

ДОМНИНА

Алиса Павловна

**ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ПОЛУЧЕНИЕ,
ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ
РАЗВИТИЯ ЭНДОМЕТРИЯ КРЫС**

03.03.04. – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт – Петербург

2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении наук

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Научный руководитель:

Никольский Николай Николаевич

д. б. н., академик,

Институт цитологии РАН,

г. Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

Баранов Владислав Сергеевич

д. м. н., член-корреспондент РАН, заведующий

лабораторией пренатальной диагностики врожденных

и наследственных болезней Федерального государственного

бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт

акушерства и гинекологии им.Д.О. Отта» СЗО РАМН

г. Санкт-Петербург

Самойлович Марина Платоновна

д. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории гибридной технологии

Федерального государственного учреждения "Российский научный центр

радиологии и хирургических технологий" Минздравсоцразвития России,

г. Санкт-Петербург

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное

учреждение «Научно-исследовательский

институт онкологии им. Н.Н.Петрова»

Минздрава России

Защита диссертации состоится «27» июня 2014 года в «14» часов на заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

Адрес электронной почты Института: cellbio@incras.ru

Сайт: <http://www.incras.ru>

Факс: 8 (812) 297 – 35 - 41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте

<http://www.incras.ru>

Автореферат разослан « » 2014 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,

Кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В настоящее время в мире проводятся обширные исследования по разработке технологий использования мезенхимных стволовых клеток (МСК) для клеточной терапии различных заболеваний. Клетки со свойствами МСК выделены из различных тканей взрослого организма, включая подкожную и висцеральную жировую ткань, легкие, пульпу зуба, периодонтальную связку, ткань скелетных мышц, хрящей, сухожилий, синовиальную мембрану. Наиболее распространенными источниками для выделения МСК помимо костного мозга являются жировая ткань (Parker and Katz, 2006) и кровь пуповинного канатика (Bieback and Kluter, 2007). Но методы получения клеточного материала из костного мозга и жировой ткани являются болезненными и могут быть опасными для доноров, а кровь пуповинного канатика можно получить лишь раз в жизни. Поэтому возникла необходимость в поиске более доступного источника МСК. В последние годы появилось значительное число публикаций о выделении и использовании стволовых клеток эндометрия и менструальной крови (эМСК). Неинвазивный для донора способ получения, высокая пластичность, активная пролиферация и кариотипическая стабильность сделали данный тип МСК привлекательным объектом исследования и возможного применения в клинике. Роль стволовых клеток в циклической регенерации эндометрия была несомненной уже много лет назад (Pranishnikov, 1978; Padykula et al., 1989; Padykula, 1991). Однако собственно популяция эндометриальных стволовых клеток была впервые изолирована из эндометрия, а затем и из менструальной крови человека, и охарактеризована лишь в 2004 г (Chen et al., 2004; Cho et al., 2004, Gargett, 2006). В течение последних лет биологические свойства эМСК были охарактеризованы более полно, в том числе в отношении пластичности (Schwab et al., 2005; Gargett et al., 2006, 2009; Schwab and Gargett, 2007; Wolff et al., 2007; Morelli et al., 2012).

В литературе описаны положительные терапевтические результаты применения эМСК в экспериментальных исследованиях на животных при таких заболеваниях, как мышечная дистрофия Дюшена, инфаркта миокарда (Hida et al., 2008; Toyoda et al., 2007), инсульте (Borlongan et al., 2010), болезни Паркинсона (Wolff et al., 2011). Было показано, что трансплантированные эМСК тормозят рост глиомы у крыс (Han et al., 2009).

Учитывая эндометриальное происхождение данного типа МСК показалось интересным и важным изучить их влияние на функциональное состояние эндометрия.

Цели и задачи исследования

Цель настоящей работы – выделение и характеристика мезенхимных стволовых клеток из десквамированного эндометрия, содержащегося в менструальной крови человека (эМСК) и изучение влияния трансплантации эМСК человека на развитие децидуальной оболочки у псевдобеременных крыс.

Задачи работы:

1. Выделение линий мезенхимных стволовых клеток из десквамированного эндометрия, содержащегося в менструальной крови человека (эМСК).
2. Характеристика полученных линий эМСК.
 - а) Изучение кинетики роста эМСК
 - б) Иммунофлуоресцентный анализ маркеров эМСК.
 - в) Кариотипический анализ эМСК.
 - г) Изучение пластичности эМСК: остеогенная и адипогенная дифференцировка *in vitro*.
3. Исследование репликативного старения полученных эМСК.
4. Разработка экспериментальной модели трансплантации МСК для оценки их влияния на развитие эндометрия у экспериментальных животных.
5. Изучение влияния трансплантированных эМСК человека на развитие децидуальной ткани у псевдобеременных крыс.
6. Изучение влияния трансплантированных видоспецифических клеток костного мозга (ККМ) крысы на развитие децидуальной ткани у псевдобеременных крыс. (В качестве контроля, для подтверждения стимулирующих свойств эМСК, а не их ксеногенного для крыс статуса.)

Основные положения, выносимые на защиту

1. Полученные линии эМСК полностью соответствуют статусу мультипотентных мезенхимных стромальных стволовых клеток человека, выделяемых из различных тканевых источников.
2. Длительное культивирование эМСК *in vitro* приводит к репликативному старению.
3. Трансплантация эМСК человека в матку псевдобеременным крысам стимулирует развитие децидуальной ткани у крыс.
4. Трансплантация видоспецифических ККМ крысы в матку псевдобеременным крысам стимулирует развитие децидуальной ткани у крыс в той же степени, что и трансплантация эМСК человека.

Научная новизна работы

Были получены и охарактеризованы 3 линии мезенхимных стволовых клеток из десквамированного эндометрия, содержащегося в менструальной крови человека (эМСК). Клетки этих линий обладают всеми свойствами, присущими мезенхимным стволовым клеткам: самообновлением, экспрессией специфических маркеров, мультипотентностью. Простой и неинвазивный для донора способ получения, активная пролиферация и мультипотентность делает эти клетки подходящим субстратом для клеточной терапии. Кроме того, данные клетки могут служить удобной моделью нетрансформированных клеток человека для фундаментальных исследований в клеточной биологии и фармакологии.

Впервые был предложен и апробирован способ оценки влияния трансплантации эМСК на развитие эндометрия экспериментальных животных. Впервые была сделана попытка изучения терапевтических свойств эМСК *in vivo* на модели псевдобеременности у крыс. Было выявлено более интенсивное развитие децидуальной ткани после трансплантации эМСК в матку псевдобеременным крысам. При этом в результате трансплантации не изменяется гистологическая структура ткани. Впервые было обнаружено, что трансплантация эМСК ведет к увеличению размера децидуа за счет более интенсивного развития и пролиферации всех тканевых элементов. Для подтверждения стимулирующих свойств эМСК, а не их ксеногенного для крыс статуса, проводились эксперименты с использованием ККМ крысы в аналогичной модели. Было обнаружено, что трансплантация ККМ крысы оказывает такой же эффект, как и трансплантация эМСК человека. Таким образом, полученные данные открывают дальнейшие перспективы для детального изучения влияния эМСК и других мезенхимных стволовых клеток на функциональное состояние эндометрия.

Теоретическое и практическое значение работы

В данной работе были отработаны методики выделения и культивирования МСК из альтернативного костному мозгу, более доступного тканевого источника – эндометрия, содержащегося в менструальной крови человека. Выделенные эМСК могут стать подходящим клеточным материалом при разработке подходов к лечению различных заболеваний и травм способами, основанными на принципах клеточной терапии. Полученные клетки могут служить объектом таких фундаментальных исследований в биологии, как исследования механизмов пролиферации, дифференцировки и межклеточных взаимодействий. Кроме того, культуры эМСК как культуры нетрансформированных клеток человека могут стать субстратом для фармакологии и

вирусологии. Особенный источник выделения эМСК делает их подходящим модельным объектом для исследования свойств фармакологических препаратов, применяемых в акушерско-гинекологической практике.

Результаты работы могут быть использованы для дальнейшего изучения влияния эМСК и МСК из других тканевых источников на функциональное состояние эндометрия и разработки способов лечения форм бесплодия, связанного с недостаточным развитием эндометрия.

