

УДК 57.085.23

Изучение регенеративного потенциала клеток плаценты в модельных экспериментах на мышах

Богданенко Е.В.¹, Сергиевич Л.А.², Карнаухов А.В.², Карнаухова Е.В.²,
Карнаухова Н.А.², Манохина И.А.², Карнаухов В.Н.²

¹ — ФГБНУ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² — Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, д. 3

Плацента может быть источником как мезенхимальных, так и гематopoэтических стволовых клеток. Человеческая плацента широко используется в косметологии, но ее свойства в свете возможного применения для трансплантации в регенеративной медицине до конца не ясны. С целью изучения закономерностей приживления пересаженных во взрослый организм клеток цельной фракции плаценты проведены модельные эксперименты на мышах линии C57BL/6. **Методы.** Для этого использовали суспензию плаценты от плодов 18–20-го дня беременности разных способов обработки. Один из родителей каждого плода нес ген зеленого флуоресцентного белка — Tg(ACTB-EGFP)1Osb/J. Реципиентами являлись интактные или облученные в сублетальной дозе мыши 4–6-мес. возраста линии C57BL/6, не несущие этот трансген. Трансплантация суспензии проводилась внутривенно или внутривентриально, при этом второй способ оказался предпочтительным как намного более безопасный. **Результаты.** Использование флуоресцентной микроскопии показало образование в селезенке экзоклонов, а в костном мозге — незначительное количество светящихся клеток только у облученных мышей, начиная с 11-х суток после облучения. Показано, что донорские GFP⁺-клетки обнаруживались в организме реципиента только в том случае, если использовались плаценты плодов от самок с геном GFP. Анализ суспензии клеток плаценты на маркеры CD45 и CD117 показал наличие среди них гематopoэтических стволовых клеток и их дифференцированных потомков — лейкоцитов. **Заключение.** Полученные в данной работе результаты могут быть в дальнейшем использованы при разработке способов лечения и продления жизни собственным клеточным материалом женщин, родивших детей и сохранивших после этого свою плаценту в криобанке.

Ключевые слова: плацента, регенеративная медицина, стволовые клетки, облучение, продление жизни, GFP, мыши, трансплантация, криоконсервация, информационная гипотеза старения.

Для цитирования: Богданенко Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухов А.В., Карнаухова Е.В., Карнаухова Н.А., Манохина И.А., Карнаухов В.Н. Изучение регенеративного потенциала клеток плаценты в модельных экспериментах на мышах. Патогенез. 2017; 15(1): 24–33.

Для корреспонденции: Богданенко Елена Валентиновна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. молекулярных основ болезней зависимости. ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, e-mail: lenabogdval@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.01.2017

Study of the regenerative potential of placental cells in model experiments on mice

Bogdanenko E.V.¹, Sergievich L.A.², Karnaukhov A.V.², Karnaukhova E.V.²,
Karnaukhova N.A.², Manokhina I.A.², Karnaukhov V.N.²

¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, ul. Baltiyskaya 8, Moscow, 125315 Russia

² — Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

A placenta may be a source of both mesenchymal and hematopoietic stem cells. The human placenta is widely used in cosmetology but its properties are not quite clear in light of its possible application for a transplantation in the regenerative medicine. The aim of this report was to study regularities of engraftment of an entire cellular placenta fraction transplanted to an adult organism in the model experiments on mice of the C57BL/6 strain. **Methods.** The placental suspension obtained from fetuses of the 18–20 days of pregnancy was used. One of their parents carried the Tg(ACTB-EGFP)1Osb/J green fluorescent protein gene. The 4 to 6 months old C57BL/6 mice without this transgene and intact or irradiated in the sublethal dose were used as recipients. The suspension was transplanted intravenously or intraperitoneally, the second route of administration was being preferable as much more safe. **Results.** The using of fluorescent microscopy showed the exocolony formation in a spleen and the presence of the negligible quantity of the luminous cells only in the bone marrow of the irradiated mice starting with the 11th irradiation day. It was shown that the donor cells were appeared in the recipient organism only in the case when the placentas of fetuses from the females carrying GFP gene were used. An analysis of the placenta cell suspension on CD45 and CD117 markers revealed among them the presence of the hematopoietic stem cells as well as leucocytes which were their differentiated progenies. **Conclusion.** Results obtained in this work may be used in future to develop the methods of therapy and life prolongation of the delivered women who reserved their own placenta by cryopreservation using their own cellular substance.

Key words: placenta, regenerative medicine, stem cells, radiation, life extension, GFP, mice, transplantation, cryopreservation, information hypothesis of aging.

For citation: Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Karnaukhova N.A., Manokhina I.A., Karnaukhov V.N. Study of the regenerative potential of placental cells in model experiments on mice. *Patogenez*. 2017; 15(1): 24–33 (In Russian).

For correspondence: Bogdanenko Elena V., Doctor. *biol. Sciences, the Vedas. scientific. et al. lab. Depending on the molecular basis of diseases, Institute of General Pathology and Pathophysiology RAS, Moscow, Russia*, e-mail: lenabogdval@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 20.01.2017

Введение

Использование плаценты в косметологии началось еще несколько десятков лет назад и является широко используемым и разрекламированным средством для омоложения кожи. В целях омоложения стареющего организма, а также иммуностимуляции больных с различными видами заболеваний уже давно были рекомендованы внутримышечные введения суспензии плаценты [1]. Некоторые современные исследования, проведенные на мышах, также показали антивозрастной эффект сингенной трансплантации суспензии клеток терминальной плаценты (18-й день беременности), введенной внутривнутрибрюшинно [2].

Однако окончательной ясности о степени эффективности таких процедур и о механизмах их действия пока нет, в частности потому, что в состав суспензии входят различные типы клеток, а присутствие некоторых из них в плаценте было установлено совсем недавно [3–6]. В то же время предпочтение в экспериментальной медицине отдается использованию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) плаценты, так как они не содержат рецепторов главного комплекса гистосовместимости второго типа. МСК могут ингибировать Т-клеточную пролиферацию и дифференцировку дендритных клеток, которые считаются ключевыми звеньями активации аутоиммунных заболеваний и реакции «трансплантант против хозяина» [7]. Для улучшения приживаемости гематопозитических стволовых клеток (ГСК), выделенных из пуповинной крови, перспективной представляется возможность их трансплантации совместно с МСК [3, 8, 9].

Плацента является источником не только МСК, но и ГСК. В частности, для человеческой плаценты показано [3], что в ней содержатся ниши для ГСК с 6-й недели беременности и до стадии зрелой плаценты; она содержит незрелые ГСК плода и стволовые клетки, экспрессирующие CD34 в процессе онтогенеза. Зрелая плацента человека содержит в несколько раз больше таких клеток, чем пуповинная кровь [3]. Из зрелой плаценты человека выделяют также амниотические эпителиальные клетки. Они экспрессируют поверхностные маркеры Oкт-4 и nanog, присутствующие на эмбриональных стволовых клетках и клетках зародышевой линии, а также на плюрипотентных стволовых клетках [10].

