

На правах рукописи

**Шипунова Ирина Николаевна**

**ИЕРАРХИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА СТРОМАЛЬНОГО  
МИКРООКРУЖЕНИЯ КРОВЕТВОРНОЙ ТКАНИ В НОРМЕ И ПРИ  
ЗАБОЛЕВАНИЯХ СИСТЕМЫ КРОВИ**

14.01.21 – гематология и переливание крови

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва

2018 г.

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

**Научные консультанты:**

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

**Савченко Валерий Григорьевич**

доктор биологических наук **Дризе Нина Иосифовна**

**Официальные оппоненты:**

**Буравкова Людмила Борисовна** - доктор медицинских наук, профессор,  
член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе ФГБУН  
«Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-  
биологических проблем» Российской академии наук, г. Москва.

**Сергеева Наталья Сергеевна** - доктор биологических наук, профессор,  
руководитель отделения Прогноза эффективности консервативного лечения  
Московского научно-исследовательского онкологического института  
(МНИОИ) имени П.А. Герцена - филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии»  
Минздрава России, г. Москва.

**Масчан Михаил Александрович**, доктор медицинских наук, профессор,  
директор Высшей школы молекулярной и экспериментальной медицины ФГБУ  
«Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии,  
онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации, г. Москва.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-  
исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального  
медико-биологического агентства»

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г. в \_\_\_\_\_ часов  
на заседании диссертационного Совета Д 208.135.03 при ФГБУ «Национальный  
медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России  
по адресу: 125167, Россия, г. Москва, Новый Зыковский проезд, 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный  
медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России и на  
сайте [www.blood.ru](http://www.blood.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 года

Ученый секретарь диссертационного Совета  
кандидат медицинских наук

Е. П. Сысоева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### *Актуальность темы исследования*

Во взрослом костном мозге (КМ) кроветворение поддерживается и регулируется стромальным микроокружением. Известно, что кроветворная система имеет четкую иерархическую структуру: в основе находятся стволовые кроветворные клетки (СКК), способные к самоподдержанию и продуцирующие потомков, дающих начало всем линиям кроветворных дифференцировок. Между тем отдел стромальных предшественников охарактеризован недостаточно. Стромальное микроокружение обладает низкой интенсивностью самообновления, что приводит к трудностям в исследовании его иерархической структуры. Более того, для стромальных предшественников до сих пор не выявлены уникальные иммунофенотипические маркеры, необходимые и достаточные для выделения чистой популяции каждого из известных типов предшественников. Поэтому большинство исследований в настоящее время выполнены с применением функциональных тестов.

В КМ стромальные клетки формируют кроветворную нишу. Это специализированное стромальное микроокружение, поддерживающее функционирование СКК. В настоящее время описано, как минимум, два типа ниш – эндостальная и периваскулярная. Разные типы ниш регулируют функции разных типов кроветворных предшественников. Таким образом, качество кроветворения напрямую зависит от состояния стромальных клеток КМ. Исследование иерархической структуры стромальных клеток, механизмов взаимодействия и путей регуляции кроветворных и стромальных клеток необходимо для полного представления о функционировании кроветворной системы и разработки путей коррекции или компенсации изменений, происходящих в ней с возрастом, под действием внешних воздействий или же в процессе развития патологических состояний.

Костномозговая строма регулирует кроветворение как в норме, так и при различных заболеваниях системы кроветворения. Известно, что у больных с гематологическими заболеваниями повреждается стромальное микроокружение. При различных нозологиях, по-видимому, задействованы разные механизмы. Неясно, насколько клетки кроветворного микроокружения вовлечены в патогенез этих заболеваний. Изменения в стромальном микроокружении также могут быть

одной из причин неполноценного кроветворения у больных после трансплантации аллогенного костного мозга (алло-ТКМ). Исследование изменений, происходящих с клетками стромы у больных, поможет более полно охарактеризовать патогенез заболеваний системы крови и оценить характер изменений, происходящих в строме КМ, как в процессе развития болезни, так и в ходе ее лечения.

Итак, исследование основных характеристик клеток-предшественниц стромального микроокружения, поддерживающего кроветворение, позволит установить иерархическую структуру отдела, выявить нарушения, возникающие с возрастом и в процессе развития патологических процессов.

### ***Степень разработанности темы***

Впервые существование клоногенных стромальных клеток-предшественниц – колониобразующих единиц фибробластов (КОЕф) – было описано и экспериментально подтверждено советским ученым А.Я. Фриденштейном с соавторами около 50 лет назад. Огромный вклад в развитие представлений о способности к самоподдержанию, радиорезистентности и мультипотентном дифференцировочном потенциале мезенхимных стволовых клеток (МСК) внесли исследования И.Л. Черткова с соавторами. Источники, механизмы и пути дифференцировки тканеспецифических и эмбриональных стволовых клеток в пре- и постнатальном онтогенезе в течение многих лет исследовались учеными под руководством Н.Г. Хрущова.

