М.Ю.Шагидулин, Н.А.Онищенко, В.С.Репин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2012. - № 4. – С.50-54.
19. Горностаева, А.Н. Оценка иммуносупрессивных эффектов мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при разном содержании  $O_2$  в среде культивирования / А.Н.Горностаева, Е.Р.Андреева, И.В.Андрианова, Л.Б.Буравкова // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. - № 2. – С.92-97.
20. Горская, Ю.Ф. Влияние BMP-2 на численность и остеогенные свойства мультипотентных стромальных клеток и экспрессию генов цитокинов в первичных культурах клеток костного мозга и селезенки мышей СВА, иммунизированных бактериальными антигенами / Ю.Ф.Горская, Т.А.Данилова, М.В.Мезенцева, И.М.Шаповал, Т.М.Грунина, М.С.Бартов, А.С.Карягина, В.Г.Лушин, Р.К.Чайлахян, А.И.Куралесова, Ю.В.Герасимов, В.Г.Нестеренко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т.155, № 5. – С.602-607.

21. Глюкман, Э. Пуповинная кровь как альтернативный источник гемопоэтических стволовых клеток для трансплантации / Э.Глюкман // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т.6, № 1. – С.12- 15.
22. Григорян, А.С. Характеристика стромальных клеток костного мозга в реакции смешанной культуры лимфоцитов / А.С.Григорян, Н.В.Цупкина, Р.В.Деев, Г.П.Пинаев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т.2, № 3. – С.62- 66.
23. Двирнык, В.Н. Морфологические особенности кроветворения после трансплантации аллогенного костного мозга при миелодиспластических синдромах / В.Н.Двирнык, Л.А.Кузьмина, А.В.Кохно, Е.Н.Гласко, Э.Г.Гемджян, Е.Н.Паровичникова // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т.58, № 4. – С.4-10.
24. Делекторская, В.В. Нейроэндокринные опухоли пищеварительной системы: морфологический спектр и клеточная пролиферация (индекс Ki67) / В.В.Делекторская, Н.Е.Кушлинский // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. - № 5. – С.28-38.
25. Долгих, В.Т. Опухолевый рост: учебное пособие / В.Т.Долгих. – Феникс, 2007. – 160 с.
26. Домрачева, Е.В. Возможности и перспективы гематологической цитогенетики / Е.В.Домрачева, Е.А.Есеева // Медицинская генетика. – 2004. – Т.3, № 4. – С.166-179.
27. Дроков, М.Ю. Трансплантация аллогенного костного мозга без проведения предтрансплантационного кондиционирования с использованием циклофосфида и мезенхимальных стромальных клеток в качестве индукции толерантности / М.Ю.Дроков, Е.Н.Паровичникова, Л.А.Кузьмина, В.А.Васильева, Е.С.Урнова, В.В.Троицкая, Г.М.Галстян, Р.Ф.Богданов, В.Г.Савченко // Гематология и трансфузиология. – 2014. - № 1. – С.42-46.

28. Дыгай, А.М. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Фармакологические аспекты / А.М.Дыгай, В.В.Жданов. – М.: Изд-во РАМН, 2010. – 138 с.
29. Дыгай, А.М. Реакции системы крови и стволовых клеток в условиях блеомициновой модели фиброза легких / А.М.Дагай, Е.Г.Скурихин, Т.В.Андреева, Л.А.Ермолаева, Е.С.Хмелевская, О.В.Першина, В.А.Крупин, А.М.Резцова, И.Э.Степанова, В.Е.Гольдберг // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т.152, № 8. – С.132-136.
30. Дыгай, А.М. Реакция гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток, мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток на введение кетансерина при пневмофиброзе / А.М.Дыгай, Е.Г.Скурихин, О.В.Першина, И.Э. Степанова, Е.С.Хмелевская, Н.Н.Ермакова, А.М.Резцова, В.А.Крупин, Д.В.Рейхарт, В.Е.Гольдберг // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. - № 7. – С.25-31.
31. Дыгай, А.М. Стволовая клетка. Новые подходы в терапии дегенеративных заболеваний / А.М.Дыгай, Е.Г.Скурихин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2012. - № 2. – С.3-14.
32. Еремин, И.И. Клеточные технологии в терапии ожогов / И.И.Еремин, В.Л.Зорин, А.В.Поляков, В.Р.Черкасов, А.И.Зорина // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2011. - № 4. – С.74-81.
33. Жербин, Е.А. Радиационная гематология / Е.А.Жербин, А.Б.Чухловин. – М.: Медицина, 1989. – 176 с.
34. Жидких, С.Ю. Применение мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из стромы пуповины новорожденного, в лечении хронических ран / С.Ю.Жидких, С.В.Горюнов, Ю.Г.Суздальцева, Н.В.Жидких, А.И.Привиденцев, И.С.Абрамов, К.Н.Ярыгин, В.А.Ступнин // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.7, № 2. – С.26.

35. Жиронкина, О.А. Проллиферативный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из костного мозга человека / О.А.Жиронкина, И.Н.Шипунова, А.Е.Бигильдеев, Н.В.Сац, Н.А.Петинати, Н.И.Дризе // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. - № 4. – С.230-235.
36. Жуковский, Н.С. Протеомика остеобластов как компонентов ниши гемопоэтических стволовых клеток / Н.С.Жуковский, В.П.Карагодин, И.А.Собенин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2011. - № 4. – С.29-33.
37. Захаров, Ю.М. Регуляция остеогенной дифференциации мезенхимальных стволовых клеток костного мозга / Ю.М.Захаров, Э.Б.Макарова // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. – 2013. – Т.99, №4. – С.417-432.
38. Зюзьков, Г.Н. Роль NF-κB-зависимого сигналинга в реализации ростового потенциала мезенхимальных клеток-предшественников под влиянием фактора роста фибробластов / Г.Н.Зюзьков, М.Г.Данилец, А.А.Лигачева, В.В.Жданов, Е.В.Удуд, Л.А.Мирошниченко, А.В.Чайковский, Е.В.Симанина, Е.С.Трофимова, М.Ю.Минакова, Е.А.Лосев, В.В.Удуд, А.М.Дыгай // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. - № 3. – С.331-335.
39. Ильинских, Н.Н. Цитогенетический гомеостаз и иммунитет / Н.Н.Ильинских, И.Н.Ильинских, Е.Ф.Бочаров. – Новосибирск: Издательство «Наука» Сибирское отделение, 1986. – 256 с.
40. Исаев, А.А. Применение клеток пуповинной крови в клинической практике / А.А.Исаев, В.С.Мелихова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т.3, №1. – С.34- 41.
41. Йылмаз, Т.С. Участие стволовых клеток в репаративной и физиологической регенерации почки: дис. ... канд. мед. наук: 03.03.04 / Йылмаз Татьяна Сергеевна. – Казань, 2010. – 114 с.

42. Кишкун, А.А. Биологический возраст и старение: возможности определения и пути коррекции / А.А.Кишкун. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2008. – 976 с.
43. Кондратьева, И.А. Практикум по иммунологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений / И.А.Кондратьева, А.А.Ярилин, С.Г.Егорова. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 272 с.
44. Кост, Е.А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: Медицина, 1975. – 360 с.
45. Котенко, К.В. Клеточные технологии в лечении радиационных ожогов: опыт ФМБЦ им. А.И. Бурназян / К.В.Котенко, И.И.Еремин, Б.Б. Мороз, А.Ю.Бушманов, Н.М.Надежина, И.А.Галстян, О.С. Гринаковская, А.В.Аксененко, Ю.Б.Дешевой, В.Г.Лебедев, Т.С.Слободина, Ю.А. Жгутов, С.Е.Лаук-Дубицкий, П.С.Еремин // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Том VII, № 2. – С.97-102.
46. Котенко, К.В. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток при лечении лучевых поражений кожи / К.В.Котенко, Б.Б. Мороз, Н.М.Надеждина, И.А.Галстян, Н.А.Онищенко, И.И.Еремин, Ю.Б.Дешевой, В.Г.Лебедев, Т.С.Слободина, С.Е.Дубицкий, О.С.Гринаковская, Ю.А.Жгутов, А.Ю.Бушманов // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2011. - № 1. – С.20-26.
47. Куртова, А.В. Экспрессия CXCR4 и эффективность мобилизации CD34<sup>+</sup> гемопоэтических стволовых клеток / А.В.Куртова, М.А.Эстрина, С.М.Алексеев, С.А.Трофимова, О.А.Тупицына, В.Г.Карпов, А.Е. Здоров, Б.В.Афанасьев, Е.Е.Зуева // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т.2, № 3. – С.51 - 56.
48. Лавров, А.В. Расположение хромосом в ядрах мезенхимных стволовых клеток человека / А.В.Лавров, Я.И.Вольдгорн // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. - № 2. – С.83-87.

49. Лебедев, С.В. Клеточная терапия критической ишемии нижних конечностей (проблемы и перспективы) / С.В.Лебедев, А.В.Карасев, В.В.Кунгурцев, А.В.Лохонина, Е.Б.Клейменова // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. - № 3. – С.33-45.
50. Лимонов, В.Л. Весовые, морфометрические и цитологические характеристики лимфоидных органов мышей при воздействии производного индолилтиоалканкарбоновой кислоты (соединения ВЛ-11-02) / В.Л.Лимонов, А.В.Шурлыгина, М.В.Робинсон, Л.В.Вербицкая, Н.Г.Пантелеева, М.В.Тендитник, О.П.Колесникова, В.А.Труфакин // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2005. - № 2. – С.55-58.
51. Лисяный, Н.И. Различная функциональная активность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и их предшественников / Н.И.Лисяный // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т.8, № 3. – С. 36-37.
52. Логовская, Л.В. Индукция остеогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека / Л.В.Логовская, Т.Б.Бухарова, А.В.Волков, Е.Б.Вихрова, О.В.Махнач, Д.В.Гольдштейн // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. - №1. – С.28-34.
53. Лукьянова, Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции / Л.Д.Лукьянова. – 2011. - № 1. – С.3-20.
54. Луценко, Е.Д. Содержание ИЛ-10 и количество CD4+CD210+ -клеток при адьювантном артрите до и после применения криоконсервированных клеток плаценты / Е.Д.Луценко, Н.А.Бондарович, А.Н.Гольцев // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2014. - №2. – С.92-97.
55. Маслов, Л.Н. Гипоксическое прекондиционирование стволовых клеток как новый подход к повышению эффективности клеточной терапии

- инфаркта миокарда / Л.Н.Маслов, Ю.К.Подоксенов, А.Г.Портниченко, А.В.Наумова // Вестник Российской академической науки. – 2013. - № 12. – С.16-26.
56. Макарова, Э.Б. Интеграция костной ткани и пористые титановые имплантанты с алмазоподобными нанопокровками / Э.Б.Макарова, Ю.М.Захаров, А.П.Рубштейн, А.И.Исайкин // Гений ортопедии. – 2011. – Т.7, №2. – С.111-116.
57. Макеев, О.Г. Принципы генно-клеточной терапии социально значимых заболеваний / О.Г.Макеев, А.В.Коротков, С.В.Костюкова, О.А.Сатонкина, Е.А.Шуман, В.А.Буханцев, М.С.Васильева, А.Е.Зверева, М.Ю.Герасимов, Ю.А.Симанова, Л.А.Власова, А.И.Пономарев, А.И.Улыбин, П.С.Зубанов // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2013. - № 1 (43). – С.96-99.
58. Мещанинов, В.Н. Использование клеточно-ориентированных метаболитов для коррекции биовозраста / В.Н.Мещанинов, И.В.Гаврилов, Е.Л.Ткаченко, С.В.Жарков, А.М.Попов, Т.Ю.Вержбицкая, Ю.Е.Катырева, В.В.Минин, К.В.Егорин // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2013. - № 4 (46). – С.94-97.
59. Мусина, Р.А. Стволовые клетки: свойства и перспективы использования в медицине / Р.А.Мусина // Молекулярная биология. - 2004, Т. 38, № 4. - С.1-15.
60. Наханов, А.К. Дифференцировка мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из костного мозга, в инсулин-продуцирующие клетки в условиях *in vitro* / А.Х.Наханов, Б.А.Сейдахметова, С.Т.Турсуналиев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.7, № 2. – С.40-41.
61. Новицкий, А.В. Аллогенная трансплантация клеток пуповинной крови у больных с неходжкинскими лимфомами / А.В.Новицкий,

