

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

EXPERIMENTAL STUDIES

Альдегиддегидрогеназа как маркер ранних мезенхимных клеток-предшественниц в культуре стромы костного мозга доноров

К.А. Ветошкин, Н.В. Исаева, М.А. Бутолина, Н.В. Минаева, Н.А. Зорина, М.Н. Хоробрых, Ю.С. Змеева

ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА», ул. Красноармейская, д. 72, Киров, Российская Федерация, 610027

Aldehyde Dehydrogenase as a Marker of Early Mesenchymal Progenitor Cells in Donor Bone Marrow Stroma

KA Vetoshkin, NV Isaeva, MA Butolina, NV Minaeva, NA Zorina, MN Khorobrykh, YuS Zmeeva

Kirov Research Institute of Hematology and Transfusiology, 72 Krasnoarmeiskaya str., Kirov, Russian Federation, 610027

РЕФЕРАТ

Цель. Анализ скорости роста культур мезенхимных стромальных клеток (МСК) в зависимости от количества альдегиддегидрогеназа-положительных (ALDH⁺) клеток.

Материалы и методы. Исследованы культуры мезенхимных клеток костного мозга 10 доноров (5 мужчин и 5 женщин) с медианой возраста 34,5 года (диапазон 14–38 лет). Ядродержащие клетки из миеловзвеси выделяли путем центрифугирования на градиенте плотности. МСК культивировали по общепринятому протоколу с использованием богатой тромбоцитами донорской плазмы. Идентификацию клеток стромы и подсчет количества клеток ALDH⁺ осуществляли методом лазерной проточной цитометрии согласно критериям Международного общества клеточной терапии.

Результаты. Скорость роста культур МСК и количество клеток ALDH⁺ максимальные при первичном посеве и пассаже № 1 и статистически значимо снижаются к пассажу № 3. Обнаружена зависимость скорости роста культур МСК от количества клеток ALDH⁺. С увеличением возраста донора снижается скорость роста культуры МСК и содержание клеток ALDH⁺ в строме костного мозга.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о взаимосвязи между скоростью роста культуры МСК костного мозга, возрастом донора и количеством клеток ALDH⁺. Установлено, что клетки, экспрессирующие ALDH, обеспечивают самоподдержание популяции МСК. Исходя из полученных результатов, мы предполагаем, что изученный маркер ALDH может служить объективным критерием принадлежности мезенхимных клеточных элементов к категории ранних клеток-предшественниц.

Ключевые слова: культура клеток, мезенхимные клетки, альдегиддегидрогеназа, скорость роста культуры.

Получено: 28 ноября 2019 г.

Принято в печать: 1 марта 2020 г.

ABSTRACT

Aim. To analyze the growth rate of mesenchymal stromal cell (MSC) culture depending on the aldehyde dehydrogenase-positive (ALDH⁺) cell count.

Materials & Methods. The study involved bone marrow mesenchymal cell cultures of 10 donors (5 men and 5 women) with median age of 34.5 years (range 14–38 years). Nucleated cells were obtained by density gradient centrifugation. MSCs were cultivated according to the conventional protocol using platelet-rich donor plasma. Stromal cell identification and ALDH⁺ cell counting were performed by laser flow cytometry according to the criteria of the International Society for Cell Therapy.

Results. The growth rate of MSC cultures and ALDH⁺ cell counts are maximum at primary and passage No. 1, becoming significantly lower by passage No. 3. The relationship between MSC culture growth rate and ALDH⁺ cell count was revealed. The older the donor, the lower MSC culture growth rate and ALDH⁺ cell count in bone marrow stroma.

Conclusion. The data obtained indicate the relationship between bone marrow MSC culture growth rate, donor's age, and ALDH⁺ cell count. ALDH-expressing cells proved to confer MSC population renewal. Based on the results acquired, we assume that the studied ALDH marker can serve as an objective criterion for placing mesenchymal cell elements into the category of early progenitor cells.

Keywords: cell culture, mesenchymal cells, aldehyde dehydrogenase, culture growth rate.

Received: November 28, 2019

Accepted: March 1, 2020

Для переписки: Константин Александрович Ветошкин, канд. мед. наук, Красноармейская ул., д. 72, Киров, Российская Федерация, 610027; тел.: +7(905)870-06-92; e-mail: kostyavetoshkin@yandex.ru

Для цитирования: Ветошкин К.А., Исаева Н.В., Бутолина М.А. и др. Альдегиддегидрогеназа как маркер ранних мезенхимных клеток-предшественниц в культуре стромы костного мозга доноров. Клиническая онкогематология. 2020;13(2):123–8.

