

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc278905>

# Экспрессия гена нестина в стромальных предшественниках из костного мозга человека

А.И. Дорофеева<sup>1</sup>, Т.Ф. Савватеева<sup>2</sup>, И.Н. Шипунова<sup>1</sup><sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр гематологии, Москва, Российская Федерация;<sup>2</sup> Московская школа на Юго-Западе №1543, Москва, Российская Федерация

## АННОТАЦИЯ

**Введение.** Иерархия стромальных предшественников из костного мозга охарактеризована скудно, в культуре выделяют мультипотентные мезенхимные стромальные клетки и колониобразующие единицы фибробластов. До настоящего времени не найдены уникальные сочетания поверхностных антигенов для мезенхимных стволовых клеток, что затрудняет получение их чистой популяции. Часто в качестве маркера этих клеток используют экспрессию гена нестина.

**Цель работы** — оценить уровень экспрессии гена нестина в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках и в колониобразующих единицах фибробластов и охарактеризовать изменение его экспрессии при переходе от олигопотентных клеток-предшественниц к монопотентным.

**Материалы и методы.** Стромальные предшественники проанализировали в образцах костного мозга, полученных от 19 доноров стандартными методами. Из тех же образцов костного мозга было суммарно получено 296 индивидуальных клонов колониобразующих единиц фибробластов. В клетках анализировали способность к дифференцировке в жировом и костном направлениях, а также относительный уровень экспрессии гена нестина.

**Результаты.** Средний относительный уровень экспрессии нестина статистически значимо не отличается в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках ( $0,41 \pm 0,13$ ) и в суммарной популяции колониобразующих единиц фибробластов ( $0,24 \pm 0,05$ ). В индивидуальных клонах колониобразующих единиц фибробластов экспрессия нестина была статистически незначимо выше, чем в суммарной популяции ( $0,31 \pm 0,04$ ). При анализе колониобразующих единиц фибробластов, различающихся по дифференцировочному потенциалу, наивысшая экспрессия нестина выявлена в группе монопотентных остеогенных предшественников, тогда как в олигопотентных предшественниках его экспрессия была статистически значимо ниже.

**Заключение.** Экспрессия гена нестина в мезенхимных стромальных предшественниках из костного мозга не является специфичной для мезенхимных стволовых клеток и не может быть использована в качестве уникального маркера этого типа клеток. По нашим данным, высокий уровень экспрессии нестина скорее идентифицирует монопотентные остеогенные предшественники.

**Ключевые слова:** мезенхимные стромальные клетки; колониобразующие единицы фибробластов; экспрессия генов; нестин.

## Для цитирования:

Дорофеева А.И., Савватеева Т.Ф., Шипунова И.Н. Экспрессия гена нестина в стромальных предшественниках из костного мозга человека // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 1. С. 53–60. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc278905>

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc278905>

# Nestin gene expression in stromal precursor cells from the human bone marrow

Alena I. Dorofeeva<sup>1</sup>, Tat'jana F. Savvateeva<sup>2</sup>, Irina N. Shipounova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup> Moscow School in the South-West N 1543, Moscow, Russian Federation

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The hierarchy of stromal progenitors from the bone marrow is poorly characterized; multipotent mesenchymal stromal cells and colony-forming units of fibroblasts are isolated in culture. Mesenchymal stem cells do not have a unique combination of surface antigens, making it difficult to obtain the pure population. The expression of the nestin gene is often used as a marker of these cells.

**AIM:** To evaluate the level of expression of the nestin gene in multipotent mesenchymal stromal cells and in colony-forming units of fibroblasts and to characterize the change in its expression during the transition from oligopotent progenitor cells to monopotent ones.

**MATERIALS AND METHODS:** Stromal progenitors were analyzed in bone marrow samples from 19 donors by standard methods. A total of 296 individual clones of fibroblast colony-forming units were obtained from the same bone marrow samples. The cells were analyzed for the ability to differentiate toward the adipogenic and osteogenic lineages. Relative expression level of nestin gene was analyzed in all cells.

**RESULTS:** Mean relative expression level of nestin did not differ significantly in multipotent mesenchymal stromal cells ( $0.41 \pm 0.13$ ) and in the total population of colony-forming units of fibroblasts ( $0.24 \pm 0.05$ ). In individual clones of colony-forming units of fibroblasts, nestin expression was not significantly higher than in the total population ( $0.31 \pm 0.04$ ). When analyzing colony-forming units of fibroblasts differing in their differentiation potential, the highest expression of nestin was found in the group of monopotent osteogenic progenitors, while its expression was significantly lower in oligopotent progenitors.

