

ТЫРИНА ЕКАТЕРИНА АНДРЕЕВНА

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ  
КЛЕТОК И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В  
УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЭФФЕКТОВ  
МИКРОГРАВИТАЦИИ**

1.5.5 – Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва, 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН **Буравкова Людмила Борисовна**

Официальные оппоненты: **Шипунова Ирина Николаевна**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, старший научный сотрудник лаборатории физиологии кроветворения

**Меньшиков Михаил Юрьевич**, доктор биологических наук, Институт экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ведущий научный сотрудник лаборатории ангиогенеза

Ведущая организация: Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»

Защита состоится «21» сентября 2023 г. в 10-00 часов

на заседании диссертационного совета Д 24.1.023.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук по адресу: 123007 г. Москва, Хорошевское шоссе, 76 А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук и на сайте

<http://www.imbp.ru/WebPages/win1251/ScienceN/DisserSov/Tyrina2023/Tyrina.html>

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Светлана Викторовна Поддубко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Микрогравитация как один из главных факторов космического полета (КП) оказывает негативное воздействие на различные физиологические системы в организме человека, в особенности, на опорно-двигательный аппарат, сердечно-сосудистую систему и гемопоэз (Какурин и др., 1971; Davis et al., 1996; Graebe et al., 2004; Григорьев и др., 2009; Астахов и др., 2012; Оганов, Григорьев, 2012; Козловская, 2017; Garrett-Bakelman et al., 2019; Vernice et al., 2020; Baran et al., 2021; Charvat et al., 2022). В связи с увеличением продолжительности КП исследование механизмов воздействия факторов КП и адаптация к ним являются особенно актуальными.

У космонавтов после 6-8 суток КП в крови снижалось количество циркулирующих лимфоцитов, эозинофилов, и увеличивалось количество гранулоцитов (Taylor et al., 1986). После полетов биоспутников «Бион 1-11», «Бион-М1», а также «STS-58/SLS-2» в рамках программы Space Shuttle у грызунов выявлено угнетение эритроидного ростка, в том числе на уровне общего миелоидного предшественника – КОЕ-ГЭММ, усиление гранулоцитопоеза, появление бластных клеток (Швец и др., 1984; Ichiki et al., 1996; Sotnezova et al., 2017; Markina et al., 2018). Показано существенное (в 20 раз) снижение числа КОЕ в костном мозге (Швец, Кривенкова, 1977).

Адаптация организма к воздействию неблагоприятных факторов КП и гемопоэз в значительной степени связаны с функционированием компартментов костного мозга (КМ). Поэтому обнаруженные изменения могут быть обусловлены нарушениями в гемопоэтической нише КМ (Markina et al., 2018). В создании гемопоэз-индуцирующего микроокружения особая роль принадлежит мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам (МСК), которые являются гравичувствительными (Buravkova et al., 2010; Gershovich et al., 2013; Ratushnyy et al., 2019; Lin et al., 2020). Поскольку гемопоэтический и стромальный компартменты чувствительны к действию микрогравитации, анализ механизмов, регулирующих функциональное состояние, физиологическую активность и взаимодействие этих клеток имеет важное значение как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения.

В связи с ограниченной возможностью проведения экспериментов на борту космических аппаратов, для наземного моделирования эффектов микрогравитации используются устройства случайного позиционирования, такие как 3D-клиностаты и Random Positioning Machine (RPM) (Van Loon, 2007). Показано, что при моделировании происходит изменение активности МСК, что может влиять на их способность к формированию гемопоэз-поддерживающей стромы. Тем не менее, в настоящий момент нет экспериментальных данных относительно эффектов микрогравитации на *ex vivo* гемопоэз. Поэтому совместное культивирование МСК и гемопоэтических клеток представляет адекватную и актуальную экспериментальную модель для исследования особенностей их взаимодействия *in vitro* при моделировании эффектов микрогравитации.

В настоящее время перспективным становится использование гемопоэтических и стромальных клеток, выделенных не из КМ, а из альтернативных источников, так как они могут быть легко и в достаточном количестве извлечены из ткани донора. Показано, что экспансия гемопоэтических клеток пуповинной крови, как и из КМ, может эффективно происходить в жидкой или полужидкой среде и при культивировании на различных стромальных подслоях (Robinson et al., 2006). В настоящей работе для выявления особенностей взаимодействия МСК и гемопоэтических предшественников в условиях моделирования эффектов микрогравитации использовали разработанную ранее *in vitro* модель гемопоэтической ниши, которая заключается в совместном культивировании мононуклеаров пуповинной крови (пкМНК) и МСК, выделенных из жировой ткани (Andreeva et al., 2015).

#### **Цель работы:**

Изучить особенности межклеточного взаимодействия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических предшественников в условиях моделирования эффектов микрогравитации.

#### **Задачи:**

1. Охарактеризовать исходные популяции мезенхимальных стромальных клеток (МСК), мононуклеаров пуповинной крови (пкМНК) и совместную культуру МСК и пкМНК после 72 часов взаимодействия;
2. Оптимизировать экспериментальную модель сокультивирования МСК и пкМНК для изучения эффектов моделируемой микрогравитации с помощью устройства случайного позиционирования;
3. Проанализировать динамику образования суспензионной и МСК-ассоциированной фракций гемопоэтических клеток в модели взаимодействия МСК и пкМНК;
4. Оценить функциональные и фенотипические особенности суспензионной и МСК-ассоциированной фракций гемопоэтических клеток при моделировании эффектов микрогравитации;
5. Оценить транскрипционный профиль МСК и гемопоэтических клеток при взаимодействии в условиях моделирования эффектов микрогравитации;
6. Охарактеризовать паракринный профиль при взаимодействии МСК и гемопоэтических предшественников.

#### **Научная новизна**

В результате выполнения работы выявлены особенности *ex vivo* миелопоэза и роль стромального микроокружения при моделировании эффектов микрогравитации. Для этого в качестве объекта исследования использовали гетероклеточные ассоциаты, состоящие из ГСПК пуповинной крови и МСК, а также оптимизировали модель для анализа самоподдержания и коммитирования гемопоэтических клеток при экспозиции на RPM.

Используемая модель гетероклеточных ассоциатов позволила получить гемопоэтические клетки разной степени зрелости, локализованные в отдельных компартментах. Впервые показано изменение соотношения и распределения между

фракциями гемопоэтических клеток, сокультивируемых с МСК, в условиях моделирования эффектов микрогравитации: в суспензионной и МСК-ассоциированной фракциях гемопоэтических клеток снижалась доля гемопоэтических предшественников, клеток моноцитарного, эритроидного и лимфоцитарного ростка, а также усиливался гранулоцитарный росток.

Впервые в *in vitro* модели взаимодействия ГСПК и МСК показано преимущественное снижение экспрессии генов, ассоциированных с адгезией к матриксу, межклеточным взаимодействием, цитоскелетом и его регуляцией, внеклеточным матриксом, а также изменение экспрессии генов, регулирующих самоподдержание/дифференцировку ГСПК в МСК при моделировании эффектов микрогравитации.

Впервые в суспензионных и МСК-ассоциированных ГСПК показано изменение экспрессии генов гемопоэз-регулирующих цитокинов, обеспечивающих баланс примитивных/коммитированных ГСПК, а также регулирующих дифференцировку МСК. В суспензионных и МСК-ассоциированных ГСПК показаны разнонаправленные изменения экспрессии генов, ассоциированных с адгезией и межклеточным взаимодействием при моделировании эффектов микрогравитации.

Впервые в *in vitro* модели гемопоэтической ниши выявлено изменение паракринного профиля цитокинов, которые могут опосредовать изменения в количестве и соотношении ГСПК различных ростков, а также в дифференцировке МСК при моделировании эффектов микрогравитации.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные в процессе экспериментальной работы результаты дополняют представление о влиянии микрогравитации на кроветворную нишу и о причине изменений, происходящих в организме под влиянием невесомости. Полученные результаты могут лечь в основу дальнейшего изучения механизмов гравитационной чувствительности клеток и разработки мер противодействия негативным изменениям гемопоэза в условиях космического полёта. Выбранная для работы *in vitro* модель сокультивирования гемопоэтических клеток пуповинной крови и МСК представляет интерес не только для космических исследований, но и для регенеративной медицины как инструмент для создания 3Д-гетероклеточных структур. На основе выбранной *in vitro* модели зарегистрирован патент на получение ассоциатов гемопоэтических и стромальных клеток-предшественников, в которых МСК сохраняют иммуносупрессивную активность (RU 2722669 C1).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. При моделировании эффектов микрогравитации *in vitro* в сокультуре МСК и ГСПК снижается количество гемопоэтических предшественников в суспензионной фракции, а также изменяется соотношение ГСПК различных ростков с уменьшением активности моноцитарного, лимфоцитарного и эритроидного ростков, но активацией гранулоцитарного ростка.