В настоящее время российские ученые активно исследуют свойства и пути возможного применения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК). Активно разрабатываются и применяются на практике методы и подходы получения ММСК из различных типов тканей человека. Так, свойства ММСК, полученных из жировой ткани людей изучают в группе под руководством В.А. Ткачука, а регуляцию способности этих клеток к хомингу исследует Е.В. Парфенова с коллегами. Изменение пролиферативных и дифференцировочных свойств ММСК, а также регенеративного потенциала при ожирении и сахарном диабете изучают Р.И. Дмитриева с коллегами. Методы выделения, иммунологические и функциональные характеристики ММСК из пупочной вены разрабатывает коллектив под руководством Ю.А. Романова. Свойства ММСК из эндометрия исследует группа под руководством Н.Н. Никольского.

Свойства ММСК из жировой ткани в условиях гипоксии, аноксии и пониженной гравитации изучают Л.Б. Буравкова с коллегами, а свойства ММСК из пуповинной крови в тех же условиях – группа ученых под руководством Е.Р. Андреевой.

Также активно ведутся работы по разработке протоколов получения ММСК из тканей различных биологических видов с последующим изучением свойств выделенных клеток. Свойства ММСК приматов изучают В.З. Агрба с коллегами, а ММСК собак – группа М.В. Киселевского. Группа под руководством Р.К. Чайлахяна занимается сравнением регенеративных свойств ММСК крысы, выращенных в условиях нормоксии и гипоксии. Свойства различных субпопуляций ММСК из КМ и эмбриональной печени крыс исследует группа ученых под руководством Е.И. Домарацкой.

Также в нашей стране проходят исследования фундаментальных свойств ММСК. Так, Б.В. Попов с соавторами занимаются изучением молекулярных и клеточных механизмов дифференцировки ММСК в зрелые клетки различной тканевой специфичности. Возрастные изменения стромальных предшественников из КМ мышцы исследуют В.Г. Нестеренко с соавторами, а возможные пути стимуляции пролиферации нормальных и стареющих ММСК из КМ мышцы изучает А.В. Белявский с коллегами. Продолжая работы Н.Г. Хрущова и В.И. Старостина, исследования фенотипических особенностей и потенций к дифференцировке пре- и постнатальных генераций ММСК, их роль в миогенезе, возможности прикладного применения ММСК для регенерации повреждений мышечной ткани проводятся под руководством Е.И. Домарацкой.

Отдельным направлением исследований является применение ММСК для лечения костных дефектов и биосовместимых трансплантатов. Поиск подходящих материалов и условий культивирования ММСК проводит группа Н.С. Сергеевой, а разработкой биосовместимых материалов для использования их при кокультивировании с ММСК ведется, например, в группах под руководством В.С. Комлева, В.И. Севастьянова и М.П. Кирпичникова. ММСК кролика для разработки моделей биосовместимых резорбируемых аутотрансплантатов используют несколько групп исследователей: для регенерации повреждений связок эти клетки применяет Р.К. Чайлахян с соавторами, для регенерации крупных костных дефектов – В.Е. Мамонов и Н.И. Дризе. Также в качестве

модели в группе под руководством И.В. Майбородина используют ММСК крыс: исследуют эффект их введения на скорость регенерации повреждения костной и хрящевой ткани.

В связи с тем, что ММСК обладают не только регенеративными свойствами, но и участвуют в иммунологических реакциях в организме, область их возможного применения в клинической практике не ограничивается только лишь восстановлением соединительной ткани. А.А. Темнов с соавторами используют ММСК для создания новых методов диагностики и лечения, а также исследуют физиологические изменения данных клеток в условиях острой травмы. Продолжая дело В.Н. Ярыгина, внедрением ММСК в клиническую практику занимается Н.В. Ярыгин. Иммуномодулирующие свойства ММСК из КМ, жировой ткани и пупочной вены изучает группа под руководством В.Б. Климовича. Исследователи под руководством Я.Ш. Шварца разрабатывают способы модификации ММСК с целью регуляции их про- и противовоспалительную активности. Влияние ММСК, введенных в момент алло-ТКМ, на восстановление иммунитета пациентов изучает Е.Р. Черных с коллегами. О.В. Лебединская с соавторами исследуют морфологические, иммунофенотипические, функциональные особенности и пути дифференцировки *ex vivo* стволовых стромальных клеток и их взаимодействие с эффекторными иммунными клетками.

А.Г. Конопляников с соавторами исследует возможности применения ММСК для диагностики и лечения повреждений органов и тканей. Данные исследования включают работы по использованию наночастиц в диагностике и лечении, а также применение ММСК в терапии некоторых заболеваний легких, таких как фиброз легочной ткани и туберкулез.

Ведутся активные исследования роли ММСК в канцерогенезе. А.В. Белявский с коллегами изучает влияние ММСК на опухолевые клетки при кокультивировании, пути возможной модификации ММСК с целью достичь противоопухолевого эффекта. Ингибирующий эффект ММСК из КМ на формирование метастазов исследует группа Е.В. Загайновой. В.Б. Климович с коллегами изучает свойства ММСК из жировой ткани больных раком молочной железы. Также количество и свойства стромальных предшественников из опухолей человека под влиянием различных полипептидов, а также при различных физических воздействиях исследуют под руководством Р.К. Чайлахяна.