**CONCLUSION:** Nestin gene expression in mesenchymal stromal progenitors from the bone marrow is not specific for mesenchymal stem cells and cannot be used as a unique marker of this cell type. According to our data, a high level of nestin expression rather identifies monopotent osteogenic progenitors.

**Keywords:** mesenchymal stromal cells; colony forming units of fibroblasts; gene expression; nestin.

## To cite this article:

Dorofeeva AI, Savvateeva TF, Shipounova IN. Nestin gene expression in stromal precursor cells from the human bone marrow. *Genes & cells*. 2023;18(1):53–60. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc278905>

Received: 15.09.2022

Accepted: 24.02.2023

Published: 17.03.2023

## ВВЕДЕНИЕ

Успешное функционирование стволовых клеток крови в течение всей жизни организма во многом обусловлено кроветворным микроокружением костного мозга (КМ). Оно состоит из клеток разнообразных типов, чаще всего некроветворного происхождения, а также растворимых регуляторных факторов и внеклеточного матрикса. Большую часть кроветворного микроокружения составляют стромальные клетки — потомки мезенхимных стволовых клеток (МСК). В настоящее время экспериментально иерархия стромальных предшественников охарактеризована скудно. В экспериментах *in vitro* выделяют мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) [1] и колониобразующие единицы фибробластов (КОЕф) [2]. До сих пор не найдено уникального маркера МСК или сочетания поверхностных антигенов, необходимых и достаточных для выделения чистой популяции этих самых ранних стромальных предшественников. Показано, что экспрессия гена нестина (*NES*), изначально выявленная в нейральных предшественниках [3], характерна и для МСК [4]. Часто экспрессия этого гена используется в качестве маркера стволовых клеток в различных тканях [5–7], в том числе и МСК [8, 9]. Показана экспрессия нестина и в некоторых опухолевых клетках [10].

**Цель работы** — оценить уровень экспрессии гена *NES* в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках и их потомках — колониобразующих единицах фибробластов, выделенных из костного мозга здоровых доноров, а также выяснить, как изменяется этот показатель при переходе от стромальных бипотентных клеток-предшественниц, способных к остеогенной и адипогенной дифференцировке, к монопотентным клеткам-предшественницам, способным осуществлять дифференцировку только в одну из указанных линий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аликвоты КМ получали от доноров гемопоэтических стволовых клеток в момент плановой эксфузии КМ в отделении химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток Национального медицинского исследовательского центра гематологии (Москва, Россия). Все доноры подписали информированное согласие на участие в исследовании. Из КМ 19 доноров (11 мужчин, 8 женщин, средний возраст —  $29,5 \pm 2,7$  года) получали ММСК и КОЕф по стандартным методикам.

Для получения культуры ММСК  $3 \times 10^6$  мононуклеаров КМ помещали в культуральный флакон T25 и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  в стандартной культуральной среде  $\alpha$ MEM (ICN Holding, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, США), 2 мМ L-глутамин (ICN Holding, США), 100 ед./мл

пенициллина (ОАО «Синтез», Россия) и 50 мг/мл стрептомицина (ООО «БиоФармГарант», Россия). Культуральную среду меняли дважды в неделю. По достижении конfluence клетки трипсинизировали, подсчитывали и рассаживали из расчёта  $10^5$  клеток на флакон T25. Иммунофенотип и дифференцировочный потенциал ММСК, полученных по данному протоколу, соответствуют международным критериям [11], что было опубликовано нами ранее [12–14]. ММСК имели следующий иммунофенотип:  $\text{CD}105^+\text{CD}73^+\text{CD}90^+\text{CD}45^-\text{CD}34^-\text{CD}14^-\text{CD}19^-\text{HLA-DR}^-$ . Из ММСК на 1-м пассаже и КОЕф выделяли РНК по адаптированному протоколу [15].

