

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ ВО ФРАКЦИЯХ КЛЕТОК
КОСТНОГО МОЗГА, ИЗОЛИРОВАННЫХ С ПОМОЩЬЮ
ПРОТИВОТОЧНОГО ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ В
ЭЛЮТРИАТОРНОМ РОТОРЕ**

Дударев А. Н.¹,
Непша Т. А.¹,
Городецкая А. Ю.¹,
Усынин И. Ф.¹

¹ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной
медицины, Научно-исследовательский институт биохимии, г. Новосибирск,
Россия.

**CYTOKINE GENE EXPRESSION IN BONE MARROW CELL
FRACTIONS ISOLATED BY COUNTERFLOW CENTRIFUGAL
ELUTRIATION**

Dudarev A. N. ^a,
Nepsha T. A. ^a,
Gorodetskaya A. Yu. ^a,
Usynin I. F. ^a

^a Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Institute of Biochemistry, Novosibirsk, Russia.

Резюме

По своему клеточному составу красный костный мозг состоит из чрезвычайно гетерогенной популяции клеток, включающей стволовые клетки, клетки ретикулярной стромы и клетки пяти кроветворных ростков. Для клеточной терапии и экспериментальных исследований актуальной задачей является получение клеточных фракций костного мозга, обогащенных определенным типом клеток. В данной работе мы исследовали уровень экспрессии мРНК генов цитокинов во фракциях клеток костного мозга, изолированных с помощью противоточного центрифугирования в элютриаторном роторе. Фракционирование клеток выполняли при скорости вращения ротора 2500 об/мин. Отбирали шесть клеточных фракций (Ф): Ф-1 при скорости потока буфера 12 мл/мин, Ф-2 – 15 мл/мин, Ф-3 – 19 мл/мин, Ф-4 – 23 мл/мин, Ф-5 – 50 мл/мин, Ф-6 – собирали после остановки вращения ротора. Цитоморфологический анализ полученных фракций показал, что из общей популяции клеток в «легкой» фракции Ф-1 концентрируется 80% эритроцитов и 40% лимфоцитов, в Ф-2 – 44% лимфоцитов, 50% полихроматофильных и 51% оксифильных нормоцитов, в Ф-3 и Ф-4 – 70% нейтрофилов и 40% эозинофильных гранулоцитов, в Ф-6 – 64% макрофагов, 95% мегакариоцитов, 35% ретикулярных и 62% тучных клеток. Бластные клетки разных ростков кроветворения обнаружены преимущественно в Ф-5. С помощью RT-PCR максимальная экспрессия генов фактора стволовых клеток (*Scf*) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (*Gm-csf*) выявлена в «тяжелой» фракции Ф-6, фактора некроза опухолей (*Tnf-α*) и эритропоэтина (*Epo*) – в Ф-4, Ф-5 и Ф-6, макрофагального колониестимулирующего фактора (*M-csf*) – в Ф-3 и Ф-4. Таким образом, данный метод позволяет эффективно отделить «легкие» фракции лимфоцитов и эритроцитов от основной массы клеток костного мозга, что может быть использовано при аллогенной трансплантации клеток костного мозга для снижения риска развития острой реакции «трансплантат против хозяина». Другим важным преимуществом метода является возможность получить фракции «тяжелых» клеток, обладающих регенеративным потенциалом, с целью их использования в клеточной терапии для стимуляции восстановительных процессов в органах и тканях.

Ключевые слова: костный мозг, противоточное центрифугирование, цитокины, экспрессия генов, мРНК, RT-PCR.

Abstract

The cellular composition of red bone marrow is composed of an extremely heterogeneous cell population, including stem cells, reticulum cells and cells of the five hematopoietic lineages. The current task for cell therapy and experimental studies is to obtain cell fractions of bone marrow enriched with a certain type of cells. In this paper we investigated the level of cytokine mRNA expression in bone marrow cell fractions isolated by counterflow centrifugation in an elutriator rotor. Cell fractionations were isolated at a rotor speed of 2500 rpm. Six cell fractions (F) were collected: F-1 at a buffer flow rate of 12 ml/min, F-2 – 15 ml/min, F-3 – 19 ml/min, F-4 – 23 ml/min, F-5 – 50 ml/min, F-6 – collected after stopping the rotor rotating. Cytomorphological analysis of the fractions showed that erythrocytes (80%) and lymphocytes (40%) are collected in the “light” fraction F-1, lymphocytes (44%), polychromatophilic (50%) and oxyphilic (51%) normocytes – in F-2, neutrophils (70%) and eosinophilic granulocytes (40%) – in F-3 and F-4, macrophages (64%), megakaryocytes (95%), reticular (35%) and mast cells (62%) – in F-6. Blast cells of different hematopoietic lineages were detected mainly in F-5. Using RT-PCR, the maximum gene expression of the stem cell factor (*Scf*) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (*Gm-csf*) was detected in the “heavy” fraction F-6, gene expression of tumor necrosis factor- α (*Tnf- α*) and erythropoietin (*Epo*) – in F-4, F-5 and F-6, and gene expression of macrophage colony-stimulating factor (*M-csf*) – in F-3 and F-4. Thus, this method allow to separate the "light" fractions of lymphocytes and erythrocytes from the bulk of bone marrow cells, which can be used in allogeneic bone marrow cell transplantation to reduce the risk of acute graft-versus-host disease. Another important advantage of the method is the ability to obtain fractions of "heavy" cells with high regenerative potential in order to use them in cell therapy to stimulate regenerative processes in organs and tissues.