- М.С.Фоминых // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т.6, № 1. – С.31-35.
62. Обернихин, С.С. Морфофункциональные изменения тимуса и селезенки при развитии системного воспалительного ответа у потомства самок мышей, на ранних сроках беременности подвергшихся однократному иммуностимулирующему воздействию / С.С.Обернихин, Н.В.Яглова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. - № 6. – С.786-791.
63. Орлов, А.А. Влияние трансплантации аутогенных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани на течение остеогенетического процесса (экспериментальное исследование) / А.А. Орлов, И.Н.Сабурина, С.Д.Сысоев, А.С.Григорьян // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2014. - № 1. – С.3-8.
64. Осипенко, А.В. Иммунный контроль иммуномодуляции регенерации тканей / А.В.Осипенко, В.В.Базарный, В.А.Сырнев // Патофизиология органов и систем. Типовые патологические процессы. – 1996. – С.155.
65. Осипенко, А.В. Иммунобиологические механизмы регенерации тканей / А.В.Осипенко, В.А.Черешнев. – СПб.: УрО РАН, 1997. – 130 с.
66. Петров, Р.В. Миграция стволовых клеток из экранированного костного мозга при неравномерном облучении / Р.В.Петров, Р.М.Хайтов // Радиобиология. – 1972. – Т.12, № 1. – С.69-76.
67. Плотников, Е.Ю. Митохондрии как центральное звено повреждающих и защитных сигнальных путей при развитии почечной недостаточности: дис. ...доктор. биол. наук: 03.00.25 / Плотников Егор Юрьевич. – Москва, 2009. – 325 с.
68. Повещенко, А.Ф. Современные достижения в создании методов изучения миграции стволовых клеток / А.Ф.Повещенко, О.В.Повещенко, В.И.Коненков // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. - № 9. – С.46-52.

69. Попугайло, М.В. Влияние аргинина на состояние гематологических и биохимических показателей старых крыс на фоне действия фенилгидразина / М.В.Попугайло, И.В.Вечкаева, А.П.Ястребов, Е.Я.Осипова // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2012. - № 3 (40). – С.90-91.
70. Пшенникова, М.Г. Роль генетических особенностей организма в устойчивости к повреждающим воздействиям и в защитных эффектах адаптации / М.Г.Пшенникова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2011. - № 4. – С.7-17.
71. Рагимов, А.А. Настоящее, проблемы и перспективы трансфизиологии / А.А.Рагимов // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2012. - № 10. – С.70-77.
72. Репин, В.С. Медицинская клеточная биология / В.С.Репин, Г.Т. Сухих. – М.: БЭБиМ, 1998. – 200 с.
73. Ризванов, А.А. Доклинические исследования терапии бокового амиотрофического склероза с помощью генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины / А.А.Ризванов, Д.С.Гусева, И.И.Салафутдинов, Ф.В.Баширов, А.П.Киясов, Р.Р.Исламов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.7, № 2. – С.63-70.
74. Робинсон, М.В. Морфолог в иммунологическом мире / М.В.Робинсон, В.А.Труфакин // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 1998. - № 2. – С.20-24.
75. Рябов, С.И. Эффективность введения клеток плацентарно/пуповинной крови человека крысам с тяжелой травмой спинного мозга / С.И.Рябов, М.А.Звягинцева, Е.Р.Павлович, В.А.Смирнов, А.А.Гринь, В.П.Чехонин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т.157, № 1. – С.98-102.
76. Савченко, В.Г. Трансплантация аллогенных и аутологичных гемопоэтических стволовых клеток при острых лейкозах (итоги 20-

- летнего опыта) / В.Г.Савченко, Л.С.Любимова, Е.Н.Паровичникова // Терапевтический архив. – 2007. – Т.79, № 7. – С.30-35.
77. Сабурина, И.Н. Эпителио-мезенхимальная пластичность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в норме и патологии (экспериментальное исследование): автореф.дис. ... д-ра. биол. наук: 14.03.03, 03.03.04 / Сабурина Ирина Николаевна. – М., 2010. – 47 с.
78. Сазонов, С.В. Особенности состояния пролиферативных процессов в условиях возрастной инволюции организма: дис. ...д-ра. мед. наук: 14.00.16 / Сазонов Сергей Владимирович. – Екатеринбург, 1999. – 372 с.
79. Сазонов, С.В. Влияние трансплантированных Т-лимфоцитов на состояние регенераторных процессов в органах при старении организма / С.В.Сазонов, А.П.Ястребов, С.Л.Леонтьев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. - Т. 7, № 2. – С.46.
80. Сериков, В.Б. Плацента человека как источник гемопоэтических стволовых клеток / В.Б.Сериков, Ф.Куйперс // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. - Т. 3, № 2. – С.51 – 56.
81. Скурихин, Е.Г. Дифференцировка мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток легких при пневмофиброзе / Е.Г.Скурихин, Е.С.Хмелевская, О.В.Першина, Н.Н.Ермакова, В.А.Крупин, А.М.Резцова, Л.А.Ермолаева, В.Д.Якушина, И.Э.Степанова, В.М.Резцова, Н.В.Чердынцева, М.Н.Стахеева, А.М.Дыгай // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. - № 4. – С.192-200.
82. Степанов, А.А. Алгоритм получения гемопоэтических стволовых клеток из периферической крови для аутогенной трансплантации / А.А.Степанов, Е.В.Коротаев, В.И.Рабинович, Л.П.Астахова, С.А.Пономарев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т.8, № 3. – С.55-56.
83. Труфакин, В.А. Гистофизиология иммунной системы / В.А.Труфакин, А.В.Шурлыгина // Иммунология. – 2002. - № 1. – С.4-8.

84. Тюкавин, А.И. Механизм целевой миграции мезенхимальных стволовых клеток / А.И.Тюкавин, М.М.Галагудза, В.М.Михайлов, А.А.Венков, Г.Ш.Мчедлидзе, Н.В.Буркова // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. - № 2. – С.106-110.
85. Улыбин, А.И. Применение аутогенных дермальных фибробластов в косметологии / А.И.Улыбин, П.С.Зубанов, С.В.Костюкова, А.Е.Зверева, О.Г.Макеев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.7, № 4. – С. 21- 27.
86. Уфимцева, А.И. Характеристика и ex vivo экспансия гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток пуповинной крови // А.И. Уфимцева, Е.В. Канов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т.8, № 3. – С. 56- 57.
87. Фадеев, Ф.А. Использование первичных клеточных культур для лечения ожогов кожи / Ф.А.Фадеев, А.Г.Сергеев // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2013. - № 4 (46). – С.134-138.
88. Фатхутдинов, Т.Х. Механизмы терапевтической активности мультипотентных клеток при заболеваниях сердца / Т.Х.Фатхутдинов, Г.Б.Большакова, Д.В.Гольдштейн, Г.Т.Сухих // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. - № 4. – С.183-193.
89. Фриденштейн, А.Я. Проллиферативный и дифференцировочный потенциал скелетогенных колониеобразующих клеток костного мозга / А.Я.Фриденштейн, Р.К.Чайлахян, Ю.В.Герасимов // Цитология. - 1986. – Т.28, № 3. – С.341-349.
90. Хавинсон, В.Х. Модулирующее влияние эпиталамина и эпиталона на функциональную морфологию селезенки старых пинеалэктомированных крыс / В.Х.Хавинсон, С.С.Коновалов, В.В.Южаков, В.В.Попучиев, И.М.Кветной // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2001. – Т.132, № 11. – С.586-591.

91. Халдояниди, С.К. Роль гиалуроновой кислоты в регуляции иммуно- и миелопоэза: дис. ... мед. наук: 14.03.09. – Новосибирск, 2011. - 187 с.
92. Хамаганова, Е.Г. Проблема неоднозначностей при HLA-типировании с высоким разрешением для трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток от неродственного донора / Е.Г.Хамаганова, Б.В.Бидерман, И.А.Якутик, А.А.Юшкова, Л.А.Кузьмина, Е.Н.Паровичникова, А.Б.Судариков, В.Г.Савченко // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т.59, № 2. – С.4-9.
93. Холоденко, И.В. Внутривенная ксенотрансплантация мезенхимальных стволовых клеток плаценты человека крысам: сравнительная оценка хоуминга в головном мозге в двух моделях экспериментального ишемического инсульта / И.В.Холоденко, К.Н.Ярыгин, Л.В.Губский, А.А.Кониева, Р.Т.Таирова, О.В.Поварова, Р.В.Холоденко, В.В.Бурунова, В.Н.Ярыгин, В.И.Скворцова // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. - № 3. – С.123-129.
94. Цибулевский, А.Ю. Морфо-биофизическое исследование эритроцитов интактных и ваготомированных крыс в различные сроки после острой кровопотери / А.Ю.Цибулевский, Т.К.Дубовая, А.Г.Максина, Б.З.Соколинский, А.М.Пятницкий, В.С.Медовый, В.Е.Анисимова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2013. - № 1. – С.50-56.
95. Чертков, И.Л. Дифференцировочный потенциал стволовых клеток (Проблема пластичности) / И.Л.Чертков, Н.И.Дризе // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2005. - № 10. – С.37-44.
96. Чертков, И.Л. Схема кроветворения / И.Л.Чертков, Р.И.Дризе, А.И.Воробьев // Терапевтический архив. – 2006. - № 7. – С.5-12.
97. Шаблий, В.А. Криоконсервирование ткани плаценты человека – источник гемопоэтических прогениторных клеток и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / В.А.Шаблий, М.Д.Кучма,

- В.М.Кирик, А.Н.Онищенко, Л.Л.Лукаш, Г.С.Лобынцева // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.7, № 1. – С.54- 62.
98. Шаблий, В. Характеристика мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из плаценты человека / В.Шаблий, М.Кучма, В.Кирик, Г.Онищенко, П.Арешков, Н.Скрипник, Л.Лукаш, Г.Лобынцева // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.7, №4. – С.55-61.
99. Шаманская, Т.В. Использование пуповинной крови при проведении аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у детей / Т.В.Шаманская, Т.А.Астрелина, Э.А.Подколзина, Е.Э.Карпова, Л.Л.Лебедева, Е.В.Скоробогатова, О.В.Паина, М.В.Яковлева // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т.5, №2. – С.29- 35.
100. Шахпазян, Н.К. Сравнение биологических свойств мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и плаценты для клинического применения / Н.К.Шахпазян, Т.А.Астрелина, М.В.Яковлева, А.Е.Гомзяков, Н.А.Новоселова, Я.А.Круглова, Е.В.Боякова, Б.Л.Лазебник, О.В.Князев, Е.В.Скоробогатова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.7, № 2. – С.53-54.
101. Шуман, Е.А. Результаты доклинических исследований генно-клеточной терапии сердечной недостаточности / Е.А.Шуман, А.В.Коротков, О.Г.Макеев // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2012. - № 3 (40). – С.98-99.
102. Энциклопедия клинической онкологии: Руководство для практических врачей. – М.: РЛС – 2005. – С.1356.
103. Юшков, Б.Г. Система крови и экстремальные воздействия на организм / Б.Г.Юшков, В.Г.Климин, М.В.Северин. – Екатеринбург: УрО РАН, 1999. – 200 с.