Для получения культуры КОЕф  $10^6$  мононуклеаров КМ помещали в культуральный флакон T25 и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  в течение 14 дней в стандартной культуральной среде  $\alpha$ MEM (ICN Holding, США), содержащей 20% ЭТС (HyClone, США), 2 мМ L-глутамин (ICN Holding, США), 100 ед./мл пенициллина (ОАО «Синтез», Россия) и 50 мг/мл стрептомицина (ООО «БиоФармГарант», Россия). Одновременно из тех же образцов КМ получали индивидуальные клоны КОЕф. В среднем из каждого образца донорского КМ было выделено  $16 \pm 3$  клон (от 1 до 50, медиана — 15). Для этого по 15 000 клеток КМ высаживали в лунки 96-луночной платы в среде  $\alpha$ MEM с 20% ЭТС и культивировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ . Клетки из лунок, где был выявлен рост только одного клон, по достижении конfluence пересаживали в ячейки 6-луночной платы в среде  $\alpha$ MEM с 10% ЭТС. Затем конfluence ячейку рассаживали на три ячейки и через 2–3 дня в две из них добавляли стандартные смеси индукторов костной и жировой дифференцировки. В третьей ячейке контрольные клетки культивировали в стандартной среде.

Остеогенную дифференцировку индуцировали в стандартной среде для культивирования клеток, содержащей 0,1 мкМ дексаметазона, 0,15 мМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты тринатриевой соли и 3 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

Для индукции адипогенной дифференцировки использовали стандартную среду для культивирования, содержащую 1 мкМ дексаметазона, 60 мкМ индометацина и 5 мкг/мл инсулина.

Через 14 дней из клеток выделяли РНК. Ответ на индукторы дифференцировки определяли по изменению относительного уровня экспрессии (ОУЭ) маркерных генов (*ALPL* и *PTHr* для остеогенной и *FABP4* и *PPARG* — для адипогенной дифференцировки). ОУЭ маркерных генов и гена *NES* анализировали при помощи ПЦР в режиме реального времени в модификации TaqMan. Последовательности праймеров и флуоресцентных проб были подобраны авторами и доступны по запросу. По ответу на индукторы костной и/или жировой дифференцировки для каждого клон делали вывод, к каким дифференцировкам данный конкретный клон способен. Затем в контрольных клетках, культивировавшихся без индукторов, анализировали ОУЭ гена *NES*. По этому протоколу

проанализировано 296 индивидуальных клонов КОЕф, полученных из КМ здоровых доноров.

**Статистическая обработка.** Данные в тексте представлены в виде «среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего». При анализе данных использовали U-критерий Манна–Уитни, статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Анализ данных выполняли на онлайн-ресурсе <https://www.socscistatistics.com> и в программе Microsoft Excel. При помощи онлайн-ресурса <http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/> сделано графическое представление данных в виде диаграмм размаха («ящичков с усами») по Тюки. На диаграммах центральная горизонтальная линия обозначает медиану, границы фигуры — 25-й и 75-й процентиля, «усы» — полуторный интерквартильный размах, выбросы представлены в виде точек.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

