

ФАСТОВА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ИЗУЧЕНИЕ СТРОМАЛЬНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА
У БОЛЬНЫХ ДИФфуЗНОЙ В-КЛЕТОЧНОЙ КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ
ЛИМФОМОЙ БЕЗ ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА В ДЕБЮТЕ
ЗАБОЛЕВАНИЯ И ПОСЛЕ ХИМИОТЕРАПИИ**

14.01.21 – гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

МОСКВА 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

Доктор медицинских наук **Магомедова Аминат Умарасхабовна**

Кандидат медицинских наук **Петинати Наталия Арнольдовна**

Официальные оппоненты:

Стуклов Николай Игоревич - доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», кафедра госпитальной терапии с курсами эндокринологии, гематологии и клинической лабораторной диагностики Медицинского института, профессор кафедры

Мякова Наталья Валерьевна - доктор медицинских наук, профессор, Мякова Наталья Валерьевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением онкогематологии ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ имени Д. Рогачева».

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «__» __ 2021 года в _____ часов

на заседании диссертационного совета Д 208.135.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125176, г. Москва, Новый Зыковский проезд, 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте blood.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2020 года

Ученый секретарь диссертационного совета,

Кандидат медицинских наук

Сысоева Елена Павловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Стромальное микроокружение костного мозга играет важную роль в кроветворении и патогенезе гематологических заболеваний [Петинати Н. А. и соавт., 2019; Савченко, В. Г. и соавт., 2016; Zhao, Z.-G. и соавт., 2007]. Современные исследования направлены на поиск инструмента для воздействия не только на стволовые кроветворные клетки, но и на клетки стромы – основного регулятора гемопоэза. Для того, чтобы понимать процессы, протекающие в строме костного мозга (КМ) при развитии гематологических заболеваний и изменений, связанных с терапией гемобластозов, необходимо детальное изучение морфологических и функциональных изменений в клетках-предшественницах стромального микроокружения. Известно, что у больных лейкозами изменены свойства клеток-предшественниц стромального микроокружения [Shipounova, I. N. и соавт., 2009; Vlau, O. и соавт., 2011]. Опухолевые клетки при лейкозах непосредственно взаимодействуют со стромальным микроокружением костного мозга. В этом случае невозможно по мере лечения разделить влияние опухолевых клеток и цитостатических препаратов, используемых в терапии.

У 10-25% больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ) с помощью гистологического или молекулярного методов исследования выявляется поражение костного мозга [Swerdlow, S. H. и соавт., 2017]. Считается, что у остальных пациентов с ДВККЛ костный мозг не вовлечен в опухолевый процесс. Поэтому, ДВККЛ без вовлечения костного мозга предоставляет собой уникальную возможность изучения дистантного влияния опухолевых клеток на строму костного мозга.

В зависимости от наличия или отсутствия признаков неблагоприятного прогноза существует несколько вариантов полихимиотерапии (ПХТ) при ДВККЛ. Больным старше 60 лет и/или же без признаков неблагоприятного прогноза применяют R-СНОР-21 и ему подобные курсы. По данным M.D. Anderson Cancer Center при использовании терапии СНОР-21 у больных ДВККЛ без признаков неблагоприятного прогноза частота полных ремиссий составляет 81%. Однако в группе неблагоприятного прогноза общая и бессобытийная выживаемость колеблется от 30 до 50% [Магомедова А.У. и соавт., 2005, Schmits R. и соавт., 2005; Bartlett, N. L. и соавт., 2019]. Поэтому пациентам с ДВККЛ моложе 60 лет, с двумя и более признаками неблагоприятного прогноза проводится высокодозная химиотерапия курсами R±mNHL-BFM-90 или R-DA-EPOCH с или без трансплантации аутологичных стволовых кроветворных клеток.

Несмотря на то, что применение высокодозной химиотерапии приводит к лучшим результатам, чем терапия по программе R-СНОР, при ее использовании отмечается более выраженная гематологическая и негематологическая токсичность [Магомедова, А. У. и соавт., 2008; Panny, M. и соавт., 2016]. По данным исследователей, даже через годы после применения высокодозной ПХТ и трансплантации стволовых клеток сохраняется отдаленная гематологическая токсичность [Грибанова Е.О., 2005; Дорохина Е.И., 2015]. Это предоставляет уникальную возможность оценить воздействие различных цитотоксических препаратов, используемых в терапии, как непосредственно после терапии, так и более чем через 5 лет после ее завершения.

Степень разработанности темы диссертации

При лимфопролиферативных заболеваниях костный мозг не всегда вовлечен в опухолевый процесс. Мало исследований, посвященных стромальному микроокружению костного мозга при лимфомах, в том числе при ДВККЛ. Показано, что лучевая и химиотерапия вызывают количественные и качественные повреждения стромы костного мозга. У больных ДВККЛ отмечается снижение плотности костей после химиотерапии, что может быть связано с изменениями стромальных клеток-предшественниц. Отсутствуют работы, оценивающие изменения клеток-предшественниц костного мозга при ДВККЛ до химиотерапии и на разных этапах химиотерапевтического воздействия.

Цель исследования

Изучить изменения клеток-предшественниц стромального микроокружения КМ у больных ДВККЛ без поражения КМ в дебюте заболевания и на разных сроках после завершения лечения.

Задачи исследования

1. Оценить морфологические и функциональные характеристики стромальных клеток-предшественниц костного мозга –мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) и колониобразующих единиц фибробластов (КОЕф) у больных ДВККЛ в дебюте заболевания.
2. Проанализировать морфологические и функциональные характеристики стромальных клеток-предшественниц костного мозга у больных ДВККЛ на разных сроках после окончания химиотерапевтического лечения.
3. Изучить изменения стромальных клеток-предшественниц костного мозга у больных ДВККЛ более чем через 5 лет после различных курсов химиотерапии.

4. Проследить за изменениями костной ткани у пациентов с ДВККЛ в дебюте заболевания и после достижения ремиссии на отдаленных сроках после окончания лечения.

5. Исследовать влияние растворимых факторов в плазме больных ДВККЛ на МСК *in vitro*.

Научная новизна исследования

Проведена динамическая оценка основных характеристик клеток-предшественниц стромы костного мозга (МСК и КОЕ-Ф) у больных первичной (*de novo*) ДВККЛ до начала и на разных сроках после завершения химиотерапии. Выявлены изменения костной ткани у больных ДВККЛ.

Теоретическая и практическая значимость

Изучение стромального микроокружения у пациентов с ДВККЛ без поражения костного мозга позволит уточнить влияние опухолевых клеток на клетки-предшественницы костного мозга в дебюте заболевания. Исследование клеток-предшественниц стромального микроокружения КМ на разных этапах химиотерапевтического воздействия и более чем через 5 лет после окончания терапии предоставит возможность оценить токсическое влияние различных курсов химиотерапии, исключив непосредственное влияние опухолевых клеток.

Положения, выносимые на защиту

1. У пациентов ДВККЛ без поражения КМ в дебюте заболевания изменяются свойства стромальных клеток КМ.