104. Юшков, Б.Г. Роль стволовых клеток в регенерации печени и почек / Б.Г.Юшков, И.Г.Данилова, И.А.Козакова // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2013. - № 1 (43). – С.46-48.
105. Ярмоненко, С.П. Радиобиология человека и животных: учебное пособие / С.П.Ярмоненко, А.А.Вайнсон. – М.: Высшая школа, 2004. – 549 с.
106. Ястребов, А.П. Старение, перекисное окисление липидов и биовозраст / А.П.Ястребов, В.Н.Мещанинов. – Екатеринбург: ООО «Уральский следопыт», 2005. – 220 с.
107. Ястребов, А.П. Регуляция гемопоэза при воздействии на организм экстремальных факторов / А.П.Ястребов, Б.Г.Юшков, В.Н.Большаков. – Свердловск: Уральский рабочий, 1988. – 152 с.
108. Abudusaimi, A. Adipose-derived stem cells enhance bone regeneration in vascular necrosis of the femoral head in the rabbit / A. Abudusaimi, Y. Aihemaitijiang, Y.H.Wang, L.Cui, S.Maimaitiming, M.Abulikemu:. Journal of International Medical Reseach. – 2011. – Vol. 39. – P.1852–1860.
109. Aggarwal, S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S.Aggarwal, M.F.Pittenger // Blood. – 2005. – Vol. 105. – P.1815–1822.
110. Ahn, J.H. Comparison of immunoreactivities in 4-HNE and superoxide dismutases in the cervical and the lumbar spinal cord between adult and aged dogs / J.H. Ahn, J.H.Choi, J.S.Kim, H.J.Lee, C.H.Lee, K.Y.Yoo, I.K.Hwang, Y.L.Lee, H.C.Shin, M.H.Won // Experimental Gerontology. – 2011. – Vol. 46. – P.703–708.
111. Ahn, J.Y. Intramarrow injection of beta-catenin-activated, but not naive mesenchymal stromal cells stimulates self-renewal of hematopoietic stem cells in bone marrow / J.Y. Ahn, G.Park, J.S.Shim // Experimental and Molecular Medicine. – 2010. – Vol. 42. – P.122–131.
112. Aimaiti, A. Therapeutic effect of osteogenically induced adipose derived stem cells on vascular deprivation-induced osteonecrosis of the femoral head

- in rabbits / A.Aimaiti, Y.Saiwulaiti, M.Saiyiti, Y.H.Wang, L.Cui, A.Yusufu // Chinese Journal of Traumatology. – 2011. – Vol. 14. – P.215–220.
113. Aldinucci, A. Inhibition of immune synapse by altered dendritic cell actin distribution: a new pathway of mesenchymal stem cell immune regulation / A.Aldinucci, L.Rizzetto, L.Pieri // Journal of Immunology. – 2010. – Vol. – 185, №9. – P.5102-5110.
114. Alvarado-Moreno, A. In vitro cell cycle dynamics of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood / A. Alvarado-Moreno, A.Chávez-González, A.Cérbulo, L.Arriaga, H.Mayani // Hematology. – 2010. – Vol. 15. – P.11–20.
115. Alvares-Silva, M. Mouse placenta is a major hematopoietic organ / M.Alvares-Silva, P.Belo – Diabangouaya, J.Salaun, F.Dieterlen – Lievre // Developmental Cell. – 2003. – P.5437 – 5444.
116. Alviano, F. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro / F.Alviano, V.Fossati, C.Marchionni // Development Biology. – 2007. – Vol. 7. – P.11.
117. Anker,P.S. Nonexpanded primari lung and bone marrow-derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood-derived CD34+ cells in NOD / SCIDmice / P.S.Anker, W.A.Noor, A.B.Kruisselbrink, S.A.Scherjon, W.Beekhuizen, R.Willemze, H.H. Kanhai, W.E.Fibbe // Experimental Hematology. – 2003. – Vol. 31. – P.881–889.
118. Aparicio-Vergara, M. Bone marrow transplantation in mice as a tool for studying the role of hematopoietic cells in metabolic and cardiovascular diseases / M. Aparicio-Vergara, R.Shiri-Sverdlov, G.de Haan // Atherosclerosis. – 2010. – Vol. 213. – P.335–44.
119. Arnalich-Montiel,F Adipose derived stem cells area source for cell therapy of the corneal stroma / F.Arnalich-Montiel, S.Pastor, A.Blazquez-Martinez, J.Fernandez-Delgado, M.Nistal, L.Alio, M.P.DeMiguel // StemCells. – 2008. – Vol. 26. – P.570–579.

120. Baird, K. Chronic graft-versus-host-disease (GVHD) in children / K.Baird, K.Cooke, K.R.Schultz // *Pediatric Clinics of North America*. - 2010. - Vol 57, № 1. - P.297 - 322.
121. Baker, D.J. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing associated disorders / D.J. Baker, T.Wijshake, T.Tchkonia, N.K.LeBrasseur, B.G.Childs, B.van de Sluis, J.L.Kirkland, J.M.van Deursen // *Nature*. – 2011. – Vol. 479. – P.232–236.
122. Ball, L.M. Cotransplantation of ex vivo-expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation / L.M.Ball, M.E. Bernardo, H.Roelofs, A.Lankester, A.Cometa, R.M.Egeler, F.Locatelli, W.E.Fibbe // *Blood*. - 2007. – Vol. 110. – P.2764 – 2767.
123. Barcena, A. The human placenta is a hematopoietic organ during the embryonic and fetal periods of development / A.Barcena, M.Kapidzic, M.O.Muench, M.Gormley, M.A.Scott, J.F.Weier, C.Ferlatte, S.J.Fisher // *Development Biology*. - 2009. – Vol. 327. - P.24-33.
124. Becker, A.J. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells / A.J.Becker, E.A.McCulloch, J.E.Till // *Nature*. – 1963. – Vol. 197. – P.452–454.
125. Benarafa, C. SerpinB1 protects the mature neutrophil reserve in the bone marrow / C.Benerafa, T.E.LeCuyer, M.Baumann, J.M.Stolley, T.P. Cremona, E.Remold-O'Donnell // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2011. - Vol. 90, № 1. – P.21-29.
126. Benito, A.I. Hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood progenitors: review of current clinical result / A.I.Benito, M.A.Diaz, M. Gonzalez-Vicent, J.Sevilla, L. Madero // *Bone Marrow Transplantation*. - 2004. – Vol. 33. – P.675 - 690.
127. Bensidhoum, M. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1 + human mesenchymal stem cells into the NOD / SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment / M.Bensidhoum, A.Chapel,

- S.Francois, C.Demarquay, C.Mazurier, L.Fouillard, S.Bouchet, J.M.Bertho, P.Gourmelon, J.Aigueperse, P.Charbord, N.C.Gorin, D.Thierry, M.Lopez. – Blood. – 2004. – Vol. 103. – P.3313 – 3319.
128. Berger, J. Influence of food restriction on mammalian immunity / J.Berger // Journal of Applied Biomedicine. – 2013. – Vol. 11. – P. 1–5.
129. Bhatia, M. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice / M.Bhatia, J.C.Wang, U.Kapp, D.Bonnet, J.E. // Dick Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1997. – Vol. 94, № 10. – P. 5320-5325.
130. Bianco, P. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine / P.Bianco // Nature Medicine. – 2013. – Vol. 19, № 1. – P. 38-42.
131. Bocelli-Tyndall, C. Fibroblast growth factor 2 and platelet-derived growth factor, but not platelet lysate, induce proliferation dependent, functional class II major histocompatibility complex antigen in human mesenchymal stem cells / C.Bocelli-Tyndall, P.Zajac, N.Di Maggio, E.Trella, F.Benvenuto, G.Iezzi // Arthritis and Rheumatism. – 2010. – Vol. – 62. – P.3815-3825.
132. Borena, B.M. Mammary stem cell research in veterinary science: an update / B.M. Borena, L.Bussche, C.Burvenich, L.Duchanteau, G.R.Van de Walle // Stem Cells Development. – Vol. 22. – P.1743-1751.
133. Boué, S. Analysis of human and mouse reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. What is in the plate? / S.Boué, I.Paramonov, M.J.Barrero, J.C.Izpisúa Belmonte // Public library of science one. - 2010. - Vol. - 5, № 9. -P. - 14243.
134. Bourin, P. Culture and use of mesenchymal stem cells in phase I and II clinical trials / P.Bourin, L.Sensebe, V.Planat-Bechard // Stem Cell international. – 2010. – Vol. 2. - P.1-8.
135. Brennand ,K.J. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells / K.J.Brennand, A.Simone, J.Jou, C.Gelboin-Burkhart, N.Tran,

- S.Sangar, Y.Li, Y.Mu, G.Chen, D.Yu // *Nature*. – 2011. – Vol. 473. – P. 221–225.
136. Brown, M.E. Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral blood T lymphocytes / M.E.Brown, E.Rondon, D.Rajesh, A.Mack, R.Lewis, X.Feng, L.J.Zitur, R.D.Learish, E.F.Nuwaysir // *Public library of science one*. - 2010.- Vol. 5, № 6. - P. - 11373.
137. Broxmeyer, H.E. Umbilical cord transplantation: epilogue / H.E.Broxmeyer // *Hematology*. – 2010. – Vol. 47. – P. 97–103.
138. Bunting, K.D. Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice / K.D.Bunting, J.Galipeau, D.Topham, E.Benaim, B.P.Sorrentino // *Blood*. – 1998. – Vol. 92. – P.2269–2279.
139. Burova, E. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium / E.Burova, A. Borodkina, A.Shatrova, N.Nikolsky // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2013. – P.474931.
140. Caplice, N. M. The future of cell therapy for acute myocardial infarction / N. M.Caplice // *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. – 2006. – Vol. 3. – P.129–132.
141. Cardoso, T.C. Isolation and characterization of wharton's jelly derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three dimensional system / T.C.Cardoso, H.F.Ferrari, A.F.Garcia, J.B.Novais, C.S.Silva-Frade, M.C.Ferrarezi, A.L.Andrade, R.Gameiro // *BMC Biotechnology*. – 2012. – P.12-18.
142. Carette, J.E. Generation of iPSCs from cultured human malignant cells / J.E.Carette, J.Pruszek, M.Varadarajan, V.A.Blomen, S.Gokhale // *Blood*. – 2010. – Vol.115. – P.4039–4042.