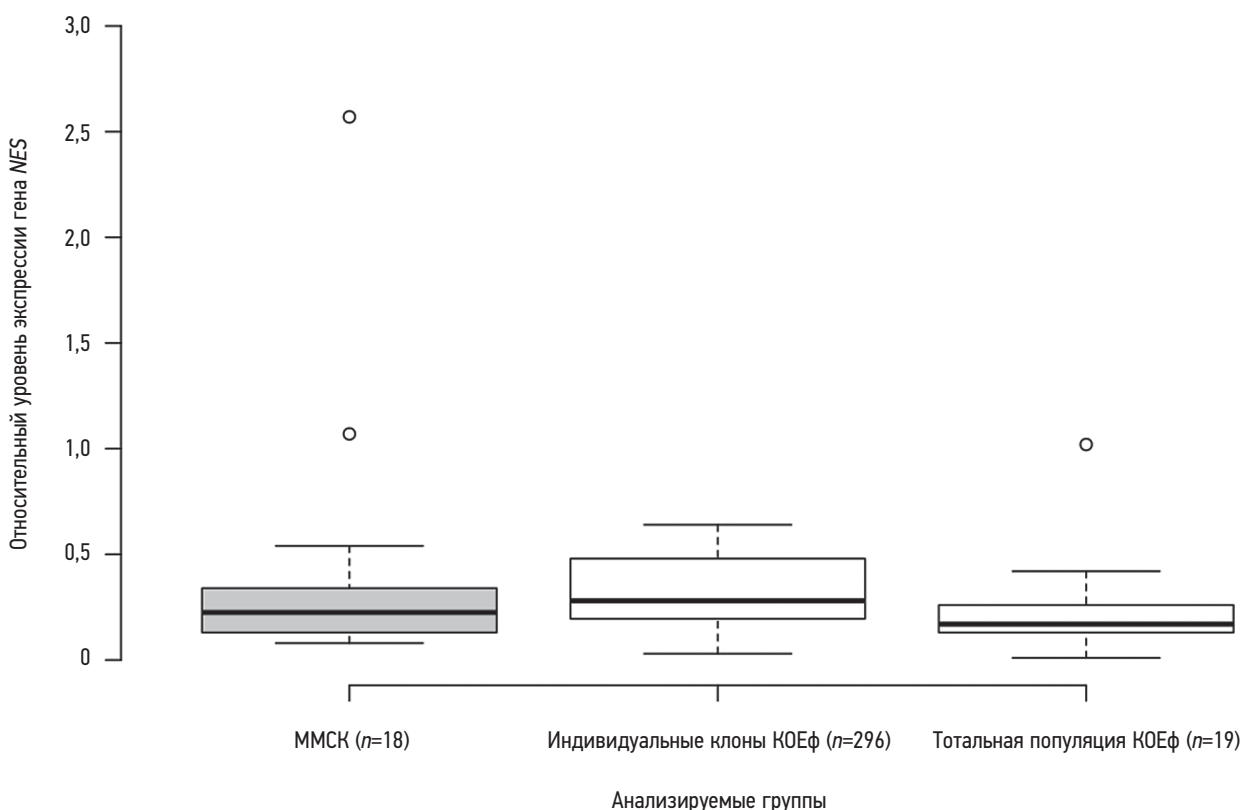
Оказалось, что средний ОУЭ гена *NES* статистически значимо не отличается в ММСК ( $0,41 \pm 0,13$ ) и в суммарной популяции КОЕф ( $0,24 \pm 0,05$ ) (рис. 1, группы ММСК и тотальная популяция КОЕф). В индивидуальных клонках КОЕф ОУЭ был статистически незначимо выше, чем в суммарной популяции ( $0,31 \pm 0,04$ ) (рис. 1, группа индивидуальные клоны КОЕф).

Очевидно, что статистически значимых отличий по уровню экспрессии нестина между двумя проанализированными типами стромальных предшественников нет.

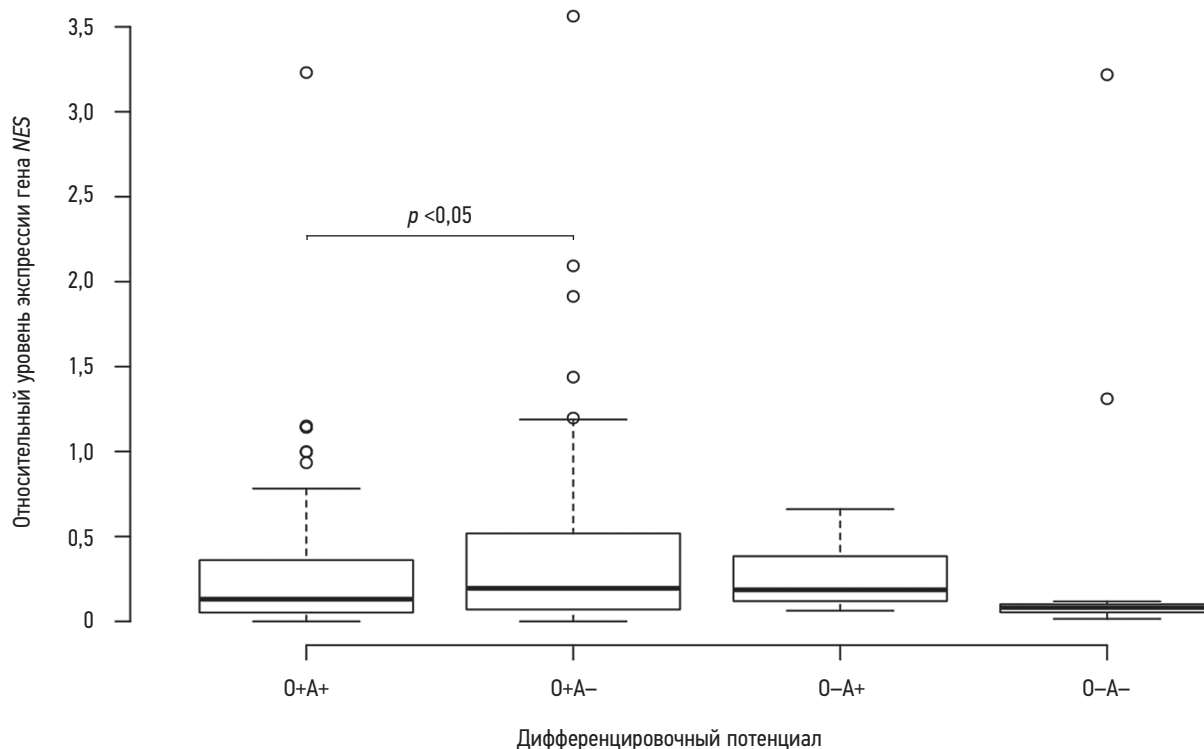
Индивидуальные клоны КОЕф проанализированы по способности к дифференцировке в жировом и костном направлениях. В итоге все 296 проанализированных клонов были сгруппированы в 4 субпопуляции: 50% всех клонов способны к дифференцировке и в остеогенном, и в адипогенном направлении (O+A+); 43% клонов способны к остеогенной, но не к адипогенной дифференцировке (O+A-); всего 3% клонов способны к адипогенной, но не к остеогенной дифференцировке (O-A+); 4% составили клоны, не способные к данным дифференцировкам (O-A-). При анализе экспрессии нестина в клетках индивидуальных клонов КОЕф, различающихся по дифференцировочному потенциалу, наивысший ОУЭ этого гена был выявлен в группе монопотентных остеогенных предшественников (O+A-), тогда как в бипотентных предшественниках (O+A+) его экспрессия была статистически значимо ниже (рис. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экспрессии нестина в ММСК и КОЕф не выявил различий между этими стромальными