Апробация работы

Материалы работы были представлены на Конгрессе европейского биохимического общества «Механизмы в биологии» (Federation of European Biochemical Societies CONGRESS 2013 “Mechanisms in Biology”) (Санкт-Петербург, 2013), Всероссийском симпозиуме и Школе-конференции для молодых ученых по биологии клетки в культуре (Санкт-Петербург, 2013), Мировом конгрессе по регенеративной медицине (World Conference on Regenerative Medicine 2013) (Германия, Лейпциг 2013), I Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2013). По результатам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 4 статьи, и получен патент.

Личный вклад автора.

Все экспериментальные процедуры и обработка результатов выполнены лично автором. Анализ подготовленных автором проб на проточном цитофлуорометре осуществлял Зенин В.В. Структурный кариотипический анализ проводили совместно с Гринчук Т.М. Помощь в проведении хирургических операций и анализе децидуальной ткани оказывал Михайлов В.М. Во всех совместных работах вклад автора был определяющим. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 130 источников. Диссертация изложена на 98 страницах. Иллюстративный материал содержит 21 рисунок и 3 таблицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение и культивирование ЭМСК. Менструальная кровь, содержащая фрагменты эндометрия, была получена от 3-х женщин 30-40 лет, проходивших подготовку к ЭКО. Забор менструальной крови проводили на 2-е сутки менструального цикла. Полученный образец переносили в фосфатно-солевой буфер PBS (Sigma, США) с добавлением цитрата натрия и 10 % смеси антибиотика и антимикотика (смесь пенициллина, стрептомицина и амфотерицина) (Sigma, США) и доставляли в лабораторию. Центрифугированный осадок, содержащий фрагменты эндометрия переносили в 6-сантиметровые чашки Петри (Corning, США) и культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10 % бычьей эмбриональной сыворотки (FBS; HyClone, США), 1 % смеси антибиотика и антимикотика, 1 % глутамакса в течение 3–7 сут. За это время среду меняли несколько раз. Полученную популяцию адгезивных клеток пересевали с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и EDTA (Invitrogen, США). Плотность при пересеве составляла 14–15 тыс. кл/см².

Иммуноцитохимия. Для иммуофлуоресцентного анализа поверхностного антигена SSEA-4 живые клетки инкубировали с мышиными моноклональными антителами против SSEA-4 (Chemicon) в разведении 1 : 50 в течение 30–40 мин. Затем клетки фиксировали 15 мин 4%-ным раствором формальдегида (Sigma, США) на PBS. Несвязавшиеся антитела отмывали раствором PBS с добавлением 0.1%-ного Tween 20 и блокировали от неспецифического связывания 1%-ным раствором BSA (Sigma, США). Флуоресцентное окрашивание антигенов Oct-4, нестина и бета-III-тубулина проводили согласно стандартному протоколу. Все клетки фиксировали 4%-ным раствором формалина, пермеабелизовывали 0.2–0.5 %-ным раствором Тритона X-100 (Merk, США). Для блокирования использовали 1%-ный раствор BSA на PBS в течение 30 мин. Использовали мышиные моноклональные антитела против Oct-4 (1 : 50) (Santa-Cruz, США) и бета-III-тубулина в разведении 1 : 1000 (Chemicon, США), а также кроличьи поликлональные антитела против нестина (1 : 100) (Chemicon, США) и бета-III-тубулина (1 : 100) (Sigma, США). В качестве вторых антител использовали козы антимышинные и антикроличьи антиглобулины от компании Jackson ImmunoResearch (США), Dylight 488 (1 : 400) или CY3 (1 : 300) (Chemicon, США). Для визуализации нестина использовали антитела, конъюгированные с CY2 (1 : 300). Ядра подкрашивали раствором DAPI (Merk, США) в концентрации 1 мкг/мл. Микроскопический анализ проводили с помощью микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия) и камеры Lieca DFC 420C (Германия).

Адипогенная дифференцировка. Клетки (2×10^4 кл/см²) высевали в чашки Петри, покрытые 0.1%-ным желатином (Sigma, США). После образования субмонослоя (80 % конфлюентности) в ростовую среду добавляли следующие факторы: 1 мМ дексаметазона (Sigma, США), 0.5 мМ изобутилметилксантина (IBMX; Sigma, США), 10 мкг/мл рекомбинантного инсулина человека (Sigma, США) и 100 мМ индометацина. Клетки культивировали в этой среде в течение 5 сут со сменой половины среды каждые 2-е сутки. Следующим этапом был перевод клеток на 1–2 сут в среду, поддерживающую их жизнеспособность, а именно: DMEM/F12, содержащей 10 % FBS, 1 % глутамакса, 1 % смеси пенициллина и стрептомицина и 10 мкг/мл инсулина. Таким образом, попеременно меняя среды культивирования, производили дифференцировку клеток в течение 3–5 нед, а затем фиксировали 10%-ным формальдегидом в течение 1 ч. Жировые капли окрашивали красителем Oil Red (Sigma, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Контрольные клетки культивировали в ростовой среде без добавления стимулирующих факторов.

Остеогенная дифференцировка. Клетки (2×10^4 кл/см²) высевали в чашки Петри, покрытые 0.1%-ным желатином. После образования монослоя (100 % конфлюентности) в ростовую среду добавляли следующие дифференцировочные факторы: 100 нМ дексаметазона, 10 мМ бета-глицерофосфата, 0.2 мМ аскорбин-2-фосфата. Клетки дифференцировали 3–5 нед со сменой половины объема среды каждые 2–3 сут. Затем клетки фиксировали 70%-ным ледяным этанолом 1 ч и окрашивали ализариновым красным (pH 4.1) (Sigma, США) в течение 30 мин. Контрольные клетки культивировали в ростовой среде без добавления стимулирующих факторов.

Изучение кинетики роста. Ростовые характеристики ЭМСК определяли методом построения графиков роста. Для этого культуру ЭМСК сеяли в чаши Петри (3.5 см) в количестве 1×10^5 клеток на чашку. Ежедневно в течение 5 сут выполняли подсчет клеток с помощью камеры Горяева. Для каждой группы измерений использовали по 2 чашки, подсчет производили трижды и вычисляли среднее значение. Время удвоения популяции рассчитывали по формуле:

$$td = \frac{2 \cdot \Delta t \cdot x_0}{x},$$

где td - время удвоения популяции, x_0 - количество клеток в начале интервала времени, x - количество клеток в конце интервала времени, Δt - интервал времени. По полученным данным строили график роста.

Для определения эффективности клонирования клетки сеяли с плотностью 5 и 10 кл/см² в 6-сантиметровые чашки Петри. Посеянные ЭМСК культивировали в течении 14

сут, затем производили подсчет колоний. Колонией считали группу более 50 клеток. Эффективность клонирования (%) определяли по соотношению числа клонов к числу посеянных клеток. Для визуализации клонов использовали краситель Гимза (BDH, Англия).

Анализ активности SA- β -галактозидазы (SA- β -gal). Проявление активности SA- β -галактозидазы является широко распространенным маркером клеточного старения. Этот фермент является лизосомной гидролазой и активен в норме при pH 4.0. Идентификация стареющих клеток основана на том, что в них этот фермент проявляет свою активность при pH 6.0. Определение активности SA- β -галактозидазы проводили с помощью Senescence SA- β -galactosidase staining kit (Cell Signaling, США) Для этого клетки высевали на 3.5-сантиметровые чашки Петри. На 2--3 сут культивирования ростовую среду удаляли, культуру промывали раствором PBS. Далее клетки фиксировали смесью формальдегида и глутаральдегида при комнатной температуре в течение 10--15 мин. После фиксации культуру тщательно промывали раствором PBS. Затем добавляли окрашивающий раствор и инкубировали при 37 °C без CO₂ в течение 8 ч. При окрашивании величину pH поддерживали на уровне 6.0. Результаты оценивали с помощью светового микроскопа. Клетки, вступившие в стадию старения, обнаруживали по проявлению активности SA- β -галактозидазы, что приводило к ярко-синему окрашиванию цитоплазмы.