2. Количество МСК-ассоциированных гемопоэтических клеток снижается при моделировании эффектов микрогравитации, при этом доля клеток моноцитарной, эритроидной и лимфоцитарной линии уменьшается, но активируется гранулоцитарный росток. Соотношение гемопоэтических предшественников смещается в сторону более коммитированных ГСПК.
3. Моделирование эффектов микрогравитации в течение 14 суток изменяет транскрипционный профиль сокультивируемых мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и гемопоэтических предшественников (ГСПК) преимущественно в сторону снижения экспрессии генов, ассоциированных с адгезией и межклеточным взаимодействием. В суспензионной фракции ГСПК отмечается обратный эффект. Как в МСК, так и в ГСПК преимущественно повышается экспрессия цитокинов, ингибирующих пролиферацию ГСПК, и снижается экспрессия генов цитокинов, стимулирующих их пролиферацию.
4. Моделирование эффектов микрогравитации изменяет паракринный профиль цитокинов в сокультуре мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и гемопоэтических предшественников: увеличивается содержание цитокинов, негативно регулирующих гемопоэтические предшественники *in vitro*.

#### **Степень достоверности результатов проведённых исследований**

Диссертационная работа выполнена с использованием современных методов клеточной и молекулярной биологии, а также адекватной статистической обработки данных. Выносимые на защиту положения и выводы основаны на достоверных результатах экспериментов, проиллюстрированных графиками и таблицами.

#### **Апробация работы**

Основные результаты и положения диссертации были представлены и обсуждены на научных мероприятиях: XVIII конференция молодых учёных, специалистов и студентов, посвящённой 50-летию высадки человека на Луну (Москва, 2019), IV национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2019), Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) European Chapter Conference (Rhodes, Greece, 2019), XIV академические чтения по космонавтике, посвященные памяти академика С.П. Королёва (Москва, 2021), XIX конференция молодых учёных, специалистов и студентов», посвящённая 60-летию первого полета человека в космос (Москва, 2021), XLVI академические чтения по космонавтике, посвященные памяти академика С. П. Королёва (Москва, 2022), XXXIV международная зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2022), VIII Молодежная школа-конференция по молекулярной биологии (Санкт-Петербург, 2022), XX Конференция молодых учёных, специалистов и студентов с международным участием, посвященная 165-летию со дня рождения К.Э.Циолковского (Москва, 2022), V национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2022), XLVII академические чтения по космонавтике, посвященные памяти академика С. П. Королёва (Москва, 2023), XXI Конференция молодых учёных,

специалистов и студентов, посвященная 60-летию Института медико-биологических проблем (Москва, 2023).

По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах из перечня журнала ВАК РФ и баз данных Scopus/Web of Science, 14 тезисов докладов, 1 патент на изобретение.

#### **Связь работы с научными программами**

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-29-04026 и программы фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН, тема 65.3.

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Текст диссертации изложен на 181 страницах машинописного текста, результаты проиллюстрированы 35 рисунками и 13 таблицами. Список литературы содержит 487 источника, из них 48 на русском и 439 на иностранном языке.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

#### Совместное культивирование МСК и пкМНК

В экспериментах использовали МСК жировой ткани 2-5 пассажей из коллекции клеточных культур лаборатории клеточной физиологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН. Мононуклеары пуповинной крови (пкМНК) были предоставлены Банком стволовых клеток «Криоцентр» (Москва) в рамках договора о научном сотрудничестве. При достижении МСК состояния 70-80% конфлюентности вносили свежеразмороженную суспензию пкМНК в количестве  $2-3 \times 10^6$  клеток/мл, а затем культивировали совместно в течение 72 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония), после чего неадгезировавшие к МСК клетки удаляли, а флаконы с адгезировавшими пкМНК полностью заполняли ростовой средой, насыщали CO<sub>2</sub> в инкубаторе и продолжали культивировать в статическом контроле (при 37°C в термостате) и на устройстве случайного позиционирования (RPM, в термостате при тех же условиях).

#### Моделирование эффектов микрогравитации

Для моделирования эффектов микрогравитации использовалась машина случайного позиционирования – «Gravite» (Space Bio-Laboratories, Co., Ltd., Япония). При управляемом вращении двух рамок «Gravite» имитирует эффект снижения влияния силы тяжести на культуру клеток до  $10^{-3} g$  (Van Loon, 2007). Схема исследования представлена на рис. 1.

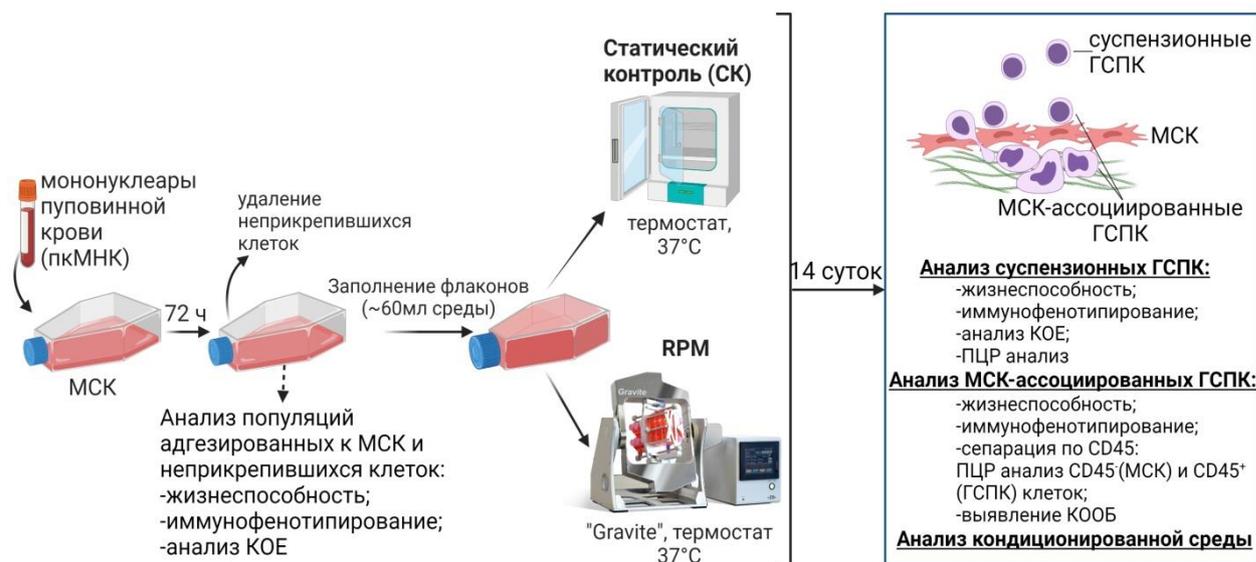


Рис. 1. Схема эксперимента по оценке влияния эффектов 14-суточной моделируемой микрогравитации на взаимодействие гемопоэтических и стромальных клеток.

### Анализ колониеобразующей активности

Наличие колониеобразующих единиц (КОЕ) оценивали по способности образовывать колонии в полужидкой среде HSC005 (R&D Systems, США). В соответствии с протоколом производителя  $50 \times 10^3$  ГСПК смешивали с полужидкой средой (1,5 мл) и помещали в 35-мм чашки Петри в дублях в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Колонии определяли на 14 день культивирования на микроскопе Nikon Eclipse TiU (Nikon, Япония). Подсчет колоний проводили в проходящем свете, для морфологического анализа применяли темное поле с использованием атласа гемопозитических колоний (STEMCELL Technologies, Канада).

### Анализ клеток, образующих области «булыжной мостовой»

Слайд-флаконы с клетками фиксировали ледяным метанолом в течение 5 минут и окрашивали по Гимзе (AppliChem, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Препараты использовали для подсчета областей «булыжной мостовой» с помощью микроскопа Nikon Eclipse TiU (Япония). Наличие клеток, образующих области «булыжной мостовой» (КООБ) регистрировали по появлению в культуре фазово-тусклых скоплений не менее пяти клеток, которые обнаруживались с помощью фазово-контрастной микроскопии.

### Оценка жизнеспособности и иммунофенотипа

К анализируемой клеточной суспензии добавляли рекомендуемое производителем количество антиген-специфичных антител, конъюгированных с флуоресцентными метками. На пробу отбирали по 100 мкл конечной суспензии (100-500 тыс. клеток на пробу). Каждую пробу окрашивали на жизнеспособность (7AAD) и анализировали на проточном цитофлуориметре CytoFlex S (Beckman Coulter, США). Во избежание ложных результатов из-за неспецифического связывания антител использовали соответствующие изотипические контроли. Жизнеспособность клеток определяли с использованием набора Annexin V-FITC/PI (Beckman Coulter, США) согласно инструкции производителя.

### Оценка уровня относительной экспрессии генов

Для определения уровня экспрессии генов из клеток выделяли тотальную РНК с помощью лизирующего реагента QIAzol (Qiagen, США) методом фенол-хлороформной экстракции, после чего осуществляли обработку ДНКазой и реакцию обратной транскрипции с использованием QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, США) согласно инструкциям производителя. Полученную кДНК использовали для проведения количественной ПЦР с применением «Набора реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green 1» (Синтол, Россия). Уровень экспрессии генов, ассоциированных с клеточной адгезией и внеклеточным матриксом, оценивали с помощью набора RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array – Human Extracellular Matrix & Adhesion Molecules (Qiagen, США). Использовали следующие гены домашнего хозяйства – *ACTB*, *B2M*, *HPRT1*, *GAPDH*, *RPLP0*. Для определения экспрессии отдельных генов

использовали пары праймеров на гены *CXCL1*, *CXCL12*, *CXCR4*, *LIF*, *VEGF*, *TGFB*, *IL-6*, *IL-8*, *CCL7*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CCL11*, *CSF1*, *CSF2*, *CSF3*, *CSF1R*, *CSF2R*, *CSF3R*, *FLT3L*, *KITLG*, *ITGA1*, *ITGA2*, *ITGA4*, *ITGA5*, *ITGA8*, *ITGAL*, *ITGAM*, *ITGAV*, *ITGB1*, *ITGB3*, *ITGB5*, *VCAM1*, *ICAM1*, *FN1*, *TUBB*, *PHOA*, *ROCK1*, *ACTB*, *ACTG1*, *SPARC*, *SPP1*, *COL1A1*, *MMP1*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP3*, *CD44*, *PECAM1*, *CTNNA1*, *CTNNA1*, *CTNNA1*, *CTNNA1*, *CDKN2A*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CCND1* (все - Qiagen, США). Для нормализации результатов исследования использовали праймеры референсных генов (*HPRT1*, *RPLP0*). Уровень экспрессии генов оценивали с использованием метода  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak, Schmittgen, 2001).