Что касается модельных экспериментов на мышах, то в них был обнаружен гематопозитический потенциал CD117⁺ стволовых клеток из амниотической жидкости. Эти клетки оказались способными к репопуляции клеточного состава костного мозга у иммунодефицитных животных [11]. Также была показана функциональная стабильная интеграция стволовых клеток из амниотической

жидкости в скелетные мышцы мутантных мышей с мышечной дистрофией с увеличением их продолжительности жизни до 70% [12]. В работе [13] было обнаружено, что изогенные клетки плаценты на 15-й день беременности оказались пригодными для лечения гипопластической анемии мутантных мышей (WW^V) после их внутривнутрибрюшного введения облученным животным.

Таким образом, перспективы использования клеток плаценты для лечения различных болезней и омоложения выглядят привлекательными. В то же время еще в 60-х годах прошлого века было показано, что клетки плаценты являются иммунологически компетентными и содержат антигены, вызывающие их отторжение [14, 15]. У больных гемобластомами после трансплантации аллогенных ГСК введение МСК не снижало частоту возникновения реакции «трансплантант против хозяина» [16], а у детей с лейкозами введение МСК давало острую реакцию в виде острой нехватки воздуха, повышения температуры и давления, а также болевого синдрома [8]. Таким образом, введение культивированных клеток плаценты пока не дало убедительного результата, несмотря на успех в наработке нужного для трансплантации количества клеток. Неясно даже, клетки какого происхождения — детские или материнские — способны пролиферировать при культивировании [17, 18]. Работ по исследованию способов применения цельной фракции плаценты для трансплантации, как менее трудозатратных по сравнению с культивированием и выделением из нее отдельных фракций, очень мало. Остается также открытым вопрос о приживаемости клеток плаценты в организме реципиента. Некоторые авторы связывают положительное воздействие после их введения не со встраиванием в организм хозяина, а с паракринным эффектом [19]. Как и в случае с культивированием, до конца не выяснен вопрос, клетки какой части плаценты — материнской или детской — способны приживаться в организме реципиента [4].

Поэтому целью нашей работы было выяснение закономерностей приживания в организме реципиента и регенеративной способности клеток цельной фракции плаценты, как наиболее просто получаемой, и определение перспектив, связанных с применением плаценты в регенеративной медицине и геронтологии. В соответствии с этой целью мы провели модельные эксперименты на мышах инбредной линии C57BL/6.

Материалы и методы

Животные. В эксперименте использовались самки и самцы мышей в возрасте 4–6 мес., несущие ген зеленого флуоресцентного белка (Enhanced Green Fluorescent Pro-

tein — EGFP, Tg(CTB-EGFP)10sb/J,) разводимые на основе инбредной линии C57BL/6 EGFP^{-/-}.

Животные были получены при содействии А.М. Малащенко из Научного Центра биомедицинских технологий РАМН, куда они поступили из Jackson Laboratory, Bar Harbor, США с любезного разрешения А.В. Червонского. Трансген GFP в клетках донора (GFP⁺ мыши) использовался как метка для определения их приживаемости в организме не несущего трансген GFP реципиента (GFP⁻ мыши) [20—23]. Мыши содержались в виварии ИБК РАН по 1—3 мыши в клетке на рационе из гранулированного корма с дополнительной подкормкой зерносмесью, состоящей из пшеницы, ячменя, красного проса, семечек подсолнуха, кукурузы и травяных гранул.

Было сформировано четыре группы животных. 11 животных контрольной группы только облучали. В трех экспериментальных группах проводилась сингенная трансплантация клеток зрелой плаценты 18—20-го дня беременности 5, 11 и 5 мышам-реципиентам соответственно. В первой экспериментальной группе проводился безоблучательный вариант трансплантации. В других двух экспериментальных группах за сутки до введения клеток плаценты реципиенты получали дозу радиации 6,5 Гр (LD_{50/30}).

Для выяснения с помощью маркера GFP принадлежности прижившихся клеток плаценты матери или плоду проводились два варианта скрещивания самцов и самок:

- 1) GFP⁺♀ × GFP⁻♂ или GFP⁺○ × GFP⁺♂;
- 2) GFP⁻♀ × GFP⁺♂.

Так как часть клеток плаценты принадлежит матери, а часть плоду, то в первом варианте скрещивания белок GFP в материнской части экспрессируется всегда, а в детской части он или экспрессируется, или нет. Во втором варианте скрещивания в материнской части плаценты белок GFP не экспрессируется, а в детской части также возможен оба варианта.

В первом безоблучательном эксперименте при трансплантации использовались клетки плаценты, где как детская, так и материнская части плаценты экспрессируют GFP белок. Во втором эксперименте использовались клетки плаценты, где клетки материнской части экспрессировали GFP белок, а детской — в одном случае экспрессировали GFP белок, а в другом нет. В третьем эксперименте облученным мышам проводилась трансплантация клеток плаценты, где детская часть экспрессировала GFP белок, а материнская — нет.

Инъекции проводили внутривенно (в хвостовую вену) и внутрибрюшинно (первая экспериментальная группа) и внутрибрюшинно (вторая и третья экспериментальные группы).

Источник рентгеновского облучения. Облучение животных проводилось сотрудниками Группы источников излучений Института биофизики клетки РАН г. Пущино на рентгеновской установке РУТ-250-15-2 (РУМ 17), I = 15 мА, U = 200 кВ, с фильтрами из меди и алюминия, толщиной по 1 мм каждый, мощность излучения 1 Гр/мин.

Получение суспензии клеток плаценты и их трансплантация. Плаценту выделяли у самок на 18—20 день беременности и измельчали ее ножницами на часовом стекле в 400 мкл PBS.

Для выделения клеток массу, полученную после измельчения плаценты в 400 мкл PBS на часовом стекле, переносили в стеклянный гомогенизатор и перетирали ее

с помощью тefлонового пестика. Гомогенат разбавляли 400 мкл PBS, фильтровали через фильтр с размером ячеек 70 мкм и центрифугировали его при 300 g 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 400—500 мкл PBS в зависимости от количества используемых одновременно плацент (2 или 3) и вводили полученную суспензию внутрибрюшинно (3—5*10⁶ клеток) инсулиновым шприцем. Для внутривенного введения методика выделения клеток была аналогичной, но использовали только 1 плаценту у реципиента, а ресуспендирование после центрифугирования проводили в 100 мкл PBS (1,6 ± 0,2 млн клеток).

Для ферментативного выделения клеток к измельченной плаценте добавляли 2-кратный объем 0,1% раствора коллагеназы I, все тщательно перемешивали и ставили в термостат на 37°C. Через 25 мин смесь пипетировали и инкубировали еще 25 мин. Затем еще раз пипетировали полученную массу до устранения комочков, фильтровали через фильтр с размером ячеек 70 мкм и центрифугировали при 300 g 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 100—500 мкл в зависимости от способа введения. Количество клеток при таком выделении в расчете на 1 плаценту составило 2,7 ± 0,3 млн клеток.