143. Carey, B.W. Single-gene transgenic mouse strains for reprogramming adult somatic cells / B.W.Carey, S.Markoulaki, C.Beard, J.Hanna, R.Jaenisch // Nature Methods. - 2010. - Vol. - 7, № 1. - P.56-59.
144. Carpenter, L. Efficient differentiation of human induced pluripotent stem cells generates cardiac cells that provide protection following myocardial infarction in the rat / L.Carpenter, C.Carr, C.T.Yang, D.J.Stuckey, K. Clarke, S.M. Watt // Stem Cells Development. – 2012. – Vol. 21, № 6. – P.977–986.
145. Charron, D. Anti-HLA antibodies in regenerative medicine stem cell therapy / D.Charron, C.Suberbielle-Boissel, R.Tamouza, R.Al-Daccak // Human Immunology. – 2012. – Vol. 73. – P.1287-1294.
146. Cerrada, I. Hypoxia-inducible factor 1 alpha contributes to cardiac healing in mesenchymal stem cells-mediated cardiac repair / I. Cerrada, A.Ruiz-Saurí, R.Carrero, C.Trigueros, A.Doronsoro, J.M.Sanchez-Puelles, A.Diez-Juan, J.A. Montero, P.Sepúlveda // Stem Cells and Development. – 2013. – Vol. 22. – P.501–511.
147. Challen, G. A. A side order of stem cells: the SP phenotype/ G.A. Challen, M.H.Little // Stem Cells. - 2006. – Vol. – 24. - P.3.
148. Chaudhary, P.M. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells / P.M.Chaudhary, I.B. Roninson // Cell. -1991. – Vol. – 66. – P.85–94.
149. Chen, C.Z. Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells / C.Z.Chen, M. Li,D. de Graaf, S.Monti, B.Gottgens, M.J.Sa´nchez, E.S. Lander, T.R.Golub, A.R.Green, H.F.Lodish // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2002. – Vol. 99. – P.15468–15473.
150. Cho, H.J. Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation // H.J.Cho, C.S.Lee, Y.W.Kwon, J.S.Paek, S.H.Lee, J.Hur, E.J. Lee, T.Y.Roh, I.S.Chu,

- S.H.Leem, Y.Kim, H.J.Kang, Y.B.Park, H.S.Kim // *Blood*. - 2010. - Vol. - 116, № 3. - P.386-395.
151. Choi, S.M. Reprogramming of EBV-immortalized B-lymphocyte cell lines into induced pluripotent stem cells / S.M.Choi, H.Liu, P.Chaudhari, Y.Kim, L.Cheng, J.Feng // *Blood*. – 2011. – Vol. 118. – P.1801–1805.
152. Chow, A. Bone marrow CD169 macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche / A. Chow, D.Lucas, A.Hidalgo, S.Mendez-Ferrer, D.Hashimoto, C.Scheiermann // *Journal of Experimental Medicine*. – 2011. – Vol. 208. – P.261–271.
153. Christ, O. Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity / O. Christ, K. Lucke, S. Imren, K. Leung, M. Hamilton, A. Eaves, C. Smith, C. Eaves // *Haematologica*. – 2007. - 92, № 9. – P.1165-72.
154. Christensen, J.L. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells / J.L.Christensen, I.L.Weissman // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. – 98. – P.14541–14546.
155. Christensen, M.E. Mesenchymal stromal cells transiently alter the inflammatory milieu posttransplant to delay graft-versus-host disease / M.E. Christensen, B.E.Turner, L.J.Sinfield // *Haematologica*. – 2010. – Vol. 95. – P.2102–2110.
156. Christopher, M.J. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice / M.J. Christopher, M.Rao, F.Liu, J.R.Woloszynek, D.C.Link // *Journal of Experimental Medicine*. – 2011. – Vol. 208. – P.251–260.
157. Christopherson, K.W. Cell surface peptidase CD 26/ dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL 12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis

- of human cord blood CD34+ progenitor cells / K.W.Christopherson, G.Hangoc, H.E.Broxmeyer // *Blood*. - 2004. - 103, № 8. - P.2981-2989.
158. Ciccocioppo, R. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease / R.Ciccocioppo, M.E.Bernardo, A.Sgarella // *Gut*. - 2011. - Vol. 60. - P.788-798.
159. Cizkova, D. Role of transplanted bone marrow cells in response to skeletal muscle injury / D.Cizkova, J.Vavrova, S.Micuda // *Folia Biology (Prague)*. - 2011. - Vol. 57. - P.232-241.
160. Clapes, T. Embryonic development of hematopoietic stem cells: implications for clinical use // T.Clapes, C.Robin // *Regenerative Medicine*. - 2012. - Vol. 7. - P.349-368.
161. Connick, P. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label Phase IIa proof-of-concept study / P.Connick, M.Kolappan, C.Crawley // *Lancet Neurology*. - 2012. - Vol. 11. - P.150-156.
162. Cuende, N. Concise Review: Bone Marrow Mononuclear Cells for the Treatment of Ischemic Syndromes: Medicinal Product or Cell Transplantation? / N.Cuende, L.Rico, C.Herrera // *Stem Cells Translational Medicine*. - 2012. - Vol. 1, № 5. - P.403-408.
163. Dahlberg, A. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells / A.Dahlberg, C.Delaney, I.D.Bernstein // *Blood*. - 2011. - Vol. 23. - P.234-245.
164. Denning-Kendall, P. Cobblestone area-forming cells in human cord blood are heterogeneous and differ from long-term culture-initiating cells / P.Denning-Kendall, S.Singha, B.Bradley, J.Hows // *Stem Cells*. - 2003. - 21, № 6. - P.694-701.
165. Delaney, C. Strategies to enhance umbilical cord blood stem cell engraftment in adult patients / C.Delaney, M.Z.Ratajczak, M.J.Laughlin // *Expert Review of Hematology*. - 2010. - Vol. 3. - P.273-283.

166. Devine, S.M. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates / S.M.Devine, C.Cobbs, M.Jennings, A.Bartholomew, R.Hoffman // *Blood*. – 2003. – Vol. 101. – P.2999–3001.
167. Didenko, V.V. Biotin-labeled hairpin oligonucleotides: probes to detect double-strand breaks. DNA in apoptotic cells / V.V. Didenko, J.R.Tunstead, P.J. Hornsby // *American Journal of Pathology*. – 1998. - Vol. 152. – P.897–902.
168. Ding, L. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells / L. Ding, T.L.Saunders, G.Enikolopov, S.J.Morrison // *Nature*. – 2012. – Vol. 481. – P.457–462.
169. Doulatov, S. Hematopoiesis: a human perspective / S.Doulatov, F.Notta, E.Laurenti // *Cell Stem Cell*. – 2012. – Vol. 10. – P.120–136.
170. Dmitrieva, R.I. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, differences and similarities / R.I. Dmitrieva, I.R.Minullina, A.A.Bilibina, O.V.Tarasova, S.V.Anisimov, A.Y.Zaritskey // *Cell Cycle*. – 2012. – Vol. 11. – P.377–383.
171. Ebben, J.D. Introduction to induced pluripotent stem cells: advancing the potential for personalized medicine / J.D. Ebben, M.Zorniak, P.A.Clark, J.S.Kuo // *World Neurosurg*. – 2011. – Vol. 76. – P.270-275.
172. Ellis, J. Benefits of utilizing gene - modified iPSCs for clinical applications / J.Ellis, C.Baum, N.Benvenisty, G.Mostoslavsky, H.Okano, W.L.Stanford, M.Porteus, M.Sadelain // *Cell Stem Cell*. - 2010.- Vol. 7, № 4. - P.429-430.
173. Encado, A. CD34+ CD 38- is a good predictive marker of cloning ability and expansion potential of CD34+ cord blood cells / A.Encado, E.Mateu, F.Carbonell-Uberos // *Transfusion*. – 2003. – Vol. – 43, No 3. – P.383-389.
174. Falanga, V. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds / V.Falanga, S.Iwamoto, M.Chartier, T.Yufit, J. Butmarc, N.Kouttab, D.Shroyer, P.Carson // *Tissue engineering*. – 2007. – Vol. 13. – P.1299–1312.

175. Fausto, N. Hepatocyte differentiation and liver progenitor cells / N.Fausto // *Current Opinion in Cell Biology*. – 1990. – Vol. – 2. – P.1036 – 1042.
176. Feitosa, M.L. Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine femoral head: preliminary results / M.L.Feitosa, L.Fadel, P.C.Beltrão-Braga, C.V.Wenceslau, I.Kerkis, A.Kerkis, E.H.Birgel Júnior, J.F.Martins, S.Martins Ddos, M.A.Miglino, C.E.Ambrósio // *Acta Cirurgica Brasileira*. – 2010. – Vol. 25. – P.416–422.
177. Ferroni, L. Potential for neural differentiation of mesenchymal stem cells / L. Ferroni, C.Gardin, I.Tocco, R.Epis, A.Casadei, V.Vindigni, G.Mucci, B.Zavan // *Biochemistry English Biotechnology*. – 2013. – Vol. 129. – P.89–115.
178. Filip, S. Splenectomy influence homing of transplanted stem cells in bone marrow-ablated mice / S. Filip, J.Mokry, J.Vavrova // *Stem Cells Development*. – 2012. – Vol. 21. – P.702–709.
179. Forsberg, E.C. Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cell / E.C.Forsberg , S.S.Prochaska, S.Katzman // *Public Library of Science Genetics*. – 2005. – P.75.
180. Fouillard, L. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma / L.Fouillard, M.Bensidhoum, D.Bories, H.Bonte, M.Lopez, A.M.Moseley, A. Smith, S.Lesage, F.Beaujean, D.Thierry, P.Gourmelon, A.Najman, N.C.Gorin // *Leukemia*. - 2003. – Vol. 17. – P.474–476.
181. Fu-sheng, W. CD34 Negative Hematopoietic Stem Cells / W.Fu-sheng // *Sysmex Journal International*. – 2002. - Vol. – 12, No.1.
182. Gallacher, L. Isolation and characterization of human CD34 – Lin – and CD34 + Lin- hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7 / L.Gallacher, B.Murdoch, D.M. Wu, F.N.Karanu, M.Keeney, M.Bhatia // *Blood*. – 2000. – Vol. 95. – P.2813–2820.