#### Определение содержания гемопоэз-регулирующих цитокинов в среде культивирования

Для характеристики паракринной активности собирали кондиционированную среду, центрифугировали при 2500 g для удаления клеточного мусора и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения измерений. Определение содержания хемокинов в кондиционированной среде проводили с помощью мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа (система MILLIPLEX® MAP, Merck Millipore, Германия) в соответствии с инструкциями производителя с использованием панели Human Cytokine / Chemokine (48-plex). Анализ образцов проводился на приборе MAGPIX (Luminex, США). Концентрации вычислялись автоматически в программном обеспечении xPONENT 4.2 (Luminex, США).

#### Статистический анализ

Для определения достоверности различий между выборками применяли непараметрические критерии Манна-Уитни и Уилкоксона при выбранном уровне значимости  $p < 0,05$ . В качестве характеристик полученных выборок использовали среднее и стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ).

#### **Результаты и обсуждение**

На первом этапе охарактеризовали используемые клеточные культуры. МСК из жировой ткани соответствовали минимальным критериям Международного общества клеточной терапии (ISCT). К ним относятся адгезия к пластику, экспрессия маркеров CD73, CD90 и CD105, отсутствие экспрессии гемопоэтических и эндотелиальных маркеров и способность к дифференцировке *in vitro* (Dominici et al., 2006).

С помощью проточной цитофлуориметрии оценили состав исходной фракции пкМНК. Проведенная оценка иммунофенотипа зрелых клеток соответствовала данным других исследователей (Tsegaye et al., 2003, Cervera et al., 2006; Романов и др., 2015).

В пкМНК было выявлено  $0,9 \pm 0,5\%$  положительных по CD34 клеток. Помимо CD34, использовали также маркер CD133, что позволило выделить ранние CD133<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> ( $0,2 \pm 0,1\%$ ), средние CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> ( $0,6 \pm 0,4\%$ ) и поздние CD133<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> ГСПК ( $0,2 \pm 0,2\%$ )

(Miraglia et al., 1997, Yin et al., 1997, McGuckin et al., 2003). Известно, что в состав CD34<sup>+</sup> ГСПК входят и более коммитированные предшественники. Поэтому среди CD34<sup>+</sup> клеток определяли такие линейные маркеры, как CD71, CD235a, CD33, CD4, CD15. В составе CD34<sup>+</sup> ГСПК выявили ранние эритроидные предшественники (CD71<sup>+</sup>/CD235a<sup>+</sup>) - бурст-образующие единицы эритроцитов (БОЕ-Э) (12,1±1,9%) и поздние эритроидные предшественники (CD71<sup>+</sup>/CD235a<sup>+</sup>) – колониеобразующие единицы эритроцитов (КОЕ-Э) и проэритробласты (0,6±0,2%). Гранулоцитарно-макрофагальные предшественники (CD33<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup>/CD14<sup>-</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD15<sup>-</sup>) составили 0,6±0,1% от CD34<sup>+</sup> ГСПК. Монобласты (CD33<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup>/CD14<sup>-</sup>/CD15<sup>-</sup>) составили 5,0±2,7%, а миелобласты (CD33<sup>+</sup>/CD15<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD11b<sup>-</sup>/CD14<sup>-</sup>) - 8,2±3,1% от CD34<sup>+</sup> клеток. Таким образом, среди более коммитированных ГСПК наибольшую часть составляют эритроидные предшественники.

Для изучения механизмов взаимодействия гемopoэтических предшественников и МСК в условиях моделирования эффектов микрогравитации была выбрана модель сокультивирования пкМНК, содержащих ГСПК, и МСК с последующей экспансией ГСПК (Маслова и др., 2013; Andreeva et al., 2018). Эта система представляет собой экспериментально доступную модель ранних стадий кроветворения. В результате стромазависимой экспансии образуются суспензионные ГСПК и МСК-ассоциированные ГСПК, которые отличаются по свойствам и пролиферативному потенциалу (Dexter et al., 1977). Пополнение пула суспензионных гемopoэтических клеток происходит за счет деления адгезированных (Jing et al., 2010). Обе фракции ГСПК динамически связаны друг с другом, что, по-видимому, имитирует кооперацию в нишах стволовых клеток *in vivo*: покоящиеся ГСПК преимущественно располагаются в остеобластических нишах, тогда как более активные самообновляющиеся ГСПК сохраняются в периваскулярной нише (Wilson, Trumpp, 2006; Xie et al., 2009).

На первом этапе оптимизировали эту модель в связи с применением устройства случайного позиционирования, что требовало использование полностью заполненных средой флаконов, а также выбрали способ подготовки стромального подслоя. Учитывая, что митотически-неактивные МСК, полученные обработкой митомицином С в концентрации 1,5 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США) хуже поддерживали ГСПК по сравнению с пролиферирующими МСК, для изучения взаимодействия ГСПК и МСК в условиях моделирования эффектов микрогравитации использовали модель с пролиферирующими МСК.

Для выбора временной точки оценки эффектов взаимодействия МСК и ГСПК в среде оценивали концентрацию глюкозы и лактата, а также определяли количество МСК-ассоциированных, суспензионных ГСПК и КОЕ в их составе. На основании полученных результатов была выбрана временная точка – 14 суток, в которой наблюдалось максимальное образование популяций ГСПК и КОЕ.

На первом этапе выполнения исследования к МСК вносили суспензию пкМНК и сокультивировали в течение 72 часов. За это время ГСПК различной степени коммитирования, а также часть зрелых клеток, входящих в состав пкМНК, адгезировала к стромальному подслою. На этапе сокультивирования пкМНК и МСК большая часть ГСПК, содержащихся в пкМНК, адгезировала к МСК. Причем ранние ГСПК превалировали над средними и поздними ГСПК в составе МСК-ассоциированных клеток. Среди средних и поздних ГСПК преобладали гранулоцитарные и эритроидные предшественники. Жизнеспособность клеток была высокой, что позволило нам использовать эту сокультуру для дальнейшего 14-суточного моделирования эффектов микрогравитации. Эти данные соотносятся с результатами более ранних работ, выполненных в нашей лаборатории (Andreeva et al., 2015, Маслова и др., 2013).

За 14 суток сокультивирования МСК и ГСПК в условиях статического контроля (СК) и моделирования эффектов микрогравитации (RPM) снова образовывались две фракции гемопоэтических клеток – суспензионная и МСК-ассоциированная. Количество суспензионных клеток и их жизнеспособность не изменились при экспозиции на RPM и не отличались от контроля. Однако были найдены изменения в соотношении различных популяций гемопоэтических клеток. Выявлено снижение доли CD34<sup>+</sup> ГСПК, клеток моноцитарной и лимфоцитарной линии (в том числе Т-хелперов) и усиление гранулоцитарного роста (таблица 1).

Таблица 1. Иммунофенотип суспензионных клеток через 14 суток экспозиции в СК и на RPM. Mean±SD (n=3). \* - p<0,05

Клеточная популяция	Фенотипирование	СК, %	RPM, %
ГСПК	CD34 <sup>+</sup>	6,9±2,1	4,0±0,5*
моноциты и их предшественники	CD4 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> и CD4 <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup>	31,3±2,8	20,6±5,6*
гранулоциты и их предшественники	CD15 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup>	4,8±2,2	11,2±2,7*
лимфоциты и их предшественники	CD7 <sup>+</sup>	54,4±4,5	40,0±6,4*
Т-хелперы	CD4 <sup>+</sup> и SSC/FSC лимфоцитов	49,5±3,6	32,9±4,6*
более зрелые эритроидные клетки	CD235 <sup>+</sup> CD71 <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup>	8,4±5,3	11,46±7,6
коммитированные эритроидные предшественники	CD235 <sup>-</sup> CD71 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup>	1,0±0,4	1,1±0,9

Во фракции суспензионных клеток было снижено общее количество колониеобразующих единиц (КОЕ), а также количество клеток в образуемых потомками КОЕ колониях. Моделирование эффектов микрогравитации привело к увеличению доли унипотентных гранулоцитарных колоний (КОЕ-Г), а также снижению доли унипотентных эритроидных колоний (БОЕ-Э), моноцитарных колоний (КОЕ-М) и бипотентных гранулоцитарно-моноцитарных колоний (КОЕ-ГМ) (Рис. 2).