DOI: 10.21320/2500-2139-2020-13-2-123-128

For correspondence: Konstantin Aleksandrovich Vetoshkin, MD, PhD, 72 Krasnoarmeiskaya str., Kirov, Russian Federation, 610027; Tel.: +7(905)870-06-92; e-mail: kostyavetoshkin@yandex.ru

For citation: Vetoshkin KA, Isaeva NV, Butolina MA, et al. Aldehyde Dehydrogenase as a Marker of Early Mesenchymal Progenitor Cells in Donor Bone Marrow Stroma. Clinical oncohematology. 2020;13(2):123–8 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2020-13-2-123-128

ВВЕДЕНИЕ

В костном мозге представлены два основных вида стволовых клеток: гемопоэтические и мезенхимные. Последние представляют собой популяцию плюрипотентных клеток, способных дифференцироваться в направлении хондроцитов, остеобластов, адипоцитов и ряда других клеток соединительной ткани [1, 2].

Международным обществом клеточной терапии (ISCT) сформулированы критерии идентификации мезенхимных стромальных клеток (МСК). Согласно данным критериям, МСК проявляют адгезию к пластику при стандартных условиях культивирования, имеют определенный набор поверхностных антигенов [2, 3], а также обладают полипотентностью.

В настоящее время активно изучается иерархия мезенхимного отдела стромы костного мозга [4, 5]. Установлено наличие в строме ранних мезенхимных клеток-предшественниц с высоким пролиферативным потенциалом, обеспечивающих самоподдержание популяции. Такие клетки принято называть стволовыми. Однако до настоящего времени не определены иммунологические маркеры, которые позволили бы идентифицировать прогениторные элементы мезенхимной природы. Известно, что универсальным свойством ранних клеток-предшественниц различного тканевого происхождения является резистентность к действию алкилирующих агентов (циклофосамида и его производных) [5–8]. Указанное свойство обеспечивается наличием в клетках альдегиддегидрогеназы (ALDH) [6–8]. Экспрессия ALDH высокая в жизнеспособных клетках-предшественницах различных линий, включая гемопоэтические, эндотелиальные, мезенхимные и нейральные [9–12]. В исследованиях последних лет показана стволовая природа мезенхимных клеток жировой ткани [13], вартонова студия пуповины [14], кожи [15], экспрессирующих ALDH. В то же время практически отсутствуют данные о количестве и динамике содержания ALDH-позитивных (ALDH+) элементов в культуре МСК костного мозга доноров и возможной взаимосвязи с показателями скорости роста культуры.

Цель исследования — анализ скорости роста культур МСК в зависимости от количества клеток ALDH+.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника МСК использовали костный мозг 10 доноров (5 мужчин и 5 женщин), полученный при миелоэкспузии. Возраст доноров варьировал

от 14 до 38 лет (медиана 34,5 года). Выделение фракции моноклеаров осуществляли путем фракционирования на градиенте плотности Lympholyte Cedarlane (плотность 1,077 при температуре 22 °С). МСК культивировали по общепринятому протоколу в среде aMEM (StemCell Technologies, Канада) с добавлением 4 % донорской плазмы, обогащенной тромбоцитами [16, 17], 2 ммоль/л L-глутамин (StemCell Technologies, Канада) и 2 ед./мл гепарина (Sigma, США) при температуре 37 °С в атмосфере 5%-го углекислого газа. Выделенные миелокарициты вносили в культуральные флаконы Corning (Т-150 см²) в рабочем разведении 4–5 × 10⁴/см² площади флакона (первичный посев, или P0). Через 2–3 дня осуществляли отмывание неприкрепленных клеток и смену среды. После формирования конфлюэнтного монослоя клетки обрабатывали трипсином (StemCell Technologies, Канада). При последующих пассажах (P1–P3) мезенхимные клетки рассаживали с плотностью 1,5–2,0 × 10³/см² площади флакона.

При каждом пассаже определяли время достижения культурой конфлюэнтного монослоя (степень покрытия флакона 90–95 %), на пассажах № 1–3 рассчитывали время удвоения клеток по формуле:

$$T_{(1/2)} = T_k \times \frac{\ln 2}{\ln \frac{N_k}{N_0}},$$

где $T_{1/2}$ — время удвоения; T_k — длительность культивирования (ч); \ln — натуральный логарифм; N_k — количество полученных клеток; N_0 — количество посеянных клеток.

