

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

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

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

**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 (*Tnfa*) 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

### Адрес для переписки:

Усынин Иван Федорович  
Научно-исследовательский институт биохимии  
630060, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.  
Тел.: 8 (383) 274-94-17.  
E-mail: ivan.usynin@frcftm.ru

### Address for correspondence:

Ivan F. Usynin  
Research Institute of Biochemistry  
2 Timakov St  
Novosibirsk  
630060 Russian Federation  
Phone: +7 (383) 274-94-17.  
E-mail: ivan.usynin@frcftm.ru

### Образец цитирования:

А.Н. Дударев, Т.А. Непша, А.Ю. Городецкая, И.Ф. Усынин «Экспрессия генов цитокинов во фракциях клеток костного мозга, изолированных с помощью противоточного центрифугирования в элютриаторном роторе» // Медицинская иммунология, 2026. Т. 28, № 1. С. 109-116.  
doi: 10.15789/1563-0625-CGE-3211

© Дударев А.Н. и соавт., 2026  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

A.N. Dudarev, T.A. Nepsha, A.Yu. Gorodetskaya, I.F. Usynin  
“Cytokine gene expression in bone marrow cell fractions  
isolated by counterflow centrifugal elutriation”, *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2026,  
Vol. 28, no. 1, pp. 109-116.  
doi: 10.15789/1563-0625-CGE-3211

© Dudarev A.N. et al., 2026  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-CGE-3211

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

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

Research Institute of Biochemistry, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** Cellular contents of red bone marrow is presented by an extremely heterogeneous cell population including stem cells, reticular cells, and differentiating cells of 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. The marrow cell fractions were isolated at a rotor speed of 2500 rpm. Six cell fractions (F-1 to F-6) were collected: F-1, at a buffer flow rate of 12 mL/min; F-2, at 15 mL/min; F-3, at 19 mL/min; F-4, at 23 mL/min; F-5, at 50 mL/min. Fraction 6 was collected after stopping the rotation. 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- $\alpha$  (*Tnf $\alpha$* ) 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 allows 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 in order to stimulate regenerative processes in organs and tissues.

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

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

## Введение

Красный костный мозг (КМ) является центральным органом кроветворения и иммунной системы [17]. 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 струк-

тур 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 P.E. Lindahl [14] 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 [7]. 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 [12]. По сравнению с фракционированием клеток в градиенте Ficoll-Нураque, данный метод позволяет выделить из крови жизнеспособные и функционально активные популяции лимфоцитов и гранулоцитов [13]. 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 [9, 11].

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

## Материалы и методы

### Изолирование клеток КМ

Клетки КМ выделяли в стерильных условиях из диафизов бедренных и берцовых костей крыс линии Wistar 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 ( $180\text{--}230 \times 10^6$  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 °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–Гимзы [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 «Ли́ра» (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 ДНКазой согласно протоколу (Thermo Scientific, США). Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции в 20 мкл с использованием набора реактивов OT M-MuLV RN 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 $\times$ ) (BiolabMix, Россия) и смесь специфических прямых и обратных праймеров (табл. 1) (ООО «Биосет»), 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  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  программного обеспечения LightCycler 96.

Статистическая обработка данных выполнена в программе SigmaPlot 12.5. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение 8 независимых экспериментов. Различия между выборками оценивали с помощью непара-

метрического U-критерия Манна–Уитни и считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Согласно номограмме к элютриаторному ротору [7], 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  $\leq 7$  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 [9]. Авторы разделили исходную суспензию клеток на 16 фракций, которые по своим характеристикам были объединены в три фракции: малые лимфоцитарные клетки, ядросодержащие 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) [9]. Культивирование клеточных фракций КМ кошек позволило продемонстрировать, что фракции мелкокоразмерных («легких») клеток содержат эритроидные колонии, а более крупные («тяжелые») фракции клеток – миелоидные колонии. Предполагается, что мононуклеарные клетки, обнаруженные во фракции мелкокоразмерных клеток, представляют собой более раннюю и примитивную популяцию гемопоэтических клеток, требующую более длительного времени культивирования для полного развития колонии [11].