Снижение количества колоний при моделировании эффектов микрогравитации указывает на то, что во фракции суспензионных клеток содержалось меньшее количество

предшественников. А сокращение количества клеток в колониях свидетельствует о меньшей пролиферативной активности предшественников, их большей зрелости и ограниченной способности к самообновлению.

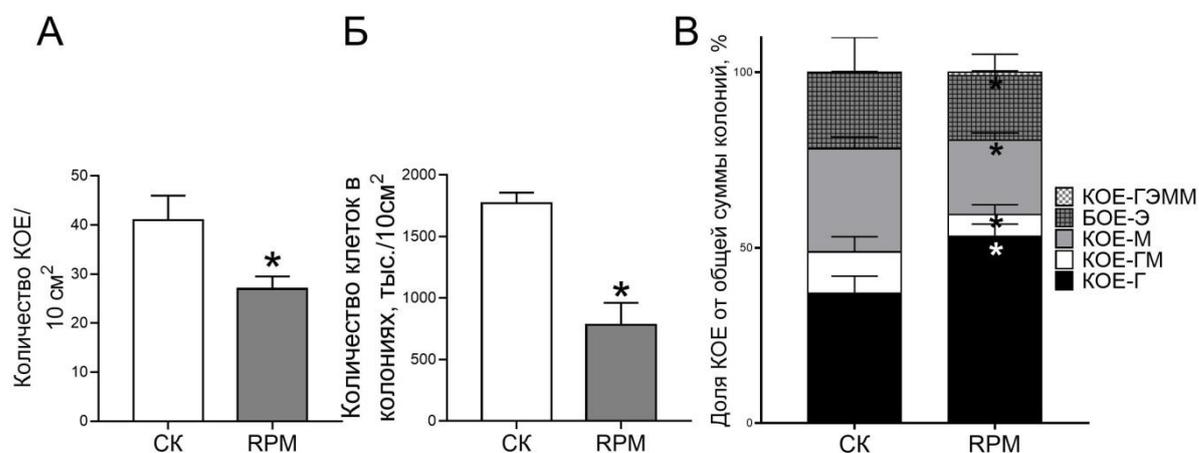


Рис. 2. Оценка количества КОЕ среди суспензионных ГСПК. А – абсолютное количество КОЕ на 10 см<sup>2</sup>. Б – количество клеток в колониях, образованных КОЕ. В - структура популяции КОЕ – соотношение КОЕ различных\* ростков и коммитированности, %. Представлены данные 6 независимых экспериментов. \* - p<0,05

В отличие от суспензионной фракции количество ГСПК в МСК-ассоциированной фракции значительно снизилось при моделировании эффектов микрогравитации. При этом жизнеспособность клеток оставалась на одном уровне со статическим контролем. Анализ МСК-ассоциированной фракции с помощью проточной цитофлуориметрии выявил увеличение доли поздних CD34<sup>+</sup>CD133<sup>-</sup> ГСПК при сохранении количества ранних и средних ГСПК в условиях экспозиции на RPM. Как и при анализе суспензионной фракции выявили снижение доли клеток моноцитарной и лимфоцитарной линии (в том числе Т-хелперов) наряду с увеличением клеток гранулоцитарного ростка. Помимо этого, происходило снижение доли CD71<sup>+</sup>CD235a<sup>-</sup> эритроидных предшественников.

Таблица 2. Иммунофенотип МСК-ассоциированных клеток через 14 суток экспозиции в СК и на RPM. Mean±SD (n=6). \* - p<0,05

Клеточная популяция	Фенотипирование	СК, %	RPM, %
гемопоэтический компартмент	CD45 <sup>+</sup> CD90 <sup>-</sup>	24,2±11,8	6,06±2,7*
	CD45 <sup>-</sup> CD90 <sup>-</sup>	7,8±4,5	9,9±5,1
ранние и средние ГСПК	CD133 <sup>+</sup> среди CD45 <sup>+</sup>	3,1±0,8	2,7±0,8
поздние ГСПК	CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>-</sup> среди CD45 <sup>+</sup>	5,2±3,3	8,1±4,5*
моноциты и их предшественники	CD4 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> и CD4 <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup> среди CD45 <sup>+</sup>	66,9±9,5	43,2±5,3*
гранулоциты и их предшественники	CD15 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> среди CD45 <sup>+</sup>	2,7±2,2	7,8±2,8*

лимфоциты и их предшественники	CD7 <sup>+</sup> среди CD45 <sup>+</sup>	8,1±2,7	3,7±2,2*
T-хелперы	CD4 <sup>+</sup> и SSC/FSC лимфоцитов среди CD45 <sup>+</sup>	4,7±1,2	2,0±0,9*
более зрелые эритроидные клетки	CD235 <sup>+</sup> CD71 <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup> среди CD45 <sup>-</sup>	22,5±14,9	17,6±9,6
коммитированные эритроидные предшественники	CD235 <sup>-</sup> CD71 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> среди CD45 <sup>-</sup>	15,02±4,3	7,2±2,5*

Помимо определения фенотипа в нашей работе был проведен функциональный анализ МСК-ассоциированных ГСПК на выявление и подсчет количества скоплений клеток, образующих области «булыжной мостовой» (КООБ). Моделирование эффектов микрогравитации привело к снижению количества скоплений КООБ в 2 раза, что, по всей видимости, свидетельствует о сокращении количества примитивных ГСПК.

Известно, что значительную роль в функциональном состоянии ГСПК играют прямые контакты с их клеточным микроокружением (Wagner et al., 2007, Pinho, Frenette, 2019). При моделировании эффектов микрогравитации в ГСПК, ассоциированных с МСК, снижается экспрессия *ICAM1*, *ITGA4*, *ITGAM*, *CTNNB1* и возрастает экспрессия *ITGA1*, *ITGB1*, *VCAM1* (Рис. 3, 5). Любопытно, что анализ суспензионных ГСПК при моделировании эффектов микрогравитации, показал увеличение экспрессии *ICAM1*, *VCAM1*, *ITGA5* и *ITGB1* и снижение *ITGA1* и *ITGAM* (Рис. 3, 5). Это подчеркивает те различия в свойствах МСК-ассоциированных и суспензионных ГСПК, которые были показаны ранее (Wagner et al., 2007; Jing et al., 2010). Возможно, преимущественное увеличение экспрессии молекул адгезии в ГСПК, которые находятся в суспензии без контактов с другими гемопоэтическими клетками, клетками стромы и матриксом, является эффектом компенсации.

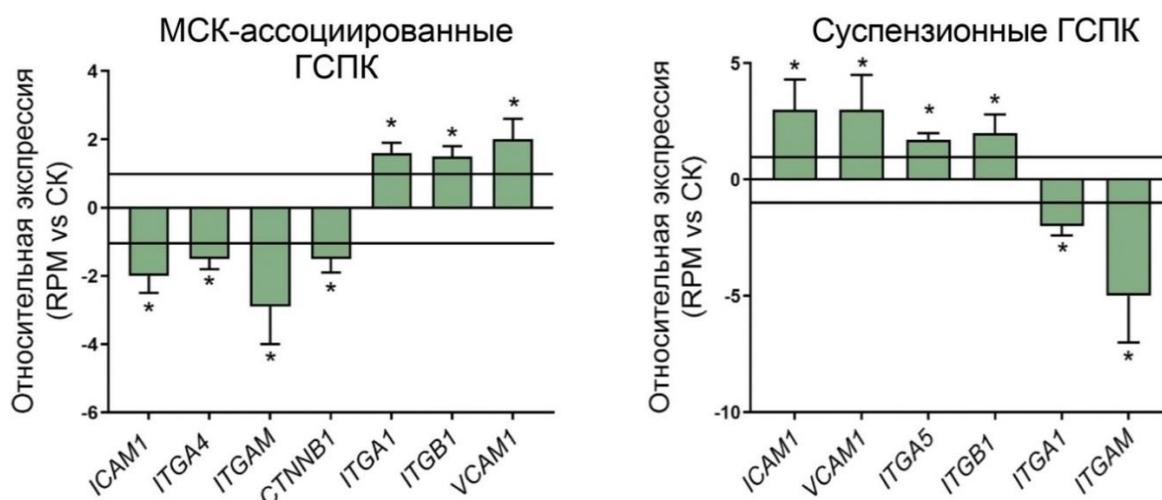


Рис. 3. Относительная экспрессия генов, ассоциированных с межклеточным взаимодействием и адгезией к матриксу после 14-суточной экспозиции МСК-ассоциированных и суспензионных ГСПК на RPM. Экспрессия в СК принята за единицу. \* -  $p < 0,05$  в сравнении с экспрессией в клетках, культивированных в СК,  $n=3$