МСК идентифицировали согласно критериям ISCT: адгезия к пластику веретеновидных клеток, наличие иммунологических маркеров CD44, CD105, CD73 и CD90, отсутствие экспрессии CD34, CD31, CD45, CD117, CD133 и HLA-DR. Иммунофенотип культуры МСК, а также количество клеток ALDH+ определяли методом проточной цитометрии с помощью лазерного проточного цитофлуориметра FACS Canto II. Панель реагентов включала в себя моноклональные антитела к указанным иммунологическим маркерам (набор Human MSC Analysis Kit компании BD Biosciences, США).

При сравнении результатов применяли непараметрический критерий Уилкоксона, коэффициент корреляции Пирсона. Значения $p < 0,05$ рассматривали как статистически значимые.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По светооптическим характеристикам МСК на всех этапах культивирования (P0–P3) представляли собой однородную популяцию крупных клеток, имеющих веретеновидную форму. При анализе иммунофенотипа клеток культуры отмечена экспрессия в высокой степени таких маркеров, как CD90 ($82,9 \pm 17,1 \%$), CD73 ($78,2 \pm 17,2 \%$), CD44 ($74,8 \pm 22,7 \%$), меньшая степень экспрессии CD105 ($19,3 \pm 10,2 \%$). При оценке первичного посева уровень примеси гемопоэтических стволовых клеток (CD34+) составил $3,5 \pm 1,8 \%$ от общего количества клеток, а к концу пассажа № 1 данный показатель снизился до $0,02-0,05 \%$. Аналогично выявлено снижение экспрессии антигенов гистосовместимости HLA класса II к 2–3 пересевам ($\leq 0,5 \%$). Полученные в процессе культивирования клеточные элементы практически не экспрессировали маркеры CD31 ($0-6,3 \%$), CD45 ($0-5,2 \%$), CD117 ($0-2,6 \%$) и CD133 ($0,2-3,8 \%$).

Степень экспрессии основных иммунологических маркеров культур МСК соответствует данным, представленным в литературе [2, 3]. Кроме того, иммунофенотипическая характеристика МСК не изменялась на протяжении четырех пассажей. По иммунологическим характеристикам культуры пластик-адгезивных клеток можно расценивать как мезенхимные с минимальной примесью гемопоэтических элементов. В связи с этим при определении количества клеток, экспрессирующих ALDH, можно пренебречь примесью гемопоэтических элементов.

Известно, что время достижения клетками первичного посева конфлюэнтного монослоя косвенно отражает количество мезенхимных стволовых элементов [18]. Время достижения степени 90–95%-го покрытия клетками поверхности флакона варьировало от 8 (пассаж № 1) до 15 дней (пассаж № 3). Динамика сроков достижения монослоя в процессе культивирования МСК представлена на рис. 1.

В целом указанные временные характеристики роста МСК костного мозга доноров соответствуют данным, представленным в литературе [18, 19]. Однако длительность каждого пассажа в какой-то мере зависит от плотности посева, т. е. количества клеток, внесенных в культуру. Для более полной характеристики пролиферативного потенциала МСК мы определили время удвоения культуры, не зависящее от количества взятых на посев клеток, а также изучили взаимосвязь между параметрами скорости роста культуры МСК и числом клеток, экспрессирующих ALDH (табл. 1).

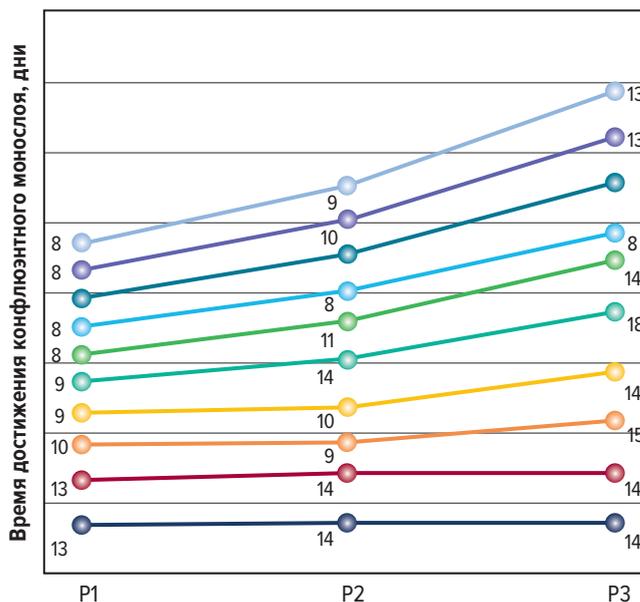


Рис. 1. Динамика сроков достижения конфлюэнтного монослоя на протяжении 3 пассажей (P1–P3)