Кариотипический анализ. Препараты метафазных хромосом получали по схеме: накапливали клетки в стадии метафазы с использованием митостатика, обрабатывали их гипотоническим раствором, фиксировали и раскапывали суспензию на предметные стекла. В качестве митостатика использовали 0.05 мкг демиколцина (Sigma, США) на 1 мл среды. ЭМСК снимали 0.05%-ным раствором трипсина и EDTA. Гипотоническую обработку проводили 0.56%-ным раствором KCl. Клетки фиксировали стандартным способом в трех сменах свежеприготовленной смеси метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1). Фиксированный материал раскапывали на влажные охлажденные предметные стекла и высушивали при 37 °C. Хромосомы окрашивали на G-диски красителем Гимза в фосфатном буфере (pH 6.4) после предварительной обработки 0.25%-ным раствором трипсина по модифицированному методу Сибрайта (Seabright, 1977). Метафазные пластинки анализировали с помощью светового микроскопа (Carl Zeiss, Германия) с использованием иммерсионного объектива 100 $\times$. Идентифицировали хромосомы в соответствии со стандартной номенклатурой (Yunis, 1980; Мамаева, 2002).

Проточная цитофотометрия. Иммунофенотипический анализ поверхностных CD-маркеров у полученных ЭМСК проводили с использованием проточного цитофлуометра Epics XL (Beckman Coulter, США). Суспензию единичных клеток получали при помощи

0.05%-ного трипсина и EDTA. Клетки (1 млн/мл) ресуспензировали в растворе PBS, содержащем 5 % эмбриональной коровьей сыворотки. Для анализа использовали антитела, конъюгированные с ФИТЦ или фикоэритрином: CD13, CD29, CD34, CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-DR.

Получение моноклеаров костного мозга крысы. В качестве стволовых ККМ использовали моноклеарную фракцию ККМ, выделенную из трубчатых костей конечностей крыс при помощи промывания полости костей раствором PBS. Для получения моноклеарной фракции клеточную суспензию фракционировали в 63%-ном растворе Перколла, центрифугируя при 1500 g в течение 15 мин. Фракцию на границе раздела сред собирали и отмывали от Перколла в растворе PBS. Клетки считали в камере Горяева.

Подготовка клеток к трансплантации. Культивирование клеток производили, как описано выше. На 3 -4 пассаже приготавливали суспензию единичных клеток в растворе PBS и производили подсчет клеток в камере Горяева. Все манипуляции, во избежание инфицирования животного, проводили с соблюдением стерильности.

В отдельных экспериментах по трансплантации эМСК проводили мониторинг клеток после введения их лабораторным животным. Для этого культуру эМСК окрашивали прижизненными красителями. Hoechst 33342 и РКН 67, которые флуоресцируют на разных длинах волн, Окраску проводили следуя инструкциям производителя. Чтобы проконтролировать качество окрашивания, часть суспензии помещали в чашки Петри с ростовой средой и культивировали. Результат анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Подготовка животных и проведение операции. Были использованы 30 половозрелых самок белых беспородных крыс массой 200--220 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария с постоянным доступом к воде и корму. Индукцию псевдобеременности осуществляли в фазе эструс. Отбор животных в стадии эструс выполняли методом микроскопии влагалищных мазков. Для индукции псевдобеременности проводили раздражение влагалища крысы электрическим током частотой 1 Гц, напряжением 10 мВ в течение 40 секунд. После проведенных манипуляций животному предоставляли покой. На 5-е сут под эфирным наркозом животное фиксировали на операционном столе в дорсальном положении. Поле операции, от последних ребер до крыльев подвздошных костей, тщательно выбривали и дезинфицировали. Разрезы кожи и мышц брюшной стенки длиной 2 см производили с двух сторон, отступив от позвоночника по 1,5 см. Через разрезы извлекали правый и левый рога матки. В стенку одного рога матки трансплантировали суспензию стволовых

клеток эндометрия (ЭМСК) человека (300 тыс. клеток в 10 мкл PBS). Контрольным рогом служил другой рог матки, в который таким же образом вводили раствор PBS. После этого рану ушивали послойно и животному предоставляли покой. Через 6 сут крысу выводили из опыта передозировкой эфирного наркоза и для морфологического исследования извлекали оба рога матки.

Подготовка гистологических срезов и морфометрический анализ. Рога матки извлекали, удаляли яичник, широкую маточную связку и взвешивали. Затем производили взвешивание только децидуальной ткани. Для этого рога матки разрезали по ходу внутриматочного канала и извлекали децидуальную оболочку.

Гистологические срезы сформировавшихся децидуа толщиной 15 мкм готовили на криостате так, чтобы плоскость среза была перпендикулярна или параллельна длинной оси рога матки. При этом децидуа ориентировали так, чтобы срез проходил параллельно мезометрально-антимезометральной оси матки. Срезы фиксировали смесью этанола и метанолом при -20°C в течение 2 мин и окрашивали гематоксилином и эозином. При микроскопическом изучении оценивали целостность децидуа и отсутствие очагов воспаления или некроза, а также степень дифференцировки децидуа в мезометральном–антимезометральном направлении.

Морфометрический анализ проводили путем микроскопирования срезов, используя объектив 10×. При помощи окулярной линейки измеряли диаметр среза в мезометральном–антимезометральном направлении от мышечной до мышечной оболочки в единицах окулярной линейки. Цену деления линейки определяли при помощи объект-микрометра. На этой же линии измерения определяли длину антимезометральной части децидуа, которая образована большими децидуальными клетками (БДК), и вычисляли долю длины этой части децидуа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Было получено 3 клеточные линии из менструальной крови (эМСК), которые были охарактеризованы. Исходным материалом для линий явилась менструальная кровь 3-х женщин 24 - 38 лет, проходивших процедуру ЭКО. От каждого донора было отобрано по одному образцу менструальной крови из которого было выделено по одной линии эМСК. Исследованные линии эМСК морфологически, по экспрессии маркеров, пролиферативной активности и дифференцировочному потенциалу были схожи.

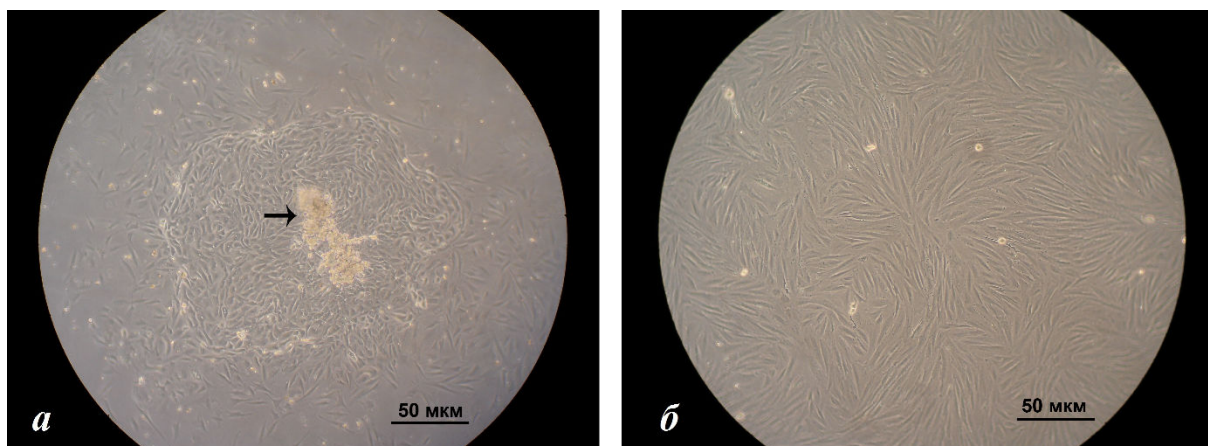


Рисунок 1. Выделение эМСК. *а – выделение эМСК из фрагмента эндометрия, стрелкой указан кусочек эндометриальной ткани вокруг которого эМСК образуют колонию б – монослой, характеризующий морфологию эМСК в процессе культивирования (пассаж 3). Фазовый контраст. Об. 10 х.*

Одним из признаков мезенхимных стволовых клеток является их адгезивность к пластику. При переносе образца менструальной крови в культуральный сосуд в ростовую среду, отдельные клетки или их скопления прикрепляются к поверхности культурального сосуда и начинают пролиферировать. На Рисунке 1, а, стрелкой указан участок эндометриальной ткани, вокруг которого образуется колония эМСК. Считается, что источником эМСК являются кусочки базального слоя эндометрия, который отслаивается в процессе менструального цикла. Образцы культур менструальной крови, в которых наблюдали наибольшее количество адгезивных клеток, отбирали для дальнейшего культивирования и получения линий.