Keywords: bone marrow, counterflow centrifugation, cytokines, gene expression, mRNA, RT-PCR.

1 Введение

Красный костный мозг (КМ) является центральным органом кроветворения и иммунной системы [16]. По своему клеточному составу он состоит из чрезвычайно гетерогенной популяции клеток, включающей стволовые клетки, клетки ретикулярной стромы и клетки пяти кроветворных ростков – эритроцитарного, гранулоцитарного, лимфоцитарного, моноцитарного и мегакариоцитарного. Для клеточной терапии и экспериментальных исследований актуальной задачей является получение клеточных фракций КМ, обогащенных определенным типом клеток. Существующие методы фракционирования клеток основаны на различиях клеток по размерам, плавучей плотности, адгезивным свойствам, спектральным свойствам внутриклеточных структур и специфическим антигенам на поверхности клеток. Одним из недостатков перечисленных методов является тот факт, что сам процесс фракционирования может оказывать существенное влияние на функциональные свойства изолированных клеток, что ограничивает область их последующего использования.

В 50-х годах прошлого столетия Линдал [13] впервые предложил принцип фракционирования клеток с помощью противоточного центрифугирования, основанный на том, что разделение клеток происходит в специально сконструированной камере, в которой на клетки действует центробежная сила и направленная в противоположном направлении сила со стороны потока жидкости. Благодаря разработке для этих целей специальных элютриаторных роторов, данный метод позволяет разделить клетки и частицы, имеющие диаметр от 2 до 50 мкм [17]. Основным преимуществом данного метода является возможность быстро фракционировать гетерогенные популяции клеток, которые в течение всей процедуры находятся в наиболее оптимальной питательной среде, что позволяет сохранить высокую жизнеспособность полученных субпопуляций клеток.

В настоящее время метод противоточного центрифугирования успешно используется для изолирования моноклеарных клеток из периферической крови человека с целью их применения в клеточной терапии после трансформации в функционально полноценные дендритные клетки [20]. Использование для этих целей иммуномагнитного фракционирования считается менее производительным и более дорогостоящим методом [18]. Использование элютриаторного ротора показало высокую эффективность при изолировании из печени резидентных макрофагов и эндотелиальных клеток [19]. Продемонстрирована возможность получения из КМ субпопуляции стволовых клеток, способные дифференцироваться в инсулин-продуцирующие клетки [11]. По сравнению с фракционированием клеток в градиенте Ficoll-Нугае, данный метод позволяет выделить из крови жизнеспособные и функционально активные популяции лимфоцитов и гранулоцитов [12]. В целом, несмотря на широкое использование противоточного центрифугирования для получения однородных клеточных

суспензий, в литературе имеются лишь единичные сообщения об использовании данного метода для фракционирования клеток КМ [8, 10].

Цель работы — с помощью RT-PCR исследовать уровень экспрессии генов цитокинов во фракциях клеток КМ, полученных с помощью противоточного центрифугирования в элютриаторном роторе.

2 Материалы и методы

Изолирование клеток костного мозга (КМ). Клетки КМ выделяли в стерильных условиях из диафизов бедренных и берцовых костей крыс линии Вистар массой 200 - 250 г путем промывания питательной средой RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка [2].

Выделение фракций клеток КМ. Для получения фракций клеток КМ использовали метод противоточного центрифугирования в камере Сандерсона элютриаторного ротора JE-5.0 центрифуги Avanti J-26XP («Beckman Coulter», США). Свежевыделенную суспензию клеток ($180-230 \times 10^6$ клеток) разводили в 15 мл фосфатно-солевого буферного раствора (pH 7,4) без ионов кальция и магния (PBS), содержащего 0,1% глюкозы. С помощью шприца суспензию клеток медленно вводили в проточную систему ротора при скорости потока буфера 6 мл/мин и вращении ротора со скоростью 2500 об/мин. Не прерывая вращение ротора (2500 об/мин), но увеличивая скорость потока буфера, собирали шесть фракций (Ф-1 – Ф-6) в объеме по 180 мл каждая: Ф-1 при скорости потока буфера 12 мл/мин, Ф-2 – 15 мл/мин, Ф-3 – 19 мл/мин, Ф-4 – 23 мл/мин, Ф-5 – 50 мл/мин, Ф-6 собирали после остановки вращения ротора. Температуру ротора и буфера в течение центрифугирования поддерживали около 10^0 С. Полученные фракции клеток осаждали в центрифуге Eppendorf 5702 в течение 10 мин: Ф-1 при скорости 3000 об/мин, а остальные фракции (Ф-2 – Ф-6) – при 2500 об/мин.