Fig. 1. The progress in attainment of monolayer confluency within 3 passages (P1–P3)

Отмечена тенденция к увеличению времени удвоения количества клеток с $59,9 \pm 18,5$ (пассаж № 1) до $106,6 \pm 19,2$ ч (пассаж № 3), что свидетельствует о снижении пролиферативной активности МСК и старении культуры [20]. Выявленное снижение скорости роста оказалось статистически значимым (критерий Уилкоксона, $p < 0,05$). Корреляционный анализ показал прямую зависимость между возрастом донора и временем удвоения культуры (коэффициент Пирсона, $r = 0,6$ для P1, $r = 0,76$ для P2, $r = 0,83$ для P3), т. е. чем старше донор, костный мозг которого использован для получения культуры МСК, тем ниже скорость роста клеток.

Установлено статистически значимое уменьшение как относительного содержания клеток ALDH+ ($59,2 \pm 18,0 \%$ в продукте P1 до $28,2 \pm 10,7 \%$ в суспензии клеток P3; критерий Уилкоксона, $p < 0,05$), так и их абсолютного количества (от $16,7-112,6 \times 10^6$ в продукте первичного посева до $3,4-30,0 \times 10^6$ в концентрате клеток на пассаже

Таблица 1. Показатели скорости роста культуры и содержания мезенхимных клеток ALDH+

| Показатель | Пассаж | | | |
|---|--------------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | Первичный посев (n = 10) | № 1 (n = 10) | № 2 (n = 10) | № 3 (n = 10) |
| Время достижения конфлюэнтного монослоя, дни | 10–16 (медиана 13) | 8–13 (медиана 9) | 8–14 (медиана 11) | 8–18 (медиана 14) |
| Время удвоения культуры, ч | — | $59,9 \pm 18,5$ | $77,0 \pm 12,7$ | $106,6 \pm 19,2$ |
| Относительное содержание клеток ALDH+, % | $63,9 \pm 21,7$ | $59,2 \pm 18,0$ | $38,0 \pm 4,4$ | $28,2 \pm 10,7$ |
| Абсолютное содержание клеток ALDH+, $\times 10^6$ | $45,2 \pm 42,8$ | $26,4 \pm 22,0$ | $8,4 \pm 1,7$ | $11,47 \pm 2,9$ |

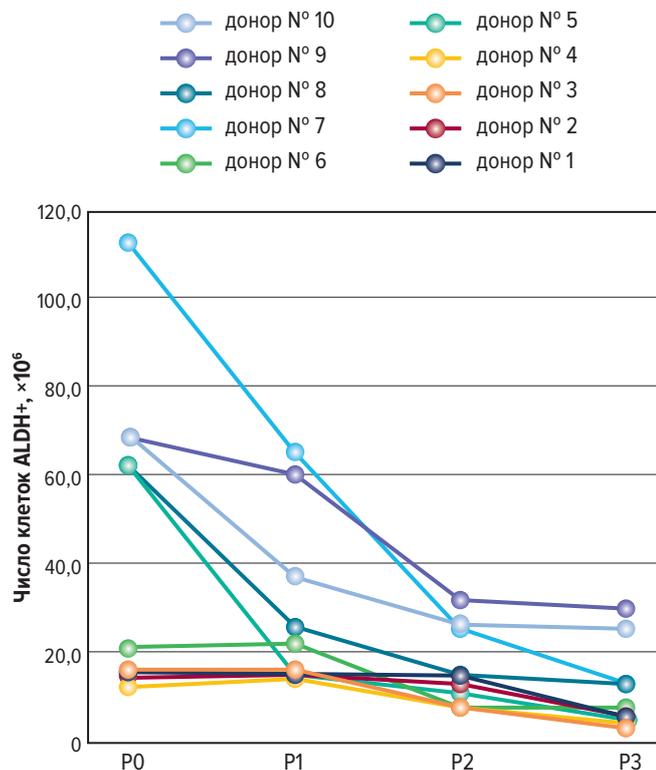


Рис. 2. Динамика количества клеток ALDH⁺ на протяжении 4 пассажей (P0–P3)