2. Химиотерапия изменяет характеристики стромальных клеток-предшественниц и эти изменения носят долгосрочный характер.

3. Молекулярно-биологические и биохимические показатели морфогенеза костной ткани у больных ДВККЛ нарушены, однако нет изменений на уровне скелета.

4. Изменения стромальных предшественников костного мозга происходят под действием растворимых факторов, секретируемых опухолевыми клетками.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность выводов обеспечена кропотливой работой с литературными источниками по теме диссертации, детальной разработкой лабораторной, инструментальной и экспериментальной частей исследования, включением в исследование большого количества образцов КМ пациентов, достаточного для достоверного использования методов статистического анализа. Полученные результаты представлены в

виде устных и стендовых докладов, тезисов на конгрессах, съездах и конференциях: всероссийской конференции с международным участием “StemCellBio–2018: Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины” (Санкт-Петербург, 2018 г.), V международной конференции «Постгеном’2018» (Казань, 2018), XXII Wilsede Meeting 2018 MODERN TRENDS IN HUMAN LEUKEMIA & CANCER (Вильзеде, 2018), IV конгрессе гематологов России (Москва, 2018), 23-м конгрессе Европейского общества гематологов (Стокгольм, 2018), 24-м конгрессе Европейского общества гематологов (Амстердам, 2019), IV национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019), 61-ом съезде американского общества гематологов (Орландо, 2019).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 2 статьи, из которых – 2 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, а также 9 тезисных сообщений (5 на русском языке и 4 на английском языке).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и библиографического указателя, включающего 193 работ. Текст работы содержит 13 таблиц, 32 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 86 больных, 40 мужчин и 46 женщин, в возрасте от 30 до 79 лет, с установленным диагнозом ДВККЛ, без вовлечения костного мозга. Из них 40 пациентов с впервые установленным диагнозом ДВККЛ, не получавших лечение до включения в исследование. Всем пациентам выполнена трепанбиопсия для исключения поражения костного мозга. Пациентам с промежуточным и высоким риском по МПИ проводилась ПХТ в рамках рандомизированного исследования ДВККЛ–2015 (n=23): терапию по программе R-mNHL-BFM-90 получили 13 пациентов, по протоколу R-DA-EPOCH 10 пациентов. Из них 8 пациентам произведена трансплантация аутологичных стволовых кроветворных клеток. Пациентам, в возрасте старше 65 лет и/или низкой группой риска, проводилась терапия по протоколу R-CHOP-21 (n=17). Исследование стромальных клеток-предшественниц костного мозга в этой группе осуществлялось до начала ХТ, через месяц и через 6 месяцев с момента завершения терапии.

Другую группу составили 46 пациентов (19 пациентов после R±CHOP, 27 пациентов после R±mNHL-BFM-90), завершившие лечение 5 и более лет назад.

Контрольную группу составили образцы КМ, полученных от здоровых доноров, в возрасте 30–78 лет. Доноров подбирали сопоставимо с возрастом больных, включенных в исследование.

Комплексное обследование костной ткани проведено у 49 человек: 11 больных ДВККЛ до начала ХТ, 24 пациентам с ДВККЛ, которым была завершена терапия R±CHOP-21 (11 пациентов) или по программе R±mNHL-BFM-90 (13 пациентов) 5 лет и более назад. Контрольную группу составили 14 человек соответствующего возраста, не имеющих гематологических заболеваний. Исследуемые группы были сопоставимы по возрасту. Доноры и больные были информированы о проведении экспериментального исследования и подписали информированное согласие.

Лечение пациентов проводилось в отделении интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов с круглосуточным и дневным стационарами (заведующий отделением к.м.н. С.К. Кравченко). Исследование основных характеристик стромальных клеток-предшественниц МСК и КОЕ-Ф осуществлялось в лаборатории физиологии кроветворения (заведующая лабораторией д.б.н. Н.И. Дризе). Во время эксфузии КМ доноров получали в отделении трансплантации КМ в ФГБУ НМИЦ гематологии МЗ РФ (заведующая отделением к.м.н. Л.А. Кузьмина, руководитель отдела д.м.н. Е.Н. Паровичникова) и в отделении ортопедии (заведующий отделением к.м.н. В.Е. Мамонов) после подписания информированного согласия.

После эксфузии костный мозг помещали в стерильные пробирки, содержащие гепарин, разводили в 2 раза средой с aMEM и 0,2 % метилцеллюлозы. При комнатной температуре оставляли на 45 минут, затем собирали надосадочную жидкость и осаждали центрифугированием при температуре 10–12°C в течение 10 минут. Определяли количество ядерных клеток при подсчете с генцианвиолетом. Далее клетки сажали во флакон, культивировали до формирования монослоя и рассаживали по 100×10^3 клеток на флакон. Культивировали клетки до третьего пассажа.

Для подсчета колоний колониеобразующих единиц фибробластов 1×10^6 ядерных клеток рассаживали на 3 флакона с площадью дна 25 см^2 . Культивировали клетки в течение 2–х недель. После этого клетки окрашивали 0,1 % раствором кристаллического фиолетового на 20 % метаноле и осуществляли подсчет колоний.

Методом проточной цитометрии определяли уровень экспрессии антигенов на поверхности МСК. После снятия МСК со дна флакона их дважды отмывали раствором CellWash, а затем 2×10^4 клеток инкубировали в течение 20 минут в темноте с моноклональными антителами анти-CD90, анти-CD54, анти-CD73, анти-CD105, анти-CD146. Анализ данных осуществляли с помощью проточного цитометра.

Популяцию МСК определяли по параметрам прямого и бокового светорассеяния, а также экспрессии на поверхности клеток антигена CD90.

Экспрессию интересующих генов определяли с помощью полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени, модификация Taqman, с использованием специфических праймеров и зондов.

Для анализа действия плазмы больных ДВККЛ на МСК из КМ здоровых доноров были использованы 10 образцов донорских МСК (4 мужчин и 6 женщин, в возрасте от 14 до 50 лет, медиана возраста 33 года). МСК культивировали 10 дней в бессывороточной среде (StemPro, Gibco) в присутствии 10 % плазмы 5 здоровых доноров (1 муж 34 года, 4 женщины, в возрасте 34, 40, 59 и 66 лет) и плазмы 8 больных ДВККЛ до и через месяц после окончания лечения. Анализировали средний уровень флуоресценции и относительный уровень экспрессии некоторых генов.

Денситометрия выполнялась на костном двухэнергетическом рентгеновском остеоденситометре Discovery A, «Hologic».

Статистический анализ в группах оценивали при помощи t-критерия Стьюдента, U-критерия Манна-Уитни и T-критерием Уилкоксона. Тесноту и направление корреляционной связи при анализе относительного уровня экспрессии генов определяли методом ранговой корреляции Спирмена. Результаты были обработаны с помощью программ GraphPad Prism.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменение свойств клеток-предшественниц стромального микроокружения при ДВККЛ до и после терапевтического воздействия

Несмотря на отсутствие поражения костного мозга, у пациентов в дебюте заболевания суммарная клеточная продукция МСК за 4 пассажа была достоверно выше по сравнению с донорами соответствующего возраста (Рисунок 1).