Полученные клетки обладают фибробластоподобной морфологией. Они активно пролиферируют *in vitro* и образуют монослой. На Рисунке 1, б представлена культура эМСК после 3–7 сут культивирования. Видны круглые митотические клетки и фибробластоподобные эМСК, образующие характерные круговые завихрения.

На ранних пассажах (пассаж 1-3) заметно, что выделенные эМСК – это гетерогенная популяция клеток, состоящая из фибробластоподобных и эпителиальных клеток, но при

дальнейшем культивировании селективным преимуществом обладают фибробластоподобные (стромальные) клетки.

На Рисунке 2 представлено два типа клеток в культуре эМСК пассажа 1. Слева хорошо видны эМСК с фибробластоподобной морфологией. На их фоне, справа, выделяются более мелкие, округлые клетки (указаны стрелкой). Это популяция эпителиальных клеток, сохраняющаяся при культивировании эМСК в небольшом количестве (Gargett, 2004, 2007).

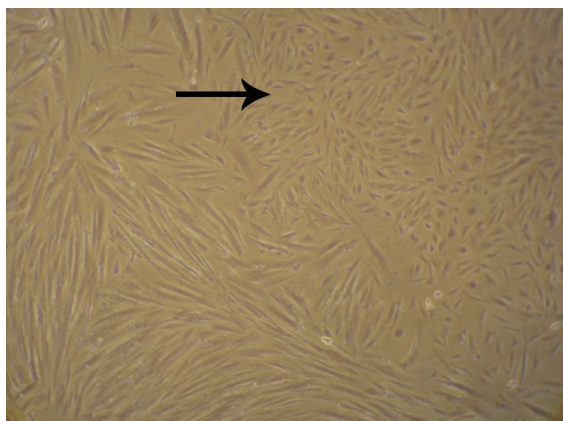


Рисунок. 2. эМСК человека в культуре, пассаж 1

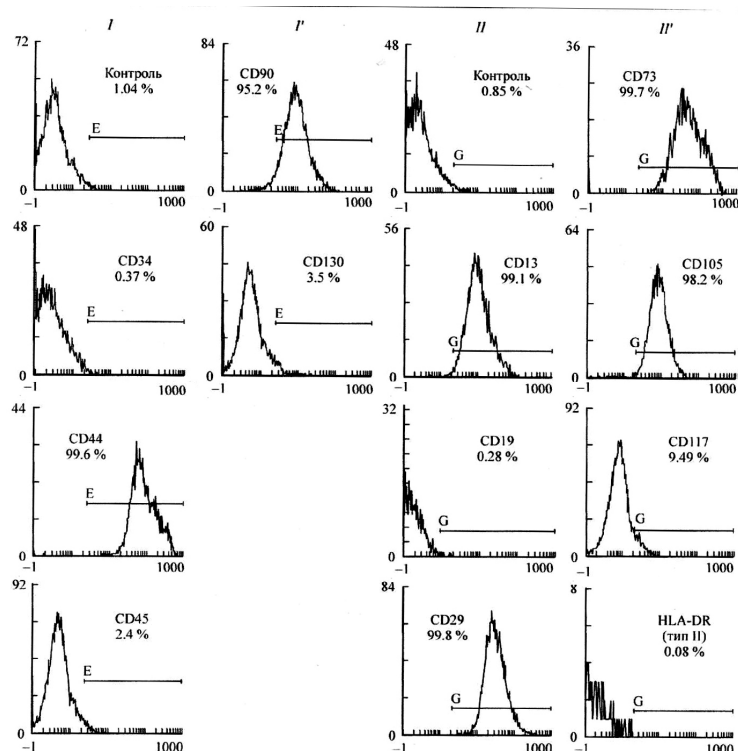
Стрелкой указаны эпителиоподобные клетки.

Об. 40×

Экспрессия определенных маркеров является обязательным свойством МСК, выделяемых из любых тканевых источников. Гистограммы Рисунка 3 иллюстрирует данные проточной цитофлуометрии. Можно обратить внимание, что у полученных эМСК наблюдается высокий уровень экспрессии основных поверхностных антигенов МСК. Процентное соотношение клеток в популяции, экспрессирующих CD90 составляет 95.2 %, CD105 – 98,2%, CD73- 99,7%, CD44 – 99.6%. Количество клеток, имеющих гемопоэтические маркеры CD 34 и CD45, CD19, CD130 и HLA-DR (класса II) составляет менее 4 %. Все это соответствует как базовым, так и дополнительным критериям Международного общества клеточной терапии для фенотипирования МСК человека по экспрессии поверхностных маркеров (Husein, Thiemermann, 2010).

Иммунофлуоресцентный анализ полученных линий эМСК показал частичную (более 50 %) экспрессию маркера плюрипотентности SSEA-4 (Stage-specific embryonic antigen 4), 100%-я экспрессия которого характерна для эмбриональных стволовых клеток человека. Некоторые авторы указывают, что эМСК экспрессируют маркеры плюрипотентности (Oct-4, Nanog). Однако, у выделенных эМСК экспрессия маркера плюрипотентности Oct-4 не была выявлена ни иммунофлюоресценцией, ни ПЦР.

Рисунок 3. Уровень экспрессии поверхностных маркеров эмСК.



*Проточная цитофлуориметрия.
Ряды I, I' – клетки окрашены
ФИТЦ, ряды II, II' – клетки
окрашены фикоэритрином.*

На Рисунке 4 представлены результаты иммунофлуоресцентного анализа полученных линий эмСК на экспрессию маркера плюрипотентности SSEA-4. Данный маркер сохраняется как на ранних (3 пассаж), так и на поздних (15 пассаж) пассажах. Положительная экспрессия определяется на мембране эмСК, в местах фокальных контактов (зеленая флуоресценция). Ядра (синего цвета) окрашены DAPI. Экспрессия поверхностного антигена SSEA-4, обычно определяющая плюрипотентный статус эмбриональных стволовых клеток, является характерной не только для эмСК (Patel et al., 2008), но и для МСК костного мозга (Gang et al., 2007).

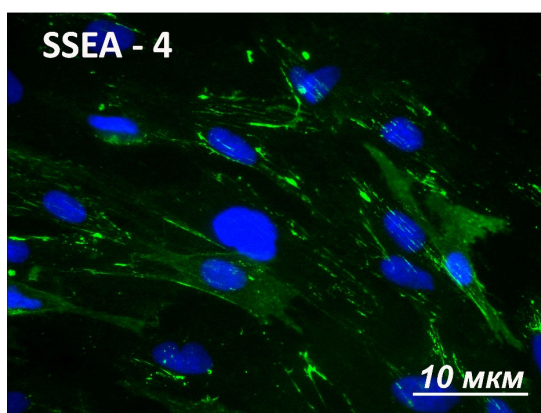


Рис. 4. Экспрессия SSEA-4 в эмСК.

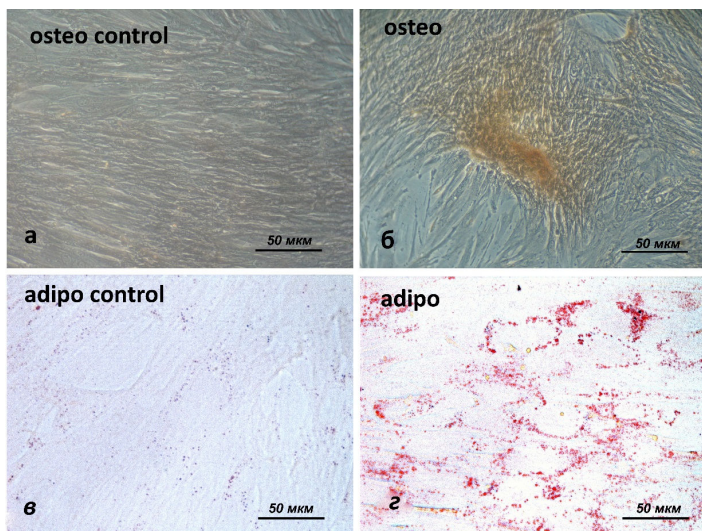
Пассаж 3. Ядра окрашены DAPI.

Обязательным свойством стволовых клеток является их мультипотентность. Согласно критериям Международного общества клеточной терапии, мультипотентность

любых МСК человека определяется их способностью под воздействием определенных стимулов дифференцироваться *in vitro* в другие типы клеток мезодермы.