Цитоморфологические исследования. Для идентификации разных типов клеток готовили мазки клеток и окрашивали по методу Романовского-Гимза [2]. Учитывая морфологические особенности некоторых типов клеток КМ крыс, проводили дифференциальный анализ клеточного состава культивируемых клеток в соответствии с рекомендациями Боллигера [5]. Для составления миелограммы подсчитывали не менее 1000 клеток с каждого мазка и вычисляли содержание каждого типа клеток в процентах. Идентификацию клеток проводили с помощью светового микроскопа Axiovert 40 CFL Zeiss (Германия), используя увеличение $\times 1000$.

Выделение РНК и проведение реакции обратной транскрипции. Суммарную РНК выделяли из клеток КМ с использованием реагента «Лира» (ООО «Биолабмикс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoPhotometer P360 (Implen, Германия). Для анализа использовали образцы, у которых отношение OD260 / OD280 было выше 1,8. РНК обрабатывали ДНК-азой согласно протоколу (Thermo Scientific, США). Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции в 20 мкл с использованием набора реактивов

ОТ M-MuLV RH kit (ООО «Биолабмикс», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

ПЦР в режиме реального времени (RT-PCR). Для проведения RT-PCR использовали готовую смесь BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (2 ×) (BiolabMix, Россия) и смесь специфических прямых и обратных праймеров (табл. 1) (ООО «Биоссет»), подобранных с использованием программного обеспечения Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). RT-PCR проводили в амплификаторе LightCycler 96 (RocheDiagnostic, Германия). Полученные данные нормировались к уровню гена *Actb* и рассчитывались в относительных единицах по отношению к содержанию мРНК изучаемого гена методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ программного обеспечения LightCycler 96.

Статистическая обработка данных выполнена в программе SigmaPlot 12.5. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение 8-и независимых экспериментов. Различия между выборками оценивали с помощью непараметрического U критерия Манна—Уитни и считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

3 Результаты и обсуждение

Согласно номограмме к элютриаторному ротору [17], используемые нами условия центрифугирования и скорости потока буфера, позволяют получить фракции, обогащенные клетками разных размеров: в Ф-1 собираются клетки с диаметром менее 7 мкм, в Ф-2 с диаметром от 7 до 8 мкм, в Ф-3 – от 8 до 9 мкм, в Ф-4 – от 9 до 10 мкм, в Ф-5 – от 10 до 15 мкм и в Ф-6 – с диаметром более 15 мкм.

Подсчет клеток во фракциях показал, что наибольшее количество клеток содержали Ф-1 ($39,7 \pm 2,9\%$) и Ф-3 ($21,2 \pm 2,7\%$). Наименьшее количество клеток содержали Ф-5 ($9,3 \pm 1,6\%$) и Ф-6 ($1,9 \pm 0,3\%$). В Ф-2 и Ф-4 содержалось $11,1 \pm 1,0$ и $16,7 \pm 1,9\%$ клеток, соответственно. В целом, суммарный выход клеток после центрифугирования составлял не менее 85%.

Цитоморфологический анализ выявил существенные различия между изолированными фракциями по содержанию разных типов клеток (табл. 2). Фракция Ф-1 содержала безъядерные и наиболее мелкие («легкие») клетки с диаметром ≤ 7 мкм. Они были представлены преимущественно зрелыми клетками эритроидного ряда. В данной фракции концентрировались более 80% всех эритроцитов и ретикулоцитов, а также около 40% лимфоцитов. Кроме того, в ней выявлены оксифильные нормоциты (21%), небольшое количество полихроматофильных нормоцитов (7%), а также малые и средние лимфоциты (5%).

В Ф-2, по сравнению с Ф-1, было значительно выше содержание полихроматофильных (50%) и оксифильных (51%) нормоцитов, а также лимфобластов и пролимфоцитов (43%). По содержанию лимфоцитов (44%) данная фракция практически не отличалась от Ф-1 (табл. 2).

В Ф-3 и Ф-4 концентрировалось наибольшее количество нейтрофилов (40%). Доля эозинофильных гранулоцитов в Ф-4 (38%) и в Ф-5 (45%) была выше в 8-10 раз по сравнению с Ф-3 (4%). Бластные клетки разных ростков

кроветворения (эритробласт, проэритробласт, миелобласт, промиелоцит, монобласт, промоноцит) выявлены преимущественно в Ф-5. Особенностью самой «тяжелой» фракции Ф-6 является высокая концентрация в этой фракции макрофагов (64%) и мегакариоцитов (95%), а также ретикулярных (35%) и тучных клеток (62%) (табл. 2).

Подобные результаты получены при фракционировании клеток КМ человека [8]. Авторы разделили исходную суспензию клеток на 16-ть фракций, которые по своим характеристикам были объединены в три фракции: малые лимфоцитарные клетки, ядродержащие эритроидные клетки среднего размера и крупные клетки миелоидного ряда. По мнению авторов, благодаря большому размеру пролиферирующих нормобластов и комитированных клеток-предшественников данный метод позволяет эффективно отделить малые лимфоцитарные клетки от клеток эритроидных (BFU-E) и миелоидных ростков (CFU-GM) [8]. Культивирование клеточных фракций КМ кошек позволило продемонстрировать, что фракции мелкоразмерных («легких») клеток содержат эритроидные колонии, а более крупные («тяжелые») фракции клеток – миелоидные колонии. Предполагается, что моноклеарные клетки, обнаруженные во фракции мелкоразмерных клеток, представляют собой более раннюю и примитивную популяцию гемопоэтических клеток, требующую более длительного времени культивирования для полного развития колонии [10].