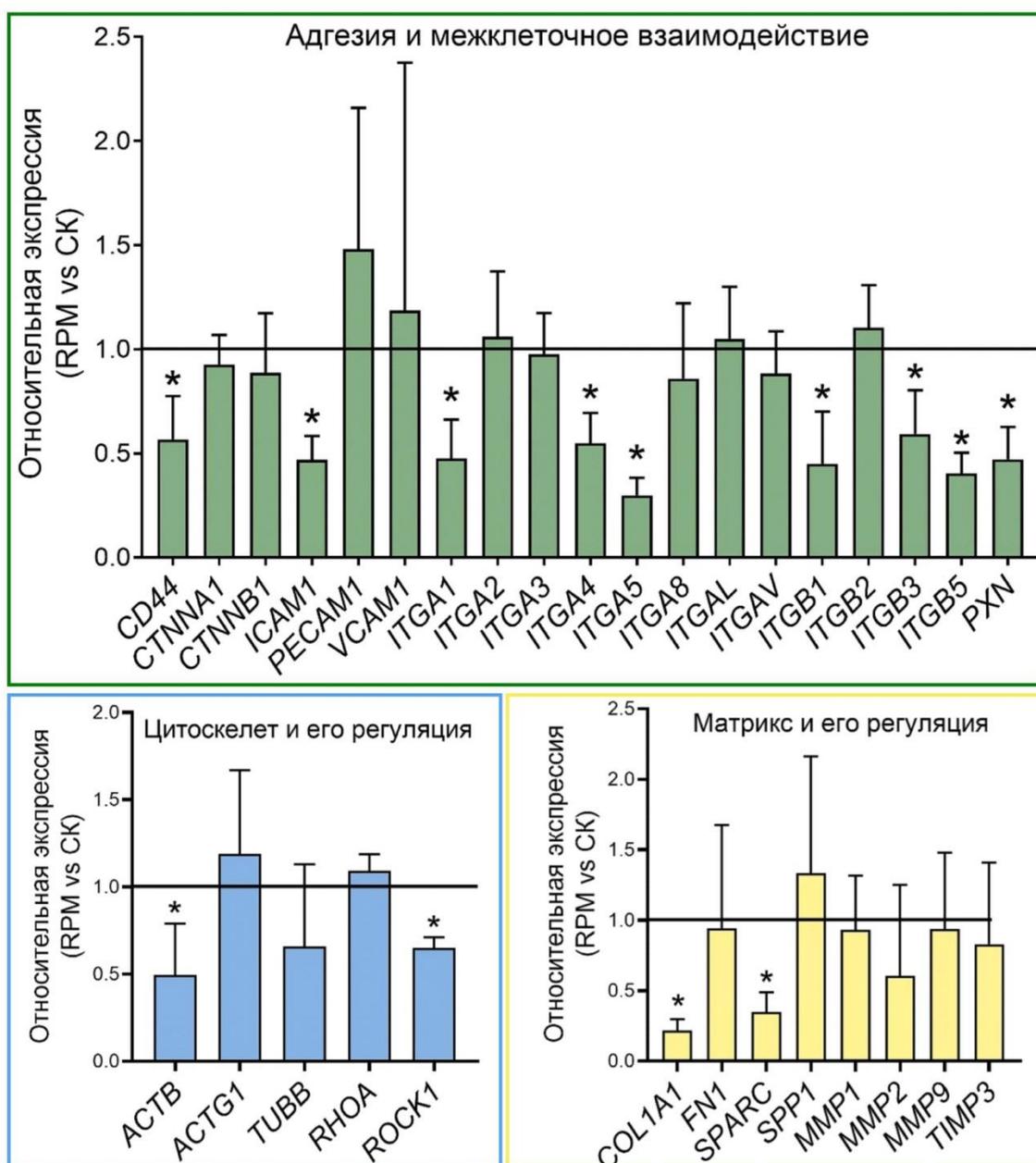


Рис. 4. Относительная экспрессия генов, ассоциированных с межклеточным взаимодействием и адгезией к матриксу после 14-суточной экспозиции МСК, сокультивируемых с ГСПК на RPM. Экспрессия в статическом контроле принята за единицу. \* -  $p < 0,05$  в сравнении с экспрессией в клетках, культивированных в СК,  $n=3$

При оценке транскрипции генов, ассоциированных с межклеточным взаимодействием, адгезией к матриксу, цитоскелетом и его регуляцией, компонентами ВКМ и его регуляторами, после 14-суточного моделирования эффектов микрогравитации выявили снижение относительной экспрессии *ITGA1*, *ITGA4*, *ITGA5*, *ITGB1*, *ITGB3*, *ITGB5*, *CD44*, *ICAM1* в МСК, сокультивируемых с ГСПК (Рис. 4, 5).

Снижение экспрессии генов интегринов, показанное в нашей работе, может быть ассоциировано с ослаблением адгезии МСК к матриксу, а также являться причиной измененной дифференцировки и пролиферации МСК, что ранее было показано при

воздействии микрогравитации (Буравкова и др., 2015, Chen et al., 2016, Zhang et al., 2018, Quynh Chi et al., 2020, Huang et al., 2020) и может отразиться на их взаимодействии с ГСПК.

В МСК, сокультивируемых с ГСПК, при моделировании эффектов микрогравитации, выявлено снижение экспрессии генов *ACTB*, *PXN*, *ROCK1*, а также *COL1A1* и *SPARC* (Рис. 4, 5). Выявленное в нашей работе снижение экспрессии генов актина *ACTB* и эффекторной молекулы *ROCK1*, контролируемой киназой Rho, может опосредовать изменение дифференцировки МСК, что показано в условиях микрогравитации. Кроме того, с учетом взаимосвязи *ACTB* и *ROCK1* с различными сигнальными путями, изменение их экспрессии может привести к широкому спектру изменений жизнедеятельности МСК. *COL1A1* и *SPARC* – гены белков внеклеточного матрикса, продуцируемых остеобластами или МСК при остеогенной дифференцировке (Delany, Hankenson, 2009). Известно, что *COL1A1* является ранним маркером клеток-предшественников остеогенеза (Köllmer et al., 2013). Остеонектин или *SPARC* также более сильно выражен на ранних стадиях остеогенеза (т.е. во время пролиферативного периода и периода отложения матрикса) (Kulterer et al., 2007).

Известна также роль *COL1A1* и *SPARC* в функционировании ГСПК. Показано, что *SPARC* косвенно поддерживает В-лимфопоэз и эритроидные предшественники (Ehninger et al., 2014; Luo et al., 2014). *COL1A1* поддерживает ГСПК в состоянии покоя, адгезирует В-лимфоидные клетки, эритроидные клетки, миелоидные клетки (Choi, Harley, 2017). Таким образом, снижение экспрессии этих молекул может объяснять снижение количества ассоциированных с МСК миелоидных клеток, а также ослабление эритроидного ростка при моделировании эффектов микрогравитации. Следует отметить, что общим для большей части молекул адгезии и межклеточного взаимодействия, цитоскелета и ВКМ, изменения в экспрессии которых выявлены в данной работе, является участие в регуляции дифференцировки МСК. Снижение экспрессии этих молекул в общей сложности может опосредовать известный в литературе феномен замедления остеодифференцировки в условиях микрогравитации. Любопытно, что МСК различной степени остеоконмитирования по-разному регулируют ГСПК (Calvi, Link, 2014). Различные по стадиям дифференцировки остеолинейные субпопуляции поддерживают долговременное восстановление ГСПК, при этом часть субпопуляций в основном поддерживает адгезию и хоуминг ГСПК, а другие продуцируют цитокины, поддерживающие баланс между покоем и активацией ГСПК (Nakamura et al., 2010). Таким образом, эффекты, которые мы обнаружили в МСК при моделировании микрогравитации, связанные с нарушенной дифференцировкой, могли стать причиной изменений, выявленных в ГСПК.

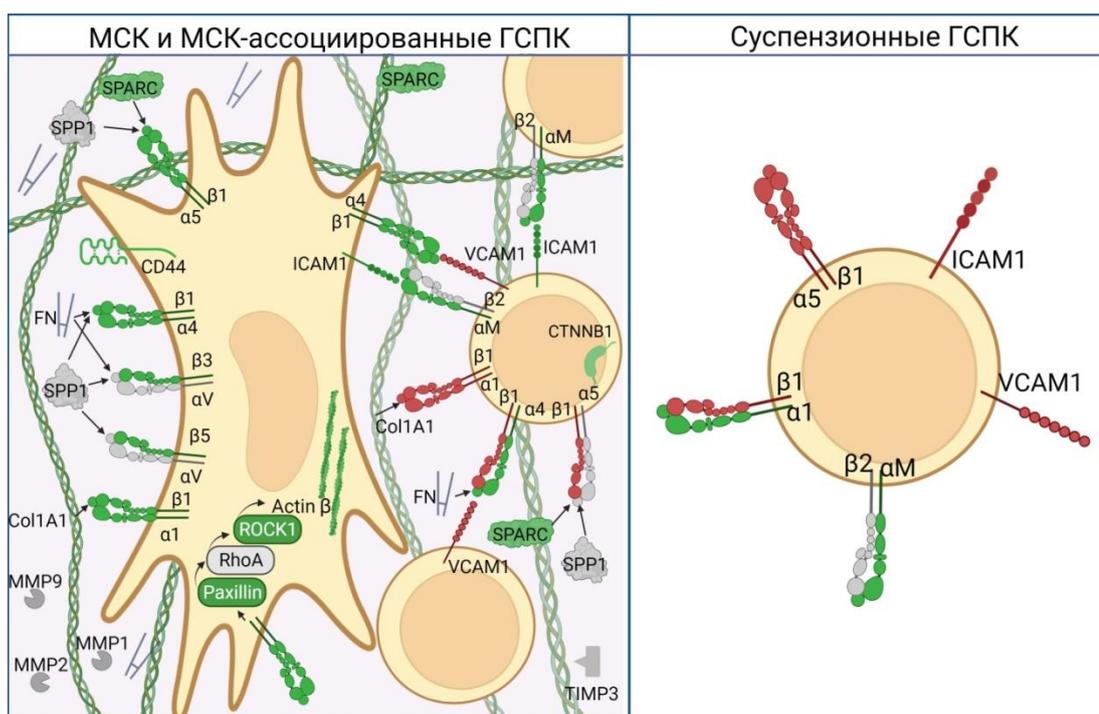


Рис. 5. Молекулы адгезии, межклеточного взаимодействия, компоненты цитоскелета, матрикса и их регуляторы, экспрессия которых была проанализирована при моделировании эффектов микрогравитации в ассоциированных МСК и ГСПК, а также суспензионных ГСПК. Зеленый цвет – снижение экспрессии, красный – увеличение экспрессии, серый – отсутствие изменений экспрессии по сравнению с контролем.