На Рисунке 5 показана направленная дифференцировка эМСК в адипоциты (Рисунок 5, а, б) и остеобласты (Рисунок 5, в, г). Обе культуры обладают специфическими гистологическими характеристиками. Так, для адипоцитов характерно накопление жировых вакуолей, а для остеобластов – наличие кальциевых отложений. Окрашенные Oil Red жирные капли располагаются в перинуклеарном пространстве цитоплазмы полученных адипоцитов (Рисунок 5, б). Это гистологически отличает адипоциты, дифференцированные из эМСК менструальной крови, от адипоцитов, полученных из МСК жировой ткани и костного мозга, где жировые вакуоли распределены по цитоплазме равномерно (Musina et al., 2006). Эффективность адипогенной и остеогенной дифференцировки составляли в наших экспериментах 70–80 % и 30 % соответственно.

Рисунок 5. Направленная дифференцировка эМСК в другие клетки мезодермы.



а – контрольные недифференцированные клетки;

б – остеобласты, отложения кальция окрашен красителем ализариновым красным,

в – контрольные недифференцированные клетки;

г – адипоциты, жировые вакуоли окрашены красителем Oil Red.

Об. 40× (а–б) и 20× (в–г)

Полученные эМСК экспрессируют нестин (Рисунок 6, а) и бета-III-тубулин, (Рисунок 6, б), что свидетельствует об их предрасположенности к дифференцировке в нейрональные клетки. Литературные данные о присутствии нестина в недифференцированных мезенхимных стволовых клетках противоречивы. Одни авторы не находят этого белка в таких клетках (Shakhbazov et al., 2009), другие авторы предполагают, что экспрессия нестина характерна для мультипотентных прогениторных клеток (Wiese et al., 2004). Данные о присутствии бета-3-тубулина в недифференцированных мезенхимных стволовых клетках отсутствуют.

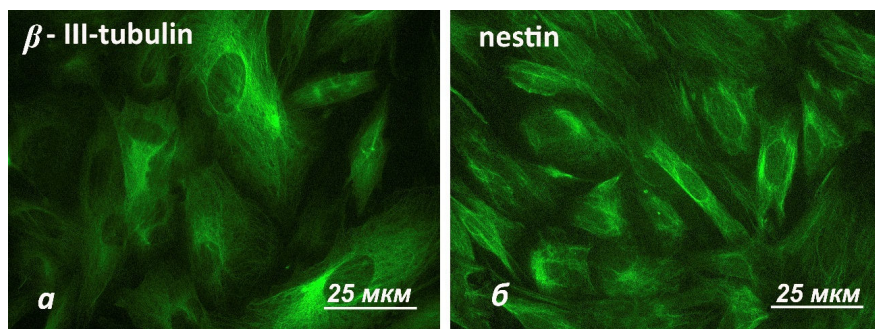


Рис. 6. Экспрессия фенотипических маркеров ЭМСК.

а – бета-III- тубулин;

б – нестин

Кариотипирование клеток линий ЭМСК с применением дифференциальной окраски хромосом на G-диски на ранних этапах культивирования (пассажи 3, 6) и более поздних (пассажи 15, 22) показало, что большинство проанализированных клеток имели структуру кариотипа, типичную для клеток человека в норме. На этом фоне с низкой частотой встречались клетки с отклонениями как в числе хромосом, так и в структуре кариотипа (появлялись анеуплоидные, околотетраплоидные клеточные варианты). Выявленные в пределах каждой проанализированной клеточной популяции кариотипические изменения не были закономерными, не получали пролиферативного преимущества в процессе культивирования клеток и не препятствовали развитию репликативного старения.

В литературе также имеются сообщения о том, что в процессе длительного культивирования МСК из костного мозга и жировой ткани иногда наблюдаются численные хромосомные изменения (анеуплоидия) (Buyanovskaya et al., 2008; Tarte et al., 2010). Ни в одном случае наблюдавшиеся хромосомные нарушения не приводили к трансформации МСК.

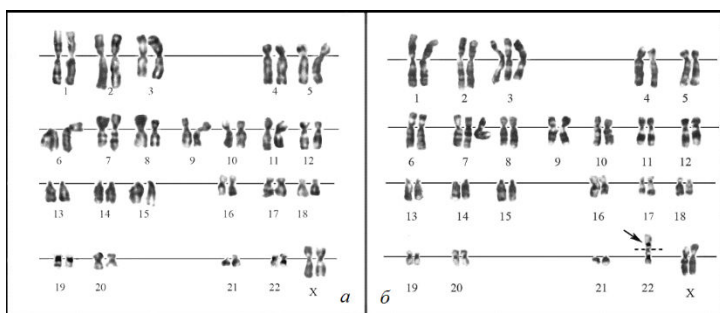


Рис.7. Кариотип ЭМСК

а - кариотип клетки ЭМСК с нормальным набором хромосом, $2n = 46, XX$;

б - кариотип ЭМСК с трисомией хромосом 3 и 7 и эктопической конъюгацией гомологов хромосомы 22. Стрелкой указана изохромосома 22.

Пролиферативные характеристики выделенных ЭМСК оценивались по времени удвоения популяции, эффективности клонирования и по графику роста. В Таблице 1 приведены данные по характеристике времени удвоения популяции и эффективности клонирования клеток полученных линий. Видно, что время удвоения популяции в разных линиях варьировало в близких пределах от 26.7 до 27.4 ч, т.е. популяция удваивалась примерно через 1 сут культивирования. Эти данные свидетельствуют об активном делении клеток. Для сравнения, время удвоения клеток костного мозга даже на ранних пассажах составляет около 60 ч (Røsland et al., 2009).

Таблица 2. Время удвоения популяции и эффективность клонирования эмСК

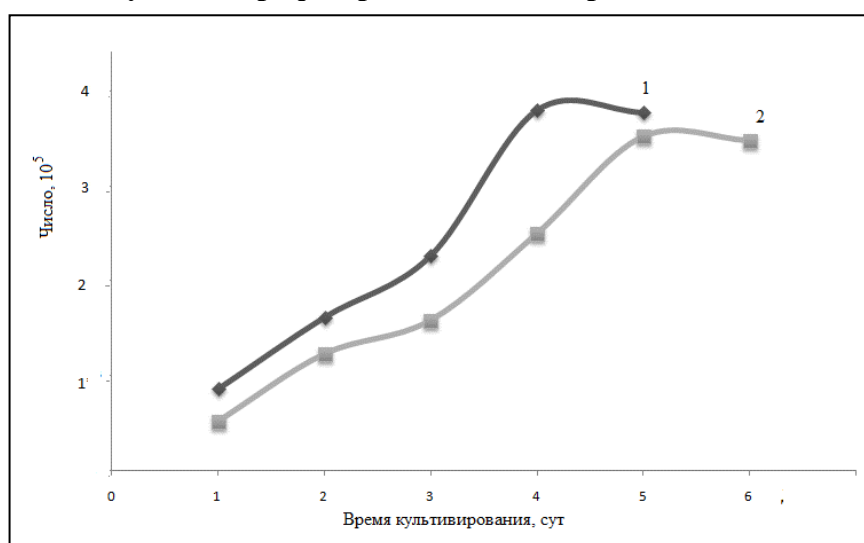
Линия эмСК	Время удвоения, часы	Эффективность клонирования, %
1	27.4	66
2	27.2	62
3	26.7	60

В процессе культивирования эмСК от момента перевода их *in vitro* до старения, проходят более 45 удвоений популяции. Согласно литературным данным число удвоений для эмСК колеблется от 25–30 (Hida et al., 2008) до 68 в отдельных случаях (Meng et al., 2007).

Высокая эффективность клонирования эмСК (около 60 %) также свидетельствует о высоком пролиферативном потенциале данных клеток. Однако по мере культивирования пролиферативная активность клеток постепенно снижается.

Анализ графиков роста эмСК на разных пассажах показал, что на 13-м пассаже клетки достигают стационарной фазы клеточного роста (остановки деления) позднее, чем на 5-м пассаже. Количество клеток на стадии плато (стационарной фазы) в культурах более поздних пассажей также уменьшается (Рисунок 9).