183. Galliot, B. Cell plasticity in homeostasis and regeneration / B. Galliot, L.Ghila // *Molecular Reproduction and Development*. – 2010. – Vol. 77. – P.837–855.
184. Gangji, V. Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: Five year follow-up of a prospective controlled study / V.Gangji, V.De Maertelaer, J.P.Hauzeur // *Bone*. – 2011. – Vol. 49. – P.1005–1009.
185. Gebler, A. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells / A. Gebler, O.Zabel, B.Seliger // *Trends in Molecular Medicine*. – 2012. – Vol. 18. – P.128-134.
186. Gecas, C. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells / C.Gecas, F.Dieterlen –Lievre, S.Orkin, H.Mikkola // *Developmental Cell*. – 2005. – P.365 – 375.
187. Gieseke, F. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells / F.Gieseke, J.Bohringer, R.Bussolary // *Blood*. – Vol. 116, № 19. – P.3770-3779.
188. Gluckman, E. Cord blood transplantation: state of the art / E.Gluckman, V.Rocha // *Hematologica*. – 2009. – Vol. 94, №4. – P.451-454.
189. Godin, I. The hare and the tortoise: an embryonic hematopoietic race / I.Godin, A.Cumano // *Nature Reviews Immunology*. – 2002. – P.593-604.
190. Goodell, M.A. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo / M.A.Goodell, K.Brose, G.Paradis, A.S.Conner, R. C.Mulligan // *Journal of Experimental Medicine*. – 1996. – 183, № 4. – P.1797-1806.
191. Gurevich, O. Transplantation of allogeneic or xenogeneic bone marrow within the donor stromal microenvironment / O.Gurevich // *Transplantation*. – 1999. – Vol. 68. – P.1362–1368.
192. Halabian, R. Genetically engineered mesenchymal stem cells stably expressing green fluorescent protein / R. Halabian, M.H. Mohammadi, A.Salimi Mohammad, A.Mohammadi Roushandeh, M.Aghaipour,

- N.Amirizadeh // Iranian Journal of Basic Medical Sciences. – 2010. – Vol.13, № 2. – P.24–30.
193. Han, Z. The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth / Z.Han, Y.Jing, S.Zhang // Cell and Bioscience. – 2012. – Vol. 2. – P.8.
194. Hang, D. Treatment of Osteonecrosis of the Femoral Head with VEGF (165) Transgenic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Mongrel Dogs / D. Hang, Q.Wang, C.Guo, Z.Chen, Z.Yan // Cells Tissues Organs. – 2012. – Vol. 195, № 6. – P.495–506.
195. Heng, J.C. The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells / J.C. Heng, B.Feng, J.Han, J.Jiang, P.Kraus, J.H.Ng, Y.L.Orlov, M.Huss, L.Yang, T.Lufkin, B.Lim, H.H.Ng // Cell Stem Cell. - 2010. - Vol. 6, № 2. - P.167-174.
196. Hao, L. Human umbilical cord blood-derived stromal cells prevent graft-versus-host disease in mice following haplo-identical stem cell transplantation / L. Hao, L.Gao, X.H.Chen // Cytotherapy. – 2011. – Vol. 13. – P.83–91.
197. Hauzeur, J.P. Phases 1–3 clinical trials using adult stem cells in osteonecrosis and nonunion fractures / J.P.Hauzeur, V.Gangji // International Journal of Stem Cells. – 2010. – P.410170.
198. Herraiz, C. N-glycosylation of the human melanocortin 1 receptor: occupancy of glycosylation sequons and functional role Sanchez-Laorden / C. Herraiz, C.Jimenez-Cervantes, J.C.Garcia-Borron // Pigment Cell and Melanoma Reserarch. – 2011. – Vol. 24. – P.479–489.
199. Hess, D. A. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity / D.A.Hess , T.E.Meyerrose, L.Wirthlin, T.P. Craft, P.E. Herrbrich, M. H. Creer , J.A. // Blood. 2004. –Vol. 104, № 6. – P.1648-1655.

200. Hill, R. Selective evolution of stromal mesenchyme with p53 loss in response to epithelial tumorigenesis / R.Hill, S.Yurong, D.Robert // *Cell*. – Vol. 123. – P. 1001-1011.
201. Hofmann, T.J. Transplanted murine long-term repopulating hematopoietic cells can differentiate to osteoblasts in the marrow stem cell niche / T.J. Hofmann, S.Otsuru, R.Marino // *Molecular Therapy*. – 2013. – Vol. 21. – P.1224–31.
202. Horwitz, E.M. Isolate allogeneic bone marrowderived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone / E.M.Horwitz, P.L.Gordon, W.W.Koo, J.C.Marx, M.Neel, R.Y.McNall, L.Muul, T.Hofmann // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2002. – Vol. 99. – P. 8932–8937.
203. Houssaint, E. Differentiation of the mouse hepatic primordium. II. Extrinsic origin of the haemopoietic cell line / E.Houssaint // *Cell Differ*. – 1981. – Vol. 10. – P.243-252.
204. Hu, K. Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells / K. Hu, J.Yu, K.Suknuntha, S.Tian, K.Montgomery, K.D.Choi. // *Blood*. – 2011. – Vol. 117. – P.109–119.
205. Ikebe, C. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols / C.Ikebe, K.Suzuki // *Biomed Research International*. – 2014. – P.951512.
206. Inoue, H. The use of induced pluripotent stem cells in drug development / H.Inoue, S.Yamanaka // *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. - 2011. - Vol. 89, № 5. - P.655-661.
207. Israel, M.A. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells / M.A.Israel, S.H.Yuan, C.Bardy, S.M.Reyna, Y. Mu, C.Herrera, M.P.Hefferan, S.Van Gorp, K.L.Nazor, F.S.Boscolo // *Nature*. – 2012. – Vol. 482. – P.216–220.

208. Jeon, M.S. Xenoreactivity of human clonal mesenchymal stem cells in a major histocompatibility complex-matched allogeneic graft-versus-host disease mouse model / M.S. Jeon, H.J.Lim, T.G.Yi // *Cell Immunology*. – 2010. – Vol. 261. – P.57–63.
209. Jia, F. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells // F.Jia, K. D.Wilson, N.Sun, D.M.Gupta, M.Huang, Z.Li, N. J.Panetta, Z.Y.Chen, R.C.Robbins, M.A.Kay, M.T.Longaker, J.C.Wu // *Nature Methods*. - 2010. - Vol. - 7, № 3. - P.197-199.
210. Jing, D. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells-modeling the niche compartments in vitro / D.Jing, A.V.Fonseca, N.Alakel, F.A.Fierro, K.Muller, M.Bornhauser // *Haematologica*. – 2010. – Vol. 95, № 4. – P.542–550.
211. Jones, E. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status / E.Jones, X.Yang // *Injury*. – 2011. – Vol. 42. – P.562–568.
212. Joo, S.Y. Mesenchymal stromal cells inhibit graft-versus-host disease of mice in a dose-dependent manner / S.Y. Joo, K.A.Cho, Y.J.Jung // *Cytotherapy*. – 2010. – Vol. 12. – P.361–370.
213. Jorgensen, C. Mesenchymal stem cells in arthritis: role of bone marrow microenvironment / C.Jorgensen // *Arthritis Research Therapy*. – 2010. - Vol. - 12, № 4. - P.135-139.
214. Jozefczuk, J. Comparative analysis of human embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells reveals current drawbacks and possible strategies for improved differentiation / J.Jozefczuk, A.Prigione, L.Chavez, J.Adjaye // *Stem Cells Development*. – 2011. - Vol. 20. – P.1259–1275.
215. Kavanagh, D.J. Hematopoietic stem cell homing to injured tissues / D.J. Kavanagh, N.Kali // *Stem Cell Revolution*. – 2011. – Vol. 7. – P.672–682.
216. Kavanagh, H. Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells / H.Kavanagh, B.Mahon // *Allergy*. – 2011. – Vol. 66. – P.523–531.

217. Kebriaei, P. Treatment of graft-versus-host-disease with mesenchymal stromal cells / P.Kebriaei, S.Robinson // *Cytotherapy*. – 2011. – Vol. – 13, № 3. – P.262-268.
218. Kidd, S. Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon-beta suppress pancreatic tumors in vivo, an effect countered by anti-inflammatory treatment / S.Kidd, L.Galdwell, M.Dietrich // *Cytotherapy*. - 2010. - Vol. - 12, № 5. - P. 615 - 625.
219. Kim, D.W. Cotransplantation of third-party mesenchymal stromal cells can alleviate single donor predominance and increase engraftment from double cord transplantation / D.W.Kim, Y.J.Chung, T.G. Kim, Y.L.Kim, I.H.Oh // *Blood*. – 2004. – Vol. 103. – P.1941–1948.
220. Kong, Y. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging / Y. Kong , H.Cui, H.Zhang // *Journal of Signal Transduction*. – 2012. – P. 13.
221. Krampera, M. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus / M.Krampera, S.Marconi, A.Pasini, M.Galieg` , G.Rigotti, F.Mosna, M.Tinelli, L.Lovato, E.Anghileri, A.Andreini, G.Pizzolo, A.Sbarbati, B.Bonetti // *Bone*. – 2007. – Vol. 40. – P.382–390.
222. Krause, D.S. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell / D.S.Krause, N.D.Theise, M.I.Collector,S.Henegariu, S.Hwang, R.Gardner, S.Neutzel, S.J.Sharkis // *Cell*. – 2001. – Vol. – 105. – P.369–377.
223. Kular, J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level / J. Kular, J.Tickner, S.M.Chitn, J.Xu // *Clinical Biochemistry*. – 2012. – Vol. 45, № 12. – P.863-873.
224. Lacaud, G. Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro / G.Lacaud, L.Gore, M.Kennedy // *Blood*. – 2002. – P. 458-466.

225. Lagasse, E. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo / E.Lagasse, H.Connors, M.Al-Dhalimy, M.Reitsma, M.Dohse // *Cell*. – 2013. – Vol. – 109. – P.233–241.
226. Lefaucheur, C. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study / C.Lefaucheur, A.Loupy, D.Vernerey, J.P.Duong-Van-Huyen, C.Suberbielle, D.Anglicheau // *Lancet*. – 2013. – Vol. 381. – P.313-319.
227. Lampron, A. Effects of myeloablation, peripheral chimerism, and whole-body irradiation on the entry of bone marrow-derived cells into the brain / A. Lampron, M.Lessard, S.Rivest // *Cell Transplantation*. – 2012. – Vol. 21. – P.1149–59.
228. Lauden, L. Allogenicity of human cardiac stem/ progenitor cells orchestrated by programmed death ligand 1 / L. Lauden, W.Boukouaci, L.R.Borlado, I.P.López, P.Sepúlveda, R.Tamouza // *Circulation Research*. – 2013. – Vol. 112. – P.451-64.
229. Le Blanc, K. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells / K.Le Blanc, H.Samuelsson, B.Gustafsson, M.Remberger, B.Sundberg, J.Arvidson, P.Ljungman, H.Lonnies, S.Nava, O.Ringden // *Leukemia*. – 2007. Vol. 21. – P.1733–1738.
230. Le Blanc, K. Treatment of severe acute graft versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells / K.Le Blanc, I.Rasmusson, B.Sundberg, C.Gotherstrom, M.Hassan, M.Uzunel, O.Ringden. – *Lancet*. – 2004. – Vol. 363. – P.1439–1441.
231. Lee, D.H. Isolation and expansion of synovial CD34 (–) CD44 (+) CD90 (+) mesenchymal stem cell: comparison of an enzymatic method and a direct explant technique / D.H.Lee, S.D.Joo, S.B.Han, J.Im, S.H.Lee, C.H.Sonn, K.M.Lee // *Connective Tissue Research*. – 2010. – Vol. 52. – P.226–234.
232. Leucht, P. Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration / P.Leucht, J.B.Kim, R.Amasha, A.W.James, S.Girod, J.A.Helms // *Development*. – 2008. – Vol. 135. – P.2845–2854.

233. Li, Q. Decrease of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation / Q. Li, Z.Zhai, X.Xu // *Leukemia Research*. – 2010. – Vol. 34. – P.1158–1168.
234. Li, Y. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules / Y.Li, Q.Zhang, X.Yin, W.Yang, Y.Du, P.Hou, J.Ge, C.Liu, W.Zhang, X.Zhang, // *Cell Research*. - 2011. - Vol. - 21, № 1. - P.196-204.
235. Li, Z.H. Intravenous transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head / Z.H.Li, W.Liao, X.L.Cui, Q.Zhao, M.Liu, Y.H.Chen, T.S.Liu, N.L.Liu, F.Wang, Y.Yi, N.S.Shao // *International Journal of Medical Sciences*. – 2011. – Vol. 8. – P.74–83.
236. Lioznov, M.V. Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants / M.V.Lioznov, P.Freiberger, N.Kröger, A.R.Zander, B.Fehse // *Bone Marrow Transplantation*. – 2005. - Vol. – 35, № 9. - P. 909-914.
237. Lombardi, G. Role of IGF-I on PTH effects on bone / G. Lombardi, S.C.Di, L.Vuolo, E.Guerra, E.Scarano, A.Colao // *Journal of Endocrinological Investigation*. – 2010. – Vol. 33, № 7. – P.22-26.
238. Lu, D. Comparison of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells for Treatment of Diabetic Critical Limb Ischemia and Foot Ulcer: A Double-Blind, Randomized Controlled Trial / D.Lu, B.Chen, Z.Liang, W.Deng, Y.Jiang, S.Li, J.Xu, Q.Wu, Z.Zhang, B.Xie, S.Chen // *Diabetes Research and Clinical Practice*. – 2011. – Vol. 92, № 1. – P.26–36.
239. Lü, Y. TGF- $\beta$ 1 induced bone marrow mesenchymal stem cells differentiate in cardiomyocyte-like cells / Y.Lü, H.P.Wang, B.Liu, Z.G.Wu, Y.L.Huo, C.W.Gao // *Acta Anatomica Sinica*. – 2013. – Vol. 44. – P. 49–54.