Общее количество выделенных из плацент клеток подсчитывали в камере Горяева. Для определения в них процента GFP⁺ клеток 10 мкл готовой к введению суспензии наносили на полилизинное предметное стекло, которое накрывали покровным стеклом. Затем фотографировали 10—20 полей зрения равномерно по всему препарату; одно и то же поле снимали дважды — в свете флуоресценции и в ДИК (дифференциальном интерференционном контрасте). При освещении светом с длиной волны в диапазоне 395—475 нм GFP флуоресцирует в зеленой области спектра с максимумом флуоресценции на длине волны 508 нм. В работе использовали флуоресцентный микроскоп Axio-Imager Z1 с цветной цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия).

Выделение селезенки, тимуса и костного мозга. Мышей-реципиентов забивали дислокацией шейных позвонков, начиная с 5-го дня после введения клеток плаценты. Затем извлекали тимус и селезенку и помещали их в фосфатно-солевой буфер, после чего промывали и взвешивали. Органы протирали с помощью скальпеля через капроновый фильтр с размером пор 70 мкм с использованием фосфатно-солевого буфера в объеме 1 мл для тимуса и 2 мл для селезенки. Костный мозг выделяли из одной бедренной кости путем ее измельчения в фарфоровой ступке с раствором фосфатно-солевого буфера в объеме 600 мкл. Полученную суспензию фильтровали через капроновый фильтр с диаметром пор 70 мкм.

Подсчет собственных колоний (эндоколоний) у облученных мышей проводили на диафрагмальной, а донорских колоний (экзоколоний) как на диафрагмальной, так и висцеральной поверхностях целой селезенки. Их количество служило показателем степени восстановления селезенки после облучения и приживаемости трансплантированных клеток плаценты.

Определение количества GFP⁺ клеток в органах реципиентов. По 10 мкл суспензии костного мозга, тимуса и селезенки помещали на предметные стекла, покрытые полилизинном (Thermo scientific, Германия), и накрывали покровным стеклом 20 x 20 мм. Присутствие GFP⁺ клеток выявляли таким же способом, как и в суспензии плаценты. GFP⁺ клетки в препарате подсчитывали на восьми го-

горизонтальных дорожках от левого до правого края покровного стекла через равные промежутки между ними. Количество клеток оценивали в условных единицах:

- 1 — от 5 до 40 клеток на препарат;
- 2 — от 41 до 160 клеток;
- 3 — 161 до 400 клеток;
- 4 — от 401 до 600 клеток;
- 5 — более 600 клеток на препарат.

Иммунофлуоресценция. Экспрессию мембранных рецепторов на клетках плаценты анализировали с использованием моноклональных антител к CD117 (BioLegend, Сан-Диего, штат Калифорния, США) и CD45R/B220 (BD Biosciences, Сан Хосе, Калифорния, США), меченных phycoerythrin (PE). Для этого клетки инкубировали в течение 1 ч при 4°C в темноте. Затем клетки промывали в фосфатно-солевом буфере и подсчитывали по методике, описанной выше для клеток плаценты.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерного языка программирования МАТЕМАТИКА 5.2. Доверительную вероятность P определяли стандартным образом с использованием критерия Стьюдента. Результаты представлены как $M \pm m$, где M — среднее значение, m — стандартная ошибка. Аппроксимацию экспериментальных данных проводили с использованием полиномиальных функций 1-го порядка с определением остаточного среднеквадратичного отклонения.

Результаты и обсуждение

Поскольку для человека, как правило, доступно и приемлемо использование только зрелой плаценты, то в модельных экспериментах на животных мы использовали зрелую плаценту мышей (18–20 день беременности). Для проверки приживаемости и регенеративной способности проводилась сингенная трансплантация клеток плаценты интактным и сублетально облученным мышам. Для такого варианта оказалось эффективным одновременное использование не менее двух плацент. Наибольшее количество клеток в расчете на плаценту было получено при использовании коллагеназы вместо простого механического измельчения органа, что составило $2,7 \pm 0,3$ млн клеток (из них $0,6 \pm 0,02$ млн GFP⁺ клеток) против $1,6 \pm 0,2$ млн (из них $0,16 \pm 0,02$ млн GFP⁺ клеток). Интересно, что такой способ обработки плаценты коллагеназой не привел к повышению приживаемости клеток трансплантата у облученных животных (табл. 1, 16-е сутки). Возможно, это связано с частичным нарушением функциональности клеток, обработанных коллагеназой.

В первом эксперименте клетки плаценты (в материнской и детской частях плаценты экспрессируется GFP белок) вводились необлученным GFP⁻ животным. Органы мышей-реципиентов исследовали на 5–8-й день после трансплантации, исходя из того, что в наших предыдущих экспериментах по безоблучательной сингенной трансплантации клеток костного мозга максимум заселения клетками донора селезенки и костного мозга реципиента наблюдался именно в эти сроки [21]. Прижившихся клеток донора, экспрессирующих GFP белок, в тимусе и костном мозге реципиентов выявлено не было, независимо от способа выделения клеток плаценты (с коллагеназой или без нее) как при внутривенном, так и при внутрибрюшинном введении суспензии плаценты. В селезенке были

обнаружены только единичные GFP⁺ клетки после внутрибрюшинного введения суспензии плаценты, не обработанной коллагеназой. При этом у реципиентов колоний на селезенке обнаружено не было, что совпадает с данными литературы о том, что они образуются только у облученных животных [24]. Таким образом, введение интактным животным цельной фракции клеток плаценты оказалось неэффективным.

Во втором эксперименте после внутривенного введения в большинстве случаев наступала мгновенная смерть облученных реципиентов, вероятно, по причине наличия в ней факторов тромбообразования (коллагена, мелкой взвеси ткани плаценты), что отмечают и другие исследователи [14, 15], хотя клеток при этом вводилось значительно (в 2–3 раза) меньше, чем при внутрибрюшинном введении. Поэтому, в конечном счете, мы остановились на варианте внутрибрюшинного введения. Родительские пары для плодов, от которых получали плаценты, подбирали по принципу:

$$\text{GFP}^+_{\text{♀}} \times \text{GFP}^+_{\text{♂}}$$

или

$$\text{GFP}^+_{\text{♀}} \times \text{GFP}^+_{\text{♂}}$$

Среди плацент отбирались те, у которых и детская, и материнская часть несли ген GFP (т.е. его несли и плод, и мать). На 8–29-е сутки после облучения у реципиентов были обнаружены GFP⁺ экзоколонии на селезенке или GFP⁺ клетки в ее суспензии. В небольшом количестве в нескольких случаях клетки донора были найдены в суспензии костного мозга и в единичном случае — в суспензии тимуса (табл. 1). Количество и размер флуоресцирующих экзоколоний в селезенке увеличивались, начиная с 11-х суток после облучения. Заселение начиналось вдоль сосудов на висцеральной стороне селезенки в области ее ворот с последующим расселением в паренхиме и образованием колоний, выходящих на противоположную, диафрагмальную сторону (рис. 1, А). К 21-му дню после облучения наблюдалось до 4-х достаточно крупных колоний (до 3 мм в диаметре), проросших на внешнюю сторону селезенки, при этом много больших флуоресцирующих колоний находилось на висцеральной стороне вдоль сосудов органа (рис. 1, Б). На 29-й день после облучения колонии, состоящие из разнородных флуоресцирующих клеток, оставались только в периферической области стромы селезенки с переходом на поддерживающие этот орган ткани. Несколько колоний было обнаружено в брыжейке как около желудка, так и в самом низу брюшной полости.