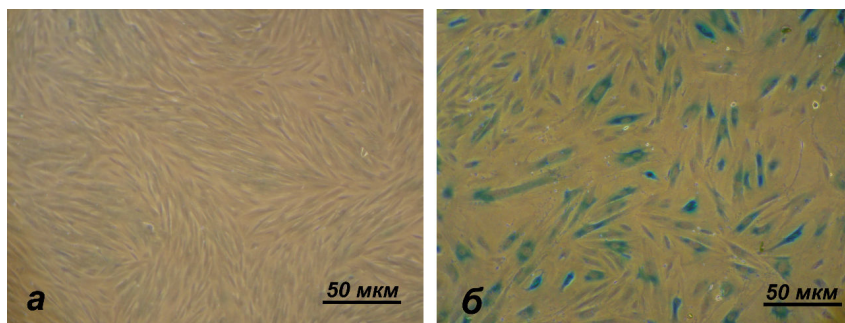
Рисунок 9. График роста эмСК на разных пассажах.



Кривая I - пассаж 5, кривая II - пассаж 13.

По мере культивирования морфология клеток изменяется. Исходные клетки имеют фибробластоподобную форму и образуют после пересева и культивирования монослой. На поздних пассажах (пассаж 26 - 30) клетки увеличиваются в размере, уплотняются и не образуют плотного монослоя. Эти признаки характерны для клеточного старения. Для идентификации клеточного старения широко используется окраска на ассоциированную со старением SA-β-галактозидазы. По мере культивирования число SA-β-галактозидаза - позитивных клеток увеличивается (Рисунок 10) и, в конце концов, достигает практически 100 %. В общей сложности все полученные нами линии прошли около 40—45 удвоений

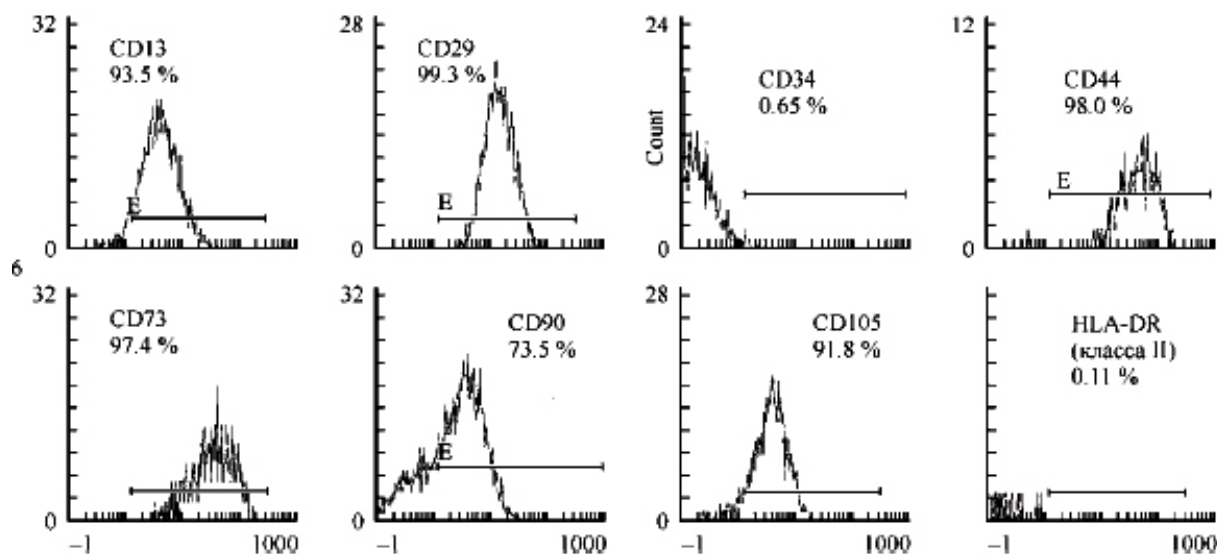
клеточной популяции, что составляет 30-32 пассажа, после чего клетки необратимо утратили способность делиться, и культура постепенно погибла.



**Рисунок 10. Окраска
ЭМСК на активность β -
галактозидазы**
а- 8-й пассаж;
б- 26-й пассаж.

Установлено, что несмотря на то, что пролиферативная активность ЭМСК снижается по мере культивирования, клетки сохраняли экспрессию характерных для ЭМСК поверхностных маркеров (Рисунок 11). Профиль экспрессии маркеров не менялся даже на очень поздних пассажах (26 пассаж). Они по-прежнему были позитивны по маркерам МСК CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и негативны по гематопозитическим маркерам CD34 и HLA-DR (класс II).

Рисунок 11. Экспрессия маркеров ЭМСК на 26 пассаже.



Нами было изучено влияние локальной трансплантации в стенку матки псевдобеременных крыс ЭМСК человека на рост и дифференцировку децидуальной ткани. В стенку одного рога матки трансплантировали суспензию ЭМСК человека (300 тыс. клеток в 10 мкл PBS). Контрольным рогом служил другой рог матки, в который таким же образом вводили раствор PBS. На Рисунке 12 представлена матка крысы после проведенного эксперимента. Видно увеличение опытного рога матки (левый) в сравнении с контрольным (правый) из-за сильного развития децидуальной ткани.

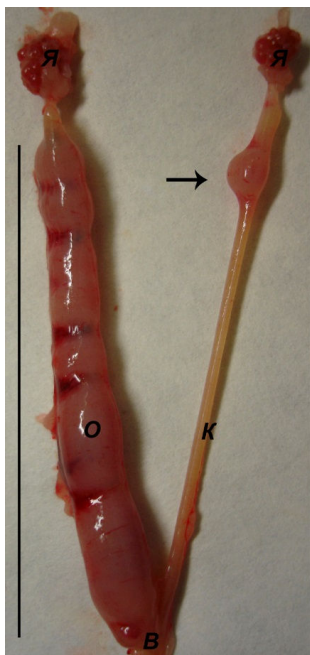


Рисунок 12. Матка крыс с участками децидуа после трансплантации ЭМСК.

О - опытный рог,

К – контрольный рог,

Я- яичники,

В – влагалищный конец матки.

Стрелкой указано развитие децидуальной ткани в контрольном роге, чертой указано развитие децидуальной ткани в опытном роге.

Анализ полученных гистологических срезов показал, что трансплантация ЭМСК не нарушает дифференцировку децидуальных клеток и гистологическую организацию ткани. При микроскопическом изучении не было обнаружено очагов воспаления или некроза (Рисунок 13).

Децидуальная оболочка человека и грызунов, в т.ч., крыс и мышей, включает в себя три основных типа клеток, большие и малые децидуальные клетки и гранулярные клетки эндометрия.

В децидуальной оболочке крыс различают две основные области: мезометральную и антимезометральную.

Мезометральная часть децидуа состоит из малых децидуальных клеток (МДК) (Рисунке 13а), между отростками которых распространяются гранулярные клетки эндометрия.

Антимезометральная часть децидуа сформирована большими децидуальными клетками (БДК), представленными на Рисунке 13б. При имплантации бластоциста проникает из полости матки через маточный эпителий в эндометрий антимезометральной части матки и продолжает дальнейшее развитие в окружении БДК.

Возникновение децидуальной реакции определяют по появлению в эндометрии БДК (Krehbiel, 1937).

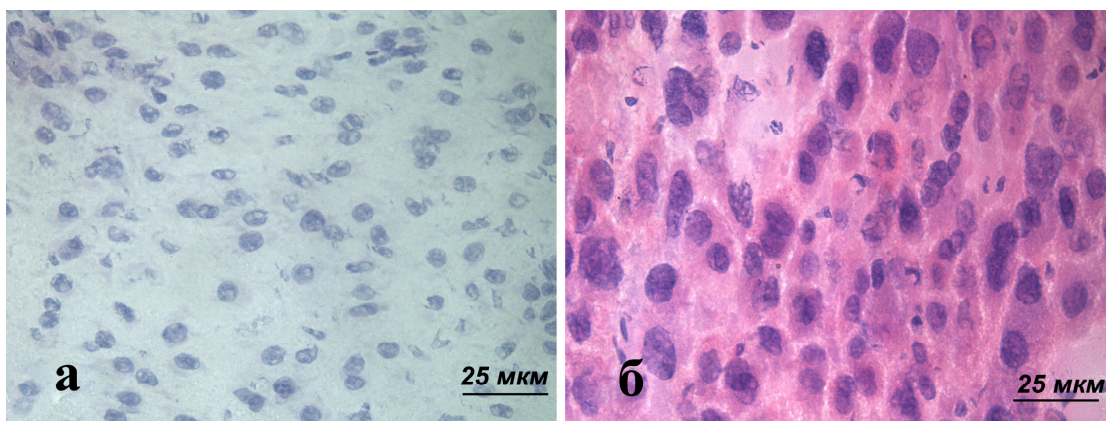


Рисунок 13. Гистологические срезы децидуальной ткани крысы после трансплантации эМСК.