**Рис. 1.** Относительный уровень экспрессии гена *NES* в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках (ММСК) и колониеобразующих единицах фибробластов (КОЕф). Статистическая значимость различий определена с помощью U-теста Манна–Уитни.  
**Fig. 1.** Relative expression level of *NES* gene in multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) and fibroblast colony forming units (CFU-F). Statistical significance of the differences was determined with Mann–Whitney U-test.



**Рис. 2.** Относительный уровень экспрессии гена *NES* в индивидуальных клонах колониеобразующих единиц фибробластов, различающихся по дифференцировочному потенциалу. Анализируемые группы: O+A+ — бипотентные предшественники, способные к остеогенной и к адипогенной дифференцировке ( $n=149$ ); O+A- — монопотентные предшественники, способные только к остеогенной дифференцировке ( $n=126$ ); O-A+ — монопотентные предшественники, способные только к адипогенной дифференцировке ( $n=8$ ); O-A- — стромальные клетки, не способные к указанным дифференцировкам ( $n=13$ ). Статистическая значимость различий определена с помощью U-теста Манна–Уитни.

**Fig. 2.** Relative expression level of *NES* gene in individual clones of fibroblast colony forming units, which differed in their differentiation potential. The groups analyzed were O+A+ — bipotent precursors, able to osteogenic and adipogenic differentiation ( $n=149$ ); O+A- — monopotent precursors able to osteogenic differentiation only ( $n=126$ ); O-A+ — monopotent precursors able to adipogenic differentiation only ( $n=8$ ); O-A- — stromal cells unable to differentiate toward osteogenic or adipogenic lineages ( $n=13$ ). Statistical significance of the differences was determined with Mann–Whitney U-test.

предшественниками. Однако ранее нами были показаны статистически значимые отличия в экспрессии генов, отвечающих за пролиферацию и дифференцировку в данных типах клеток-предшественниц, которые подтверждали, что это действительно два отдельных типа стромальных предшественников [13]. В мировой литературе очень часто искажают метод определения КОЕф, придуманный А.Я. Фриденштейном [16], и подменяют этим понятием анализ клоногенных клеток в культуре ММСК [17–19]. В нашей работе анализировали именно исходные, полученные непосредственно из КМ колонии КОЕф. Продемонстрировано разнообразие вариантов реализации дифференцировочного потенциала индивидуальных колоний КОЕф и убедительно показано, что самый высокий ОУЭ нестина характерен для монопотентных остеобластных предшественников, но не для бипотентных стромальных предшественников, обладающих более широким дифференцировочным потенциалом и таким образом находящихся ближе к МСК в иерархии мезенхимных предшественников. В мировой литературе имеются единичные публикации, показывающие,