Для реципрокной трансплантации клеток плаценты в качестве реципиента была взята мышь, несущая ген GFP. Ей были трансплантированы клетки плаценты GFP⁻ плода, полученного от GFP⁻ родителей. На 15-е сутки после облучения на диафрагмальной поверхности селезенки этого животного были обнаружены 4 крупные несветящиеся черные колонии (рис. 1, В), что в корне отличалось от картины облученного контроля, в котором GFP⁺ и GFP⁻ мышей облучали без подсадки им клеток плаценты. В случае облученного контроля можно было наблюдать рост эндоколоний (т.е. образованных собственными клетками селезенки, рис. 1, Г, Д), а в эксперименте параллельно с этим происходило образование экзоколоний.

Внешне колонии представляют собой розовые выпуклости на поверхности селезенки, являющиеся новыми очагами гемопоэза в организме, в котором собственная кроветворная ткань разрушена радиацией. Колонии в селезенке у мышей регистрируются только после воздействия радиации на организм, за исключением мутантной линии WW^V [25]. Рост эндоколоний во 2-м эксперименте начинался с 11–14-х суток после облучения, когда на селезенке выделялись крупные колонии (6–10 штук), постепенно сливавшиеся друг с другом на 15–16 сутки (рис. 2 А, Б). Установлено [24], что у мышей эндоколонии не регистрируются вообще при дозе ЛД_{100/15}. Поскольку в нашем эксперименте мышей облучали сублетальной дозой (ЛД_{50/30}), то появление эндоколоний можно считать закономерным.

Следует отметить различие в динамике образования эндоколоний в этом эксперименте и в группе облученного контроля. В экспериментальной группе с 11-х суток после облучения можно было наблюдать до 10 средних эндоколоний, к 14-м суткам — до 6 более крупных колоний, к 15-м суткам — слившиеся эндоколонии (табл. 1, рис. 2 А, Б).

В то же время в группе облученного контроля к 12–14-м суткам колоний только начинали появляться, к 16-м суткам образовывалось много мелких и единичные большие и лишь к 17-м суткам можно наблюдать слившиеся колонии (табл. 2, рис. 2 В, Г). Это позволяет сделать вывод о том, что клетки трансплантата оказывают стимулирующее влияние на процесс колониеобразования в селезенке.

Таким образом, нами было показано, что трансплантация сингенных клеток цельной фракции плаценты завершается их приживлением, по крайней мере, на срок

нашего наблюдения за реципиентами. Также, судя по времени обнаружения эндоколоний, после облучения ускорялось восстановление селезенки у облученных экспериментальных животных по сравнению с контролем. Однако оставался нерешенным вопрос, клетки какой части плаценты — материнской или детской, или той и другой — приживаются в организме реципиента. Для ответа на него был проведен еще один эксперимент.

В третьем эксперименте облученным мышам проводилась трансплантация клеток плаценты, где детская часть экспрессировала GFP белок, а материнская — нет. На 15–21 сутки после облучения у реципиентов в суспензии костного мозга, селезенки, тимуса в наблюдаемый период GFP⁺ клеток обнаружено не было. На поверхности селезенки на 15–21 сутки наблюдались только слившиеся эндоколонии, а GFP⁺ колонии обнаружены не были. Данный результат согласуется с исследованиями других авторов [17, 18, 26], в которых с помощью кариотипирования было выяснено, что мезенхимальные стволовые клетки плаценты человека имеют материнское происхождение.

Для окончательного решения вопроса о принадлежности прижившихся клеток к материнской или детской части провели трансплантацию клеток плаценты, в которой детская часть была GFP⁺, а материнская — GFP⁻, к GFP-реципиенту. На 15-е сутки после облучения на висцеральной стороне селезенки было обнаружено множество мелких GFP⁺ колоний (рис. 1, Е). GFP⁺ клетки были обнаружены и в суспензии клеток селезенки реципиента. На основании результатов трех вариантов трансплантации нами был сделан вывод, что во всех случаях в организме реципиента приживаются только клетки материнской части плаценты.