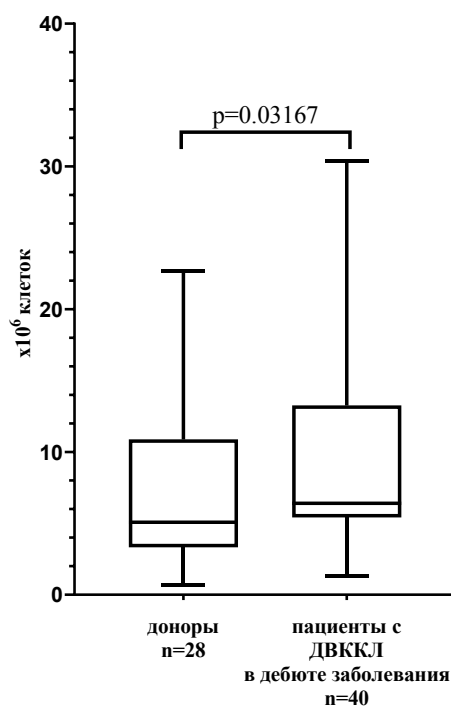


Рисунок 1 – Суммарная клеточная продукция МСК за 4 пассажа здоровых доноров и больных ДВККЛ в дебюте заболевания. Границы бокса — первый и третий квартили (5–й и 95–й процентиля), линия в центре ранжированного ряда — медиана (50–й процентиль). Концы усов — минимальное и максимальное значения полученных данных.

Концентрация КОЕф в КМ и время, необходимое для достижения конfluenceнтности после исходной посадки (время до P0) не отличалось в культурах МСК больных ДВККЛ и здоровых доноров.

Анализ морфологических и иммунофенотипических характеристик МСК из КМ больных ДВККЛ показал, что МСК доноров имеют более высокий показатель прямого светорассеяния в сравнении с МСК пациентов до начала ПХТ ($p < 0,0001$). Это говорит о том, что изменены не только культуральные характеристики клеток-предшественниц КМ, но и морфологические.

Была проанализирована экспрессия некоторых генов в МСК пациентов с ДВККЛ в дебюте заболевания (Таблица 1).

Таблица 1 – Относительный уровень экспрессии генов в МСК доноров и у пациентов до начала терапии

Относительный уровень экспрессии	Доноры	Пациенты с ДВККЛ до начала ХТ
<i>MMP2</i>	$3,9 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,3$

<i>SPP1</i>	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,02
<i>BGLAP</i>	2,0 ± 0,7	1,8 ± 0,2
<i>IL6</i>	11,3 ± 3,1	14,1 ± 2,4
<i>TGFb</i>	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1
<i>PDGFRβ</i>	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,05
<i>PPARg</i>	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1
<i>SOX9</i>	1,5 ± 0,2	1,1 ± 0,1
<i>FGF2</i>	5,1 ± 0,6	8,7 ± 1,4*
<i>FGFR1</i>	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,05
<i>FGFR2</i>	2,2 ± 0,2	3,4 ± 0,3*
<i>VEGF</i>	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,03
<i>ICAM1</i>	1,2 ± 0,2	0,9 ± 0,2
<i>SMURF</i>	3,7 ± 0,2	3,3 ± 0,2
<i>BMP4</i>	1,2 ± 0,2	0,8 ± 0,08
<i>BMP2</i>	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,2
<i>IL8</i>	0,2 ± 0,06	2,3 ± 0,7*
<i>MCAM</i>	5,3 ± 0,8	6,3 ± 0,8
<i>SDF1</i>	1,6 ± 0,1	2,5 ± 0,2*

* – достоверные различия между МСК доноров и пациентов в дебюте заболевания

Выявлено повышение относительного уровня экспрессии гена *FGF2*, его рецептора *FGFR2* и снижение *FGFR1*. Повышение *FGF2*, одного из основных факторов роста МСК согласуется с увеличением суммарной клеточной продукции МСК больных в дебюте заболевания. Описано участие FGF2 в прогрессе опухоли, в том числе при ДВККЛ. Показано, что FGF2 секретируется стромальными клетками костного мозга в экзосомах, которые поглощаются опухолевыми клетками и увеличивают их устойчивость к терапии

Показано повышение экспрессии гена фактора, регулирующего миграцию гемопоэтических клеток в КМ – *SDF1*. Можно предполагать, что повышение экспрессии *SDF1* в клетках-предшественницах КМ отражает один из путей подготовки для распространения опухоли. Обнаружено достоверное повышение экспрессии гена провоспалительного фактора *IL-8*, что может быть связано с системным ответом организма на опухолевый процесс.

Таким образом, культуральные, морфологические и функциональные характеристики МСК у больных ДВККЛ в дебюте заболевания изменены. Наличие данных изменений позволило предположить влияние внекостномозговых опухолевых клеток на стромальные клетки-предшественницы КМ.

В работе приведена единая группа пациентов после окончания терапии, так как различий в МСК пациентов через месяц и полгода после окончания терапии в зависимости от проведенного лечения выявлено не было. Вероятнее всего это связано с тем, что клетки-

предшественники КМ более устойчивы к химиотерапии, чем гемопоэтические клетки-предшественники и физиологически медленнее обмениваются в организме.

Не было выявлено достоверных отличий в культуральных свойствах МСК через месяц, 6 месяцев после окончания терапии и после аутоТСКК по сравнению с дебютом заболевания.

У пациентов через месяц после окончания терапии сохранялись достоверные отличия суммарной клеточной продукции МСК за 4 пассажа по сравнению с донорами (Рисунок 2).

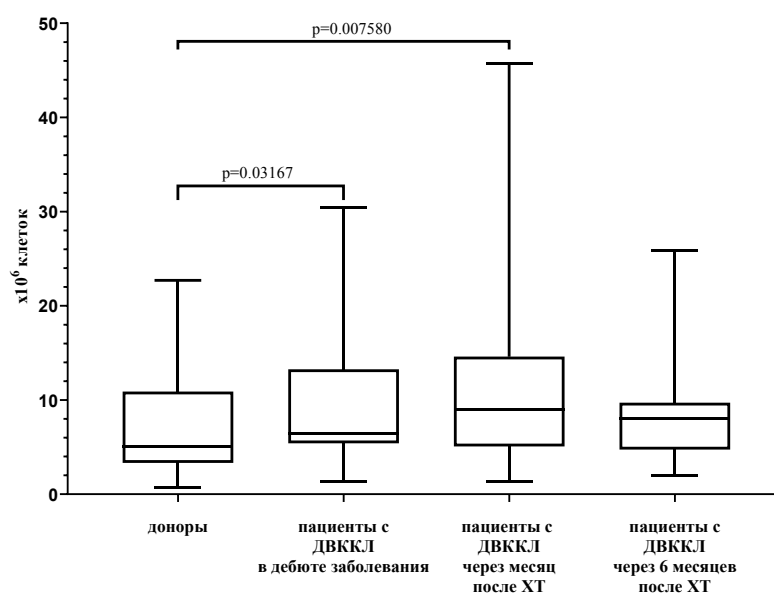


Рисунок 2 – Суммарная клеточная продукция МСК за 4 пассажа здоровых доноров и больных ДВККЛ на разных этапах терапии

Границы бокса — первый и третий квартили (5–й и 95–й процентиля), линия в центре ранжированного ряда — медиана (50–й процентиль). Концы усов — минимальное и максимальное значения полученных данных.