Как известно, функциональной особенностью ткани КМ является высокая пролиферативная активность клеток всех кроветворных ростков. Регуляция этого процесса находится под контролем широкого спектра факторов, среди которых наиболее изученными являются гемопоэтические факторы роста [1]. Учитывая значительные различия, обнаруженные между изолированными фракциями по клеточному составу, нами было проведено их сравнение по экспрессии генов ключевых цитокинов, участвующих в регуляции кроветворения в КМ. Для этого в свежевыделенных фракциях клеток с помощью RT-PCR (табл. 1) оценивали уровень экспрессии матричной РНК (мРНК) фактора стволовых клеток (SCF), эритропоэтина (Еро), макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и фактора некроза опухолей (TNF- α). Главными источниками этих цитокинов в КМ являются макрофаги, эндотелиальные клетки, лимфоциты и клетки стромы.

Учитывая высокую степень гетерогенности КМ по клеточному составу, на начальных этапах работы в качестве референсных генов мы использовали ген актина (*Actb*) и ген гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (*Hprt1*). Однако из-за отсутствия значимых различий между фракциями по уровню экспрессии этих генов все результаты рассчитаны на основе *Actb*. Наименьший уровень экспрессии всех целевых генов, относительно референсного гена, обнаружен во фракции Ф-1, что можно объяснить содержанием в данной фракции большого количества безъядерных клеток

(эритроцитов) (табл. 2). Учитывая данный факт, все результаты, представленные на рисунках, для наглядности выражены в % относительно уровня экспрессии генов в Ф-1, принятого за 100%.

Наибольший уровень экспрессии гена, кодирующего цитокин $TNF-\alpha$, выявлен в «тяжелых» фракциях (Ф-4, Ф-5 и Ф-6). Так, в Ф-5 и Ф-6 этот показатель был в 20-30 раз выше, чем в Ф-1 ($p < 0,05$) (Рис.). Подобные, хотя и менее выраженные, различия между фракциями обнаружены для гена *Epo*. Максимальная экспрессия генов *Scf* и *Gm-csf* выявлена в Ф-6 (Рис.). В отличие от перечисленных выше генов, максимальный уровень экспрессии гена *M-csf*, обнаружен во фракциях Ф-3 и Ф-4, что, вероятно, связано с высоким содержанием в этих фракциях нейтрофилов (табл. 2), активно продуцирующих данный цитокин [6].

В качестве гена, связанного с синтезом структурных белков клетки, нами была исследована экспрессия нуклеопорина (*Nup153*). Данный белок входит в состав комплекса ядерной поры, которая участвует в контроле транспорта молекул между ядром и цитоплазмой. Известно, что NUP153 участвует в транспорте мРНК и его экспрессия зависит от фаз клеточного цикла [7]. Максимальный уровень экспрессии гена нуклеопорина так же, как и цитокинов, нами выявлен во фракциях «тяжелых» клеток (Ф-6) (Рис.). Обнаруженный факт, вероятно, связан с высокой метаболической активностью этих клеток, основной функциональной ролью которых является синтез и секреция регуляторных цитокинов. В целом, хотя паттерны экспрессии исследованных генов во фракциях клеток не совпадали, наиболее высокий их уровень обнаружен в «тяжелых» фракциях клеток, обогащенных макрофагами, мегакариоцитами, ретикулярными и тучными клетками.

4 Заключение

Использование противоточного центрифугирования для фракционирования клеток КМ позволяет эффективно отделить «легкую» фракцию лимфоцитов и эритроцитов от основной массы клеток КМ. Данный метод может быть использован при аллогенной трансплантации клеток КМ для снижения риска развития острой реакции «трансплантат против хозяина», связанной с иммунологическим конфликтом между донорскими лимфоцитами и клетками реципиента [9]. Другим важным преимуществом метода является возможность получить фракции «тяжелых» клеток с высокой экспрессией генов цитокинов, обладающих регуляторным действием на клетки не только КМ, но и других органов и тканей. Известно, что $TNF-\alpha$ оказывает регуляторное действие на клеточный цикл в гепатоцитах и ускоряет регенерацию печени [14], GM-CSF стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток [4], *Epo* оказывает прямое нейропротекторное действие [3], а подкожное введение мышам с инфарктом миокарда SCF повышает их выживаемость и стимулирует регенерацию миокарда [15]. С учетом полученных результатов, авторами планируется проведение экспериментов на совместных культурах фракций клеток КМ с различными типами клеток (гепатоциты, фибробласты, нервные клетки и др.). Данный

220 подход позволит выявить фракции клеток КМ с наиболее выраженным
221 регенеративным потенциалом с целью их использования в клеточной терапии
222 для стимуляции восстановительных процессов в органах и тканях.