а – малые децидуальные клетки; б – большие децидуальные клетки. (Об. 40х)

В отдельной серии экспериментов была проведена трансплантация эМСК, меченных флуоресцентными красителями. Трансплантированные эМСК человека были обнаружены в соединительно-тканной прослойке между децидуа и мышечной оболочкой рога матки в местах инъекций в стенку матки.

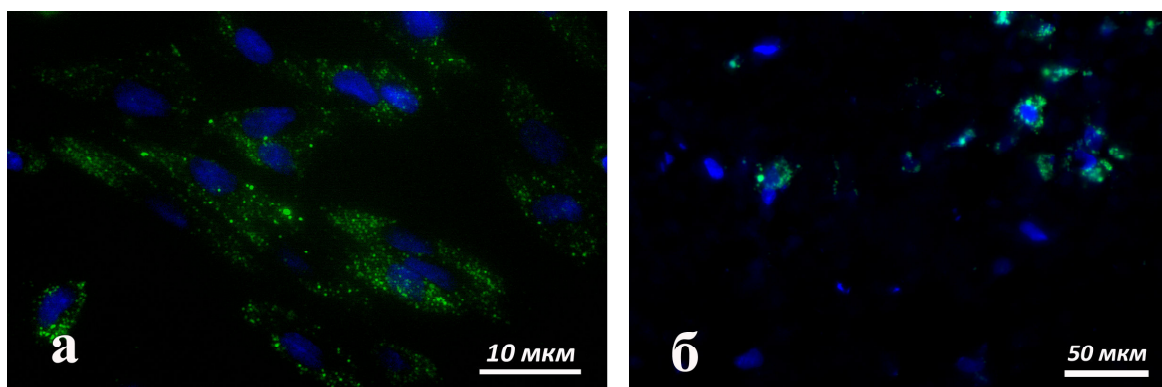


Рисунок 14. эМСК человека, меченные Hoechst 33342 и РКН 67

а - в культуре; б - в децидуа крысы на 6-е сут после трансплантации.

(Hoechst 33342, РКН 67, Об 20х)

На Рисунке 14а показаны эМСК в культуре перед проведением трансплантации, меченные прижизненными красителями. Видны синие ядра, окрашенные Hoechst 33342 и зеленая мембрана клеток, меченная РКН 67. Обнаруженные в децидуальной ткани эМСК представлены на Рисунке 14б. Также видны синие ядра, меченные Hoechst 33342 и зеленые мембраны, окрашенные РКН 67.

В местах локализации трансплантированных клеток отсутствовала лейкоцитарная инфильтрация, так как децидуальная ткань является иммунологически привилегированным местом, в котором блокировано развитие воспалительной реакции. Иммуносупрессивные свойства децидуальной ткани подтверждаются многими

исследованиями. Имеются сообщения, что при трансплантации участков кожи в децидуализированную матку псевдобеременных крыс трансплантаты сохраняли жизнеспособность гораздо дольше, чем при трансплантации в матку, где отсутствовала децидуальная реакция (Beer, 1974, Kirkwood, 1981).

В качестве контроля, для подтверждения стимулирующих свойств эМСК, а не их ксеногенного для крыс статуса, проводились эксперименты с использованием клеток костного мозга (ККМ) крысы, как источника МСК крысы, в аналогичной модели.

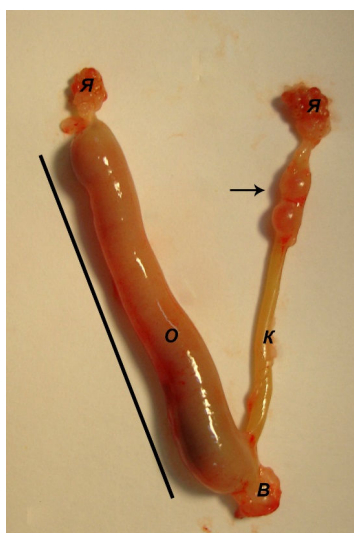


Рисунок 15. Матка крыс с участками децидуа после трансплантации ККМ крысы.

О - опытный рог,

К – контрольный рог,

Я- яичники,

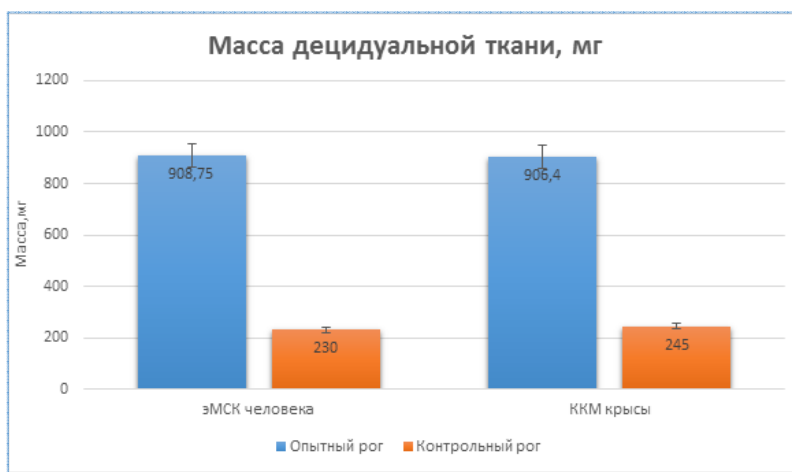
В – влагалищный конец матки.

Стрелкой указано развитие децидуальной ткани в контрольном роге, чертой указано развитие децидуальной ткани в опытном роге.

Рисунок 15 иллюстрирует, что трансплантация ККМ крысы в матку псевдобеременным крысам также стимулирует развитие децидуа, по сравнению с контрольным введением PBS. Заметно увеличение опытного рога (левый).

Результаты взвешивания опытных и контрольных рогов матки крысы показывают, что по соотношению масс увеличение ткани в опытном роге превосходит контрольный более чем в 3 раза как при трансплантации эМСК, так и при введении ККМ крысы (Рисунок 16).

Рисунок 16. Результаты взвешивания децидуальной ткани крыс.



Для количественной оценки развития и правильности гистогенеза децидуальной ткани, наиболее оптимально оценивать децидуа в мезометрально-антимезометральном направлении, как показано на Рисунке 17, так как в этом направлении наблюдаются все типы цито- гистогенеза децидуальной оболочки.

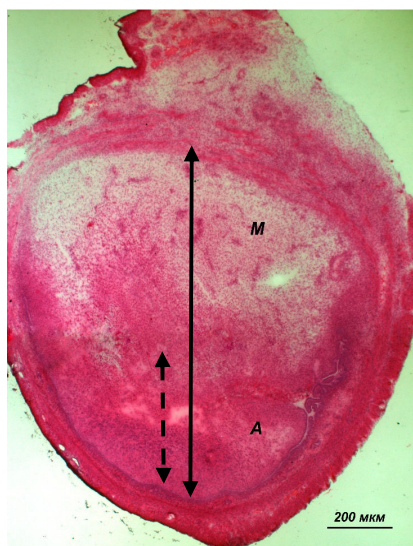


Рисунок 17. Поперечный гистологический срез матки крысы с развитой децидуальной тканью

М–мезометральная область, зона малых децидуальных клеток,

А–антимезометральная область, зона больших децидуальных клеток (Об. 10х),

Стрелкой указана зона измерения.

Штрихом указана область измерения зоны БДК.

Мезометральная и антимезометральная части децидуа крысы сформированы различными типами клеток. Долевое соотношение этих частей постоянно на каждом сроке беременности. Поэтому обнаружение отклонений соотношения их долей можно трактовать как нарушение морфогенеза децидуальной оболочки. Доля антимезометральной части колеблется от 30 до 40% площади среза децидуа. Так как децидуа имеет овальную форму, измерение диаметра дает представление о размерах децидуа и позволяет сравнивать децидуа друг с другом по их площади.

Для оценки влияния трансплантации эМСК на дифференцировку БДК, как наиболее дифференцированных клеток, была определена толщина слоя БДК и вычислена её доля (%) в общем диаметре каждой децидуа. Результаты измерений приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Результаты морфометрии децидуа крыс после трансплантации эМСК человека и ККМ крысы.