240. Ma, Y. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells / Y.Ma, Y.Xu, Z.Xiao, W.Yang, C.Zhang, E.Song, Y.Du, L.Li // *Stem Cells*. – 2006. – Vol. 24. – P.315–321.
241. Maier, C.L. Human placental pericytes poorly stimulate and actively regulate allogenic CD4 T - cell responses / C.L.Maier, J.S.Pober // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2011. – Vol. – 31. – P.183–189.
242. Malgieri, A. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art // A.Malgieri, E.Kantzari, M.P.Patrizi, S.Gambardella // *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. – 2010. – Vol. 3. – P.248–269.
243. Marchetto, M.C. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells / M.C.Marchetto, C.Carroneu, A.Acab, D.Yu, G.W.Yeo, Y.Mu, G.Chen, F.H.Gage, A.R.Muotri // *Cell*. – 2010. – Vol. 143. – P.527–539.
244. Marchi, S. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging / S. Marchi, C.Giorgi, J.M.Suski, C.Agnoletto, A.Bononi, M.Bonora, E.De Marchi, Missiroli S., S.Patergnani, F.Poletti, A.Rimessi, J.Duszynski, M.R.Wieckowski, P.Pinton // *Journal of Signal Transduction*. – 2012. – P. 17-23.
245. Martin, P.J. Prochymal (R) improves response rates in patients with steroid-refractory acute graft versus-host disease involving the liver and gut: results of a randomized, placebo-controlled, multicentre phase III trial in GvHD / P.J.Martin, J.P.Uberti, R.J.Soiffer // *Bone Marrow Transplantation*. – 2010. – Vol. 45. – P.17–19.
246. Masuya, M. Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells / M. Masuya, C.J.Drake, P.A.Fleming, C.M.Reilly, H.Zeng, W.D.Hill, A. Martin Studdard, D.C.Hess, M.Ogawa // *Blood*. - 2003. – Vol. – 101. – P.2215–2218.

247. Meijer, G.J. Cell based bone tissue engineering in jaw defects / G.J.Meijer, J.D.de Bruijn, R.Koole, C.A.van Blitterswijk // *Biomaterials*. – 2008. – Vol. 29. – P.3053–3061.
248. Melchers, F. Murine embrionic B lymphocyte developmrent in the placenta / F.Melchers // *Nature*. – 1979. – P.219-221.
249. Mendez-Ferrer, S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche / S. Mendez-Ferrer, T.V.Michurina, F.Ferraro, A.R.Mazloom, B.D.Macarthur, S.A.Lira // *Nature*. – 2010. – Vol. 466.– P.829–834.
250. Micallef, I.N. Plerixafor (Mozobil) for stem cell mobilization in patients with multiple myeloma previously treated with lenalidomide / I.N. Micallef, A.D.Ho, L.M.Klein, S.Marulkar, P.J.Gandhi, P.A.McSweeney // *Bone Marrow Transplant*. - 2011. – Vol. 46. –P.350–355.
251. Miki, T. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells/ T.Miki, S.C.Strom // *Stem Cell Reviews*. - 2006. – Vol. 2. – P.133-142.
252. Miki, T. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells Lehmann T. / T.Miki, H.Cai, D.B.Stolz, S.C.Strom // *Stem Cells*. – 2005. – Vol. 23. – P.1549-1559.
253. Mikkola, H. The journey of developing hematopoietic stem cells / H.Mikkola, S.Orkin // *Development*. – 2006. – Vol. – 133. – P.3733 – 3744.
254. Mikkola, H.K. Placenta as a site for hematopoietic stem cell development / H.K.Mikkola, C.Gekas, S.H.Orkin // *Experimental Hematology*. – 2005. – Vol. – 33. – P.1048-1054.
255. Minguell, J.J. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease / J.J.Minguell, A.Erices // *Experimental Biology and Medicine*. – 2006. – Vol. 231, № 1. – P.39-49
256. Mirza, A. Undifferentiated mesenchymal stem cells seeded on a vascular prosthesis contribute to the restoration of a physiologic vascular wall / A.Mirza, J.M.Hyvelin, G.Y.Rochefort, P.Lermusiaux, D.Antier, B.Awede,

- P.Bonnet, J.Domenech, V.Eder. // *Journal of Vascular Surgery*. – 2008. – Vol. 47. – P.1313–1321.
257. Miyata, Y. Cyclin C regulates human hematopoietic stem/progenitor cell quiescence / Y.Miyata, Y.Liu, V.Jankovic, G.Sashida, J.M.Lee, J.H.Shieh // *Stem Cells*. – 2010. – Vol. 28, № 2. – P. 308–317.
258. Miyoshi, N. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs / N.Miyoshi, H. Ishii, H.Nagano, N.Haraguchi, D.L.Dewi, Y.Kano, S.Nishikawa, M.Tanemura, K.Mimori, F.Tanaka // *Cell Stem Cell*. – 2011. – Vol. 8. – P.633–638.
259. Mohsin, S. Empowering adult stem cells for myocardial regeneration / S. Mohsin, S.Siddiqi, B.Collins, M.A.Sussman // *Circulation Research*. – 2011. – Vol. 109. – P.1415-1428.
260. Motyl, T. Identification, quantification and transcriptional profile of potential stem cells in bovine mammary gland / T. Motyl, J.B.Bierła, M.Kozłowski, M.Gajewska, B.Gajkowska, M.Koronkiewicz // *Livestock Science*. – Vol. 136. – P.136-149.
261. Munira, X. C-Kit function is necessary for in vitro myogenic differentiation of bone marrow hematopoietic cells / X.Munira, C.Massimo, F.Shafie // *Stem Cells*. - 2009. – Vol. 27, № 8. – P.1911-1920.
262. Murray, L. Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34<sup>+</sup> Thy-1<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> subpopulation from mobilized peripheral blood / L.Murray, B.Chen, A.Galy // *Blood*. - 1994. – Vol. 83, № 9. – P.368 – 378.
263. Nadali, G. Regulation of the proliferative potential of cord blood long-term culture-initiating cells (LTC-IC) by different stromal cell lines: implications for LTC-IC measurement / G.Nadali, E. A.de Wynter, F.Perandin, L.Tavecchia, C.Vincenzi, A.Ambrosetti, M.Fornalè, G.Perona, G.Pizzolo, N.G.Testa // *Haematologica*. – 1998. - Vol. 83, 12. - P.1059-1065.
264. Nakamura, Y. Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells / Y. Nakamura, F.Arai,

- H.Iwasaki, K.Hosokawa, I.Kobayashi, Y.Gomei // *Blood*. – 2010. – Vol. 116. – P.1422–1432.
265. Nelson, G. Senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence / G. Nelson, J.Wordsworth, C.Wang, D.Jurk, C.Lawless, C.Martin-Ruiz, T.von Zglinicki // *Aging Cell*. – 2012. – Vol. 11. – P.345–349.
266. Nemeth, K. Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma / K.Nemeth, A.Keane-Myers, J.M.Brown // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2010. - Vol. 107, №12. - P.5652-5657.
267. Nemeth, K. Modulation of bone marrow stromal cell function in infectious diseases by toll-like receptor ligands / K.Nemeth, B.Mayer, E.Mezey // *Journal of Molecular Medicine*. - 2010. - Vol. 88, №1. - P.5-10.
268. Ning, H. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study / H.Ning, F.Yang, M.Jiang, L. Hu, K.Feng, J.Zhang, Z.Yu, B.Li, C.Xu, Y.Li, J.Wang, J.Hu, X.Lou, H.Chen // *Leukemia*. – 2008. – Vol. 22. – P.593– 599.
269. Nishihori, T. Advances in the autologous and allogeneic transplantation strategies for multiple myeloma / T. Nishihori, M.Alsina // *Cancer Control*. - 2011. – Vol. 18. – P.258–267.
270. North, T. Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters / T. North, T.L.Gu, T.Stacy // *Development*. – 1999. – P.2563-2575.
271. Oh, J.Y. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury / J.Y.Oh, M.K.Kim, M.S.Shin, H.J.Lee, J.H.Ko, W.R.We, J.H.Lee // *Stem Cells*. – 2008. – Vol. 26. – P.1047–1055.
272. Oodi, A. Expression of P16 cell cycle inhibitor in human cord blood CD34+ expanded cells following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells / A.Oodi, M.Noruzinia, M.Habibi Roudkenar,

- M.Nikougoftar, M.S. Soltanpour, M.Khorshidfar // *Hematology*. – 2012. – Vol. 17, № 6. – P.334–340.
273. Orlic, D. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium / D.Orlic, J Kajstura, S.Chimenti, I.Jakoniuk, S.M.Anderson, Li B., J.Pickel, R. McKay, B.Nadal-Ginard, D.M.Bodine, A.Leri, P.Anversa // *Nature*. – 2001. – Vol. - 410. – P.701–705.
274. Ottersbach, K. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region / K.Ottersbach, E.Dzierzak // *Developmental Cell*. – 2005. – P.377 – 387.
275. Pacifici, R. Role of T cells in the modulation of PTH action; physiological and clinical significance / R.Pacifici // *Endocrine*. – 2013. – Vol. 44, № 3. – P.576-582.
276. Pak J. Autologous adipose tissue-derived stem cells induce persistent bone-like tissue in osteonecrotic femoral heads / J.Pak // *Pain Physician*. – 2012. – Vol. 15. – P.75–85.
277. Pal, R. Immunomodulatory derivatives induce PU.1 down-regulation, myeloid maturation arrest, and neutropenia / R. Pal, S.A.Monaghan, A.C.Hassett, M.Y.Mapara, P.Schafer, G.D. Roodman // *Blood*. – 2010. – Vol. 115. – P.605–614.
278. Palacios, H.H. Mitochondrial-specific antioxidant as drug treatments for Alzheimer disease / H.H.Palacios, B.B.Yendluri, K.Parvathaneni, V.B.Shadlinski, M.E.Obrenovich, J.Leszek, D.Gokhman, K.Gasiorowski, V.Bragin, G.Aliev // *Cns and Neurological Disorders-Drug Targets*. – 2011. – Vol. 10. P.149–162.
279. Parolini, O. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells / O.Parolini, F.Alviano, G.P.Bagnara // *Stem Cells*. – 2008. –Vol 26. - P.300-311.