Fig. 2. ALDH⁺ cell count changes within 4 passages (P0–P3)

Таблица 2. Показатели скорости роста культур мезенхимных клеток в зависимости от плотности посева клеток ALDH⁺

| Плотность посева (количество клеток ALDH ⁺ /см ²) | Время удвоения культуры, ч | Время достижения конфлюэнтного монослоя, дни |
|--|-------------------------------|--|
| > 500 (n = 30) | 38,0–117,9 (медиана 60,8) | 8–14 (медиана 9) |
| ≤ 500 (n = 10) | 49,5–133,6 (медиана 94,5) | 8–18 (медиана 14) |

№ 3). Различия статистически значимы (критерий Уилкоксона, $p < 0,05$). Существенные отличия в количестве выделенных ALDH⁺ МСК на каждом пассаже связаны с возрастом доноров. Так, при сопоставлении количества ALDH⁺ МСК, полученных в результате первичного посева, с возрастом донора установлена обратная корреляционная зависимость: чем старше донор, тем меньшее количество ALDH⁺ МСК может быть выделено (коэффициент корреляции Пирсона, $r = -0,76$).

Динамика количества клеток ALDH⁺ на протяжении 3 пассажей представлена на рис. 2.

На рис. 1 и 2 видно, что снижение абсолютного числа клеток ALDH⁺ сопровождается уменьшением скорости роста культуры (увеличивается время достижения монослоя). Установлено, что скорость роста культуры МСК зависит от содержания клеток ALDH⁺. Коэффициент корреляции Пирсона r между количеством ALDH⁺ МСК, внесенных в культуру на пассажах № 1–3, и временем удвоения клеток на данных пассажах составил $-0,67$; между содержанием клеток ALDH⁺, нормированным на единицу площади культурального флакона, и временем достижения клетками конфлюэнтного монослоя $r = -0,61$. Таким образом,

клетки, обладающие активностью ALDH, обеспечивают самоподдержание популяции МСК.

Проведен корреляционный анализ между содержанием клеток ALDH⁺, полученных с первичного посева, и сроком достижения конфлюэнтного монослоя ($r = -0,66$), между количеством указанных клеточных элементов, внесенных в культуру на пассажах № 1–3, и временем удвоения клеток на данных пассажах ($r = -0,67$), а также между числом клеток ALDH⁺, нормированным на единицу площади культурального флакона, и временем достижения клетками конфлюэнтного монослоя ($r = -0,61$). Установлено, что скорость роста культуры МСК зависит от количества клеток ALDH⁺. С учетом определения стволовых клеток как элементов, обеспечивающих самоподдержание популяции [21], а также сильной зависимости между показателями скорости роста культуры и количеством клеток, экспрессирующих ALDH, можно предположить, что указанный фермент специфически маркирует ранние клетки-предшественницы, занимающие 1–2-й класс в структуре мезенхимной ниши в строме костного мозга [4, 5]. Мы изучили скорость роста культуры МСК при различной плотности посева клеток, экспрессирующих ALDH (табл. 2).

Из данных, приведенных в табл. 2, следует, что расчет плотности посева по содержанию ALDH⁺ МСК позволяет определить оптимальное количество клеток, необходимое для пересева, и сократить время удвоения культуры с 94,5 до 60,8 ч, а сроки достижения 90–95%-й конфлюэнтности — с 14 до 9 дней. Различия статистически значимы ($p < 0,05$). Рекомендуемое нами количество ALDH⁺ МСК для осуществления пассажа — более 500/см² площади флакона. Определение содержания ALDH⁺ МСК дает возможность прогнозировать скорость роста культуры и сроки получения клеточного продукта.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время стволовые клетки определяют как элементы, способные к самообновлению (самоподдержанию) своей популяции и дифференцировке в зрелые клетки, репопулирующие соответствующие ткани и органы [21]. В зависимости от типа клеток-предшественниц используют специфические маркеры для идентификации, выделения и обогащения клеточных популяций. В частности, гемопоэтические стволовые клетки могут быть идентифицированы по наличию антигенов CD34 и CD133 [22]. В то же время высокая ALDH-активность служит универсальным маркером стволовых клеток независимо от их линейной принадлежности [23].