Как известно, функциональной особенностью ткани КМ является высокая пролиферативная активность клеток всех кроветворных ростков. Регуляция этого процесса находится

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>	AAAGAATGAAGGTGGAAGAACAGG	CGAAGCAGTGAAGTGAGGCTA
<i>Scf</i>	GGCTTTGCTTTTGGAGCCTT	ACACCTCTTGAAACTCTCTCTCT
<i>Gm-csf</i>	GTGCTCTGGAGAACGAAAAGAAC	GCGCCATTGAGTTTGGTGAG
<i>M-csf</i>	AGTGAGGGATTTTTGACCCAG	AGATGAACCATCCGCTCTTCTC
<i>Tnfa</i>	GCGTGTTTCATCCGTTCTCTACC	TACTTCAGCGTCTCGTGTGTTTCT
<i>Nup153</i>	ATCCCCTGCTTTGCACTGTCAGC	GCCCCACCATATGTTGTTTTGCC
<i>Actb</i>	AGGGAAATCGTGCGTGACAT	CCATACCCAGGAAGGAAGGC

**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

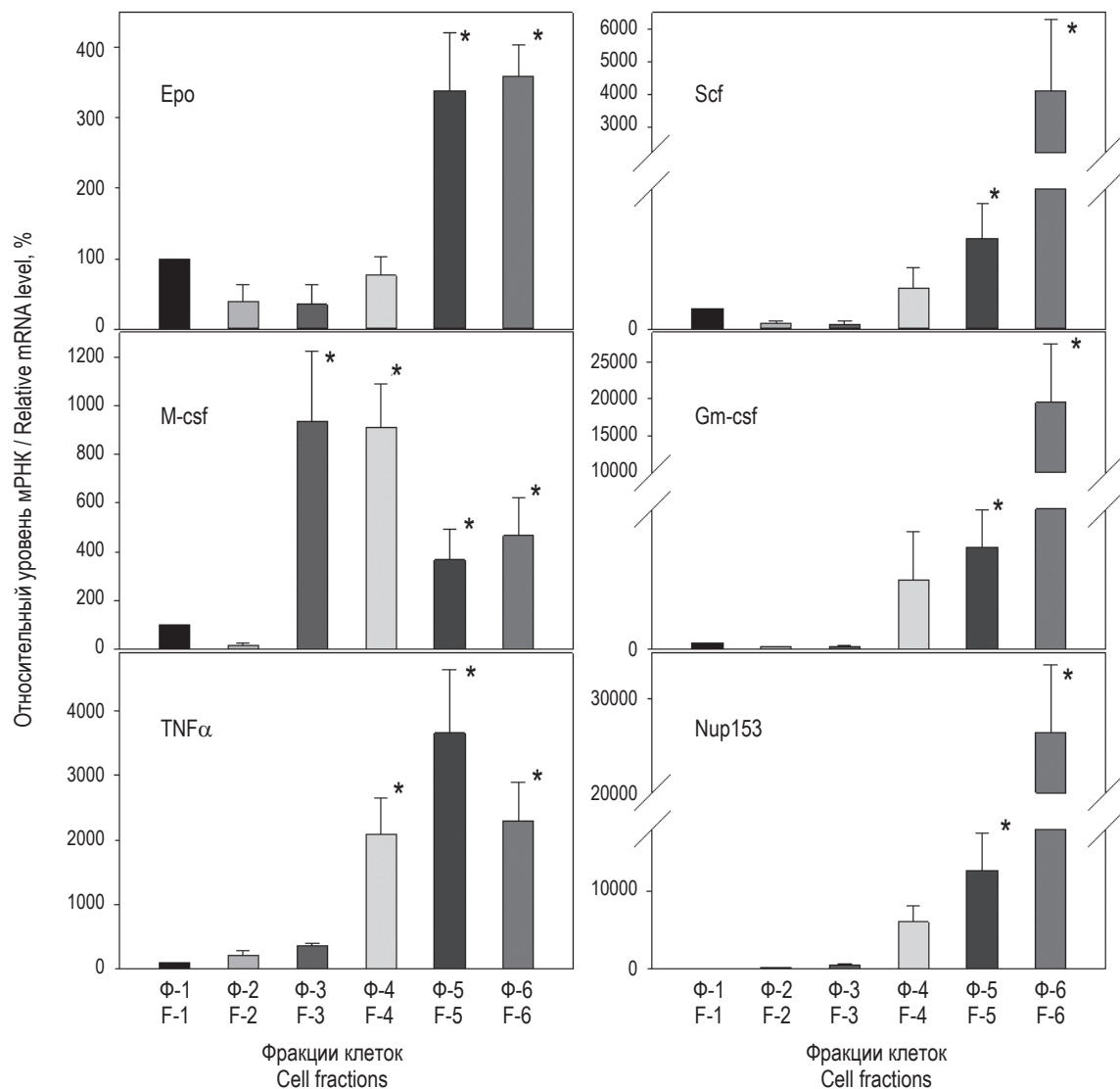
Клеточные элементы Cell types	Количество клеточных элементов во фракции, % Number of cells in the fraction, %					
	Ф-1 / F-1	Ф-2 / F-2	Ф-3 / F-3	Ф-4 / F-4	Ф-5 / F-5	Ф-6 / F-6
<b>Эритробласты</b> Erythroblasts	0,0±0,0	0,0±0,0	21,6±4,1	16,3±1,6	53,5±6,0	8,6±3,1
<b>Прозеритробласты</b> Proerythroblasts	0,0±0,0	17,6±6,5	17,4±3,8	25,1±7,9	35,2±9,3	4,7±2,3
<b>Базофильные нормоциты</b> 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
<b>Полихроматофильные нормоциты</b> 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
<b>Оксифильные нормоциты</b> Oxyphilic 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
<b>Эритроциты и ретикулоциты</b> 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
<b>Миелобласты и промиелоциты</b> 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
<b>Миелоциты и метамиелоциты</b> 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
<b>Нейтрофилы</b> 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
<b>Эозинофильные гранулоциты</b> 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
<b>Тучные клетки</b> 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
<b>Монобласты и промоноциты</b> 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
<b>Моноциты</b> 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
<b>Макрофаги</b> 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
<b>Лимфобласты и пролимфоциты</b> 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
<b>Лимфоциты</b> 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
<b>Плазматические клетки</b> 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
<b>Мегакариоциты</b> 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
<b>Ретикулярные клетки</b> 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%.