223 **Благодарности**

224 Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки
225 Российской Федерации (номер темы 125030403171-3) с использованием
226 оборудования ЦКП «Спектрометрические измерения» и ЦКП «Протеомный
227 анализ», ФИЦ ФТМ (Новосибирск, Россия).

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Последовательности праймеров, используемые для определения экспрессии генов.

Table 1. Primer sequences for analysis of gene expression.

Ген Gene	Праймеры Primers	
	Прямой (5'-3') Forward (5'-3')	Обратный (5'-3') Reverse (5'-3')
<i>Epo</i>	AAAGAATGAAGGTGGAAGAA CAGG	CGAAGCAGTGAAGTGAGGC TA
<i>Scf</i>	GGCTTTGCTTTTGGAGCCTT	ACACCTCTTGAAACTCTCTC TCT
<i>Gm-csf</i>	GTGCTCTGGAGAACGAAAAGA AC	GCGCCATTGAGTTTGGTGA G
<i>M-csf</i>	AGTGAGGGATTTTTGACCCAG	AGATGAACCATCCGTCTTCT C
<i>Tnf-α</i>	GCGTGTTTCATCCGTTCTCTACC	TACTTCAGCGTCTCGTGTGT TTCT
<i>Nup153</i>	ATCCCCTGCTTTGCACTGTCAG C	GCCCCACCATATGTTGTTTT GCC
<i>Actb</i>	AGGGAAATCGTGCGTGACAT	CCATACCCAGGAAGGAAGG C

Таблица 2. Распределение клеток костного мозга между фракциями клеток, изолированных с помощью противоточного центрифугирования в элютриаторном роторе.

Table 2. Distribution of bone marrow cells between fractions isolated by counterflow centrifugation in elutriator rotor.

Клеточные элементы Cell types	Количество клеточных элементов во фракции, % Number of cells in the fraction, %					
	Ф-1 / F-1	Ф-2 / F-2	Ф-3 / F-3	Ф-4 / F-4	Ф-5 / F-5	Ф-6 / F-6
Эритробласты / Erythroblasts	0,0±0,0	0,0±0,0	21,6±4,1	16,3±1,6	53,5±6,0	8,6±3,1
Проэритробласты / Proerythroblasts	0,0±0,0	17,6±6,5	17,4±3,8	25,1±7,9	35,2±9,3	4,7±2,3
Базофильные нормоциты / Basophilic normocytes	0,0±0,0	16,0±7,0	23,4±2,8	17,9±8,2	17,1±6,5	25,6±10,1
Полихроматофильные нормоциты / Polychromatophilic normocytes	7,2±0,9	49,7±10,2	16,4±3,7	3,3±1,3	8,9±2,7	14,5±2,3
Оксифильные нормоциты / Охуphilic normocytes	21,0±8,1	50,7±6,1	6,4±1,9	1,5±0,7	4,6±1,4	15,9±2,4
Эритроциты и ретикулоциты / Erythrocytes and reticulocytes	83,9±3,7	8,1±2,3	2,5±0,6	0,5±0,1	1,4±0,6	3,7±0,5
Миелобласты и промиелоциты / Myeloblasts and promyelocytes	0,0±0,0	1,1±0,2	8,1±0,3	14,2±6,1	61,0±3,5	15,6±6,6

Миелоциты и метамиелоциты / Myelocytes and metamyelocytes	0,0±0,0	1,0±0,1	22,3±8,2	20,4±6,9	37,0±6,3	19,4±4,8
Нейтрофилы / Neutrophils	0,0±0,0	2,4±0,5	32,5±6,3	37,7±1,9	13,4±1,6	14,0±4,0
Эозинофильные гранулоциты / Eosinophilic granulocytes	0,0±0,0	0,0±0,0	4,4±0,9	38,7±7,5	45,6±12,7	11,3±1,9
Тучные клетки / Mast cells	0,0±0,0	0,0±0,0	2,9±0,7	4,5±0,8	31,0±6,5	61,5±10,0
Монобласты и промоноциты / Monoblasts and promonocytes	0,0±0,0	12,3±4,5	17,3±0,7	19,9±2,7	27,3±4,3	23,2±4,1
Моноциты / Monocytes	0,0±0,0	21,6±4,7	33,0±6,0	14,4±2,8	14,3±2,3	16,6±4,1
Макрофаги / Macrophages	0,0±0,0	7,3±0,7	5,2±1,8	6,8±2,7	16,6±4,0	64,1±2,0
Лимфобласты и пролимфоциты / Lymphoblasts and prolymphocytes	5,0±0,3	43,3±12,4	29,6±14,0	7,4±2,4	9,6±4,0	5,1±0,9
Лимфоциты / Lymphocytes	40,1±3,4	44,3±10,3	6,7±2,2	3,9±1,7	2,1±0,4	3,0±0,5
Плазматические клетки / Plasma cells	0,0±0,0	0,0±0,0	38,9±6,1	18,4±4,3	27,4±6,1	15,3±3,2
Мегакариоциты / Megakaryocytes	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	4,5±2,4	95,5±9,9
Ретикулярные клетки / Reticular cells	0,0±0,0	10,3±4,7	4,0±1,4	18,2±3,6	39,7±14,7	28,4±8,0