ALDH играет ключевую роль в защите клеток-предшественниц от ксенобиотиков, а также в клеточной экспансии и их дифференцировке [24–27]. В настоящей работе выявлена корреляция показателей скорости роста культуры МСК костного мозга, отражающих их пролиферативный потенциал, с количеством элементов ALDH⁺, взятых для инициации культуры. Полученные нами результаты согласуются с данными M. Najjar и соавт. [15] о высокой степени экспрессии генов регуляции клеточного цикла в МСК, экспрессирующих ALDH.

Установлено, что с увеличением возраста донора пролиферативный потенциал и содержание ALDH+ МСК снижаются в равной степени. Это соответствует сведениям об уменьшении количества стволовых элементов в тканях человека с возрастом [28–30]. Исходя из полученных результатов, мы предполагаем, что изученный маркер ALDH может служить объективным критерием принадлежности клеточных элементов к категории ранних клеток-предшественниц.

ВЫВОДЫ

1. ALDH — маркер ранних мезенхимных клеток-предшественниц. Количество клеток, обладающих активностью указанного фермента, является объективным прогностическим критерием скорости роста культуры.
2. В костном мозге человека с увеличением возраста снижается содержание ALDH+ МСК.
3. Нормирование плотности посева по количеству МСК, экспрессирующих ALDH, позволяет оптимизировать сроки получения клеточного продукта.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках запланированной темы научно-исследовательской работы, согласно плану НИР ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России, и не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: К.А. Ветошкин, Н.В. Минаева, Н.В. Исаева.

Предоставление материалов исследования: все авторы.

Анализ и интерпретация данных: К.А. Ветошкин, Н.В. Минаева, Н.В. Исаева.

Подготовка рукописи: все авторы.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Осипова Е.Ю., Никитина В.А., Астрелина Т.А. и др. Динамика скорости роста, иммунофенотипа и генетическая стабильность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека на ранних и поздних пассажах при культивировании *ex vivo*. Онкогематология. 2009;4(1):44–50. [Osipova EYu, Nikitina VA, Astrelina TA, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cell growth rate dynamics, immunophenotype and genetic stability on early and late passages at *ex vivo* culturing. Onkogematologiya. 2009;4(1):44–50. (In Russ)]
2. Пулин А.А., Сабурина И.Н., Репин В.С. Поверхностные маркеры, характеризующие мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) костного мозга человека. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2008;3(3):25–30. [Pulin AA, Saburina IN, Repin VS. Surface markers of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC). Kletchnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya. 2008;3(3):25–30. (In Russ)]