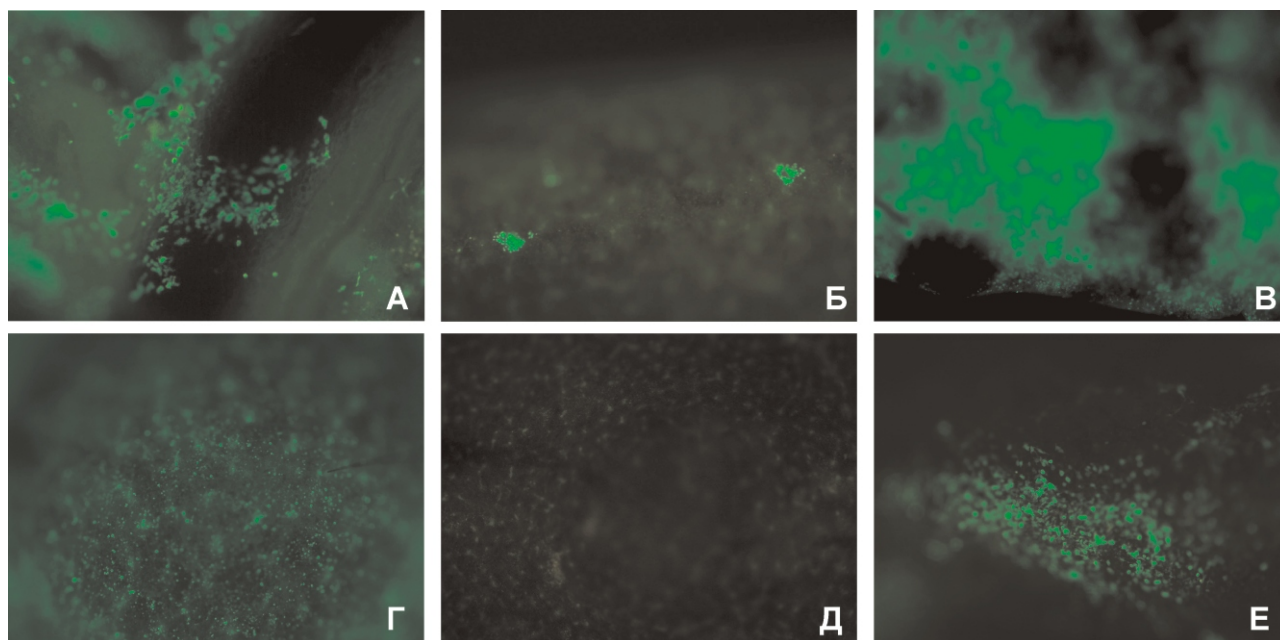


Рис. 1. Колонии в селезенке облученных (6,5 Гр) мышей (А–В, Е — после сингенной трансплантации клеток плаценты):
 А — 15-е сутки после облучения (п.о.), GFP⁻ мышь, висцеральная сторона селезенки (ув. x100), (в материнской и детской частях плаценты экспрессируется GFP);
 Б — 21-е сутки п.о., GFP⁻ мышь, диафрагмальная сторона селезенки (ув. x50), (в материнской и детской частях плаценты экспрессируется GFP);
 В — 15-е сутки п.о., GFP⁺ мышь, диафрагмальная сторона селезенки (ув. x100), (белок GFP не экспрессируется в плаценте);
 Г — облученный контроль, GFP⁺ мышь, 14-е сутки п.о., диафрагмальная сторона селезенки (ув. X50);
 Д — облученный контроль, GFP⁻ мышь, 12-е сутки п.о., диафрагмальная сторона селезенки (ув. X50);
 Е — 15-е сутки п.о., GFP⁻ мышь, висцеральная сторона селезенки (ув. x50), (в материнской частях плаценты экспрессируется GFP).

**Приживаемость клеток плаценты, в материнской части которой экспрессируется белок GFP,
в организме облученных в дозе 6,5 Гр GFP⁻ мышей**

№	Сутки п.о.	Костный мозг, GFP	Селезенка, GFP	Тимус, GFP	Количество колоний в селезенке	Кол-во GFP ⁺ клеток *10 ⁵	Общее кол-во клеток *10 ⁶	Объем суспензии (мкл)	Кол-во плацент
1	8	—	++	+—	Нет	4,8 ± 0,7	4,8 ± 0,7	300 i.p.	3 GFP ⁺
2	11	+—	++	—	GFP ⁻ : 10 средних GFP ⁺ : много мелких колоний на висцеральной стороне вдоль сосудов	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	400 i.p.	2 GFP ⁺
3	12	—+	++	—	GFP ⁻ : 3—4 больших GFP ⁺ : то же	4,8 ± 0,7	4,8 ± 0,7	500 i.p.	3 GFP ⁺
4	13	—+	++	—	GFP ⁻ : то же GFP ⁺ : то же	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	450 i.p.	2 GFP ⁺
5	14	—	+—	—	GFP ⁻ : 6 больших слившихся GFP ⁺ : 10 средних и много мелких колоний на висцеральной стороне вдоль сосудов	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	400 i.p.	2 GFP ⁺
6	15	—	+	—	GFP ⁻ : 1 большая, остальные слившиеся GFP ⁺ : 12 средних и много мелких колоний на висцеральной стороне вдоль сосудов	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	500 i.p.	2 GFP ⁻
7	15	—	+	—	GFP ⁻ : слившиеся колонии GFP ⁺ : то же	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	400 i.p.	2 GFP ⁺
8	16	+	++	—	GFP ⁻ : то же GFP ⁺ : то же	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	430 i.p.	2 GFP ⁺
9	16	+—	+	—	GFP ⁻ : то же GFP ⁺ : то же	12,0 ± 1,7*	5,4 ± 4,0*	400 i.p.	2 GFP ⁺
10	21	+	+	—	GFP ⁻ : то же GFP ⁺ : 15 больших колоний на висцеральной стороне вдоль сосудов, 4 средних на диафрагмальной стороне селезенки (проросли)	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	400 i.p.	2 GFP ⁺
11	29	+	++	—	GFP ⁻ : нет колоний GFP ⁺ : колонии на периферической области стромы селезенки	4,8 ± 0,7	4,8 ± 0,7	400 i.p.	3 GFP ⁺

Примечание. Размер колоний: маленькая — 2 мм, средняя — 3 мм, большая — 4—5 мм; "*" выделение клеток плаценты с использованием фермента коллагеназы I, i.p. — внутрибрюшинно; п.о. — после облучения; P = 0,95

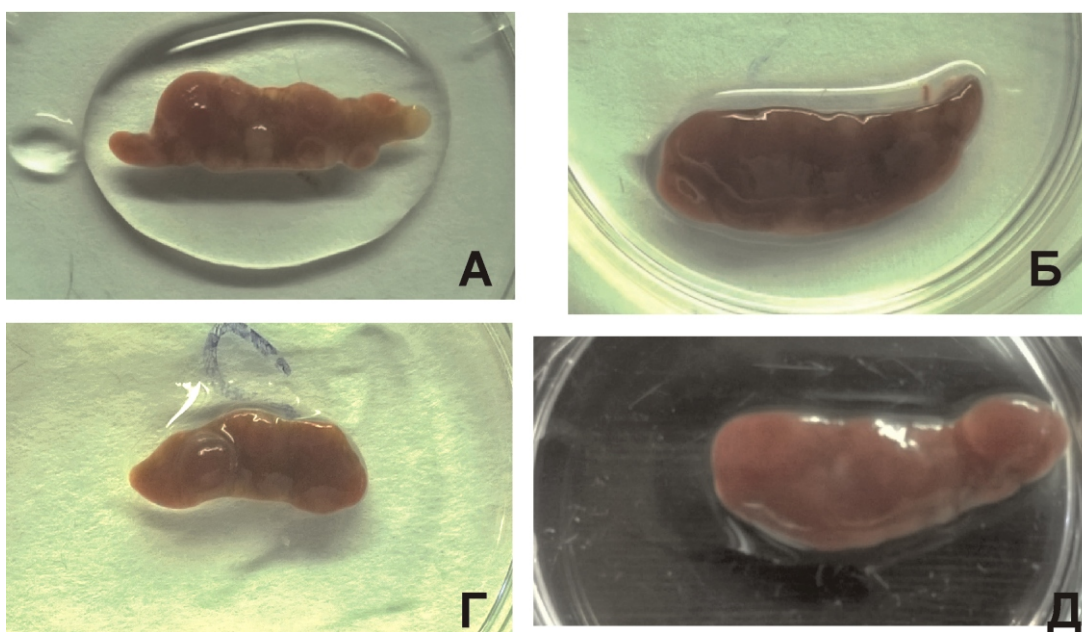


Рис. 2. Колонии в селезенке облученных мышей (6,5 Гр): А, Б, — GFP⁻ реципиент, В, Г — облученный контроль. А — 11-е сутки после облучения (п.о.); Б — 15-е сутки п.о.; В — 14-е сутки п.о.; Г — 16-е сутки п.о.

При безоблучательной трансплантации не наблюдалось существенных изменений в относительных массах селезенки и тимуса. У облученных животных как в опыте, так и в контроле к 21-м суткам после облучения было отмечено постепенное восстановление массы тимуса. Селезенка к этому сроку разрасталась, ее масса превышала контрольные показатели в несколько раз, что, очевидно, связано с колониобразованием и интенсивной пролиферацией собственных клеток, а также с массовой гибелью клеток системы крови реципиента после облучения (рис. 3).