<i>Рога матки</i>	<i>Диаметр срезов, мм</i>	<i>Доля зоны БДК (%) в общей толщине децидуа</i>
<i>Трансплантация эМСК человека (16 крыс)</i>	<i>4.3±0.5</i>	<i>35. 4±3.6</i>
<i>Трансплантация ККМ крысы (14 крыс)</i>	<i>4.6±0.3</i>	<i>36.3±4.3</i>
<i>Введение PBS</i>	<i>2.6±0.5</i>	<i>31.8±1.6</i>

По данным морфометрии, представленным в Таблице 2, срезы децидуа, в которые трансплантировали эМСК человека, характеризовались увеличением диаметра в мезо-антимезометральном направлении примерно в 1.5-2 раза по отношению к диаметру срезов децидуа контрольного рога.

Однако, процентное соотношение зон в децидуа не изменилось по сравнению с контролем, что свидетельствует о правильном развитии ткани при трансплантации эМСК человека.

По представленным в Таблице 2 результатам можно также сделать вывод, что трансплантация ККМ крысы стимулирует развитие децидуальной ткани в такой же степени, что и трансплантация эМСК человека. Это доказывает, что эффект, полученный при трансплантации эМСК не является результатом влияния ксеногенной для крыс природы клеток человека.

Таким образом, псевдобеременность крыс является эффективной моделью для оценки влияния эМСК на функциональное состояние эндометрия. Было установлено, что трансплантация эМСК человека в месте образования децидуа крыс существенно увеличивает рост децидуальной ткани по сравнению с контролем, не нарушая при этом гистологическую организацию ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе был разработан метод выделения и культивирования МСК из фрагментов эндометрия, содержащихся в менструальной крови (эМСК). Полученные линии экспрессируют специфические для МСК маркеры, дифференцируются в остеогенном и адипогенном направлении, имеют нормальный кариотип. При длительном культивировании клетки сохраняют нормальный кариотип и не immortalизируются, а вступают в фазу репликативного старения.

По своим характеристикам полученные линии соответствуют МСК, выделяемым из других источников и могут рассматриваться как перспективный трансплантационный материал для целей регенеративной медицины. В настоящей работе терапевтические свойства полученных эМСК были исследованы в экспериментах на псевдобеременных крысах. Был разработан способ оценки влияния трансплантации эМСК на развитие децидуальной ткани эндометрия крыс. Трансплантация эМСК вызывает более интенсивное развитие децидуальной ткани по сравнению с введением раствора PBS, что подтверждается изменением размера и морфометрическим анализом гистологических срезов. При проведении гистологического исследования было обнаружено, что трансплантация эМСК не нарушает дифференцировку децидуальных клеток и

организацию ткани, сохраняя в образовавшейся децидуальной ткани взаимное расположение дифференцированных клеток.

В качестве исключения возможного влияния на результат ксеногенной природы эМСК человека в отдельной серии экспериментов на аналогичной модели была проведена трансплантация клеток костного мозга (ККМ) крысы. Полученные результаты показали, что трансплантация ККМ крысы оказывает практически такой же эффект, как и трансплантация эМСК человека. Таким образом, установлено, что трансплантация эМСК человека существенно стимулирует рост децидуальной ткани сохраняя при этом гистологическую организацию ткани и взаимное расположение дифференцированных клеток эндометрия. Полученные данные демонстрируют стимулирующее действие эМСК на развитие эндометриальной ткани в условиях псевдобеременности экспериментальных животных. Использование такой модели открывает новые подходы к исследованию влияния стволовых клеток на функционирование репродуктивной системы.

ВЫВОДЫ

1. Выделенные из фрагментов десквамированного эндометрия, содержащегося в менструальной крови человека мезенхимные стволовые клетки (эМСК) экспрессируют специфические для МСК маркеры, дифференцируются в остеогенном и адипогенном направлении, имеют нормальный кариотип и по мере культивирования подвергаются репликативному старению. Полученные культуры эМСК могут быть использованы в качестве трансплантационного материала в экспериментальных исследованиях, направленных на решение проблем регенеративной медицины.
2. Разработанный способ трансплантации МСК псевдобеременным крысам позволяет оценить влияние МСК на развитие эндометрия экспериментальных животных.
3. Трансплантация эМСК человека в матку псевдобеременным крысам стимулирует рост децидуальной ткани, не нарушая гистогенез ткани.
4. Трансплантация видоспецифических ККМ крысы в матку псевдобеременным крысам (контрольный вариант) стимулирует развитие децидуальной ткани у крыс в той же степени, что и трансплантация эМСК человека.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н. (2011). «Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека». Цитология. 53(12): 919-928.
2. Домнина А.П., Фридлянская И.И., Земелько В.И., Пуговкина Н.А., Ковалева З.В., Зенин В.В., Гринчук Т.М., Никольский Н.Н. (2013). «Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека при длительном культивировании не подвергаются спонтанной трансформации» Цитология. 55 (1): 69-74
3. Domnina Alisa P., Zemelko Victoria I., Mikhailov Vyacheslav M., Nikolsky Nikolay N. (2013) «Stimulation of decidua development by transplantation of endometrial stem cells». J. Biomedical Science and Engineering. 6: 59-65
4. Домнина А.П., Михайлов В.М., Никольский Н.Н. (2014). «Влияние трансплантированных клеток костного мозга на развитие децидуальной оболочки у крыс». Цитология. 56(4) 268 -272
5. Домнина А.П., В.М. Михайлов, Н.Н. Никольский «Влияние стволовых клеток эндометрия на развитие децидуальной оболочки» 1-ый Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине 4–6 декабря 2013 г. Москва.
6. Домнина А.П., Михайлов В.М., Никольский Н.Н. «Влияние клеток костного мозга на развитие децидуальной оболочки.»; Всероссийский симпозиум и Школа-конференция для молодых ученых по биологии клетки в культуре; г. Санкт – Петербург; 21 - 25 октября 2013 г. //Цитология. 55 (9): 635
7. Domnina A, Zemelko V, Mikhailov V & Nikolsky N. (2013). «Effect of endometrial stem cells transplantation on decidua formation in pseudopregnant rats». Regenerative Medicine, Issue 6: 155
8. Domnina A. P., Mikhailov V. M., Zemelko V. I. and Nikolsky N. N. «Stimulation of decidua development by transplantation of endometrial stem cells» Special Issue: 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013, July 2013 Volume 280, Issue Supplement s1, p. 453

9. Михайлов В.М., Домнина А.П., Никольский Н.Н «Способ стимуляции образования децидуальной оболочки эндометрия в эксперименте», положительное решение о выдаче патента от 21.01.2014.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Мамаева (2002). М.: Наука. 231 с; **Bernardo et al.**, (2007) Cancer Res. 67: 9142-9149. **Bieback and Kluter** (2007) Stem Cells. (5):1270-8; **Chen** et al (2009) Cell. Mol. Biol. Lett. 14: 528–536; **Cho** et al (2004). Fertil. Steril. 81: 403–407;. **Gargett** (2006) Aust. NZ J. Obstet. Gynaecol. 46: 250–253; **Gargett** et al.(2004), Mol. Hum. Reprod. 16: 818–834; **Husein** et al . (2010) Stem cells. 28 : 585–596; **Loh** et al (2008).JAMA.299(8):925-36; **Mikhailov** (2003). Int Rev Cytol. 227, 1 – 63; **Morelli** et al (2012). Obstet. Gynaecol doi.org/10.1155/2012/851367; **Padykula** et al.(1989). Biol. Reprod. 40: 681–690; **Padykula** (1991) Ann. N Y Acad. Sci. 622: 47–56; **Parker and Katz** (2006) Expert Opin Biol Ther.;6(6):567-78; **Prockop** 2009 Mol. Ther. 17 : 939-946; **Prianishnikov** (1978) Contraception.18: 213–223; **Schwab** et al (2007). Hum. Reprod. 22: 2903–2911. 2011; **Seabright** (1971) Lancet.11: 971 – 972; **Thomas** et al (1975)N Engl J Med.292(17):895-902; **Tyndall** et al (1999). Bone Marrow Transplant. (7):729-34; **Wolff** et al (2011) J. Cell. Mol. Med. 15: 747–755. **Yunis**. (1980) Cancer Genet. Cytogenet.2: 221 – 229;