Попыток установить иерархию в отделе стромальных предшественников не проводилось со времен работ А.Я Фриденштейна и И.Л. Черткова, однако в то время выделение ММСК еще не было поставлено на рутинную основу, и иерархическая позиция этих клеток не была описана. В настоящее время исследований свойств истинных стволовых мезенхимных клеток практически не проводится. Системные регуляторы стромальных предшественников разной степени дифференцированности изучены мало. Недостаточно данных, касающихся ММСК, выделенных из КМ как здоровых доноров, так и пациентов с гематологическими заболеваниями, хотя известно, что между данными клетками, полученными из разных тканей человека, выявляются достоверные различия. В связи с этим, хотя в целом исследования в данной области активно ведутся в Российской Федерации, тема представленной работы изучена недостаточно и ее дальнейшая разработка представляется актуальной.

В других странах исследования ММСК и других стромальных предшественников также имеют многолетнюю историю, и в настоящее время эта область научных исследований развивается очень активно. Еще 40 лет назад Р. Скофилд предложил понятие ниши для кроветворных клеток, сформированной клетками стромы. Большой вклад в изучение состава стромальных клеток, формирующих ниши в костном мозге, внесли Д. Скадден, Ш. Моррисон, М. Оуэн, П. Бианко, М. Питтенжер и другие. Роль остеобластов в нише для кроветворных клеток исследовали группы под руководством Л. Калви и Дж. Жанга. Принципиальную роль эндотелиальных клеток в составе кроветворных ниш описали М. Киль с соавторами, также над этой темой активно работают группы Б. Сачетти и С. Мендес-Ферреры. В живом организме мыши локализацию стволовых кроветворных клеток в эндотелиальных нишах показали группы Д. Сипкинс и К. Ло Челсо.

Термин мезенхимная стволовая клетка (МСК) впервые предложил А. Каплан, имея ввиду культивируемые полипотентные стромальные предшественники. Впоследствии руководители нескольких ведущих лабораторий, занимающихся исследованиями данных клеток (Э. Хорвитс, К. Ле Блан, М. Доминичи и другие), предложили более корректное название для данного типа культивируемых клеток – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, ММСК, а термин МСК было решено оставить для истинных стволовых мезенхимных клеток-

предшественниц. Исследование изменений ММСК с возрастом проводятся под руководством А. Штольцинг, а корреляции с возрастом частоты КОЕф были показаны М. Галотто. Т. Хотта, Дж. Марш, А. Басигалупо и другие ученые изучают изменения стромального микроокружения у больных апластической анемией (АА). Строма при острых лейкозах изучена хуже. Механизмы взаимодействия лейкозных клеток со стромой больных исследуют в группах Ж. Вея, Г. Досен-Даля, М. Андрееффа, Л. Кальви и других. КОЕф в костном мозге больных острыми лейкозами изучали К. Карло-Стелла, Г. Майани, Дж. Као, А. Свирновски, А. Банфи, Л. Фуллиард и другие. В целом же, данные многих зарубежных исследований зачастую противоречивы и получены на небольшом числе пациентов или здоровых доноров. Результаты настоящей диссертационной работы внесут вклад в расширение знаний о функционировании стромальных предшественников в норме и при различных заболеваниях и могут представлять интерес для международного научного сообщества.

### ***Цель исследования***

Цель – охарактеризовать основные характеристики клеток-предшественниц поддерживающего кроветворение стромального микроокружения мыши и человека в норме и при заболеваниях системы крови.

### ***Задачи исследования***

- изучить пути системной регуляции отдела стромальных предшественников кроветворного микроокружения;
- выявить изменения, возникающие в данном отделе с возрастом;
- установить изменения, появляющиеся в отделе стромальных предшественников при возникновении и развитии патологического кроветворения;
- определить степень воздействия цитостатических препаратов на стромальные клетки-предшественницы;
- функционально охарактеризовать иерархическую структуру отдела стромальных предшественников кроветворного микроокружения.

### ***Научная новизна***

- впервые охарактеризовано действие системных регуляторов (паратиреоидный гормон (ПТГ) и гидрокортизон (ГК)) на известные в настоящее время типы стромальных предшественников в КМ;



- изменения, происходящие с возрастом со стромальными предшественниками из КМ человека, описаны на большой выборке здоровых доноров, и потому обладают высокой статистической достоверностью;

- впервые было исследовано воздействие нескольких цитостатических препаратов одновременно на два типа стромальных клеток-предшественниц, включая самые ранние;

- впервые на довольно большой выборке пациентов с АА комплексно проанализированы изменения, происходящие со стромальными клетками-предшественницами разного уровня дифференцированности у больных на разных стадиях лечения с учетом степени тяжести заболевания;

- впервые на довольно большой выборке пациентов с острыми лейкозами комплексно проанализированы изменения, происходящие со стромальными клетками-предшественницами разного уровня дифференцированности до и после проведения алло-ТКМ, причем, в отличие от других исследований, состояние стромальных предшественников оценивали в течение 1 года после выполнения алло-ТКМ;

- впервые описаны функциональные характеристики, достоверно подтверждающие иерархическую структуру отдела стромальных предшественников в КМ мыши и человека.