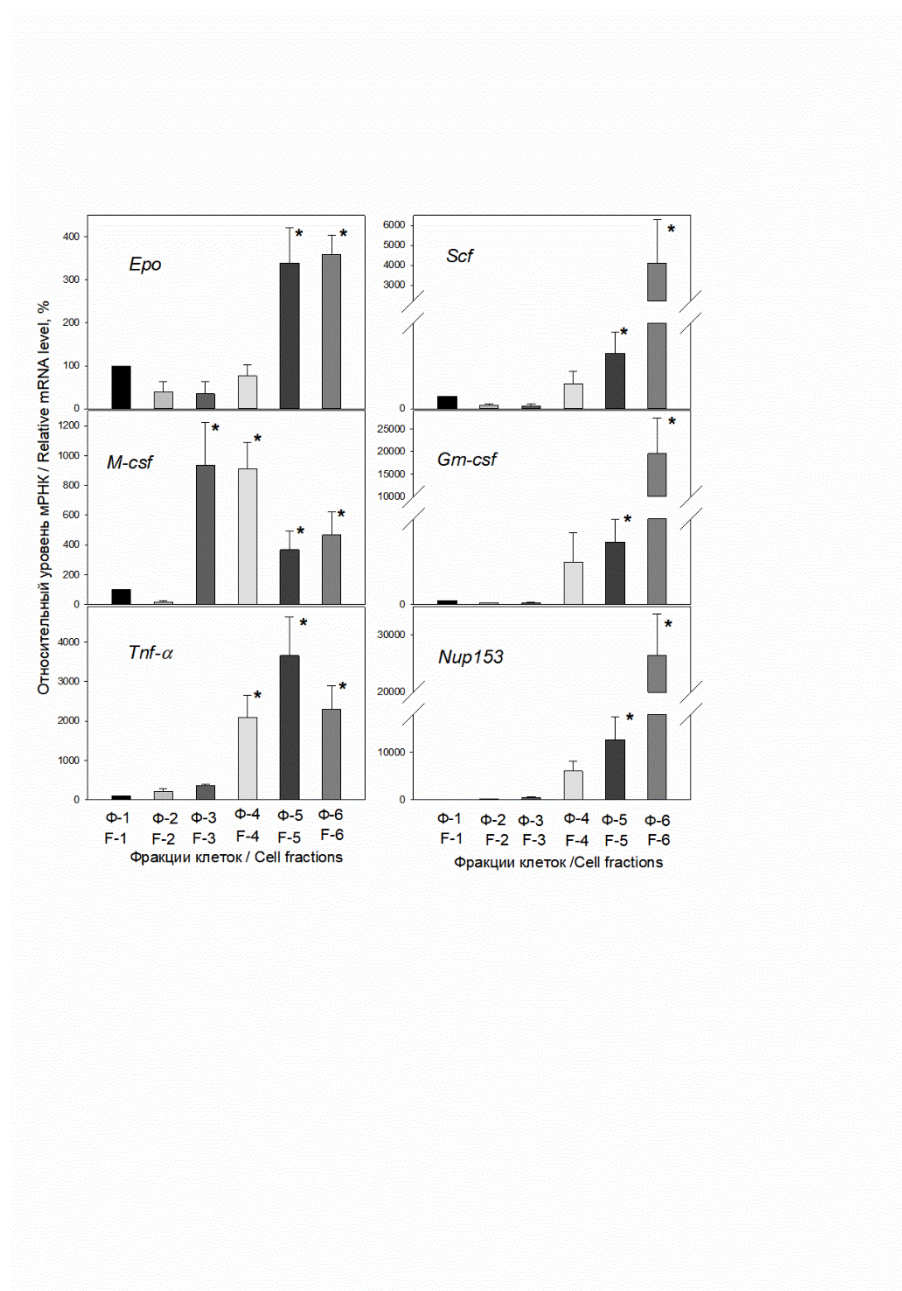
Примечание: Данные представлены в процентах от суммарного количества данного типа клеток, принятого за 100%.

Note: Data are presented as a percentage of the total number of this cell type, taken as 100%.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Экспрессия генов цитокинов во фракциях клеток КМ, изолированных с помощью противоточного центрифугирования в элютриаторном роторе. Результаты представлены в процентах от уровня экспрессии гена во фракции Ф-1, принятого за 100%. * $p < 0,05$ по сравнению с Ф-1.