У пациентов до начала терапии наблюдалась тенденция к снижению концентрации КОЕф в КМ по сравнению с донорами, однако разница недостоверна. Через месяц после завершения ПХТ концентрация КОЕф в КМ пациентов была достоверно выше по сравнению с дебютом заболевания и при этом приближена к таковой у здоровых доноров. Это свидетельствует о восстановлении клеток-предшественниц после достижения ремиссии.

Таким образом, культуральные свойства МСК изменены не только в дебюте заболевания, но и через месяц после окончания терапии. После элиминации опухоли, которая повреждала МСК, отмечалось постепенное восстановление большинства свойств клеток-предшественниц КМ. Через месяц после окончания ПХТ в большинстве характеристик МСК и КОЕф отсутствовали достоверные изменения культуральных свойств.

Показатель прямого светорассеяния МСК у пациентов через месяц после завершения ПХТ был более высоким, чем у тех же пациентов в дебюте заболевания, при этом достоверно не отличался от значения у МСК доноров. Показатель бокового светорассеяния у больных ДВККЛ через месяц после окончания лечения возрастал по сравнению с дебютом заболевания. Таким образом морфологические характеристики МСК у больных ДВККЛ после завершения терапии частично восстанавливались.

При анализе СУФ некоторых антигенов в МСК больных после завершения терапии в сравнении с МСК пациентов до начала лечения были выявлены значительных отличия (Таблица 2).

Таблица 2 – Средний уровень флуоресценции основных поверхностных антигенов МСК через месяц после завершения терапии

Исследуемые группы	CD54 (ICAM1)	CD146 (MCAM)	CD73 (NT5E)	CD90 (THY1)	CD105 (ENG)
Доноры	72 ± 16	291 ± 69	632 ± 57	6760 ± 761	610 ± 139
Больные ДВККЛ до ПХТ	110 ± 28**	292 ± 130**	907 ± 285**	5130 ± 980	1147 ± 431**
Больные ДВККЛ после ПХТ	456 ± 124^Δ**	1007 ± 245^Δ**	1433 ± 433**	5739 ± 651	4578 ± 1159^Δ**

Δ – достоверное отличие от доноров

** – достоверное отличие между группами до и после лечения

После лечения возрастала экспрессия молекул адгезии ICAM1 (CD54), повышенной также в дебюте заболевания и MCAM (CD146). Также после завершения ПХТ увеличивалась экспрессия CD73. Все эти молекулы регулируют удержание кроветворных клеток в нише. Таким образом после достижения ремиссии происходит дальнейшее усиление взаимодействия МСК больных ДВККЛ с кроветворными клетками, что наиболее вероятно связано с проведенной ПХТ. Также после достижения ремиссии на МСК продолжала возрастать экспрессия CD105 (ENG), отвечая не на присутствие опухоли в организме, а на воздействие химиопрепаратов.

После проведения химиотерапии отмечено изменение экспрессии генов в МСК (Таблица 3).

Таблица 3 – Относительный уровень экспрессии генов в МСК пациентов на разных этапах терапии

Относительный уровень экспрессии	Доноры	Пациенты с ДВККЛ до ХТ	Пациенты через месяц после ХТ	Пациенты через 6 месяцев после ХТ
<i>MMP2</i>	3,9 ± 0,4	3,2 ± 0,3	2,3 ± 0,3	2,4 ± 0,3
<i>SPP1</i>	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,04	0,2 ± 0,05*
<i>BGLAP</i>	2,0 ± 0,7	1,8 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,8 ± 0,3
<i>IL6</i>	11,3 ± 3,1	14,1 ± 2,4	21,3 ± 2,9*×	16,9 ± 4,03*
<i>TGFb</i>	1,1 ± 0,07	0,9 ± 0,06	0,8 ± 0,1*×	0,7 ± 0,1*×
<i>PDGFRβ</i>	0,8 ± 0,07	0,7 ± 0,05	0,5 ± 0,07*	0,5 ± 0,08*
<i>PPARg</i>	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,4*×	1,4 ± 0,2
<i>SOX9</i>	1,5 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,5	1,2 ± 0,1
<i>FGF2</i>	5,1 ± 0,6	8,7 ± 1,4*	9,4 ± 1,9*	7,2 ± 1,8
<i>FGFR1</i>	0,9 ± 0,07	0,7 ± 0,05*	0,7 ± 0,1*	0,6 ± 0,1*
<i>FGFR2</i>	2,2 ± 0,2	3,4 ± 0,3*	2,6 ± 0,3*	2,6 ± 0,4*
<i>VEGF</i>	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,05	0,1 ± 0,02
<i>ICAM1</i>	1,2 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,3	0,5 ± 0,1
<i>SMURF</i>	3,7 ± 0,2	3,3 ± 0,2	2,5 ± 0,2*×	2,4 ± 0,2
<i>BMP4</i>	1,2 ± 0,2	0,8 ± 0,09	0,8 ± 0,1	1,4 ± 0,3
<i>BMP2</i>	1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,3	0,9 ± 0,2
<i>IL8</i>	0,2 ± 0,06	2,3 ± 0,7*	4,8 ± 1,6*×	2,2 ± 0,9*×
<i>MCAM</i>	5,3 ± 0,8	6,3 ± 0,8	5,2 ± 0,9	4,2 ± 0,9
<i>SDF1</i>	1,6 ± 0,1	2,5 ± 0,7*	2,4 ± 0,3	1,9 ± 0,5

* достоверные различия по сравнению с контрольной группой

× достоверные различия по сравнению с больными ДВККЛ в дебюте заболевания

Через месяц после ПХТ экспрессия *IL6* достоверно возросла по сравнению с дебютом заболевания. По мере лечения экспрессия данного гена постепенно снижалась, однако все равно оставалась достоверно выше, чем у доноров.

До начала терапии экспрессия *IL8* была увеличена по сравнению с донорами. Через месяц после завершения курсов ПХТ экспрессия *IL8* достоверно продолжала повышаться. После 6 месяцев наблюдалась тенденция к нормализации, однако уровень все еще сохранялся достоверно выше, чем у пациентов до начала терапии и здоровых доноров.

Повышение провоспалительных цитокинов через месяц после окончания лечения может быть обусловлено реакцией организма на распад опухолевой ткани, а также инфекционными процессами, которыми осложняются междолевые периоды. В пользу данных предположений свидетельствует дальнейшее постепенное снижение уровней экспрессии этих интерлейкинов.