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

Теоретические данные, полученные автором в ходе исследований, расширяют имеющиеся представления об устройстве и регуляции отдела стромальных предшественников в КМ мыши и человека. Практическая значимость исследования состоит в использовании полученных результатов при планировании экспериментов и клинических исследований, в которых применяют стромальные клетки человека. Выявленные возрастные изменения стромальных предшественников необходимо учитывать при проведении экспериментов и особенно клинических исследований. Выявленные эффекты ПТГ, ГК, цитостатических препаратов, а также протоколов, сопровождающих алло-ТКМ, на стромальные предшественники разной степени зрелости необходимо учитывать в лечении пациентов, так как такие эффекты могут быть причиной осложнений. Так как стромальная ткань обновляется медленно, побочные эффекты могут проявляться через длительное время или в стрессовой ситуации.

### ***Методология и методы исследования***

Методологию данного исследования выстраивали в соответствии с поставленными задачами. Для исследований стромальных клеток-предшественниц *in vivo* использовали мышинные модели. Стромальные предшественники в КМ мыши исследовали методами *in vivo* (формирование очага эктопического кроветворения под капсулой почки сингенного реципиента) и *in vitro* (получение и культивирование длительных культур КМ мыши (ДККМ), анализ КОЕф, а также кроветворных предшественников различной степени зрелости (как косвенный показатель состояния кроветворного микроокружения)). Для исследований стромальных клеток-предшественниц в КМ человека в норме и при развитии заболеваний системы крови исследовали образцы КМ здоровых доноров и больных. Образцы КМ были получены в Отделе интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга с круглосуточным и дневным стационарами. Применяли следующие экспериментальные и описательные методы: получение и культивирование ММСК, анализ ММСК (фенотипирование поверхностных маркеров, способность к дифференцировке, показатели культивирования, способность к клонированию), анализ концентрации КОЕф. Во многих экспериментах, как на мышинных моделях, так и на человеческом КМ, также оценивали изменение относительного уровня экспрессии интересующих генов методами ПЦР в различных модификациях. Статистические отличия в зависимых группах оценивали при помощи парного t-критерия Стьюдента, в независимых – при помощи t-критерия Стьюдента для независимых выборок.

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

1. Отдел мезенхимных клеток устроен следующим образом: во главе расположены МСК, далее следуют ММСК, затем КОЕф, из которых дифференцируются индуцибельные клетки-предшественницы, в свою очередь формирующие зрелые клетки стромы костного мозга.
2. Паратиреоидный гормон, являясь системным регулятором кальциевого метаболизма, регулирует количество ниш для стволовых кроветворных клеток в костном мозге.
3. С увеличением возраста донора костного мозга изменяются свойства стромальных клеток-предшественниц: снижается концентрация КОЕф и пролиферативная способность ММСК.

4. МСК, в отличие от КОЕф, не чувствительны к воздействию цитостатических препаратов.

5. Угнетение кроветворения при апластической анемии сопровождается функциональной активацией стромального микроокружения.

6. Лечение, проводимое при острых лейкозах, оказывает различающееся влияние на разные типы стромальных клеток-предшественниц.

### ***Степень достоверности и апробация результатов***

Достоверность полученных выводов обеспечена тщательной проработкой литературных данных по теме диссертации, детальной разработкой экспериментов, наличием в анализируемых группах большого количества образцов, достаточного для достоверного использования выбранных методов статистического анализа. В работе подробно освещен каждый этап исследования. Все это делает работу воспроизводимой и проверяемой.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 26 международных научных конференциях, из которых 7 проходили в Российской Федерации и 19 – за рубежом. Всего по теме диссертации опубликовано 20 научных статей (17 статей в печатных периодических изданиях, общим объемом 100 печатных страниц; 3 статьи – в электронных периодических изданиях, 1 глава в книге объемом 32 печатных страницы и 38 тезисов в материалах научных конференций общим объемом 42 печатных страницы. Среди опубликованных статей 13 – в отечественных и 7 – в зарубежных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации результатов диссертационных исследований. Диссертация рассмотрена на объединенном заседании проблемных комиссий «Клинические исследования в гематологии (гемобластозы, депрессии кроветворения; ТКМ; миело- и лимфопролиферативные заболевания; опухоли лимфатической системы; патология красной крови; ИТП; порфирии), трансфузиологии, патологии гемостаза, хирургической гематологии, анестезиологии и интенсивной терапии»; «Фундаментальные исследования в гематологии, трансплантологии, трансфузиологии: Гемопоз, молекулярная биология, биотехнология, иммуногематология; биохимия; биофизика» и «Проблемы донорства, производства и контроля качества компонентов и препаратов крови, разработки средств воздействия на систему крови», состоявшемся 19.06.2018 г. в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, протокол № 7.

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

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы, списка сокращений и условных обозначений и приложений А,Б и В; содержит 274 страницы текста, 27 таблиц, 49 рисунков и список литературы из 447 источников.