280. Parolini, O. Human placenta: a source of progenitor/ stem cells? / O. Parolini, M.Soncini // *Journal Reproductive Medical Endocrinology*. – 2006. – Vol. 3. – P.117-126.
281. Patel, D.M. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine / D.M.Patel, J.Shah, A.S.Srivastava // *Stem Cells International*. – 2013. – Vol. 2013. – P.15.
282. Patterson–Kane, J.C. The pathogenesis of tendon microdamage in athletes: the horse as a natural model for basic cellular research // J.C. Patterson–Kane, D.L.Becker, T.Rich // *Journal Comparative of Pathology*. – 2012. – Vol. 147. – P.227–247.
283. Peled, A. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4 / A.Peled, I.Petit, O.Kollet // *Science*. – 1999. – Vol. 283 (5404). – P.845 – 848.
284. Peled A. The chemokine SDF-1 activates the LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34 (+) cells: role in transendotelia/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice / A.Peled, O. Kollet, T. Ponomarev // *Blood*. - 2000. – 95 (11). - P.3289-3296.
285. Peng, J. Micro-CT-based bone ceramic scaffolding and its performance after seeding with mesenchymal stem cells for repair of load-bearing bone defect in canine femoral head / J.Peng, C.Wen, A.Wang, Y.Wang, W.Xu, B.Zhao, L.Zhang, S.Lu, L.Qin, Q.Guo, L.Dong, J.Tian // *Journal of Biomedical Materials Reseach Part B: Applied Biomaterials*. – 2011. – Vol. 96. – P.316–325.
286. Petersen B.E., Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells / B.E.Petersen, W.C. Bowen, K.D. Patrene, W.M. Mars, A.K. Sullivan, N. Murase, S.S. Boggs, J.S. Greenberger, J.P. Goff // *Science*. – 1999. – Vol. – 284. – P.1168–1170.
287. Pfannkuche, K. Initial colony morphology-based selection for iPS cells derived from adult fibroblasts is substantially improved by temporary UTF1-

- based selection / K.Pfannkuche, A.Fatima, M.K.Gupta, R.Dieterich, J.Hescheler // Public library of science one. - 2010. - Vol. 5, № 3. - P.9580.
288. Pierantozzi, E. Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: Expression of nanog but not of oct-4 and sox-2 / E.Pierantozzi, B.Gava, I.Manini, F.Roviello, G.Marotta, M.Chiavarelli, V.Sorrentino // Stem Cells and Development. – 2011. – Vol. 20. – P.915–923.
289. Pilz, G.A. Human term placenta – derived mesenchymal stromal cells are less prone to osteogenic differentiation than bone marrow – derived mesenchymal stromal cells / G.A.Pilz, C.Ulrich, M.Ruh // Stem Cells and Development. – 2011. – Vol. 20, № 4. – P.635 – 646.
290. Planat-Benard, V. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells:physiological and therapeutic perspectives / V.Planat-Benard, J.S. Silvestre, B. Cousin, M. Andre, M. Nibbelink, R. Tamarat, M. Clergue, C. Manneville, C. Saillan-Barreau, M. Duriez, A. Tedgui, B. Levy, L. Penicaud, L. Casteilla // Circulation. – 2004. – Vol. 109. – P. 656–663.
291. Prigione, A. The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells / A.Prigione, B.Fauler, R.Lurz, H.Lehrach, J.Adjaye // Stem Cells. – 2010. – Vol. 28. – P.721–733.
292. Rackwitz, L. Stem cell- and growth factor-based regenerative therapies for a vascular necrosis of the femoral head / L.Rackwitz, L.Eden, S.Reppenhagen, J.C.Reichert, F.Jakob, H.Walles, O.Pullig, R.S.Tuan, M.Rudert, U.Nöth // Stem Cell Research and Therapy. – 2012. – Vol. 3. – P.7.
293. Ramos-Mejia, V. iPSCs from cancer cells: challenges and opportunities / V.Ramos-Mejia, M.F.Fraga, P.Menendez // Trends in Molecular Medicine. – 2012. – Vol. 18. – P.245–247.
294. Randall, T.D. Expression of murine CD38 defines a population of long-term reconstituting hematopoietic stem cells / T.D.Randall, F.E.Lund, M.C.Howard, I.L.Weissman // Blood. – 1996. – Vol. – 87. – P.4057–4067.

295. Randall, T.D. Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment / T.D.Randall, I.L.Weissman // *Blood*. – 1997. – Vol. – 89. – P.3596–3606.
296. Rebeca, S.Y. Wong Mesenchymal stem cells: angels or demons? / S.Y. Rebeca // *Journal of biomedicine and biotechnology*. – 2011. – Vol. 2. – P.1-9.
297. Ren, G. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression / G.Ren, X.Zhao, L.Zhang // *Journal Immunology*. - 2010. - Vol. 184, № 5. - P.2321-2328.
298. Rhodes, K.E. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation / K.E.Rhodes, C.Gekas, Y.Wang, // *Cell Stem Cell*. – 2008. – Vol. – 2. – P. 252-263.
299. Robin, C. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development / C. Robin, K.Bollerot, S.Mendes, E.Haak, M. Crisan, F.Cerisoli, I. Lauw, P. Kaimakis, R.Jorna, M.Vermeulen // *Stem Cell*. – 2009. – Vol. 5. – P. 385-395.
300. Soltanpour, M.S. mRNA expression and promoter DNA methylation status of CDKi p21 and p57 genes in ex vivo expanded CD34+ cells following co-culture with mesenchymal stromal cells and growth factors / M.S. Soltanpour, N.Amirizadeh, F.Zaker, A.Oodi, M.Nikougoftar, A.Kazemi // *Hematology*. – 2013. – Vol.18, № 1. – P. 30-38.
301. Samavarchi-Tehrani, P. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming / P.Samavarchi-Tehrani, A.Golipour, L.David, H.K.Sung, T.A.Beyer, A.Datti, K.Woltjen, A.Nagy, J.L.Wrana // *Cell Stem Cell*. – 2010. – Vol. 7. – P. 64–77.
302. Sanchez-Danes, A. Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease / A.Sanchez-Danes, Y.Richaud-Patin, I.Carballo-Carbajal, S.Jimenez-

- Delgado, C.Caig, S.Mora, C.DiGuglielmo, M.Ezquerria, B.Patel, A.Giralt // *EMBO Molecular Medicine*. – 2012. – Vol 4 (5). – P. 380-395.
303. Sato, T. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells / T.Sato, J.H.Laver, M.Ogawa // *Blood*. – 1999. – Vol. -94. – P.2548–2554.
304. Sen, R.K. Early results of core decompression and autologous bone marrow mononuclear cells instillation in femoral head osteonecrosis: a randomized control study / R.K.Sen, S.K.Tripathy, S.Aggarwal, N.Marwaha, R.R.Sharma, N.Khandelwal // *Journal Arthroplasty*. – 2012. – Vol. 27. – P.679–686.
305. Senturk, S. Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth / S.Senturk, M.Mumcuoglu, O.Gursoy-Yuzugullu, B.Cingoz, K.C.Akcali, M.Ozturk // *Hepatology*. – 2010. – Vol. 52. – P.966–974.
306. Schallmoser, K. Replicative Senescence-Associated Gene Expression Changes in Mesenchymal Stromal Cells are Similar under Different Culture Conditions / K.Schallmoser, C.Bartmann, W.Wagner // *Haematologica*. – 2010. – Vol. 95, № 6. – P.867–874.
307. Sharman, A. The scientific basis for healthy aging and antiaging Processes / A.Sharman, Zhumadilov Z. – New York, 2011. – 170 p.
308. Song, H.J. Peripheral Blood Stem Cell Transplantation for Ischemic Femoral Head Necrosis / H.J.Song // *Transplantation Proceedings*. – 2010. – Vol. 42, № 7. – P. 2824.
309. Song, H.J. Treatment of early a vascular necrosis of femoral head by small intestinal submucosal matrix with peripheral blood stem cells / H.J.Song, B.S.Lan, B.Cheng, K.F.Zhang, H.W.Yan, W.Z.Wang, Z.Q.Gao // *Transplantation Proceedings*. – 2011. – Vol. 43. – P. 2027–2032.
310. Sugii, S. Feeder dependent and feeder-independent iPS cell derivation from human and mouse adipose stem cells / S.Sugii, Y.Kida, W.T.Berggren, R.M.Evans // *Nature Protocols*. - 2011. - Vol. - 6, № 3. - P.346-358.

311. Sullivan, G.J. Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells // G.J.Sullivan, D.C.Hay, I.H.Park, J.Fletcher, Z.Hannoun, C.M.Payne, D.Dalgetty, J.R.Black, J.A.Ross, K.Samuel // *Hepatology*. – 2010. – Vol. 51. – P.329–335.
312. Sun, Y. Beneficial effect of autologous transplantation of endothelial progenitor cells on steroid-induced femoral head osteonecrosis in rabbits / Y.Sun, Y.Feng, C.Zhang, X.Cheng, S.Chen, Z.Ai, B.Zeng // *Cell Transplantation*. – 2011. – Vol. 20. – P.233–243.
313. Takahashi, K. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors / K.Takahashi, K.Tanabe, M.Ohnuki, M.Narita, T.Ichisaka, K.Tomoda, S.Yamanaka // *Cell*. – 2007. – Vol. 131. – P. 861–872.
314. Tamagawa, T. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human amnion derived fibroblast-like cells / T.Tamagawa, I.Ishiwata, H.Ishikawa, Y.Nakamura // *Human Cell*. – 2008. – Vol. 21. – P.38-45.
315. Tao, R. Regulation of MnSOD enzymatic activity by Sirt3 connects the mitochondrial acetylome signaling networks to aging and carcinogenesis / R.Tao, A.Vassilopoulos, L.Parsiadou, Y.Yan, D.Gius // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2013. – Vol. 20. – P.1646–1654.
316. Till, J.E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells / J.E.Till, E.A.McCulloch // *Radiation Research*. - 1961. – P.212.
317. Thomson, J.A. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts / J.A.Thomson, J.Itskovitz-Eldor, S.S.Shapiro // *Science*. – 1998. – Vol. 282. – P.1145-1147.
318. Tomita, S. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function / S.Tomita, R.K.Li, R.D.Weisel, E.J. Kim, T.Sakai, Z.Q.Jia // *Circulation*. – 1999. – Vol. 100. – P.247–256.
319. Uchida, N. ABC transporter activities of murine hematopoietic stem cells vary according to their developmental and activation status / N.Uchida,

- B.Dykstra, K.Lyons, F.Leung, M.Kristiansen, C.Eaves // *Blood*. – 2004. – Vol. 103, № 12. – P. 4487-4495.
320. Valenzuela, N.M. The link between major histocompatibility complex antibodies and cell proliferation / N.M. Valenzuela, E.F.Reed // *Transplantation Reviews (Orlando)*. – 2011. – Vol. 25. – P.154-166.
321. Van Keymeulen A. Tracing epithelial stem cells during development, homeostasis, and repair / A. Van Keymeulen, C.Blanpain // *Journal Cell Biology*. – 2012. – Vol. 197. – P.575–84.
322. Vidal, M.A. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue / M.A.Vidal, N.J. Walker, E.Napoli, D.L. Borjesson // *Stem Cells Development*. – 2012. – Vol. 21. – P.273–283.
323. Velarde, M.C. Mitochondrial oxidative stress caused Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin / M.C.Velarde, J.M.Flynn, N.U.Day, S.Melov, J.Campisi // *Aging*. – 2012. – Vol. 4. – P.3–12.
324. Wang, B.L. Treatment of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head with the implantation of core decompression and concentrated autologous bone marrow containing mononuclear cells / B.L.Wang, W.Sun, Z.C.Shi, N.F.Zhang, D.B.Yue, W.S.Guo, S.Q.Xu, J.N.Lou, Z.R.Li // *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*. – 2010. – Vol. 130. – P.859–865.
325. Wang, X. LOX-1 in the maintenance of cytoskeleton and proliferation in senescent cardiac fibroblasts / X.Wang, M.Khaidakov, Z.Ding, Y.Dai, F.Mercanti, J.L.Mehta // *Journal of Molecular and Cell Cardiology*. - 2013. – Vol. 60. – P.184–190.
326. Warren, L. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA / L.Warren, P.D.Manos, T.Ahfeldt, Y.H.Loh, H.Li, F.Lau, W.Ebina, P.K.Mandal, Z.D.Smith, A.Meissner, G.Q.Daley, A.S.Brack, J.J.Collins, C.Cowan, T.M.Schlaeger, D.J. Rossi // *Cell Stem Cell*. - 2010. - Vol. - 7, № 5. - P.618-630.