Экспрессия *FGF2* была повышена в МСК больных по сравнению с донорами, что хорошо согласуется с повышением суммарной клеточной продукции МСК у пациентов с ДВККЛ. Не отмечалось достоверной разницы в экспрессии *FGF2* в МСК из КМ пациентов в дебюте заболевания и в течение полугода после завершения терапии. Экспрессия *FGF2* оставалась повышенной, и только после 6 месяцев отличия от здоровых доноров становились недостоверными. После ПХТ отмечается дальнейшее снижение экспрессии *FGFR1*. Достоверность отличий от доноров при этом возрастает. Относительный уровень экспрессии *FGFR2* в МСК больных ДВККЛ достоверно снижен через месяц после окончания лечения, и отмечено его частичное восстановление после 6 месяцев по сравнению с дебютом заболевания.

В дебюте заболевания отсутствовали достоверные различия экспрессии в МСК КМ гена *TGFb*. Однако через 1 и 6 месяцев после завершения ПХТ отмечено снижение экспрессии этого гена. *TGFb* удерживает стволовые гемопоэтические клетки в состоянии покоя. Снижение экспрессии этого гена указывает на опосредованную стимуляцию стволовых кроветворных клеток в ответ на ПХТ.

Пролиферация МСК активируется через сигнальные пути *FGF*, *PDGF* и *TGFb*. Отсутствие изменений в экспрессии *PDGFRb* и *TGFb* в дебюте заболевания и постепенное ее снижение после окончания ПХТ может носить компенсаторный характер, связанный с сохраняющейся повышенной экспрессией *FGF2* и повышенной пролиферативной активностью МСК.

Несмотря на отсутствие достоверных различий в экспрессии *SPP1* в МСК пациентов до начала терапии и доноров, экспрессия данного гена через 6 месяцев после окончания терапии была достоверно выше по сравнению с донорами. Это может свидетельствовать о нарушениях остеогенной дифференцировки, которые проявляются лишь через некоторое время после начала болезни. В МСК больных в дебюте заболевания экспрессия *SMURF* не была изменена. После окончания лечения экспрессия этого гена снижена и остается таковой, как минимум на протяжении 6 месяцев. Кодированный этим геном белок участвует в морфогенезе кости и изменение его экспрессии подтверждает нарушение костной дифференцировки МСК.

Изменение стромального микроокружения у больных ДВККЛ 5 лет и более назад, завершивших химиотерапию

Культуральные характеристики МСК более чем через 5 лет после ПХТ нормализовались: суммарная клеточная продукция МСК за 4 пассажа, время до P0, концентрация КОЕф не отличались по сравнению с донорами и пациентами до начала ПХТ.

МСК доноров имели достоверно более высокий показатель прямого светорассеяния в сравнении с больными на отдаленных сроках независимо от проведенного курса ПХТ. Показатель бокового светорассеяния у больных ДВККЛ на отдаленных сроках после терапии по программе R±mNHL-BFM-90 был достоверно ниже, чем в группе доноров. Полученные данные указывают на изменения морфологических характеристик МСК, сохраняющихся в течении многих лет у пациентов с полной ремиссией заболевания.

Через годы после ПХТ по программе R±mNHL-BFM-90 экспрессия CD54 на поверхности МСК пациентов оставалась достоверно повышенной в сравнении с МСК доноров (Таблица 4).

Таблица 4 – Средний уровень флуоресценции основных поверхностных антигенов МСК у пациентов с ДВККЛ через 5 и более лет после завершения ПХТ

Исследуемые группы	CD54 (ICAM1)	CD146 (MCAM)	CD73 (NT5E)	CD90 (THY1)	CD105 (ENG)
Доноры	72 ± 16	291 ± 69	632 ± 57	6760 ± 761	610 ± 139
Более 5 лет после R±CHOP	242 ± 104	486 ± 72*	1998 ± 250*^Δ	4527 ± 335^Δ	1757 ± 274^Δ
Более 5 лет после R±mNHL-BFM-90	208 ± 51^Δ	284 ± 74	920 ± 108^Δ	6820 ± 967	1332 ± 265^Δ

Δ – достоверное отличие от доноров

* – достоверные отличия между группами больных через много лет после лечения

Уровень экспрессии CD146 нормализовался, однако, после ПХТ по программе R±CHOP он был достоверно выше, чем на МСК больных после R±mNHL-BFM-90. Экспрессия CD73 сохранялась повышенной в течение многих лет после завершения ПХТ, и эти изменения более выражены после R±CHOP, чем после R±mNHL-BFM-90. Увеличение экспрессии описанных антигенов говорит о более активном взаимодействии МСК больных ДВККЛ после лечения с кроветворными клетками, несмотря на длительное отсутствие химиотерапевтических препаратов. Через много лет после лечения экспрессия CD105 оставалась достоверно выше, чем в контрольной группе. Несмотря на то, что экспрессия CD90 (THY1) через месяц после лечения не отличалась от доноров, через много лет после ПХТ по программе R±CHOP она была достоверно ниже в сравнении с донорами. Учитывая, что в дебюте заболевания достоверных отличий от поверхностных антигенов доноров выявлено не было, вероятнее всего эта активация – следствие цитостатической терапии.

Экспрессия некоторых генов сохраняется изменённой даже через годы после завершения ПХТ (Таблица 5).

Таблица 5 – Относительный уровень экспрессии генов в МСК пациентов с ДВККЛ через многие годы после завершения ПХТ

Относительный уровень экспрессии	Доноры	Пациенты с ДВККЛ более 5 лет после R±СНОР	Пациенты с ДВККЛ более 5 лет после R±mNHL-BFM-90
<i>MMP2</i>	3,9 ± 0,4	2,1 ± 0,3*	2,7 ± 0,2
<i>SPP1</i>	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,08*
<i>BGLAP</i>	2,04 ± 0,7	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,3
<i>IL6</i>	11,3 ± 3,1	8,6 ± 1,7	7,2 ± 1,0
<i>TGFb</i>	1,1 ± 0,07	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,06*
<i>PDGFRβ</i>	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,05	0,9 ± 0,1
<i>PPARg</i>	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,2	2,4 ± 0,3×
<i>SOX9</i>	1,5 ± 0,2	0,9 ± 0,1*	1,2 ± 0,2
<i>FGF2</i>	5,1 ± 0,6	4,8 ± 0,8	4,2 ± 0,3
<i>FGFR1</i>	0,9 ± 0,07	0,6 ± 0,05*	0,6 ± 0,04*
<i>FGFR2</i>	2,2 ± 0,2	2,9 ± 0,2	4,5 ± 0,5
<i>VEGF</i>	0,2 ± 0,04	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01
<i>ICAM1</i>	1,2 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,05
<i>SMURF</i>	3,7 ± 0,2	3,1 ± 0,3	4,3 ± 0,4
<i>BMP4</i>	1,2 ± 0,2	0,7 ± 0,3*	0,6 ± 0,2*
<i>BMP2</i>	1,2 ± 0,3	0,4 ± 0,05	0,4 ± 0,04
<i>IL8</i>	0,2 ± 0,06	0,2 ± 0,06	0,1 ± 0,04
<i>MCAM</i>	5,3 ± 0,8	5,8 ± 0,8	5,6 ± 0,8
<i>SDF1</i>	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,2	2,4 ± 0,3*