### ***Личный вклад автора***

Автор принимал личное участие в разработке планов всех исследований, непосредственно выполнял экспериментальную часть, проводил систематизацию и обработку полученных результатов, участвовал в написании печатных работ, представлял результаты на отечественных и международных конференциях.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### ***Обзор литературы***

В обзоре литературы изложены современные представления об устройстве кроветворной ниши, ее клеточном составе и путях регуляции. Подробно описаны известные на настоящий момент типы стромальных клеток-предшественниц. Рассмотрены механизмы их системной регуляции ПТГ и ГК. Отдельный раздел посвящен описанным в настоящее время изменениям, происходящим в стромальном микроокружении с возрастом. Также приведены данные о классификации, патофизиологии и методах лечения таких заболеваний системы крови как АА, острый миелоидный (ОМЛ) и острый лимфобластный (ОЛЛ) лейкозы. Описаны известные на настоящий момент изменения, происходящие со стромальными клетками-предшественницами в ходе этих заболеваний.

### ***Материалы и методы***

Исследование проводили на клетках мыши и человека. В работе использовали самок мышей-гибридов первого поколения (СВАхС57В1/6)F1 в возрасте 12-16 недель, а также самок и самцов линии С57В1/6 в возрасте 9-26 недель. Эксперименты с животными были одобрены комиссией по биомедицинской этике при институте медико-биологических проблем РАН, протокол №257. Исследование характеристик стромального микроокружения мышей было выполнено совместно со Д.А. Свиной, Н.И. Дризе, И.Л. Чертковым.

В работе использовали КМ здоровых людей, поступивших в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ в качестве доноров для алло-ТКМ с 2004 по 2014 год. Всего

был получен КМ от 175 доноров, из них 91 женщина и 84 мужчины, в возрасте от 10 до 61 года (среднее значение  $32,4 \pm 0,9$  года, медиана – 31 год). В период с 2004 по 2008 год был получен КМ от 45 больных АА, из них 22 женщины и 23 мужчины, в возрасте от 16 до 70 лет (среднее значение  $24,8 \pm 3,7$  года, медиана – 22 года). В момент получения образцов КМ 26 человек не получали иммуносупрессивной терапии (ИСТ). Из них первичных больных, то есть, не получавших ранее никакого лечения, было 11 человек. В период с 2010 по 2013 год был получен КМ от 20 больных ОМЛ, из них 11 женщин и 9 мужчин, в возрасте от 17 до 60 лет (среднее значение  $36,3 \pm 2,8$  года, медиана – 34 года), от 15 больных ОЛЛ, из них 3 женщины и 12 мужчин, в возрасте от 18 до 39 лет (среднее значение  $28,6 \pm 1,7$  года, медиана – 28 лет) и от 3 больных АА, из них 2 мужчин и 1 женщина, в возрасте от 17 до 28 лет (среднее значение  $22 \pm 2,8$  года, медиана – 21 год). Среди больных ОМЛ часть предварительно получала лечение по протоколу ОМЛ-01.10, остальных лечили по различным схемам химиотерапии. Подавляющее число больных ОЛЛ предварительно получала лечение по протоколу ОЛЛ-2009.

Доноры и больные были информированы о проведении экспериментального исследования и подписали информированное согласие. Приведенные в данной работе эксперименты были одобрены локальным этическим комитетом. Костный мозг доноров и больных был получен в Отделе интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга с круглосуточным и дневным стационарами, руководитель – проф., д.м.н. Е.Н. Паровичникова. Исследование характеристик стромального микроокружения здоровых доноров было выполнено совместно с Д.А. Свиной, Н.А. Петинати, А.Е. Бигильдеевым, Ю.В. Ольшанской, К.С. Момотюк, Л.А. Кузьминой, Е.Н. Паровичниковой, Н.И. Дризе, В.Г. Савченко. Исследование характеристик стромального микроокружения больных АА было выполнено совместно с Т.В. Петровой, Д.А. Свиной, К.С. Момотюк, Е.А. Михайловой, М.А. Виноградовой, Н.И. Дризе. Исследование характеристик стромального микроокружения пациентов, которым была выполнена алло-ТКМ, было выполнено совместно с Н.А. Петинати, А.Е. Бигильдеевым, Л.А. Кузьминой, К.С. Момотюк, Е.Н. Паровичниковой, Н.И. Дризе, В.Г. Савченко.

Стромальные клетки-предшественницы в КМ мышцы были проанализированы при помощи формирования очага эктопического кроветворения под капсулой

почки сингенных реципиентов, посредством определения концентрации КОЕф в КМ, а также косвенно, путем оценки концентрации кроветворных клеток-предшественниц разной степени зрелости (КООБ7-28, КОЕ-ГМ, КОЕ-К), формирующихся при непосредственном контакте со стромальным микроокружением. Для оценки воздействия ПТГ на стромальные предшественники разной степени зрелости *in vivo* крысиный синтетический ПТГ (1-34) вводили мышам внутрибрюшинно в дозе 10, 30 и 80 мг/кг 5 дней в неделю в течение 4 недель; а для экспериментов *in vitro* в культуры добавляли тот же ПТГ (1-34) в концентрациях  $10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-8}$  и  $10^{-7}$  М при иницировании культуры и еженедельно при смене среды. Влияние ПТГ на кроветворные ниши для СКК было изучено методом конкурентной репопуляции. Для анализа конкурентоспособности СКК мышей-самцов, обработанных ПТГ, клетки их КМ смешивали с клетками КМ интактных самок в следующих соотношениях: 1 к 1 (по  $250 \times 10^3$  клеток), 1 к 3 ( $125 \times 10^3$  самца и  $375 \times 10^3$  самки) и 1 к 19 ( $25 \times 10^3$  самца и  $475 \times 10^3$  самки). После этого полученные смеси инъецировали внутривенно реципиентам-самкам, летально облученным в общей дозе 10 Гр двумя равными дозами с интервалом в 3 часа. В качестве контроля использовали аналогичные 3 группы животных, которым вводили КМ мышей-самцов, не обработанных ПТГ. Через 3, 10 и 16 месяцев после восстановления кроветворения у 5 экспериментальных и 5 контрольных мышей из каждой группы под легким эфирным наркозом забирали КМ из бедра, пунктируя его через коленный сустав иглой 22 размера. Среди полученных клеток анализировали генотип КОЕ-С. с помощью ПЦР. Концентрацию конкурентно репопулирующих единиц (КРЕ) вычисляли методом лимитирующих разведений, используя формулу Пуассона.