Еще одним доказательством приживаемости клеток именно материнской части плаценты явился результат анализа на CD-маркеры суспензии трансплантируемой плаценты. Для этого нами была взята суспензия плаценты, в которой GFP⁺ клетки принадлежали только детской части плаценты; их насчитывалось 12,3% от общего числа клеток. Анализ такой суспензии на маркер дифференци-

ровки CD45 показал наличие 15,1% CD45 GFP⁻ клеток и 1,2% CD45 GFP⁺ клеток, а на маркер CD117 — наличие 1,3% CD117 GFP⁻ клеток и 0,5% CD117 GFP⁺ клеток от общего количества вводимых клеток. Таким образом, в такой мышинной плаценте GFP⁻ клеток, помеченных маркерами CD117 и CD45, было существенно больше, чем GFP⁺ клеток — в 2,6 и в 12,6 раза соответственно. Вероятно, в детской части плаценты стволовых клеток, способных к заселению, значительно меньше. Так как общая концентрация стволовых клеток в суспензии плаценты оказалась значительно ниже, чем в суспензии костного мозга (неопубликованные данные), то это, по-видимому, не позволило в исследуемые сроки в полном объеме восстановить пораженные органы, особенно костный мозг и тимус.

В литературе есть данные, что для трансплантации использовали только клетки от детской части плаценты, и

Таблица 2

Образование колонии в селезенке мышей на 12—17 сутки после облучения (облученный контроль, 6,5 Гр)

№	Сутки после облучения	Колонии в селезенке
1	12	Нет
2	12	1 маленькая
3	13	1 маленькая
4	13	1 большая
5	14	Нет
6	14	Нет
7	14	2 средних
8	14	5 средних
9	15	1 средняя
10	16	1 большая и много маленьких
11	17	Слившиеся колонии

Примечание. Размер колоний: маленькая — 2 мм, средняя — 3 мм, большая — 4—5 мм

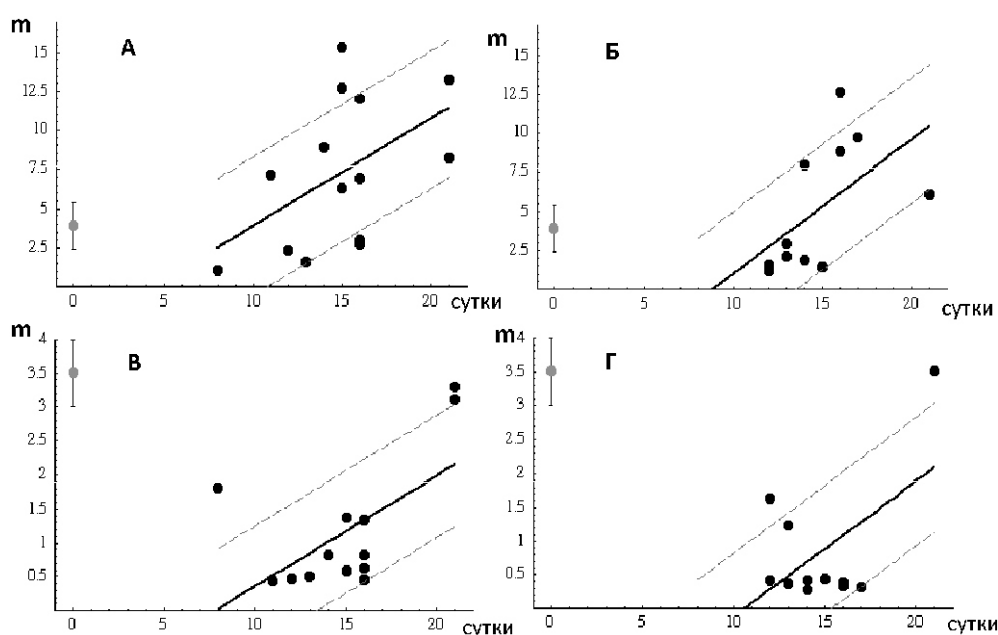


Рис. 3. Зависимости относительных масс селезенки и тимуса (m) от времени (сутки) после облучения: А — селезенка в опыте; Б — селезенка в облученном контроле; В — тимус в опыте; Г — тимус в облученном контроле (P = 0,8). По оси ординат — масса селезенки и тимуса.

именно этот тип клеток был эффективен при экспериментальном лечении мышей, при этом результат был более выраженным при введении 5–10 млн клеток плаценты. Также было показано, что для достижения терапевтического эффекта требуется 15-дневная, а не 18-дневная плацента [13]. В то же время известна работа по применению зрелой плаценты мышей, в которой внутрибрюшинное введение ее суспензии позволило увеличить продолжительность жизни животных в 1,7 раза [2].

Что касается зрелой человеческой плаценты, в которой была удалена отпадающая оболочка материнской части (maternal decidua), в процессе ее культивирования были получены мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки мезодермального материнского происхождения, обладающие высоким пролиферативным потенциалом [26]. У многих клеток плацентарной мембраны (placental septa) при культивировании найдены кластеры дифференцировки CD133, экспрессирующиеся ранними предшественниками недифференцированных гемопоэтических и эндотелиальных клеток — гемангиобластов, и CD34 — маркеры как гемопоэтических, так и эндотелиальных предшественников, [27, 28].

На основании вышесказанного можно предположить, что в наших экспериментах со зрелой мышинной плацентой мы наблюдаем заселение селезенки реципиента клетками мезодермального происхождения материнской части плаценты, и среди прижившихся клеток помимо гемопоэтических, вероятно, имеются и общие клетки-предшественники гемопоэтических и эндотелиальных клеток — гемангиобласты.

Ранее мы сообщали о существенном удлинении сроков фертильности самок-реципиентов и увеличении продолжительности жизни мышей после безоблучательной трансплантации костного мозга [20–22, 29]. Эти результаты совместно с предложенной нами ранее информационной теорией старения [30], согласно которой, основной причиной старения является накопление ошибок в геноме вследствие воздействия внешних факторов, таких, как ионизирующее излучение, температура, свободные радикалы, позволяют сделать вывод о возможном терапевтическом эффекте для человека его собственных клеток, криосохраненных в молодом возрасте.

Полученные в данной работе результаты не выявили потенциала безоблучательной трансплантации цельной фракции плаценты, однако успех такой трансплантации облученным реципиентам говорит о том, что эти результаты могут быть использованы в дальнейшем при разработке способов терапии (в том числе лучевой болезни), а также продления жизни собственным клеточным материалом женщин, родивших детей и сохранивших после этого свою плаценту в криобанке.

Список литературы

1. Коркушко О.В., Калиновская Е.Г., Литовченко С.В., Кочубей Н.В. Лечение взвесью плаценты в профилактике преждевременного старения человека. В кн.: *Тканевая терапия по Филатову*. Одесса, 1977: 127–9.
2. Li J., Zhang H., Liu G. Research on anti-aging effect of mouse placenta cells transplantation. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi. Journal of biomedical engineering*. 2010; 27(6): 1312–6.
3. Serikov V., Hounshell C., Larkin S., Green W., Ikeda H., Walters M.C. et al. Human term placenta as a source of hematopoietic cells. *Exp. Boil. Med. (Maywood)*. 2009; 234(7): 813–23.