под контролем широкого спектра факторов, среди которых наиболее изученными являются гемопоэтические факторы роста [1]. Учитывая значительные различия, обнаруженные между изолированными фракциями по клеточному со-

ставу, нами было проведено их сравнение по экспрессии генов ключевых цитокинов, участвующих в регуляции кроветворения в КМ. Для этого в свежeweделенных фракциях клеток с помощью RT-PCR (табл. 1) оценивали уровень экспрессии



**Рисунок 1. Экспрессия генов цитокинов во фракциях клеток КМ, изолированных с помощью противоточного центрифугирования в элютриаторном роторе**

Примечание. 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

Note. 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.

матричной РНК (мРНК) фактора стволовых клеток (SCF), эритропоэтина (Epo), макрофагально-колониестимулирующего фактора (M-CSF), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и фактора некроза опухолей (TNFα). 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 рисунке 1, 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. 1). Подобные, хотя и менее выраженные, различия между фракциями обнаружены для гена *Epo*. Максимальная экспрессия генов *Scf* и *Gm-csf* выявлена в Ф-6 (рис. 1). 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 [8]. Максимальный уровень экспрессии гена нуклеопорина так же, как и цитокинов, нами выявлен во фракциях «тяжелых» клеток (Ф-6) (рис. 1). 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.

## Список литературы / References

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. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology*, 2015, Vol. 8, no. 2, pp. 109-119. (In Russ.)]
2. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. Томск: Изд-во ТГУ, 1992. 272 с. [Goldberg E.D., Dygai A.M., Shakhov V.P. Methods of tissue culture in hematology]. Tomsk: Tomsk State University, 1992. 272 p.
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.V., Kivva V.N., Khripoun A.V., Chernikova I.V., Strahova N.B., Antipova N.V., Beloborodova T.P., Vorobyov I.Yu. Neuroprotective effects of erythropoietin: opportunities, prospects and reality (review). *Meditinskii vestnik yuga Rossii = Medical Herald of the South of Russia*, 2014, no. 3, pp. 28-35. (In Russ.)]
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. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*, 2006, no. 5, pp. 70-76. (In Russ.)]
5. Bolliger A.P. Cytologic evaluation of bone marrow in rats: indications, methods, and normal morphology. *Vet. Clin. Pathol.*, 2004, Vol. 33, no. 2, pp. 58-67.
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. *Am. J. Transplant.*, 2018, Vol. 18, no. 5, pp. 1247-1255.