Для оценки степени воздействия цитостатических препаратов на МСК и КОЕф мыши получали курсы, аналогичные применяемым для лечения заболеваний системы крови у людей. Курсы цитостатических препаратов проводили животным по следующим схемам. Цитарабин (Алексан (Alexan®), Ebewe Pharma, Австрия) разводили в физиологическом растворе (ФР, 0,9% NaCl) и из расчета 1 мг/кг веса мыши вводили внутрибрюшинно дважды в день в течение 2 недель (суммарная доза 16 мг/кг). Бортезомиб (Велкейд® (Velcade®), Янссен-Силаг, Бельгия) разводили в ФР и из расчета 0,2 мг/кг веса мыши и вводили внутривенно дважды в неделю в течение 3 недель (суммарная доза 1,2 мг/кг).

Разведенный препарат хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Таблетки бусульфана (Милеран (Myleran), ГлаксоСмитКляйн, Германия) толкли и растворяли в оливковом масле, пренебрегая потерями. Животных кормили перорально из расчета 40 мг/кг веса при помощи автоматической пипетки один раз в день в течение 4 дней (суммарная доза 160 мг/кг). Циклофосфан (Циклофосфан-ЛЭНС® быстрорастворимый, ООО «ЛЭНС-Фарм», Россия) разводили в ФР и из расчета 40 мг/кг веса мыши вводили внутривенно один раз в день в течение 5 дней (суммарная доза 200 мг/кг). Метотрексат (Метотрексат-Эбеве, (Methotrexate-Ebewe), Ebewe Pharma, Австрия) разводили в ФР и из расчета 4 мг/кг веса мыши вводили внутривенно один раз в день в течение 7 дней (суммарная доза 28 мг/кг). Контрольная группа получала физиологический раствор интраперитонеально. Через три дня и через 6 недель после окончания курсов цитостатических препаратов мышей усыпляли, выделяли КМ из бедер и оценивали концентрацию КОЕф и количество МСК.

Каждый полученный образец КМ человека анализировали по следующей схеме: определяли концентрацию КОЕф, получали культуру ММСК. ММСК культивировали до 2-5 пассажа, на 1 пассаже из части клеток каждого образца ММСК выделяли РНК для последующего анализа генной экспрессии; у части больных определяли способность полученных ММСК к жировой и костной дифференцировке. Также у части были определены иммунофенотипические и кариологические характеристики ММСК. Данные показатели перестали проверять в каждой полученной культуре ММСК после того, как было получено достаточное количество результатов и проведена статистическая обработка данных. Анализ экспрессии генов проводили методом обратной транскрипции с последующей ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Для оценки воздействия ГК ММСК человека его добавляли в концентрации  $10^{-6}\text{M}$  к опытным культурам в момент начала культивирования и при каждой смене среды или пассировании.

Для того чтобы оценить влияние возраста на рост и генную экспрессию в стромальных предшественниках человека, данные из группы здоровых доноров при обработке разделили на возрастные группы согласно рекомендациям ООН. В результате получилось 3 группы: доноры детского возраста (N=4, возраст от 10 до 13 лет), молодые доноры (N=71, возраст от 15 до 44 лет) и доноры среднего возраста (N=21, возраст от 45 до 61 года).

Образцы КМ больных АА получали в момент обращения в ходе диагностической пункции. Образцы КМ больных ОМЛ, ОЛЛ и АА, поступивших в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ для выполнения алло-ТКМ, были получены до начала предтрансплантационного кондиционирования (точка 0), а также через 30, 60, 90, 120, 180 и 365 дней после выполнения алло-ТКМ. Таким образом, каждый пациент был исследован в динамике в течение года после выполнения алло-ТКМ.

Статистический анализ результатов проводили в программах Microsoft Excel и Statistica 6.0. Для поиска статистически значимых различий между исследуемыми группами использовали t-критерий Стьюдента в случае нормального распределения выборок и односторонний U-тест Манна-Уитни, если распределение в выборке отличалось от нормального. Количество клоногенных предшественников определяли методом Пуассона. Корреляции между показателями оценивали с помощью непараметрического коэффициента Спирмана.