МСК продуцируют целый ряд хемокинов, которые участвуют в регуляции функциональных характеристик ГСПК и необходимы для поддержания гомеостаза ГСПК. Помимо этого, сами ГСПК и зрелые гемопоэтические клетки продуцируют цитокины, регулируя как функции МСК, так и свои собственные в петле обратной связи.

В МСК, сокультивируемых с ГСПК, возросла экспрессия *CSF2* (в 1,5 раза), *MCP-1* (в 1,5 раза), *MCP-3* (в 1,9 раз), *IL-6* (в 1,3 раза) и снижение экспрессии *CSF1* (в 1,5 раза), *MIP-1a* (в 2,5 раза), *KITLG* (в 2,5 раза). В МСК-ассоциированных ГСПК при моделировании эффектов микрогравитации снижалась экспрессия генов *TGFB*, *FLT3L*, *MCP-1*, *MIP-1b*, *RANTES*, *CXCR4*, *CSF2R*. При этом повышалась экспрессия генов *LIF*, *CXCL12*, *CSF1*, *MCP-3*, *CCL11*, *IL-6*, *IL-8* (Рис. 6). В суспензионных ГСПК при моделировании эффектов микрогравитации снижалась экспрессия *TGFB*, *FLT3L*, *RANTES*, *CXCR4* и увеличивалась экспрессия *CXCL12*, *CSF1*, *CXCL1*, *MCP-1*, *MIP-1a*, *MIP-1b*, *MCP3*, *CCL11*, *IL-6*, *IL-8* (Рис. 6). Как в МСК, так и ГСПК преимущественно увеличилась экспрессия генов цитокинов, ингибирующих пролиферацию ГСПК *in vitro*, а также снизилась экспрессия генов цитокинов, стимулирующих их пролиферацию. Это может объяснять снижение количества гемопоэтических предшественников при моделировании эффектов микрогравитации.

Следует также отметить, что при анализе экспрессии генов, ассоциированных с регуляцией клеточного цикла, в обеих популяциях ГСПК было выявлено увеличение экспрессии генов ингибиторов циклин-зависимых киназ *CDKN2A* (в 1,5 раза в МСК-

ассоциированной фракции, в 1,7 раз в суспензионной) и *CDKN1A* (в 1,4 раз в МСК-ассоциированной фракции, в 2 раза в суспензионной фракции), что также может являться причиной сниженного количества ГСПК при моделировании эффектов микрогравитации.

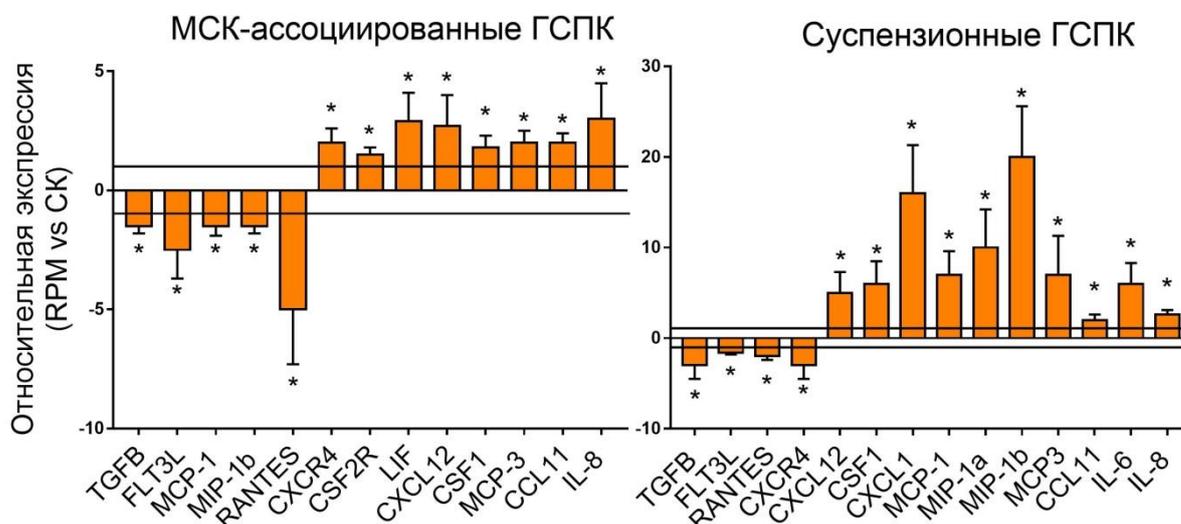


Рис. 6. Относительная экспрессия генов гемопоэз-регулирующих цитокинов после 14-суточной экспозиции МСК-ассоциированных и суспензионных ГСПК на RPM. Экспрессия в статическом контроле принята за единицу. \* -  $p < 0,05$  в сравнении с экспрессией в клетках, культивированных в СК,  $n=3$

В совместной культуре МСК и ГСПК при моделировании эффектов микрогравитации выявили увеличение содержания эотаксина (CCL11), GRO-а (CXCL1) и интерлейкина 4 (IL-4) (Рис. 7). Помимо этого снижалась концентрация хемокина MCP-3 (CCL7). Увеличение количества CCL11 и CXCL1 сопровождалось и изменением экспрессии в ГСПК. CXCL1 является хемоаттрактантом нейтрофилов и играет важную роль в поддержании гомеостаза ГСК/ГСПК (Sinclair et al., 2016). CCL11 играет важную роль в процессах созревания, миграции и активации эозинофилов, а также ингибирует мультипотентные ГСПК *in vitro* (Patel et al., 1997). Уровень как CCL11, так и CXCL1 связан с усилением резорбции кости (Kindstedt et al., 2017; Hu et al., 2020), что также наблюдается в условиях микрогравитации. Увеличение продукции CXCL1 было показано ранее в монокультуре МСК на аналогичных сроках экспозиции в RPM (Живодерников и др., 2022).

Увеличение концентрации IL-4, который, как показано в ряде работ, при прямом воздействии на ГСПК ингибирует образование макрофагальных колоний (Jansen et al., 1989), может также быть причиной снижения активности моноцитарного роста, обнаруженной при моделировании эффектов микрогравитации.

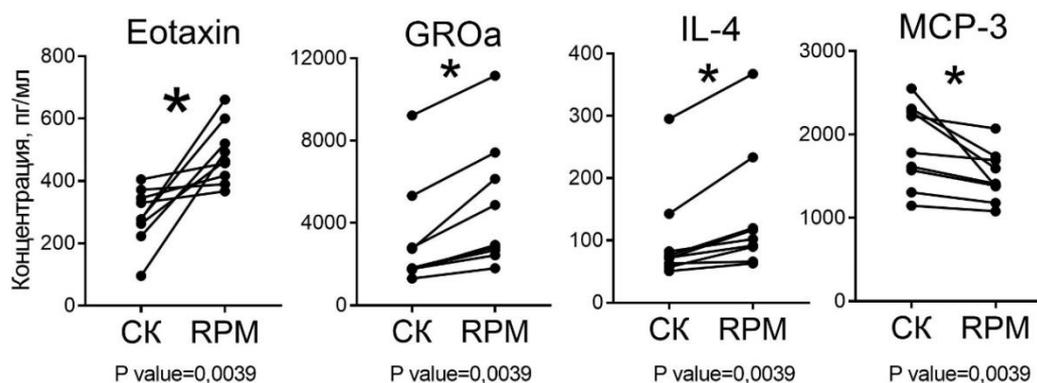


Рис. 7. Цитокины, содержание которых в кондиционированной среде сокультуры МСК и гемопоэтических клеток изменилось при моделировании эффектов микрогравитации. Представлены индивидуальные значения концентрации цитокинов в каждом эксперименте.  $n=9$ , \* -  $p < 0,05$ . СК – статический контроль, RPM – моделирование эффектов микрогравитации на RPM.

### Заключение

Таким образом, 14-суточное моделирование эффектов микрогравитации оказало влияние как на ГСПК, так и на МСК при совместном культивировании. Причем показанные изменения в фенотипе, экспрессии генов, опосредующих механотрансдукцию, экспрессии и продукции гемопоэтических цитокинов в МСК и ГСПК, по всей видимости, приводят к их взаиморегуляции наряду с существующей ауторегуляцией (Рис. 8).