Figure 1. Cytokine gene expression in fractions of bone marrow cells isolated by counterflow centrifugation in an elutriator rotor. Results are presented as a percentage of the gene expression level in the F-1 fraction, taken as 100%. * $p < 0,05$ as compared to F-1.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Усынин И. Ф. – д.б.н, зав. лабораторией механизмов межклеточных взаимодействий;

Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Научно-исследовательский институт биохимии, Новосибирск, Россия;

адрес: 630060, г. Новосибирск, улица Тимакова, 2, Россия;

телефон: 8(383)274-94-17;

e-mail: ivan.usynin@frcftm.ru

Usynin I. F. – D.Sc (Biology), Head of the Laboratoty of Mechanisms of Intercellular Communication;

Federal Research Center of Fundamental and Translation Medicine, Institute of Biochemistry, Novosibirsk, Russian Federation, Novosibirsk. Timakova St, 2;

address: 630060 RussianFederation;

telephone: 8(383)274-94-17;

e-mail: ivan.usynin@frcftm.ru

Блок 2. Информация об авторах

Дударев А. Н. – к. б. н., старший научный сотрудник, лаборатории механизмов межклеточных взаимодействий, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Научно-исследовательский институт биохимии, Новосибирск, Россия;

Dudarev A. N. – PhD,MD (Biology) Senior Research Associate, Laboratoty of Mechanisms of Intercellular Communication, Federal Research Center of Fundamental and Translation Medicine, Institute of Biochemistry, Novosibirsk, Russian Federation;

Непша Т. А. - научный сотрудник, лаборатории механизмов межклеточных взаимодействий, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Научно-исследовательский институт биохимии, Новосибирск, Россия;

Nepsha T. A. - Research Associate, Laboratoty of Mechanisms of Intercellular Communication, Federal Research Center of Fundamental and Translation Medicine, Institute of Biochemistry, Novosibirsk, Russian Federation;

Городецкая А. Ю. – научный сотрудник, лаборатории механизмов межклеточных взаимодействий, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Научно-исследовательский институт биохимии, Новосибирск, Россия;

Gorodetskaya A. Y. - Research Associate, Laboratoty of Mechanisms of Intercellular Communication, Federal Research Center of Fundamental and Translation Medicine, Institute of Biochemistry, Novosibirsk, Russian Federation.

Блок 3. Метаданные статьи

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ ВО ФРАКЦИЯХ КЛЕТОК
КОСТНОГО МОЗГА, ИЗОЛИРОВАННЫХ С ПОМОЩЬЮ
ПРОТИВОТОЧНОГО ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ В ЭЛЮТРИАТОРНОМ
РОТОРЕ

CYTOKINE GENE EXPRESSION IN BONE MARROW CELL FRACTIONS
ISOLATED BY COUNTERFLOW CENTRIFUGAL ELUTRIATION

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ФРАКЦИИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА
BONE MARROW CELL FRACTIONS

Ключевые слова: костный мозг, противоточное центрифугирование,
цитокины, экспрессия генов, мРНК, RT-PCR.

Keywords: bone marrow, counterflow centrifugation, cytokines, gene expression,
mRNA, RT-PCR.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 7,

Количество таблиц – 2,

Количество рисунков – 1.

14.03.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Поряд- ковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или DOI
1	Владимирская Е.Б. Нормальное кроветворение и его регуляция // Клиническая онкогематология, 2015. Т. 8, № 2. С. 109–119.	Vladimirsky E.B. Normal Hematopoiesis and Its Regulation. Clinical oncohematology, 2015, Vol.8, no. 2, pp. 109–119. (In Russ.) .	doi: 10.21320/2500-2139-2015-8-2-109-119
2	Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. Томск : Изд-во ТГУ, 1992. 272 с.	Goldberg E. N., Dygai A.M., Shakhov V.P. Methods of tissue culture in hematology, Tomsk, 1992, 272 p. Tomsk: Tomsk State University, 1992. (In Russ.)	https://search.rsl.ru/ru/record/01001635472
3	Кладова И.В., Кивва В.Н., Хрипун А.В., Черникова И.В., Страхова Н.Б., Антипова Н.В., Белобородова Т.П., Воробьев И.Ю. Нейропротективные эффекты эритропоэтина: возможности, перспективы и реальность // Медицинский вестник юга России. 2014. № 3. С. 28-35.	Kladova I, Kivva V., Khripoun A., Chernikova I., Strahova N., Antipova N., Beloborodova T., Vorobyov I. Neuroprotective effects of erythropoietin: opportunities, prospects and reality (review). Medical Herald of the South of Russia. 2014, Vol.3, pp. 28-35. (In Russ.)	https://www.medicalherald.ru/jour/article/view/31?locale=ru_RU [doi: 10.21886/2219-8075-2014-3-28-35]

4	Маслов Л.Н., Сазонова С.И. Использование цитокинов для стимуляции неоангиогенеза и регенерации сердца // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2006. № 5. С.70-76.	Maslov L.N., Sazonova S.I. Using cytokines to stimulate neoangiogenesis and cardiac regeneration // Experimental and Clinical Pharmacology, 2006, No. 5, pp. 70-76.	www.ekf.folium.ru/index.php/ekf/article/view/1058 [https://doi.org/10.30906/0869-2092-2006-69-5-70-76]
5	Bolliger AP. Cytologic evaluation of bone marrow in rats: indications, methods, and normal morphology. <i>Vet. Clin. Pathol.</i> , 2004, Vol.33, no. 2, pp. 58-67.	–	doi: 10.1111/j.1939-165x.2004.tb00351.x
6	Braza M. S., Conde P., Garcia M., Cortegano I., Brahmachary M., Pothula V. F., Fay F., Boros P., Werner S. A., Ginhoux F., Mulder W. J.M., Ochando J. Neutrophil derived CSF1 induces macrophage polarization and promotes transplantation tolerance. <i>American journal of transplantation</i> , 2018, Vol.18, no. 5, pp. 1247-1255.	–	doi:10.1111/ajt.14645
7	Chakraborty P., Wang Y., Wei J.H., van Deursen J. Yu H., Malureanu L., et al. Nucleoporin levels regulate cell cycle progression and phase-specific	–	doi; 10.1016 /j. devcel. 2008. 08. 020