## 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 [10]. 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 [15], 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 [16]. 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 подход позволит выявить фракции клеток КМ с наиболее выраженным регенеративным потенциалом с целью их использования в клеточной терапии для стимуляции восстановительных процессов в органах и тканях.

7. Centrifugal elutriation. In: Burdon R.H., van Knippenberg P.H., Sharpe P.T. (eds.). *Methods of cell separation. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Elsevier, 1988, pp. 91-106.
8. Chakraborty P., Wang Y., Wei J.H., van Deursen J., Yu H., Malureanu L., Dasso M., Forbes D.J., Levy D.E., Seemann J., Fontoura B.M.A. Nucleoporin levels regulate cell cycle progression and phase-specific gene expression. *Dev. Cell*, 2008, Vol. 15, pp. 657-667.
9. 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. *Br. J. Haematol.*, 1984, Vol. 58, no. 2, pp. 249-258.
10. 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. *Blood*, 1986, Vol. 67, no. 5, pp. 1302-1308.
11. Gengozian N., Legendre A.M. Separation of feline bone marrow cells by counterflow centrifugal elutriation. Identification and isolation of presumptive early and late myeloid/erythroid progenitors. *Transplantation*, 1995, Vol. 60, no. 8, pp. 836-841.
12. 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. *Stem Cells Dev.*, 2015, Vol. 24, no. 19, pp. 2297-2306.
13. Khansari N., Beauclair K., Gustad T. Separation of bovine lymphocytes and granulocytes from blood by use of elutriation. *Am. J. Vet. Res.*, 1989, Vol. 50, no. 8, pp. 1263-1265.
14. Lindahl P.E. Principle of a counter-streaming centrifuge for the separation of particles of different sizes. *Nature*, 1948, Vol. 161, pp. 648-650.
15. Michalopoulos G.K. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr. Physiol.*, 2013, Vol. 3, no. 1, pp. 485-513.
16. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Limana F., Jakoniuk I., Quaini F., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, Vol. 98, no. 18, pp. 10344-10349.
17. Schirrmacher, V. Bone Marrow: The Central Immune System. *Immuno*, 2023, Vol. 3, no. 3, pp. 289-329.
18. Stroncek D.F., Fellowes V., Pham C., Khuu H., Fowler D.H., Wood L.V., Sabatino M. Counter-flow elutriation of clinical peripheral blood mononuclear cell concentrates for the production of dendritic and T cell therapies. *J. Transl. Med.*, 2014, Vol. 12, 241. doi: 10.1186/s12967-014-0241-y.
19. Usynin I., Frevert U., Klotz C. Malaria circumsporozoite protein inhibits respiratory burst in Kupffer cells. *Cell Microbiol.*, 2007, Vol. 9, no. 11, pp. 2610-2628.
20. Zahorchak A.F., DeRiggi M.L., Muzzio J.L., Sutherland V., Humar A., Lakkis F.G., Hsu Y.S., Thomson A.W. Manufacturing and validation of Good Manufacturing Practice-compliant regulatory dendritic cells for infusion into organ transplant recipients. *Cytotherapy*, 2023, Vol. 25, no. 4, pp. 432-441.

**Авторы:**

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

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

Городецкая А.Ю. — научный сотрудник лаборатории механизмов межклеточных взаимодействий, Научно-исследовательский институт биохимии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Усынин И.Ф. — д.б.н., заведующий лабораторией механизмов межклеточных взаимодействий, Научно-исследовательский институт биохимии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

Dudarev A.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Mechanisms of Intercellular Communication, Research Institute of Biochemistry, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Nepsha T.A., Researcher, Laboratory of Mechanisms of Intercellular Communication, Research Institute of Biochemistry, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Gorodetskaya A.Yu., Researcher, Laboratory of Mechanisms of Intercellular Communication, Research Institute of Biochemistry, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Usynin I.F., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Mechanisms of Intercellular Communication, Research Institute of Biochemistry, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 14.03.2025

Отправлена на доработку 15.03.2025

Принята к печати 25.06.2025

Received 14.03.2025

Revision received 15.03.2025

Accepted 25.06.2025