Моделирование эффектов микрогравитации привело к снижению количества МСК-ассоциированных клеток, в том числе количества КООБ, которые являются примитивными гемопоэтическими предшественниками. В суспензионной фракции ГСПК, которая является более коммитированной, выявлено снижение общего числа КОЕ и клеточности образуемых колоний, что указывает на снижение количества и пролиферативного потенциала предшественников. Эти результаты свидетельствуют о том, что снижение числа ГСПК является ключевым ответом гемопоэтического компартмента на снижение гравитационного стимула. На это также указывает однонаправленность изменений в большом числе исследований, проведенных на различных источниках гемопоэтических клеток как в реальной микрогравитации, так и в модельных экспериментах (Davis et al, 1996; Plett et al., 2001, 2004; Zheng et al., 2011; Wang et al., 2019). Для объяснения этого феномена мы рассматривали несколько возможных причин: а) снижение количества ГСПК из-за усиления клеточной гибели; б) ускоренное коммитирование ГСПК, приводящее к снижению числа предшественников; в) снижение пролиферации.

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что наибольший вклад в общий эффект снижения количества гемопоэтических предшественников вносит замедление пролиферации. Об этом свидетельствует увеличение экспрессии генов ингибиторов циклин-зависимых киназ CDKN2A и CDKN1A. Следует также отметить, что

изменение распределения ГСПК различных ростков, выявленное в нашем исследовании, в достаточной мере согласуется с данными литературы, полученными в различных *in vitro* и *in vivo* моделях в условиях реальной или моделированной микрогравитации.

Суммируя изменения в гемопоэтическом компартменте при моделировании эффектов микрогравитации, стоит отметить, что также были получены изменения в экспрессии гемопоэз-регулирующих цитокинов, многие из которых регулируют баланс самообновления/коммитирования ГСПК. Большая часть эффектов может объяснять снижение количества МСК-ассоциированных ГСПК и изменение соотношения популяций различных ростков. Следует также отметить, что ряд цитокинов, молекул адгезии и межклеточного взаимодействия, экспрессия которых изменилась в условиях моделирования эффектов микрогравитации, оказывает влияние и на МСК, с которыми сокультивировались гемопоэтические клетки. Это касается таких процессов в МСК, как пролиферация, дифференцировка, миграция, апоптоз, что ранее описывалось в литературе при снижении гравитационного стимула.

Изменение транскрипционного профиля МСК, связанного с адгезией, межклеточным взаимодействием, цитоскелетом и его регуляцией, внеклеточным матриксом (ВКМ), а также цитокинами, затрагивает множество сигнальных путей, регулирующих пролиферацию, дифференцировку, миграцию и другие клеточные процессы. Стоит отметить, что многие из молекул, экспрессия которых изменилась, играют важную роль в остеодифференцировке МСК, которая претерпевает изменения при микрогравитации. Изменение дифференцировки МСК, в свою очередь, может оказывать влияние на ГСПК, как это ранее было показано в литературе (Calvi, Link, 2014). Известно, что ГСПК могут усиливать остеодифференцировку МСК (Andreeva et al., 2021, Jia et al., 2021). Несмотря на это, учитывая снижение экспрессии многих интегринов, положительно регулирующих остеодифференцировку МСК, сокультивирование с ГСПК, по-видимому, не отменяет этот эффект при экспозиции на RPM. Хотя увеличение экспрессии TGFB гемопоэтическими клетками, возможно, является эффектом противодействия снижению остеодифференцировки МСК.

Таким образом, полученные данные могут быть аргументом в пользу того, что наблюдаемые изменения в системе крови в космических полетах, связаны с функционированием гемопоэтической ниши. Моделирование эффектов микрогравитации вызывает снижение количества гемопоэтических предшественников, а также изменение соотношения гемопоэтических ростков в *in vitro* модели взаимодействия МСК и ГСПК, что, по всей видимости, связано с замедлением их пролиферации и измененной дифференцировкой. В свою очередь, причиной такого эффекта может быть изменение экспрессии генов межклеточного взаимодействия, адгезии, ВКМ, цитоскелета в МСК, а также экспрессии генов взаимодействия и адгезии в ГСПК, важных для регуляции дифференцировки и пролиферации клеток как стромального, так и гемопоэтического компартмента. Изменение экспрессии генов цитокинов, регулирующих процессы пролиферации и дифференцировки, в МСК и ГСПК также может быть причиной

эффектов, выявленных в гемопоэтическом компартменте при моделировании эффектов микрогравитации. Таким образом, полученные результаты открывают новые мишени для раскрытия молекулярно-клеточных механизмов действия микрогравитации на гемопоэтическую нишу, а также для создания мер противодействия негативным эффектам микрогравитации.

### Моделирование эффектов микрогравитации

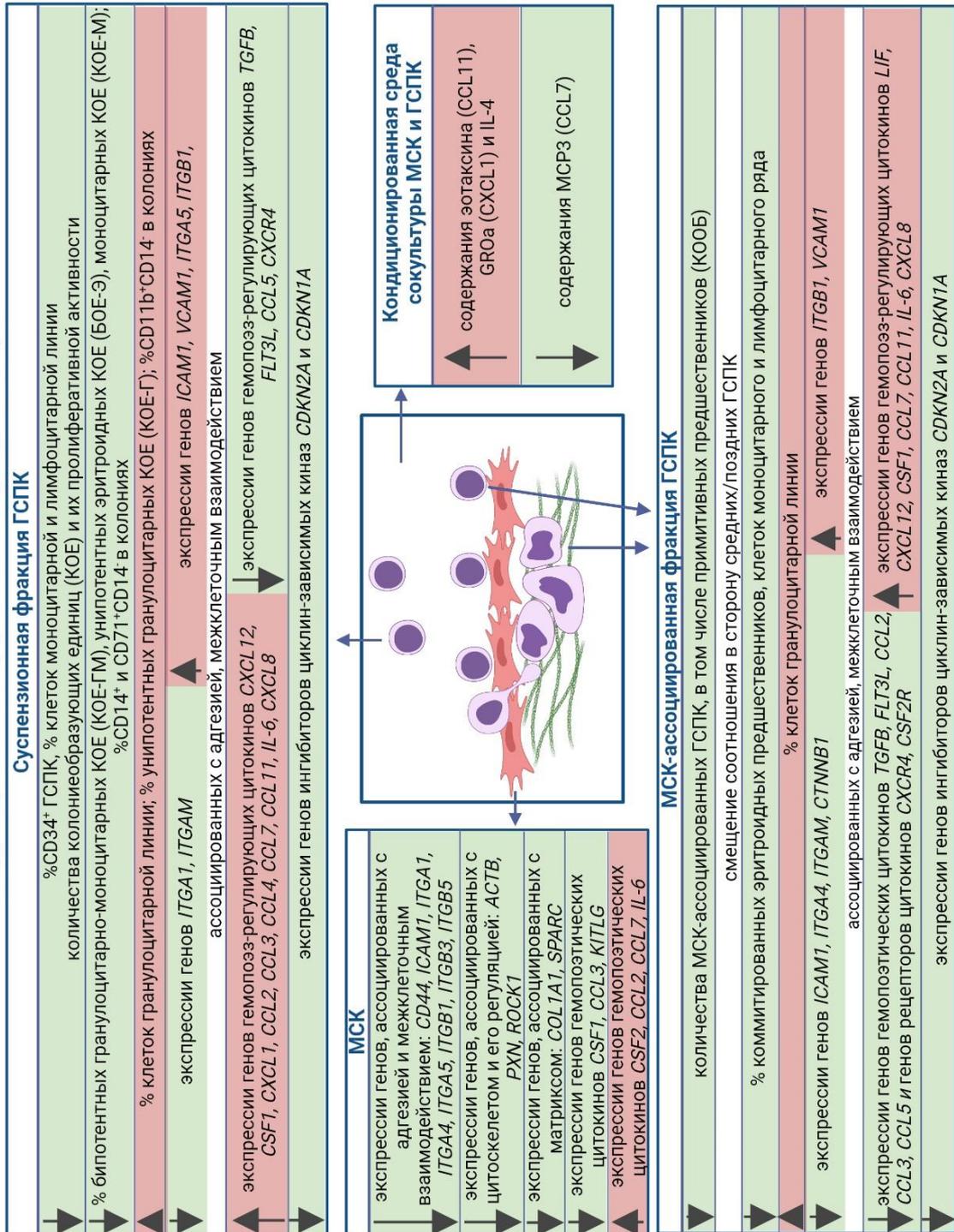


Рис. 8. Влияние 14-суточного моделирования эффектов микрогравитации на взаимодействие МСК и ГСПК. Зеленый цвет – снижение, красный – увеличение по сравнению со СК.