	gene expression. <i>Developmental cell</i> , 2008, Vol. 15, pp. 657–667.		
8	De Witte T, Plas A, Koekman E, Blankenburg G, Salden M, Wessels J, Haanen C. Separation of human bone marrow by counterflow centrifugation monitored by DNA-flowcytometry. <i>Br. J. Haematol.</i> , 1984, Vol. 58, no. 2, pp. 249-258.	–	https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2141.1984.tb06083.x ИЛИ https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1984.tb06083.x
9	De Witte T, Hoogenhout J, de Pauw B, Holdrinet R, Janssen J, Wessels J, van Daal W, Hustinx T, Haanen C. Depletion of donor lymphocytes by counterflow centrifugation successfully prevents acute graft-versus-host disease in matched allogeneic marrow transplantation. <i>Blood</i> , 1986, Vol. 67, no. 5, pp. 1302-1308.	–	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120798502?via%3Dihub [https://doi.org/10.1182/blood.V67.5.1302.1302]
10	Gengozian N, Legendre AM. Separation of feline bone marrow cells by counterflow centrifugal elutriation. Identification and isolation of presumptive early and late myeloid/erythroid	–	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7482744/

	progenitors. <i>Transplantation</i> , 1995, Vol. 60, no. 8, pp. 836-841.		
11	Goldenberg-Cohen N, Iskovich S, Askenasy N. Bone Marrow Homing Enriches Stem Cells Responsible for Neogenesis of Insulin-Producing Cells, While Radiation Decreases Homing Efficiency. <i>Stem Cells Dev.</i> , 2015, Vol. 24, no. 19, pp. 2297-2306.	–	https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2014.0524 [https://doi.org/10.1089/scd.2014.0524]
12	Khansari N, Beauclair K, Gustad T. Separation of bovine lymphocytes and granulocytes from blood by use of elutriation. <i>Am. J. Vet. Res.</i> , 1989, Vol. 50, no. 8, pp. 1263-1265.	–	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2782710/
13	Lindahl, P.E. Principle of a Counter-Streaming Centrifuge for the Separation of Particles of Different Sizes. <i>Nature</i> , 1948, Vol. 161, pp. 648–650.	–	https://www.nature.com/articles/161648a0 [doi: 10.1038/161648a0]
14	Michalopoulos G.K. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. <i>Compr. Physiol.</i> , 2013, Vol. 3, no. 1, pp. 485-513.	–	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23720294/ или

			https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c120014 [DOI: 10.1002/cphy.c120014]
15	Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. <i>Proc. Natl. Acad. Sci., U S A</i> , 2001, Vol. 98, no. 18, pp. 10344-10349.	—	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11504914/ или https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC56963/ [doi: 10.1073 / pnas.181177898]
16	Schirmacher, V. Bone Marrow: The Central Immune System. <i>Immuno</i> , 2023, Vol. 3, pp. 289–329.	—	https://www.mdpi.com/2673-5601/3/3/19 [doi:10.3390/immuno3030019].
17	Sharpe P.T. Methods of Cell Separation. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Chapter 5. Centrifugal elutriation. <i>Elsevier</i> , 1988, pp. 91-106.	—	https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0075753508706302 [https://doi.org/10.1016/S0075-7535(08)70630-2 .]
18	Stroncek DF, Fellowes V, Pham C, Khuu H, Fowler DH, Wood LV, Sabatino M. Counter-flow elutriation of clinical peripheral blood mononuclear cell concentrates for the production	—	https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-014-0241-y

	of dendritic and T cell therapies. <i>J. Transl. Med.</i> , 2014, Vol. 12, pp. 41.		[doi: 10.1186/s12967-014-0241-y.]
19	Usynin I., Frevert U, Klotz C. Malaria circumsporozoite protein inhibits respiratory burst in Kupffer cells. <i>Cell Microbiol.</i> 2007, Vol. 9, no. 11, pp. 2610-2628.	–	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17573905/ [doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00982.x.]
20	Zahorchak AF, DeRiggi ML, Muzzio JL, Sutherland V, Humar A, Lakkis FG, Hsu YS, Thomson AW. Manufacturing and validation of Good Manufacturing Practice-compliant regulatory dendritic cells for infusion into organ transplant recipients. <i>Cytotherapy.</i> 2023, Vol. 25, no. 4, pp. 432-441.	–	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36639251/ DOI: 10.1016/j.jcyt.2022.11.005]