что высокий уровень нестина характерен как раз для МСК, локализованных в непосредственной близости к кости и направленных на остеогенную дифференцировку [20]. В настоящей работе авторы исходили из визуально выявляемой локализации нестин-положительных клеток в КМ. Однако есть и другие работы, в которых говорится о том, что экспрессия нестина характерна для ранних мультипотентных предшественников и исчезает в процессе культивирования и в более дифференцированных клетках [8]. Другими исследователями в КМ выделены две субпопуляции клеток, экспрессирующих нестин: яркие и тусклые, и получены противоречивые данные о том, какие из этих клеток являются истинными МСК [21, 22]. Необходимо отметить, что все вышеперечисленные исследования выполнены на трансгенных мышах, в геном которых под контроль промотора нестина был введён ген зелёного флуоресцентного белка. В нашей работе при анализе экспрессии гена с помощью ПЦР в режиме реального времени доказано, что стромальные монопотентные остеогенные предшественники из КМ человека обладают самым высоким уровнем экспрессии



нестина среди всех проанализированных типов стромальных клеток-предшественниц.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспрессия гена *NES* в мезенхимных стромальных предшественниках из костного мозга не является специфичной для мезенхимных стволовых клеток и не может быть использована в качестве уникального маркера данного типа клеток. Высокий уровень экспрессии этого гена скорее характерен для монопотентных остеогенных клеток-предшественниц.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Источник финансирования.** Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 22-15-00018), <https://rscf.ru/project/22-15-00018/>

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов:** А.И. Дорофеева и И.Н. Шипунова разработали план исследования, выполнили все процедуры, связанные с получением и культивированием ММСК, КОЕф и индивидуальных клонов КОЕф из КМ здоровых доноров, а также выделили РНК и построили кДНК для всех исследованных образцов. А.И. Дорофеева и И.Н. Шипунова проанализировали экспрессию генов в ММСК и КОЕф, Т.Ф. Савватеева и И.Н. Шипунова — в индивидуальных клонах КОЕф. Все авторы принимали участие в обработке и анализе полученных данных. Все авторы внесли значимый вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность генеральному директору ФГБУ «НМИЦ гематологии»

Е.Н. Паровичниковой, заведующей отделением химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток Л.А. Кузьминой, а также всему коллективу этого отделения за возможность получать аликвоты КМ здоровых доноров.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Source of funding.** The research was funded by a grant from the Russian Science Foundation (Project NO. 22-15-00018), <https://rscf.ru/project/22-15-00018/>

**Competing Interests.** The authors declare no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Authors' contribution:** A.I. Dorofeeva and I.N. Shipounova developed the study design, performed all procedures related to the obtaining and culturing of MMSCs, CFU and individual CFU clones from BM from healthy donors, and isolated RNA and constructed cDNA for all samples studied. A.I. Dorofeeva and I.N. Shipounova analyzed gene expression in MMSCs and CFU, T.F. Savvateeva and I.N. Shipounova — in individual CFU clones. All authors were involved in processing and analysis of the obtained data. All authors made meaningful contributions to the study and article preparation and read and approved the final version of the article before publication.

**Acknowledgements.** The authors are grateful to E.N. Parovichnikova, Director General of the Hematology Research Center, to L.A. Kuzmina, Head of the Department of Haemoblastosis Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation, as well as the entire team of this department for the opportunity to receive BM aliquots from healthy donors.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells // *J Orthop Res.* 1991. Vol. 9, N 5. P. 641–650. doi: 10.1002/jor.1100090504
2. Kuznetsov S.A., Friedenstein A.J., Robey P.G. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro // *Br J Haematol.* 1997. Vol. 97, N 3. P. 561–570. doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.902904.x
3. Dahlstrand J., Lardelli M., Lendahl U. Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system // *Brain Res Dev Brain Res.* 1995. Vol. 84, N 1. P. 109–129. doi: 10.1016/0165-3806(94)00162-s
4. Pinho S., Lacombe J., Hanoun M., et al. PDGFR and CD51 mark human Nestin+ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion // *J Exp Med.* 2013. Vol. 210, N 7. P. 1351–1367. doi: 10.1084/jem.20122252
5. Mii S., Amoh Y., Katsuoka K., Hoffman R.M. Comparison of nestin-expressing multipotent stem cells in the tongue fungiform papilla and vibrissa hair follicle // *J Cell Biochem.* 2014. Vol. 115, N 6. P. 1070–1076. doi: 10.1002/jcb.24696
6. Calderone A. The biological role of nestin (+)-cells in physiological and pathological cardiovascular remodeling // *Front Cell Dev Biol.* 2018. Vol. 6. P. 15. doi: 10.3389/fcell.2018.00015
7. Jiang M.H., Cai B., Tuo Y., et al. Characterization of nestin-positive stem Leydig cells as a potential source for the treatment of testicular Leydig cell dysfunction // *Cell Res.* 2014. Vol. 24, N 12. P. 1466–1485. doi: 10.1038/cr.2014.149
8. Méndez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F., et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche // *Nature.* 2010. Vol. 466, N 7308. P. 829–834. doi: 10.1038/nature09262
9. Bernal A., Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications // *Cell Mol Life Sci.* 2018. Vol. 75, N 12. P. 2177–2195. doi: 10.1007/s00018-018-2794-z
10. Neradil J., Veselska R. Nestin as a marker of cancer stem cells // *Cancer Sci.* 2015. Vol. 106, N 7. P. 803–811. doi: 10.1111/cas.12691

11. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. 2006. Vol. 8, N 4. P. 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905
12. Kapranov N.M., Davydova Y.O., Galtseva I.V., et al. Alterations of multipotent mesenchymal stromal cells induced by interaction with allogeneic lymphocytes in vitro // *Int J Stem Cell Res Transplant*. 2017. Vol. 5, 2. P. 277–286.
13. Shipounova I.N., Petinati N.A., Bigildeev A.E., et al. Hierarchy of mesenchymal stem cells: comparison of multipotent mesenchymal stromal cells with fibroblast colony forming units // *J Biomed Sci Eng*. 2013. Vol. 6, N 8A. P. 66–73. doi: 10.4236/jbise.2013.68A1007
14. Shipounova I.N., Petrova T.V., Svinareva D.A., et al. Alterations in hematopoietic microenvironment in patients with aplastic anemia // *Clin Transl Sci*. 2009. Vol. 2, N 1. P. 67–74. doi: 10.1111/j.1752-8062.2008.00074.x
15. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on // *Nat Protoc*. 2006. Vol. 1, N 2. P. 581–585. doi: 10.1038/nprot.2006.83
16. Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., and Kulagina N.N. Fibroblast

- precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs // *Exp Hematol*. 1976. Vol. 4, N 5. P. 267–274.
17. Sygnecka K., Heider A., Scherf N., et al. Mesenchymal stem cells support neuronal fiber growth in an organotypic brain slice co-culture model // *Stem Cells Dev*. 2015. Vol. 24, N 7. P. 824–835. doi: 10.1089/scd.2014.0262
18. Hayati A.R., Nur Fariha M.M., Tan G.C., et al. Potential of human decidua stem cells for angiogenesis and neurogenesis // *Arch Med Res*. 2011. Vol. 42, N 4. P. 291–300. doi: 10.1016/j.arcmed.2011.06.005
19. Fournier B.P., Loison-Robert L.S., Ferré F.C., et al. Characterisation of human gingival neural crest-derived stem cells in monolayer and neurosphere cultures // *Eur Cells Mater*. 2016. Vol. 31. P. 40–58. doi: 10.22203/ecm.v031a04
20. Tournaire G., Stegen S., Giacomini G., et al. Nestin-GFP transgene labels skeletal progenitors in the periosteum // *Bone*. 2020. Vol. 133. P. 115259. doi: 10.1016/j.bone.2020.115259
21. Ding L., Saunders T.L., Enikolopov G., Morrison S.J. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells // *Nature*. 2012. Vol. 481, N 7382. P. 457–462. doi: 10.1038/nature10783
22. Kunisaki Y., Bruns I., Schieirmann C., et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence // *Nature*. 2013. Vol. 502, N 7473. P. 637–643. doi: 10.1038/nature12612