4. Robin C., Bollerof K., Mendes S., Haak E., Crisan M., Cerisoli F. et al. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. *Cell Stem Cell*. 2009; 5(4): 385–95.

5. Rhodes K., Gekas C., Wang W., Lux T., Francis C.S., Chan D.N. et al. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. *Cell Stem Cell*. 2008; 2(3): 252–63.

6. Шабалий В.А., Кучма М.Д., Кирик В.М., Онищенко А.Н., Лукаш Л.Л., Лобынцева Г.С. Криоконсервирование ткани плаценты человека - источник гемопоэтических прогениторных клеток и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2012; 7(2): 54–62.

7. Aldinucci A., Rizzetto L., Pieri L., Nosi D., Romagnoli P., Biagioli T. et al. Inhibition of immune synapse by altered dendritic cell actin distribution: a new pathway of mesenchymal stem cell immune regulation. *J. Immunol*. 2010; 185(9): 5102–10.

8. Астрелина Т.А., Гомзяков А.Е., Кобзева И.В., Карпова Е.Э., Круглова Я.А., Скоробогатова Е.В. и др. Оценка качества и безопасности применения криоконсервированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток плаценты в клинической практике для клинического применения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2013; 8(4): 82–7.

9. Battiwalla M., Hematti P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 2009; 11(5): 503–15.

10. Miki T., Lehmann T., Cai H., Stolz D., Storm S.C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005; 23: 1549–59.

11. Ditadi A., de Coppi P., Picone O., Gautreau L., Smati R., Six E. et al. Human and murine amniotic fluid c-Kit⁺Lin⁻ cells display hematopoietic activity. *Blood*. 2009; 113(17): 3953–60.

12. Piccoli M., Franzin C., Bertin E., Urbani L., Blaauw B., Repele A. et al. Amniotic fluid stem cells restore the muscle cell niche in a HSA-Cre, Smn^{F7/F7} mouse model. *Stem Cells*. 2012; 30: 1675–84.

13. Dancis J., Jansen V., Brown G.F., Gorstein F., Balis M.E. Treatment of hypoplastic anemia in mice with placental transplants. *Blood*. 1977; 50: 663–70.

14. Dancis J., Douglas G.W., Fierer J. Immunological competence of mouse placental cells in irradiated hosts. *Am. J. Obst. & Gynec.* 1966; 94: 50–6.

15. Dancis J., Samuels B.D., Douglas G.W. Immunological competence of placenta. *Science*. 1962; 136: 136–7.

16. Петинати Н.А., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Любимова Л.С., Грибанова Е.О., Шипунова И.Н. и др. Лечение острой реакции «трансплантат против хозяина» у больных после трансплантации аллогенных гемопоэтических клеток мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками из костного мозга донора. *Терапевтический архив*. 2012; 7: 2630.

17. Barlow S., Brooke G., Chatterjee K., Price G., Pelekanos R., Rossetti T. et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008; 17(6): 1095–107.

18. Heazlewood C.F., Sherrell H., Ryan J., Atkinson K., Wells C.A., Fisk N.M. High incidence of contaminating maternal cell overgrowth in human placental mesenchymal stem/stromal cell cultures: a systematic review. *Stem Cells Transl. Med*. 2014; 3(11): 1305–11.

19. Шахпазян Н.К., Астрелина Т.А., Яковлева М.В. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2012; 7(1): 23–33.

20. Карнаухова А.В., Карнаухова Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухова Н.А., Богданенко Е.В., Смирнов А.А. и др. Информационная теория старения: изучение влияния трансплантации костного мозга на продолжительность жизни мышей. *Биофизика*. 2014; 59(4): 790–5.

21. Карнаухова А.В., Карнаухова Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухова Н.А., Богданенко Е.В., Манохина И.А. и др. Сравнительный анализ эффективности безоблучательной сингенной и аллогенной трансплантации EGFP⁺ клеток костного мозга мышей с использованием метода микроспектрального флуоресцентного анализа. *Биофизика*. 2014; 59(6): 1135–42.

22. Богданенко Е.В., Карнаухова А.В., Карнаухова Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухова Н.А., Манохина И.А. и др. Изучение

возможностей клеточной терапии для продления женской половой функции в модельных экспериментах на мышах. *Патогенез*. 2015; 13(3): 13-7.

23. Сергиевич Л.А., Карнаухова А.В., Карнаухова Е.В., Карнаухова Н.А., Смирнов А.А., Богданенко Е.В. и др. Применение флуоресцентного микроспектрального анализа при исследовании трансплантации EGFP⁺ клеток костного мозга мышей с использованием 5-фторурацила. *Биофизика*. 2014; 59(4): 740-8.

24. Переверзев А.Е. *Кроветворные колониобразующие клетки и физические стресс-факторы*. Л.: Наука; 1986. 172 с.

25. Stroud A.N., Brues A.M. Recovery and regeneration of spleen and thymus after single and divided dose of total body X-ray. *Fed. Proc.* 1955; 14: 148.

26. Semenov O. V., Koestenbauer S., Riegel M., Zech N., Zimmermann R., Zisch A. H. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemnes after isolation. *Am. J. Obst. & Gynec.* 2010; 202: 193.e1-13.

27. Pelosi E., Valtieri M., Coppola S., Botta R., Gabbianelli M., Lulli V. et al. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood*. 2002; 100: 3203-8.

28. Huber T. L., Kouskoff V., Fehling H. J., Palis J., Keller G. Hemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature*. 2004; 432: 625-30.

29. Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Sergievich L.A., Karnaukhova N.A., Bogdanenko E.V., Manokhina I.A. et al. Informational Theory of Aging: The Life Extension Method Based on the Bone Marrow Transplantation. *Journal of Biophysics*. 2015; Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jbp/aip/686249/>.

30. Карнаухов А.В., Карнаухова Е.В. Информационная гипотеза старения: каким образом «ускользает» от старения зародышевая линия? *Биофизика*. 2009; 54(4): 726-32.

References

1. Korkushko O.V., Kalinovskaya E.G., Lytovchenko S.V., Kochubey N.V. Treatment with a suspension of the placenta in preventing early human aging. In: *Filatov tissue therapy*. Odessa, 1977: 127-9 (in Russian).

2. Li J., Zhang H., Liu G. Research on anti-aging effect of mouse placenta cells transplantation. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi. Journal of biomedical engineering*. 2010; 27(6): 1312-6.

3. Serikov V., Hounshell C., Larkin S., Green W., Ikeda H., Walters M.C. et al. Human term placenta as a source of hematopoietic cells. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2009; 234(7): 813-23.

4. Robin C., Bollerof K., Mendes S., Haak E., Crisan M., Cerisoli F. et al. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. *Cell Stem Cell*. 2009; 5(4): 385-95.