* достоверные различия МСК по сравнению с донорами

× достоверные различия между МСК больных ДВККЛ через много лет в зависимости от терапии

У пациентов с ДВККЛ в отдаленном периоде после ПХТ нормализовалась экспрессия генов *FGF2* и *FGFR2*. Экспрессия *TGFb* в МСК пациентов с ДВККЛ через 5 лет после курсов R±mNHL-BFM-90 достоверно была снижена, это говорит о том, что СКК, взаимодействующие с МСК, могут находиться в активированном состоянии. Экспрессия *SPP1* достоверно была повышена через 6 месяцев после окончания ПХТ и осталась повышенной через годы после завершения терапии в обеих группах. Тенденция к снижению *MMP2* наблюдалась у всех пациентов с ДВККЛ через 1 и 6 месяцев после окончания терапии. Через много лет эти изменения не только не уменьшились, но и стали достоверными в МСК пациентов, которым проведена терапия R±СНОР. Экспрессия *BMP4* в МСК в обеих группах через много лет после окончания лечения была достоверно ниже в

сравнении с группой доноров. Таким образом экспрессия большинства проанализированных генов, связанных с остеогенной дифференцировкой МСК и морфогенезом кости, была изменена спустя много лет после окончания терапии.

Экспрессия *SOX9* достоверно снижалась у пациентов с ДВККЛ через многие годы после R±CHOP. Несмотря на то, что терапия R±mNHL-BFM-90 является более токсичной, в отдаленные периоды снижение экспрессии *SOX9* было более выражено после терапии R±CHOP.

Экспрессия *SDF1* была повышена у всех пациентов с ДВККЛ на разных этапах терапии. В дебюте заболевания - это повышение было достоверно. Через много лет после окончания терапии повышение экспрессии *SDF1* оставалось достоверным в МСК пациентов, которых лечили по программе R±mNHL-BFM-90.

Суммируя изменения в морфологических и функциональных характеристиках МСК больных, находящихся в полной ремиссии заболевания более 5 лет после проведения различных курсов химиотерапии, можно предполагать, что тяжесть курса ПХТ неоднозначно влияет на различные морфофункциональные параметры МСК. У изученных пациентов восстановление стромальных клеток-предшественниц происходило лучше после более тяжелого курса R±mNHL-BFM-90.

В основном выявленные длительно сохраняющиеся изменения затрагивают экспрессию генов, участвующих в пролиферации и остеогенной дифференцировке МСК. Учитывая отсутствие опухолевых клеток в КМ было предположено, что эти изменения вызваны секретируемыми опухолью растворимыми факторами.

Исследование влияния плазмы больных ДВККЛ на МСК здоровых доноров

Культивирование МСК доноров в присутствии плазмы больных до лечения снижало клеточную продукцию МСК, а после окончания лечения повышала ее (Рисунок 3).

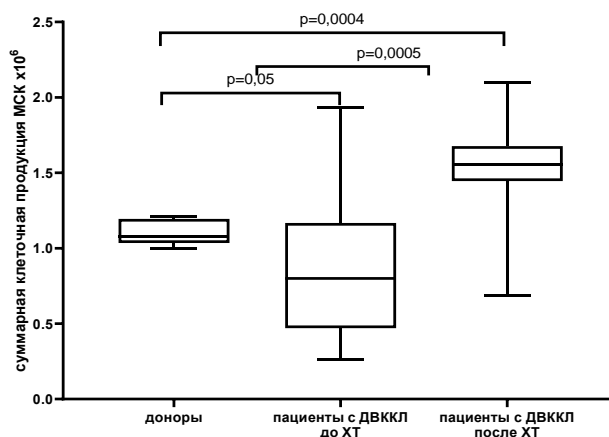


Рисунок 3 – Суммарная клеточная продукция МСК доноров. Клетки культивировали в присутствии плазмы здоровых доноров и больных ДВККЛ до и после окончания лечения.

Границы бокса — первый и третий квартили (5–й и 95–й процентиля), линия в центре ранжированного ряда — медиана (50–й процентиль). Концы усов — минимальное и максимальное значения полученных данных.

Анализ поверхностных маркеров МСК доноров после культивирования в присутствии плазмы здоровых доноров и больных ДВККЛ показал, что экспрессия HLA-DR и CD146 (МСАМ) повышены при культивировании МСК доноров с плазмой больных (Рисунок 4).

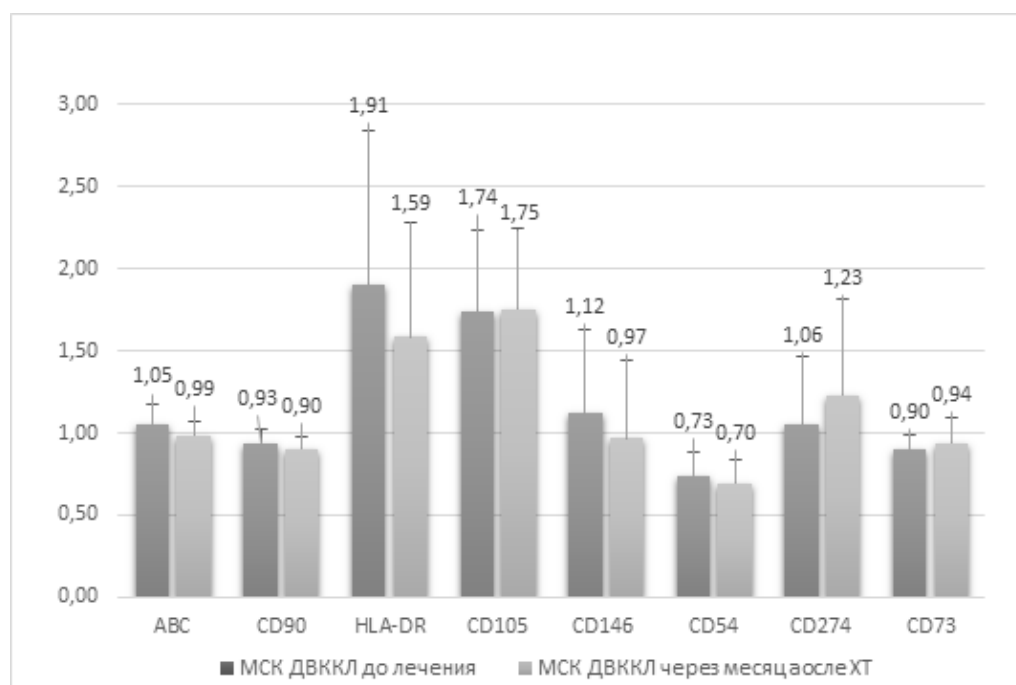


Рисунок 4 – Анализ поверхностных маркеров МСК здоровых доноров, культивированных в присутствии плазмы пациентов с ДВККЛ до и после ПХТ. За единицу принято значение доноров.