327. Wei J.P. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice / J.P. Wei, T.S. Zhang, S. Kawa // *Cell Transplantation*. - 2003. - Vol. 2. - P.545-552.
328. Wen, Q. HGF-transgenic MSCs can improve the effects of tissue self-repair in a rabbit model of traumatic osteonecrosis of the femoral head / Q.Wen, D.Jin, C.Y.Zhou, M.Q.Zhou, W.Luo, L.Ma // *Public Library of science*. - 2012. - Vol. 7. - P.37503.
329. Williams, A.R. Enhanced effect of combining human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and to restore cardiac function after myocardial infarction / A.R.Williams, K.E.Hatzistergos, B. Addicott, F.McCall, D.Carvalho, V.Suncion, A.R.Morales, J.Da Silva, M.A.Sussman, A.W.Heldman, J.M.Hare // *Circulation*. - 2013. - Vol. 127. - P.213–223.
330. Winkler, I.G., Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs / I.G. Winkler, N.A.Sims, A.R. Pettit, V.Barbier, B.Nowlan, F.Helwani // *Blood*. - 2010. - Vol. 116. - P.4815–4828.
331. Wislet-Gendebien, S. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive in excitable neuron-like phenotype / S.Wislet-Gendebien, G.Hans, P.Leprince, J.M.Rigo, G.Moonen, B.Rogister // *Stem Cells*. - 2005. - Vol. 23. - P.392–402.
332. Wu, Y. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis / Y.Wu, L.Chen, P.G.Scott, E.E.Tredget // *Stem Cells*. - 2007. - Vol. 25. - P.2648–2659.
333. Xian, L. Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells / L. Xian // *Nature Medicine*. - 2012. - Vol. 18, № 7. - P.1095-1101.
334. Xie, X.H. Promotion of bone repair by implantation of cryopreserved bone marrow-derived mononuclear cells in a rabbit model of steroid-associated

- osteonecrosis / X.H.Xie, X.L.Wang, Y.X.He, Z.Liu, H.Sheng, G.Zhang, L.Qin // *Arthritis and Rheumatology*. – 2012. – Vol. 64. – P.1562–1571.
335. Ximeri, M. Effect of lenalidomide therapy on hematopoiesis of patients with myelodysplastic syndrome associated with chromosome 5q deletion / M.Ximeri, A.Galanopoulos, M.Klaus, A.Parcharidou, K.Giannikou, M.Psyllaki // *Haematologica*. – 2010. – Vol. 95. – P.406–414.
336. Xing, Y. The combination of angiotensin II and 5-azacytidine promotes cardiomyocyte differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells // Y.Xing, A.Lv, L.Wang, X.Yan // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2012. – Vol. 360. – P.279–287.
337. Xu, M. Mesenchymal stem cells cultured on tantalum used in early-stage avascular necrosis of the femoral head / M.Xu, D.Peng // *Medical Hypotheses*. – 2011. – Vol. 76. – P.199–200.
338. Yagita, K. Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro / K. Yagita, K.Horie, S.Koinuma, W.Nakamura, I.Yamanaka, A.Urasaki, Y.Shigeyoshi, K.Kawakami, S.Shimada, J.Takeda // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107, № 8. – P.3846–3851.
339. Yamasaki, T. Bone-marrow-derived mononuclear cells with a porous hydroxyapatite scaffold for the treatment of osteonecrosis of the femoral head: a preliminary study / T.Yamasaki, Y.Yasunaga, M.Ishikawa, T.Hamaki, M.Ochi // *Journal of Bone and Joint Surgery*. – 2010. – Vol. 92. – P. 337–341.
340. Yamazaki, S. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche / S.Yamazaki, H.Ema, G.Karlsson, T.Yamaguchi, H.Miyoshi, S.Shioda, M.M.Taketo, S.Karlsson, A.Iwama, H.Nakauchi // *Cell*. – 2011. – Vol. 147, № 5. – P.1146–1158.
341. Yan~ ez, R. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immuno suppressive properties applicable for the control of the graft-versus-

- host disease / R.Yañez, M.L.Lamana, J.García-Castro, I.Colmenero, M. Ramírez, J.A.Bueren // *StemCells*. – 2006. – Vol. 24. – P.2582–2591.
342. Yang, C.S. Micro RNAs modulate iPS cell generation / C.S.Yang, Z.Li, T.M.Rana // *RNA*. – 2011. – Vol. 17. – P.1451–1460.
343. Yang, H. Association of post-thaw viable CD34+ cells and CFU-GM with time to hematopoietic engraftment / H.Yang, J.P.Acker, M.Cabuhat, B.Letcher, L.Larratt, L.E.McGann // *Bone Marrow Transplantation*. – 2005. – P.881-887.
344. Yao, H. Identification of high proliferative potential precursors with hemangioblastic activity in the mouse aorta-gonad- mesonephros region / H.Yao, B.Liu, X.Wang // *Stem Cells*. – 2007. – Vol. – 25. P.1423-1430.
345. Yoshioka, T. Concentrated autologous bone marrow aspirate transplantation treatment for corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head in systemic lupus erythematosus / T.Yoshioka, H.Mishima, H.Akaogi, S.Sakai, M.Li, N.Ochiai // *International Orthopaedics*. – 2011. – Vol. 35. – P.823–829.
346. Yu, A.L. TGF- $\beta$ 2 induces senescence associated changes in human trabecular meshwork cells / A.L.Yu, K.Birke, J.Moriniere, U.Welge-Lüssen // *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. – 2010. – Vol. 51. – P.5718–5723.
347. Yu, J. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells / J. Yu, M.A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J.L. Frane, S. Tian, J. Nie, G.A. V. Jonsdottir, Ruotti, R. Stewart // *Science*. – 2007. – Vol. 318. – P.1917–1920.
348. Zaouali, M.A. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  accumulation in steatotic liver preservation: Role of nitric oxide / M.A. Zaouali, I.B.Mosbah, E.Boncompagni, H.B.Abdennebi, M.T.Mitjavila, R.Bartrons // *World Journal of Gastroenterology*. – 2010. – Vol. 16, № 28. – P.3499–3509.
349. Zappia E. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T cell anergy / E. Zappia, S. Casazza, E. Pedemonte, F. Benvenuto, I. Bonanni, E. Gerdoni, D. Giunti, A. Ceravolo,

- F. Cazzanti, F. Frassoni, G. Mancardi, A. Uccelli // *Blood*. – 2005. – Vol. 106. – P.1755–1761.
350. Ziegler B.L. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells / B.L. Ziegler, M. Valtieri, G.A. Porada, R. De Maria, R. Muller, B. Masella, M. Gabbianelli, I. Casella, E. Pelosi, T. Bock, E.D. Zanjani, C.Peschle // *Science*. – 1999. – Vol. – 285. – P.1553–1558.
351. Zeigler, B.M. The allantois and chorion, when isolated before circulation or chorio-allantoic fusion, have hematopoietic potential / B.M.Zeigler, D.Sugiyama, M.Chen, Y.Guo, K.M.Downs, N.A.Speck // *Development*. – 2006. - P.4183-4192.
352. Zhang, F. Co-culture with Sertoli cells promotes proliferation and migration of umbilical cord mesenchymal stem cells / F.Zhang, Y.Hong, W.Liang, T.Ren, S.Jing, J.Lin // *Biochemical and Biophysical Research Communication*. – 2012. – Vol. 427. – P.86–90.
353. Zhang, F. Lectin-like oxidized LDL receptor expresses in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells and stimulates their proliferation / F. Zhang, C.Wang, S.Jing, T.Ren, Y.Li, Y.Cao, J.Lin // *Experimental Cell Research*. - 2013. – Vol. 319. – P.1054–1059.
354. Zhang,F. Ox-LDL promotes migration and adhesion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via regulation of MCP-1 expression / F. Zhang, C.Wang, H.Wang, M.Lu, Y.Li, H.Feng, J.Lin, Z.Yuan, X.Wang // *Mediators of Inflammation*. – 2013. – P.11-16.
355. Zhang, Y. Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells / Y.Zhang, C.Li, X.Iang, S.Hang, Y.Wu, B.Liu, P.Tang, N.Mao // *Experimental Hematology*. – 2004. – Vol. – 31. – P. 657 – 664.
356. Zhao, D. Treatment of early stageosteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derivedand cultured mesenchymal stem cells / D. Zhao, D.Cui, B.Wang, F.Tian, L.Guo, L.Yang, B.Liu, X.Yu // *Bone*. – 2012. – Vol. 50. – P. 325–330.

357. Zhao, J.M. The role of slingshot-1 L (SSH1L) in the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells / J.M.Zhao, M.R.Zhang, Q.Y.Ji, F.J.Xing, L.J.Meng, Y.Wang // *Molecules*. – 2012. – Vol. 17. – P.14975–14994.
358. Zhao, P. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes / P.Zhao, H.Ise, M.Hongo, M.Ota, I.Konishi, T.Nikaido // *Transplantation*. – 2005. – Vol. 79. – P.528-535.
359. Zhou, S. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype / J.D.Schuetz, K.D.Bunting, A.M.Colapietro, J. Sampath, J.J.Morris, I.Lagutina, G.C.Grosveld, M.Osawa, H.Nakauchi, B.P. Sorrentino // *Nature Medicine*. – 2001. – Vol. – 7. – P.1028–1034.
360. Zhao, T. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells / T. Zhao, Z.N.Zhang, Z.Rong, Y.Xu // *Nature*. – 2011. – Vol. 474. – P.212-215.
361. Zhu, F. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation on the inflammatory response and lung injury in rabbit with inhalation injury / F.Zhu, G.H.Guo, W.Chen // *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. – 2010. – Vol. 26, №5. – P.360-365.
362. Zuo, C. Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodeling / C.Zuo // *Osteoporosis International*. – 2012. – Vol. 23, № 6. – P.1653-1663.

Авторы выражают глубокую признательность ректору ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России, доктору медицинских наук, профессору, заслуженному врачу РФ **КУТЕПОВУ СЕРГЕЮ МИХАЙЛОВИЧУ** и главному врачу ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», доктору медицинских наук, профессору, **ЛЕОНТЬЕВУ СЕРГЕЮ ЛЕОПОЛЬДОВИЧУ** за создание возможности проведения научных исследований.

**А. П. Ястребов, Д. Ю. Гребнев, И.Ю. Маклакова**

## **СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ИХ СВОЙСТВА, ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ И РОЛЬ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ**

Монография рекомендована к изданию проблемной комиссией «Общая патология» и Ученым Советом педиатрического факультета ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава РФ в 2016 г.

Екатеринбург

2016