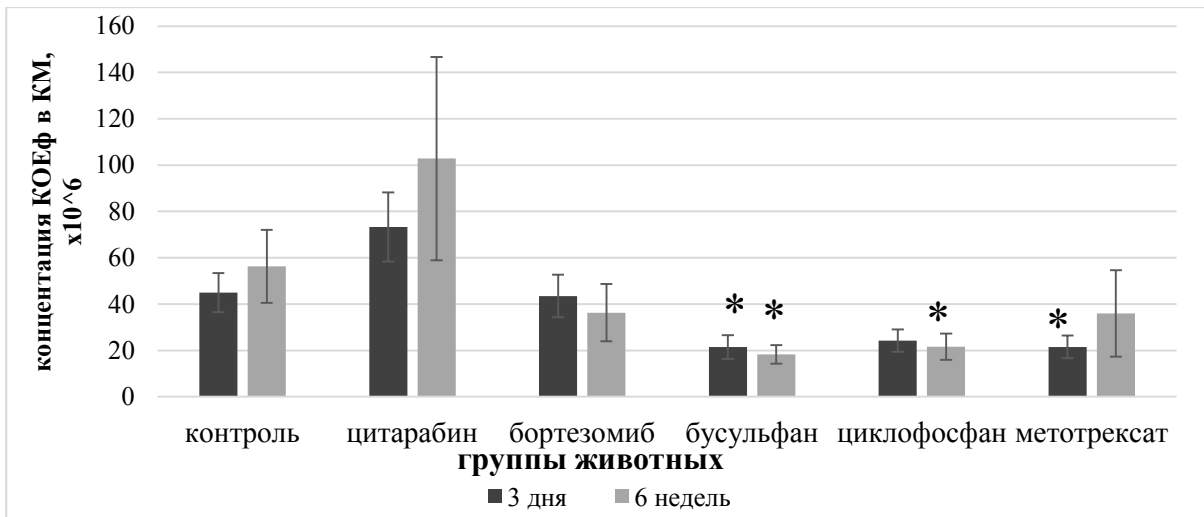
### ***Результаты работы***

#### *Иерархия стромальных предшественников: взаимное расположение МСК и КОЕф в КМ мыши*

Известно, что СКК пролиферируют крайне редко, поэтому не чувствительны к действию препаратов, ориентированных на делящиеся клетки. Полагали, что это свойство является универсальным для всех стволовых клеток. С целью проверки этого предположения исследовали влияние цитостатических препаратов на два известных стромальных типа предшественников – МСК и КОЕф. Чувствительность стромальных предшественников к препаратам, используемым для лечения гемобластозов изучена недостаточно. Исследование действия цитостатиков на стромальные предшественники – это один из подходов, позволяющий идентифицировать и разделить более ранние и зрелые стромальные предшественники и охарактеризовать их свойства.

В костном мозге животных через 3 дня и 6 недель после окончания курса цитостатических препаратов определяли концентрацию КОЕф (Рисунок 1).





\* означает  $p < 0,05$  при сравнении с контролем при использовании *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок

Рисунок 1 – Концентрация КОЕф в костном мозге мышей, получавших курсы цитостатических препаратов через 3 дня и 6 недель после окончания курсов (среднее  $\pm$  ошибка среднего)

Оказалось, что малые дозы цитарабина индуцировали повышение концентрации КОЕф, бортезомиб не оказывал влияния на концентрацию КОЕф в костном мозге, тогда как бусульфан, циклофосфан и метотрексат в использованных дозах снижали концентрацию этих стромальных предшественников в 2 раза ( $p < 0,05$ ). Необходимо отметить, что через 6 недель концентрация КОЕф в костном мозге мышей, получивших курсы цитостатических препаратов, не восстанавливалась.

В отличие от КОЕф МСК оказались нечувствительными к действию использованных препаратов. Размер очага эктопического кроветворения не изменялся через 3 дня и 6 недель после прекращения курсов цитостатических препаратов. Исключение составила группа мышей, получавших циклофосфан, – через 1,5 месяца после окончания курса препарата в этой группе размер очага, и, следовательно, количество МСК увеличилось. При ретрансплантации таких очагов к вторичным реципиентам размер образующегося *de novo* очагов эктопического кроветворения был снижен только в случае трансплантации очагов, образовавшихся из КМ мышей, получивших курс цитарабина ( $p=0,02$ ). В остальных вариантах пролиферативный потенциал МСК оказался неизменным.