5. Rhodes K., Gekas C., Wang W., Lux T., Francis C.S., Chan D.N. et al. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. *Cell Stem Cell*. 2008; 2(3): 252-63.

6. Chabaliy V.A., Kuchma M.D., Kirik V.M., Onishchenko A.N., Lukash L.L., Lobyntseva G.S. Cryopreservation of human placental tissue - a source of hematopoietic progenitor cells and multipotent mesenchymal stromal cells. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2012; 7 (2): 54-62. (in Russian).

7. Aldinucci A., Rizzetto L., Pieri L., Nosi D., Romagnoli P., Biagioli T. et al. Inhibition of immune synapse by altered dendritic cell actin distribution: a new pathway of mesenchymal stem cell immune regulation. *J. Immunol.* 2010; 185(9): 5102-10.

8. Astrelina T.A., Gomzyakov A.E., Kobzeva I.V., Karpova E.E., Kruglov J.A., Skorobogatov E.V. et al. Evaluation of the quality and safety of cryopreserved placental multipotent mesenchymal stromal cells in clinical practice for clinical applications. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2013; 8 (4): 82-7 (in Russian).

9. Battiwalla M., Hematti P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 2009; 11(5): 503-15.

10. Miki T., Lehmann T., Cai H., Stolz D., Storm S.C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005; 23: 1549-59.

11. Ditadi A., de Coppi P., Picone O., Gautreau L., Smati R., Six E. et al. Human and murine amniotic fluid c-Kit⁺Lin⁻ cells display hematopoietic activity. *Blood*. 2009; 113(17): 3953-60.

12. Piccoli M., Franzin C., Bertin E., Urbani L., Blaauw B., Repele A. et al. Amniotic fluid stem cells restore the muscle cell niche in a HSA-Cre, Smn^{F7/F7} mouse model. *Stem Cells*. 2012; 30: 1675-84.

13. Dancis J., Jansen V., Brown G.F., Gorstein F., Balis M.E. Treatment of hypoplastic anemia in mice with placental transplants. *Blood*. 1977; 50: 663-70.

14. Dancis J., Douglas G.W., Fierer J. Immunological competence of mouse placental cells in irradiated hosts. *Am. J. Obst. & Gynec.* 1966; 94: 50-6.

15. Dancis J., Samuels B.D., Douglas G.W. Immunological competence of placenta. *Science*. 1962; 136: 136-7.

16. Petinati N.A., Kuzmin L.A., Parovichnikova E.N., Lubimova L.S., Gribanova E.O., Shipunova I. et al. Treatment of "graft versus host" acute reaction with multipotent mesenchymal stromal cells from the bone marrow donor in patients after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Terapevticheskiy Archiv*. 2012; 7: 2630 (in Russian).

17. Barlow S., Brooke G., Chatterjee K., Price G., Pelekanos R., Rossetti T. et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2008; 17(6): 1095-107.

18. Heazlewood C.F., Sherrell H., Ryan J., Atkinson K., Wells C.A., Fisk N.M. High incidence of contaminating maternal cell overgrowth in human placental mesenchymal stem/stromal cell cultures: a systematic review. *Stem Cells Transl. Med.* 2014; 3(11): 1305-11.

19. Shahpazyan N.K., Astrelina T.A., Yakovleva M.V. Mesenchymal stem cells from various human tissues: biological properties and assessment of quality and safety for clinical application. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2012; 7(1): 23-33. (in Russian).

20. Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Sergievich L.A., Karnaukhova N.A., Bogdanenko E.V., Sмирнов А.А. et al. Information theory of aging: study of the effect of bone marrow transplantation on the life span of mice. *Биофизика*. 2014; 59(4): 790-5. (in Russian).

21. Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Sergievich L.A., Karnaukhova N.A., Bogdanenko E.V., Manokhina I.A. et al. Comparative analysis of the effectiveness of non-irradiated syngeneic and allogeneic transplantation of EGFP⁺ bone marrow cells of mice using the method of microspectral fluorescence analysis. *Биофизика*. 2014; 59(6): 1135-42. (in Russian).

22. Bogdanenko E.V., Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Sergievich L.A., Karnaukhova N.A., Manokhina I.A. et al. The study of stem cell therapy possibility for extension of female sexual function in model experiments on mice. *Патогенез*. 2015; 13(3): 13-7 (in Russian).

23. Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Karnaukhova N.A., Sмирнов А.А., Bogdanenko E.V. et al. Application of microspectral fluorescence analysis to study engraftment of EGFP⁺ bone marrow cells of mice with 5-fluorouracil. *Биофизика*. 2014; 59(4): 740-8 (in Russian).

24. Pereverzev A.E. *Hematopoietic colony forming cells and physical stress factors*. L.: Nauka; 1986. 172 p. (in Russian).

25. Stroud A.N., Brues A.M. Recovery and regeneration of spleen and thymus after single and divided dose of total body X-ray. *Fed. Proc.* 1955; 14: 148.

26. Semenov O.V., Koestenbauer S., Riegel M., Zech N., Zimmermann R., Zisch A. H. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemnes after isolation. *Am. J. Obst. & Gynec.* 2010; 202: 193.e1-13.

27. Pelosi E., Valtieri M., Coppola S., Botta R., Gabbianelli M., Lulli V. et al. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood*. 2002; 100: 3203-8.

28. Huber T. L., Kouskoff V., Fehling H. J., Palis J., Keller G. Hemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature*. 2004; 432: 625-30.

29. Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Sergievich L.A., Karnaukhova N.A., Bogdanenko E.V., Manokhina I.A. et al. Informational Theory of Aging: The Life Extension Method Based on the Bone Marrow Transplantation. *Journal of Biophysics*. 2015. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jbp/aip/686249/>.

30. Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V. Information hypothesis of aging: how the germ-line "escapes" from aging? *Биофизика*. 2009; 54 (4): 726-32 (in Russian).

Сведения об авторах:

Богданенко Елена Валентиновна (Bogdanenko E.V.) — доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. молекулярных основ болезней зависимости, e-mail: lenabogdval@mail.ru

Сергиевич Лариса Анатольевна (Sergievich L.A.) — канд.биол.наук, ст. науч. сотр. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: larserg@mail.ru

Карнаухов Алексей Валерьевич (Karnaikhov A.V.) — канд.физ.-мат. наук., вед. науч. сотр. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: AlexeyKarnaikhov@yandex.ru

Карнаухова Елена Викторовна (Karnaikhova E.V.) — канд.физ.-мат. наук., старший науч. сотр. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: AlexeyKarnaikhov@yandex.ru

Карнаухов Валерий Николаевич (Karnaikhov V.N.) — канд.биол.наук, зав. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: nakarnaukhova@mail.ru

Карнаухова Наталья Алексеевна (Karnaikhova N.A.) — ст. науч. сотр. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: nakarnaukhova@mail.ru

Манохина Ирина Анатольевна (Manokhina I.A.) — млад. науч. сотр. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: Iriman@mail.ru