Средний уровень флуоресценции CD105(ENG) и CD274 (PD-L1) повышались на МСК при добавлении плазмы больных в дебюте и еще больше возрастали при добавлении плазмы больных после лечения. Это указывает на активацию МСК в ответ на вещества, растворенные в плазме пациентов. Экспрессия CD54 была снижена в МСК, культивированных в присутствии плазмы пациентов, как до, так и после окончания

лечения. Однако, пропорция МСК экспрессирующих CD54 повышалась при культивировании МСК совместно с плазмой пациентов до ПХТ ($p < 0,005$), а затем нормализовалась и не отличалась от доноров при добавлении плазмы пациентов после ПХТ.

При анализе относительного уровня экспрессии генов выяснилось, что в МСК, обработанных плазмой больных, снижалась экспрессия *IL-1b*, *IL-8*, *SDF1* и *LIF* (Рисунок 5).

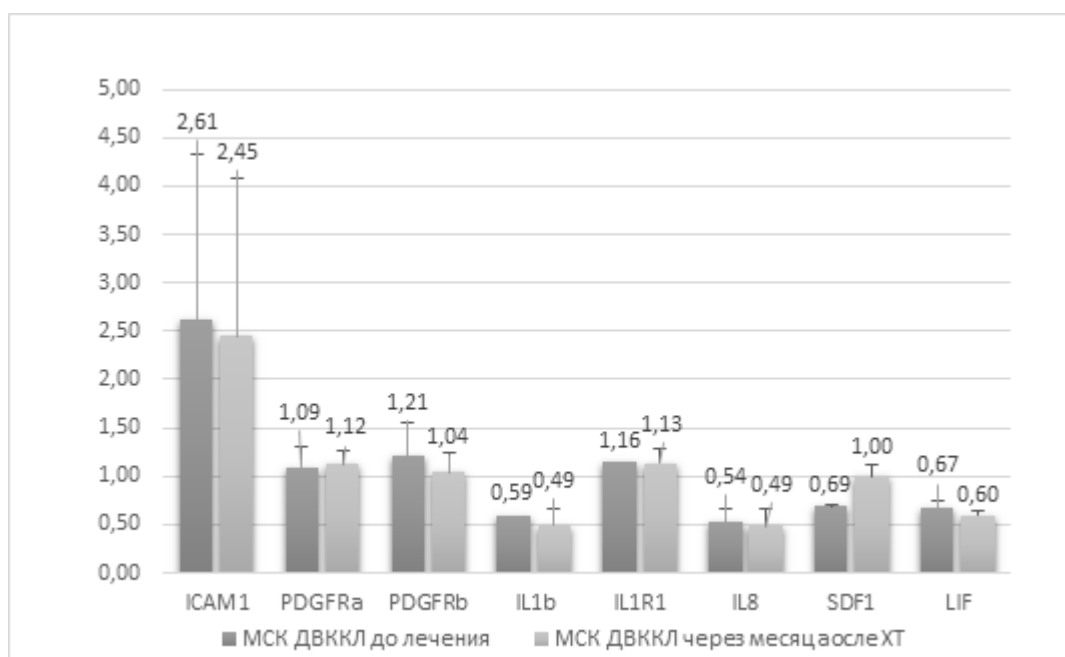


Рисунок 5 – Анализ экспрессии генов в МСК здоровых доноров, культивированных в присутствии плазмы больных ДВККЛ в дебюте заболевания и после окончания лечения. За единицу принято значение доноров.

Экспрессия *SDF1* после лечения повышалась до уровня, соответствующего МСК, обработанных плазмой доноров.

Относительный уровень экспрессии гена *ICAM1* повышался в МСК, обработанных плазмой больных, в дебюте заболевания и оставался повышенным при культивировании в присутствии плазмы больных после лечения. Ее повышение указывает на активацию МСК, обработанных плазмой больных.

Таким образом, культивирование МСК здоровых доноров в присутствии плазмы больных ДВККЛ приводит к изменению МСК. Совокупность полученных данных

свидетельствует о влиянии опухолевого процесса на стромальное микроокружение КМ у больных ДВККЛ независимо от межклеточного контакта МСК с опухолевыми клетками.

Изменения костной ткани при ДВККЛ в дебюте заболевания и на отдалённых сроках после терапии

У пациентов с ДВККЛ до начала ПХТ достоверно были увеличены маркеры резорбции кости: соотношение ДПИД/креатинин в моче и b-cross-laps в крови. Одновременно наблюдалось снижение концентрации витамина ДЗ в крови в сравнении с контрольной группой. У данных больных прямого контакта опухоли с костной тканью не было. Несмотря на это оказалось, что у пациентов с ДВККЛ на метаболическом уровне имелись изменения костной ткани. Прямой корреляции между биохимическими показателями и изменениями в экспрессии генов в МСК с обнаружено не было. Однако все эти изменения свидетельствуют о нарушении обмена костной ткани. При обследовании пациентов через много лет после окончания лечения при сохранении длительной ремиссии основного заболевания все биохимические показатели нормализовались.

Несмотря на видимые на молекулярном и клеточном уровнях изменения, при денситометрии различий в минеральной плотности кости у пациентов с ДВККЛ выявлено не было. У пациентов через много лет после достижения ремиссии плотность кости оставалась нормальной.

Учитывая, что обновление костной ткани занимает длительное время, отсутствие клинических нарушений вероятно связано с тем, что деструкция на уровне скелета у больных перед началом ПХТ не успели проявиться, тогда как признаки повышения остеорезорбции видны в биохимических анализах крови и мочи. У больных, обследованных через много лет после окончания лечения, сохраняется ремиссия заболевания и без воздействия опухоли нормализовались биохимические показатели обмена костной ткани.

Выводы

1. У больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой без поражения костного мозга по сравнению со здоровыми донорами достоверно ($p < 0,05$) изменены свойства мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга: суммарная клеточная продукция увеличена в 1,4 раза, повышен относительный уровень экспрессии генов *IL8* в 11,3 раза, *SDF1* в 1,6 раза, *FGF2* в 1,7 раз, *FGFR2* в 1,5 раза, и снижен *FGFR1* в 1,5 раза.

2. После достижения ремиссии заболевания в сравнении с пациентами до начала лечения появляются новые изменения в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках, связанные с проведенной химиотерапией. Повышается средний уровень флуоресценции поверхностных антигенов мультипотентных мезенхимных стромальных клеток ($p < 0,05$) (*CD73* в 1,6 раз, *CD105* в 4 раза, *CD54* в 4,2 раза и *CD146* в 4,5 раз). Повышается экспрессия генов *IL6* в 1,5 раза, *IL8* в 2 раза, тогда как экспрессия *TGFb* снижается в 1,4 раза, а *PDGFRb* в 1,6 раз ($p < 0,05$). Полностью характеристики стромальных клеток-предшественниц не нормализуются даже спустя 5 лет после окончания химиотерапии.