3. Harichandan A, Sivasubramaniyan K, Buhning H-J. Prospective isolation and characterization of human bone marrow-derived MSCs. *Advances in biochemical engineering and biotechnology*. 2013;129:1–17. doi: 10.1007/10_2012_147.
4. Бигильдеев А.Е. Устройство и регуляция отдела стволовых мезенхимных клеток: Дис. ... д-ра биол. наук. М., 2017. [Bigildeev AE. Ustroistvo i regulyatsiya otdela stvolovykh mezenkhimnykh kletok. (Structure and regulation of mesenchymal stem cells.) [dissertation] Moscow; 2017. (In Russ)]
5. Шипунова И.Н. Иерархическая структура стромального микроокружения кроветворной ткани в норме и при заболеваниях системы крови: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2018. [Shipunova IN. Ierarkhicheskaya struktura stromalnogo mikrookruzheniya krovotvornoi tkani v norme i pri zabolevaniyakh sistemy krovi: (Hierarchical structure of stromal microenvironment of hematopoietic tissue in norm and disorder of blood system.) [dissertation] Moscow; 2018. (In Russ)]
6. Gordon MY, Goldman JM, Gordon-Smith EC. 4-hydroperoxycyclophosphamide inhibits proliferation by human granulocyte-macrophage colony-forming cells (GM-CFC) but spares more primitive progenitor cells. *Leuk Res*. 1985;9(8):1017–21. doi: 10.1016/0145-2126(85)90072-4.
7. Sahovic EA, Colvin M, Hilton J, Ogawa M. Role of aldehyde dehydrogenase in survival of progenitors for murine blast cell colonies after treatment with 4-hydroperoxycyclophosphamide *in vitro*. *Cancer Res*. 1988;48(5):1223–6.
8. Moreb JS, Turner C, Sreerama L, et al. Interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha induce class 1 aldehyde dehydrogenase mRNA and protein in bone marrow cells. *Leuk Lymphoma*. 1995;20(1–2):77–84. doi: 10.3109/10428199509054756.
9. Gentry T, Foster S, Winstead L, et al. Simultaneous isolation of human BM hematopoietic, endothelial and mesenchymal progenitor cells by flow sorting based on aldehyde dehydrogenase activity: implications for cell therapy. *Cytotherapy*. 2007;9(3):259–74. doi: 10.1080/14653240701218516.
10. Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1999;96(16):9118–23. doi: 10.1073/pnas.96.16.9118.
11. Fallon P, Gentry T, Balber AE, et al. Mobilized peripheral blood SSCloALDH+ brcells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. *Br J Haematol*. 2003;122(1):99–108. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04357.x.
12. Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L, et al. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood*. 2004;104(6):1648–55. doi: 10.1182/blood-2004-02-0448.
13. Najar M, Crompot E, van Grunsven LA, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in adipose tissue: isolation and gene expression profile of distinct sub-population of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2018;14(4):599–611. doi: 10.1007/s12015-017-9777-6.
14. Najar M, Crompot E, van Grunsven LA, et al. Aldehyde dehydrogenase activity of Wharton jelly mesenchymal stromal cells: isolation and characterization. *Cytotechnology*. 2019;71(1):427–41. doi: 10.1007/s10616-018-0283-8.
15. Najar M, Crompot E, van Grunsven LA, et al. Foreskin-derived mesenchymal stromal cells with aldehyde dehydrogenase activity: isolation and gene profiling. *BMC Cell Biol*. 2018;19(1):4. doi: 10.1186/s12860-018-0157-0.
16. Lange C, Kacioglu F, Spiess A, et al. Accelerated and Safe Expansion of Human Mesenchymal Stromal Cells in Animal Serum-Free Medium for Transplantation and Regenerative Medicine. *J Cell Physiol*. 2007;213(1):18–26. doi: 10.1002/jcp.21081.
17. Astori G, Amati E, Bambi F, et al. Platelet lysate as a substitute for animal serum for *ex-vivo* expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):93. doi: 10.1186/s13287-016-0352-x.
18. Sorokina T, Shipounova I, Bigildeev A, et al. Alterations of the bone marrow stromal microenvironment in adult patients with leukemia before and after the treatment. *Blood*. 2016;128(22):2668. doi: 10.1182/blood.v128.22.2668.2668.
19. Шипунова И.Н., Петинати Н.А., Сац Н.В. и др. Стромальные клетки-предшественники при остром лимфобластном лейкозе. Гематология и трансфузиология. 2014;59(S1):31. [Shipunova IN, Petinati NA, Sats NV, et al. Stromal progenitor cells in acute lymphoblastic leukemia. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2014;59(S1):31. (In Russ)]
20. Супотницкий М.В., Елапов А.А., Меркулов В.А. и др. Основные технологические процессы, используемые при производстве биомедицинских клеточных продуктов. Биопрепараты. 2015;2:36–45. [Supotnitskii MV, Elapov AA, Merkulov VA, et al. Common technological processes used in manufacture of biomedical cell culture products. *Biopreparaty*. 2015;2:36–45. (In Russ)]
21. Reya T, Mottison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105–11. doi: 10.1038/35102167.
22. Hess DA, Wirthlin L, Craft TP, et al. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2006;107(5):2162–9. doi: 10.1182/blood-2005-06-2284.
23. Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, et al. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*. 2006;24(4):975–85. doi: 10.1634/stemcells.2005-0217.
24. Sladek NE. Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(1):7–23. doi: 10.1002/jbt.10057.

- 25.** Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2006;103(31):11707–12. doi: 10.1073/pnas.0603806103.
- 26.** Muramoto GG, Russell JL, Safi R, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase expands hematopoietic stem cells with radioprotective capacity. *Stem Cells*. 2010;28(3):523–34. doi: 10.1002/stem.299.
- 27.** Sladek NE. Aldehyde dehydrogenase-mediated cellular relative insensitivity to the oxazaphosphorines. *Curr Pharm Des*. 1999;5(8):607–25.
- 28.** Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg*. 1994;21(3):429–35.
- 29.** Gneccchi M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Meth Mol Biol*. 2009;482:281–94. doi: 10.1007/978-1-59745-060-7_18.
- 30.** Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*. 2003;121(2):368–74. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04284.x.
-