## REFERENCES

1. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641–650. doi: 10.1002/jor.1100090504
2. Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol*. 1997;97(3):561–570. doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.902904.x
3. Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U. Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*. 1995;84(1):109–129. doi: 10.1016/0165-3806(94)00162-s
4. Pinho S, Lacombe J, Hanoun M, et al. PDGFR and CD51 mark human Nestin+ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *J Exp Med*. 2013;210(7):1351–1367. doi: 10.1084/jem.20122252
5. Mii S, Amoh Y, Katsuoka K, Hoffman RM. Comparison of nestin-expressing multipotent stem cells in the tongue fungiform papilla and vibrissa hair follicle. *J Cell Biochem*. 2014;115(6):1070–1076. doi: 10.1002/jcb.24696
6. Calderone A. The biological role of nestin (+)-cells in physiological and pathological cardiovascular remodeling. *Front Cell Dev Biol*. 2018;6:15. doi: 10.3389/fcell.2018.00015
7. Jiang MH, Cai B, Tuo Y, et al. Characterization of nestin-positive stem Leydig cells as a potential source for the treatment of testicular Leydig cell dysfunction. *Cell Res*. 2014;24(12):1466–1485. doi: 10.1038/cr.2014.149
8. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829–834. doi: 10.1038/nature09262
9. Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(12):2177–2195. doi: 10.1007/s00018-018-2794-z
10. Neradil J, Veselska R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci*. 2015;106(7):803–811. doi: 10.1111/cas.12691
11. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–317. doi: 10.1080/14653240600855905
12. Kapranov NM, Davydova YO, Galtseva IV, et al. Alterations of multipotent mesenchymal stromal cells induced by interaction with allogeneic lymphocytes in vitro. *Int J Stem Cell Res Transplant*. 2017;5(2):277–286.
13. Shipounova IN, Petinati NA, Bigildeev AE, et al. Hierarchy of mesenchymal stem cells: comparison of multipotent mesenchymal stromal cells with fibroblast colony forming units. *J Biomed Sci Eng*. 2013;6(8A):66–73. doi: 10.4236/jbise.2013.68A1007
14. Shipounova IN, Petrova TV, Svinareva DA, et al. Alterations in hematopoietic microenvironment in patients with aplastic anemia. *Clin Transl Sci*. 2009;2(1):67–74. doi: 10.1111/j.1752-8062.2008.00074.x
15. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*. 2006;1(2):581–585. doi: 10.1038/nprot.2006.83
16. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4(5):267–274.
17. Sygnecka K, Heider A, Scherf N, et al. Mesenchymal stem cells support neuronal fiber growth in an organotypic brain slice co-culture model. *Stem Cells Dev*. 2015;24(7):824–835. doi: 10.1089/scd.2014.0262
18. Hayati AR, Nur Fariha MM, Tan GC, et al. Potential of human decidua stem cells for angiogenesis and neurogenesis. *Arch Med Res*. 2011;42(4):291–300. doi: 10.1016/j.arcmed.2011.06.005
19. Fournier BP, Loison-Robert LS, Ferré FC, et al. Characterisation of human gingival neural crest-derived stem cells in monolayer and neurosphere cultures. *Eur Cells Mater*. 2016;31:40–58. doi: 10.22203/ecm.v031a04
20. Tournaire G, Stegen S, Giacomini G, et al. Nestin-GFP transgene labels skeletal progenitors in the periosteum. *Bone*. 2020;133:115259. doi: 10.1016/j.bone.2020.115259

**21.** Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*. 2012;481(7382):457–462. doi: 10.1038/nature10783

**22.** Kunisaki Y, Bruns I, Schieirmann C, et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*. 2013;502(7473):637–643. doi: 10.1038/nature12612

## ОБ АВТОРАХ

\* **Шипунова Ирина Николаевна**, д-р биол. наук;  
адрес: Россия, 125167, Москва, Новый Зыковский пр-д, д. 4;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1189-0283>;  
eLibrary SPIN: 6901-6467;  
e-mail: iranifontova@yandex.ru

**Дорофеева Алена Игоревна**;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1154-5669>;  
eLibrary SPIN: 1034-1482;  
e-mail: resnichka22-22@mail.ru

**Савватеева Татьяна Федоровна**;  
e-mail: savvateeva.tatianka@mail.ru

\* Автор, ответственный за переписку / *Corresponding author*

## AUTHORS' INFO

\* **Irina N. Shipounova**, Dr. Sci. (Biol.);  
address: 4 Novyj Zykovskij proezd, 125167 Moscow, Russia;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1189-0283>;  
eLibrary SPIN: 6901-6467;  
e-mail: iranifontova@yandex.ru

**Alena I. Dorofeeva**;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1154-5669>;  
eLibrary SPIN: 1034-1482;  
e-mail: resnichka22-22@mail.ru

**Tat'jana F. Savvateeva**;  
e-mail: savvateeva.tatianka@mail.ru