## Выводы

1. В составе гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток (ГСПК) пуповинной крови преобладают средние ГСПК (CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>), предшественники эритроидного ростка, а также миело- и монобласты. Через 72 часа сокультивирования мононуклеаров пуповинной крови и МСК большая часть ГСПК адгезирует к стромальному подслою. Среди гемопоэтических предшественников преобладают ранние ГСПК (CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>), гранулоцитарные и эритроидные предшественники.
2. В статическом контроле и при моделировании эффектов микрогравитации в сокультуре происходит формирование суспензионной и МСК-ассоциированной популяций ГСПК. Количество суспензионных клеток не отличается, при этом снижается количество гемопоэтических предшественников, активность моноцитарного, лимфоцитарного, эритроидного ростков, но активируется гранулоцитарный росток.
3. Моделирование эффектов микрогравитации приводит к снижению количества МСК-ассоциированных гемопоэтических клеток, со смещением в сторону более коммитированных ГСПК, а также снижением доли моноцитарных и лимфоцитарных клеток, коммитированных эритроидных предшественников, и увеличением доли гранулоцитарных клеток.
4. В МСК, сокультивируемых с ГСПК, в условиях 14-суточного моделирования эффектов микрогравитации снижается экспрессия генов, ассоциированных с адгезией, межклеточным взаимодействием, цитоскелетом и внеклеточным матриксом, а также увеличивается экспрессия генов цитокинов, ингибирующих пролиферацию ГСПК (*CCL2*, *CCL7*, *IL-6*), и снижается экспрессия генов цитокинов, стимулирующих пролиферацию ГСПК (*CSF1*, *KITLG*).
5. В ГСПК, ассоциированных с МСК, 14-суточное моделирование эффектов микрогравитации приводит к преимущественному снижению экспрессии генов, ассоциированных с адгезией, межклеточным взаимодействием (*ICAM1*, *ITGA4*, *ITGAM*, *CTNNA1*), однако экспрессия генов *ITGB1*, *VCAM1* увеличивается. В суспензионных ГСПК снижается экспрессия генов *ITGA1*, *ITGAM* и преимущественно увеличивается экспрессия генов, ассоциированных с адгезией, межклеточным взаимодействием (*ICAM1*, *VCAM1*, *ITGA5*, *ITGB1*).
6. В МСК-ассоциированных и суспензионных ГСПК при 14-суточном моделировании эффектов микрогравитации повышается экспрессия генов цитокинов, ингибирующих пролиферацию ГСПК, и снижается экспрессия генов цитокинов, стимулирующих их пролиферацию, а также снижается экспрессия генов ингибиторов циклин-зависимых киназ *CDKN1A* и *CDKN2A*.
7. При моделировании эффектов микрогравитации в кондиционированной среде сокультуры МСК и гемопоэтических клеток изменяется паракринный профиль: увеличивается содержание эотаксина, GRO-а, IL-4 и снижается концентрация MCP-3, негативно регулирующих гемопоэтические предшественники *in vitro*.

## Список работ, опубликованных по материалам диссертации

### Статьи:

1. **Голикова (Тырина) Е. А.**, Андрианова И. В., Буравкова Л. Б. Методические подходы для изучения эффектов моделируемой микрогравитации при сокультивировании гемопоэтических предшественников и мезенхимальных стромальных клеток // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2020. – Т. 54. – №. 2. – С. 38-44.
2. **Тырина Е.А.**, Бобылёва П.И., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. Строма-зависимая экспансия гемопоэтических предшественников при 7-суточном моделировании эффектов микрогравитации // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2021. – Т. 55. – №3. – С. 28-35.
3. Andreeva E.R., Andrianova I.V., Bobyleva P.I., Gornostaeva A.N., Ezdakova M.I., **Golikova (Tyrina) E.A.**, Buravkova L.B. Adipose tissue-derived stromal cells retain immunosuppressive and angiogenic activity after coculture with cord blood hematopoietic precursors // European Journal of Cell Biology. – 2020. – Т. 99. – №. 2-3. – С. 151069.
4. **Tyrina E.A.**, Andreeva E.R., Buravkova L.B. Simulated microgravity affects stroma-dependent ex vivo myelopoiesis // Tissue and Cell. – 2023. – Т. 80. – С. 101987.
5. Ратушный А. Ю., **Тырина Е. А.**, Буравкова Л. Б. Моделирование микрогравитации и сокультивирование с гемопоэтическими клетками разнонаправленно модулируют Wnt-сигналинг в мезенхимальных стромальных клетках // Доклады Российской Академии наук. Науки о жизни. – 2023 – Т.510 – С. 53-57.

### Тезисы докладов научных конференций:

1. **Голикова (Тырина) Е.А.**, Ездакова М.И. Разработка методических подходов к изучению взаимодействия мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических предшественников в условиях моделирования микрогравитации // Материалы XVIII конференции молодых учёных, специалистов и студентов, посвящённой 50-летию высадки человека на Луну. Москва. 16 апреля. – 2019. – С. 16-17.
2. **Голикова (Тырина) Е.А.**, Андрианова И.В., Буравкова Л.Б. Особенности взаимодействия гемопоэтических предшественников и мезенхимальных стромальных клеток при моделировании эффектов микрогравитации // IV национальный конгресс по регенеративной медицине. Москва. 20-23 ноября. Гены и клетки. – 2019. –Т. 14. – С.62.
3. Буравкова Л.Б., Андрианова И.В., **Голикова (Тырина) Е.А.**, Горностаева А.Н. Ex vivo экспансия гемопоэтических предшественников из пуповинной крови: роль клеточных и неклеточных факторов микроокружения // IV национальный конгресс по регенеративной медицине. Москва. 20-23 ноября. Гены и клетки. – 2019. –Т. 14. – С.43.
4. Buravkova L.B., Andrianova I.V., **Golikova (Tyrina) E.A.**, Andreeva E.R. Growth-arrested adipose- tissue stromal cells and “physiological” hypoxia enhance ex vivo expansion of hematopoietic cells // TERMIS EU. Conference Book. – 2019. – P.1143.
5. **Тырина Е.А.**, Бобылёва П.И., Буравкова Л. Б. Характеристика популяции гемопоэтических предшественников после 7-суточного моделирования эффектов микрогравитации// Сборник тезисов XIV академических чтений по космонавтике, посвященных памяти академика С.П. Королёва. Москва. 2 апреля. – 2021. – С.250- 253.
6. **Тырина Е.А.**, Бобылёва П.И. Влияние остеогенного коммитирования на взаимодействие МСК и гемопоэтических предшественников в условиях моделирования эффектов микрогравитации// Материалы XIX конференции молодых учёных,

специалистов и студентов», посвящённой 60-летию первого полета человека в космос. Москва. 26 ноября. – 2021. – С.76-78.

7. Ратушный А.Ю., **Тырина Е.А.** Поддержание гематопоза сенесцентными мезенхимальными стромальными клетками// Материалы XIX конференции молодых учёных, специалистов и студентов», посвящённой 60-летию первого полета человека в космос. Москва. 26 ноября. – 2021. – С. 63-64.

8. **Тырина Е.А.**, Буравкова Л.Б. Влияние 14-суточного моделирования эффектов микрогравитации на взаимодействие мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических предшественников// Сборник тезисов XLVI академических чтений по космонавтике, посвященных памяти академика С. П. Королёва. Москва. 25- 28 января. – 2022. – С.328-332.

9. **Тырина Е.А.**, Бобылёва П.И. Взаимодействие гемопоэтических предшественников пуповинной крови и остеоккомитированных мезенхимальных стромальных клеток при 7-суточном сокультивировании// Сборник тезисов XXXIV международной зимней молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва. 8-11 февраля. – 2022. – С.87.

10. **Тырина Е.А.**, Буравкова Л. Б. Регуляция *ex vivo* гемопоза ранними остеоккомитированными мезенхимальными стромальными клетками в условиях моделирования эффектов микрогравитации // VIII молодёжная школа-конференция по молекулярной биологии и генетическим технологиям Института цитологии РАН. Санкт-Петербург. 11-14 октября. Цитология. – 2022. – Т. 64. – №7. – С.755-756.

11. **Тырина Е.А.**, Буравкова Л.Б. Длительное сокультивирование гемопоэтических клеток пуповинной крови и мезенхимальных стромальных клеток человека в условиях моделирования эффектов микрогравитации // V Национальный конгресс по регенеративной медицине. Москва. 23-25 ноября. Гены и клетки. – 2022. – Т. 17. – №. 3. – С. 234-234.

12. **Тырина Е.А.** Взаимодействие МСК и гемопоэтических клеток в условиях длительного моделирования эффектов микрогравитации // Сборник материалов XX Конференции молодых учёных, специалистов и студентов с международным участием, посвященной 165-летию со дня рождения К.Э.Циолковского. Москва. 17 ноября. – 2022. – С.61-62.

13. **Тырина Е.А.**, Буравкова Л.Б. Сокультивирование МСК и гемопоэтических клеток как *in vitro* модель гемопоэтической ниши для изучения эффектов микрогравитации // Материалы XLVII Академических чтений по космонавтике, посвященных памяти академика С.П. Королева и других выдающихся отечественных ученых – пионеров освоения космического пространства «Королёвские чтения». Москва. 24–27 января. –2023. С.152-154.

14. **Тырина Е.А.** Экспрессия генов гравичувствительных молекул в сокультивируемых мезенхимальных и гемопоэтических предшественниках при моделировании эффектов микрогравитации //Сборник материалов XXI Конференции молодых учёных, специалистов и студентов, посвященной 60-летию Института медико-биологических проблем. Москва. 21 апреля. – 2023. – С.89-90.

#### **Патент:**

Буравкова Л. Б., Андреева Е.Р., Андрианова И.В., Бобылёва П.И., **Голикова (Тырина) Е.А.**, Горностаева А.Н. Способ получения ассоциатов гемопоэтических и стромальных клеток- предшественников, способных подавлять активацию и пролиферацию аллогенных лимфоцитов. Патент на изобретение. 2020. Номер патента: RU 2722669 С1.