3. Программы терапии $R \pm CHOP$ и $R \pm mNHL-BFM-90$ по-разному влияют на стромальные клетки-предшественницы костного мозга в отдаленном периоде после окончания лечения. У пациентов после $R \pm mNHL-BFM-90$ даже через 5 лет после химиотерапии сохранялся повышенным средний уровень флуоресценции *CD54* на мультипотентных мезенхимных стромальных клетках в 2,9 раз, *CD73* в 1,5 раза, *CD105* в 2 раза по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$). Экспрессия *SPP1* оставалась повышенной в 2 раза, *SDF1* в 1,5 раза, *FGFR2* в 2 раза, а экспрессия *TGFb* сниженной в 1,24 раза, *FGFR1* в 1,5 раза, *BMP4* в 2 раза по сравнению с донорами ($p < 0,05$). У пациентов после $R \pm CHOP$ средний уровень флуоресценции *CD90* снижен в 1,5 раза, *CD73* повышен в 3 раза, а *CD105* в 2,5 раза ($p < 0,05$). Достоверно снижена экспрессия *MMP2* в 2 раза, *SOX9* в 1,6 раз, *FGFR1* в 1,5 раза, *BMP4* в 1,7 раз по сравнению с клетками доноров ($p < 0,05$).

4. Наличие лимфоидной опухоли в организме влияет на остеогенез: у больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой в дебюте заболевания отмечено повышение ДПИД в 2,91 раз, b-cross-laps в 1,75 раз и снижение витамина Д3 в 1,67 раз по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Но достижение длительной ремиссии и компенсаторные механизмы обеспечивают состояние костной ткани, соответствующее возрасту.

5. Изменения свойств мультипотентных мезенхимных стромальных клеток в строме костного мозга больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой происходят под действием факторов, секретируемых опухолью.

Список работ, опубликованных по теме

1. Фастова, Е.А. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга у больных диффузной в-клеточной крупноклеточной лимфомой/ Е.А. Фастова, А.У. Магомедова, Н.А. Петинати, Н.В. Сац, Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, Н.И. Дризе, С.К. Кравченко, В.Г. Савченко // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2019. - № 1. - с. 33-36.

2. Фастова, Е.А., Анализ состояния костной ткани у пациентов с диффузной в-клеточной крупноклеточной лимфомой без вовлечения костного мозга/ Е.А. Фастова, А.У. Магомедова, С.К. Кравченко, Н.А. Петинати, Н.В. Сац, Н.И. Дризе, В.Г. Савченко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2020. - т. 169. - № 5. - с. 608-613.

3. Фастова, Е.А., Клетки-предшественницы стромального микроокружения костного мозга у больных диффузной в-клеточной крупноклеточной лимфомой на разных этапах терапевтического воздействия/ Е.А. Фастова, Н.А. Петинати, А.У. Магомедова, А.Е. Бигильдеев, Н.В. Сац, С.К. Кравченко, Н.И. Дризе, В.Г. Савченко // Гематология и трансфузиология. – 2018. – 63 (1, прил. 1). - с. 105.

4. Фастова, Е.А., Изменение свойств МСК у больных диффузной В-крупноклеточной Лимфомой (ДВККЛ) без поражения костного мозга/ Е.А. Фастова, Н.А. Петинати, А.Е. Бигильдеев, Н.В. Сац, Н.И. Дризе, А.У. Магомедова, Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, С.К. Кравченко, В.Г. Савченко// Сборник научных трудов V Международной конференции “постгеном 2018”. – 2018. – с. 116.

6. Петинати, Н.А., Влияние лимфоидной опухоли, не затрагивающей костный мозг, на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки/ Н.А. Петинати, Н.В. Сац, Н. И. Дризе, Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, Е. А Фастова, А. У. Магомедова, С.К. Кравченко, В.Г. Савченко// Гены и Клетки. – 2019. - т. 14. - № S. -с. 180-181.

7. Петинати, Н.А., Секреция антигенов большого комплекса гистосовместимости (hla-abc) мультипотентными мезенхимными стромальными клетками больных диффузной в-клеточной крупноклеточной лимфомой/ Н.А. Петинати, И.Н. Шипунова, Е.А. Фастова, А.У. Магомедова, С.К. Кравченко, Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, Н.В. Сац, Н.И. Дризе, В.О. Шендер, К.С. Ануфриева, Г.П. Арапиди, В.Г. Савченко, М.А. Лагарькова// Гематология и трансфузиология. - 2020. – с. 43.

8. Fastova, E.A., Bone marrow stromal microenvironment precursor cells in patients with Diffuse Large B-cell Lymphoma without bone marrow involvement/ E.A. Fastova, N.A. Petinati,

N.V. Sats, N.J. Drize, A.U. Magomedova, S.K. Kravchenko, V.G. Savchenko// HemaSphere. – 2018. - т.2. – с. 1033.

9. Petinati, N.A., Changes in the secretome composition of multipotent mesenchymal stromal cells patients with diffuse large b-cell lymphoma without bone marrow involvement/ N. Petinati, V. Shender, P. Shnaider, I. Malyants, G. Arapidi, M. Lagarkova, N. Sats, N. Drize, E. Fastova, A. Magomedova, S. Kravchenko, V. Savchenko// HemaSphere. – 2019. - т. 3. – с. 1315.

10. Petinati, N.A., Alterations in secretome and transcriptome of bone marrow derived mscs in patients with diffuse large b-cell lymphoma without bone marrow involvement/ N. Petinati, N. Sats, N. Drize, I. Malyants, V. Shender, K. Anufrieva, P. Shneider, T. Grigorieva, G. Arapidi, M. Lagarkova, E. Fastova, A. Magomedova, S. Kravchenko, V. Savchenko// Blood. - 2019. - т. 134. - № 1. - с. 1514.

11. Shipounova I.N., Changes in the multipotent stromal mesenchymal cells from the bone marrow of the patients with hematological diseases in debut and after the treatment/ N.A. Petinati, N.I. Drize, A.U. Magomedova, E.A. Fastova, S.K. Kravchenko, E.Yu Chelysheva, O.A. Shukhov, A.G. Turkina, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko// Blood. - 2019. -Т. 134. - № S1. - с. 5014.

12. Petinati, N., Increased secretion of soluble HLA Class 1 molecules by Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from the bone marrow of Diffuse Large B-cell lymphoma patients without bone marrow involvement / N. Petinati, N. Sats, I. Shipounova, I. Malyants, V. Shender, K. Anufrieva, P. Shneider, T.Grigorieva, G. Arapidi, E. Fastova, A. Magomedova, S. Kravchenko, M. Lagarkova, N. Drize// HemaSphere. – 2020. - т. 4. - №1. p.1020 PB2275