Таким образом, группа цитостатиков, обладающих повреждающим и ингибирующим синтез ДНК свойством (бусульфан, циклофосфан и метотрексат), вызвала двукратное снижение концентрации КОЕф в КМ мышей, причем восстановления концентрации этих предшественников не произошло, по крайней мере, в течение 6 недель после отмены препаратов. Это наблюдение еще раз подтверждает, что стромальное микроокружение относится к медленно самообновляющейся ткани. Курс малых доз цитарабина, напротив, вызвал стойкое увеличение концентрации КОЕф. Очевидных объяснений такого действия цитарабина не находится, однако известно, что низкие концентрации препарата *in vitro* активируют эндотелиальные клетки, что сопровождается усилением экспрессии различных классов молекул клеточной адгезии. Если предположить, что активация молекул адгезии происходит и на КОЕф, то усиление их адгезивных свойств может объяснить выявление гораздо большего числа стромальных предшественников в использованном методе тестирования. Бортезомиб, являющийся ингибитором протеасом, не оказал влияния на КОЕф. Нечувствительность МСК к использованным цитостатикам, которая была установлена по стабильности их количества, подтверждает, что МСК являются стволовыми клеткам соединительной ткани. Кроме того, важным доказательством является и то, что способность МСК к самоподдержанию также не снижается, что продемонстрировано в опыте по ретрансплантации очага эктопического кроветворения вторичным реципиентам. И снова исключение составили МСК мышей, получавших малые дозы цитарабина. Можно предположить, что используемые малые дозы препарата оказывают в основном цитостатический эффект, не убивая клетку, а нарушая ее способность к многократному делению. В таком случае МСК способны к построению полноценного очага эктопического кроветворения, но исчерпывают при этом свой пролиферативный потенциал. Пул МСК мог быть также истощен за счет индукции дифференцировки предшественников. Увеличение концентрации КОЕф после проведения животным курса цитарабина может быть следствием такой индукции и является дополнительным объяснением наблюдаемого эффекта. Таким образом, большинство проанализированных препаратов, используемых для химиотерапии и кондиционирования больных перед алло-ТКМ, не влияют на истинные стволовые

клетки, МСК, но истощают пул более дифференцированных стромальных предшественников, КОЕф.

*Иерархия стромальных предшественников: взаимное расположение ММСК и КОЕф из КМ человека*

Всего сравнительный анализ основных характеристик ММСК и КОЕф был проведен в 24 образцах КМ (12 женщин доноров КМ (средний возраст  $33,3 \pm 2,82$  года), 12 – мужчин (средний возраст  $32,4 \pm 3,7$  года)). Из каждого образца КМ были получены КОЕф и ММСК и проведено попарное сравнение исследованных характеристик. Показано, что количество КОЕф в КМ доноров прямо коррелирует с суммарной клеточной продукцией ММСК за 6 пассажей ( $R=0,61$ ,  $p=0,002$ ). Экспрессия генов была исследована в суммарном пуле колоний КОЕф от каждого донора и в ММСК на 1 пассаже из того же исходного образца КМ. При сравнении относительного уровня экспрессии генов-маркеров дифференцировок, а также генов, отвечающих за регуляцию пролиферации, были выявлены достоверные отличия практически для всех проанализированных генов между КОЕф и ММСК, полученных из одних и тех же образцов КМ (Рисунок 2).

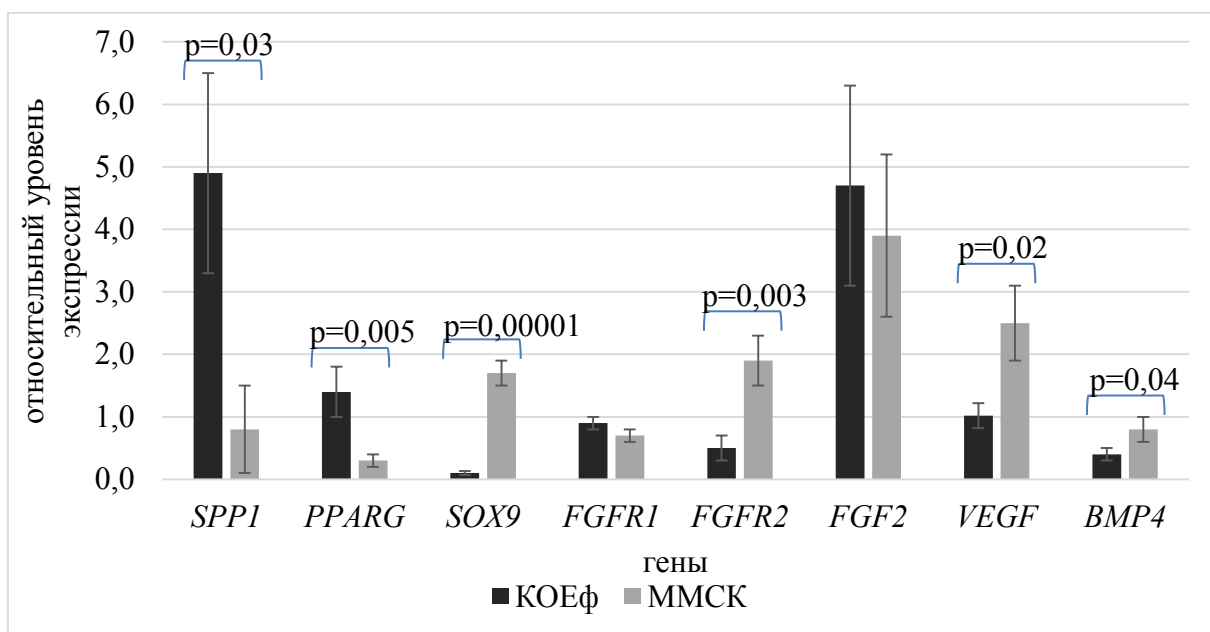


Рисунок 2 – Сравнение относительного уровня экспрессии некоторых генов в КОЕф и ММСК одних и тех же здоровых доноров (среднее  $\pm$  ошибка среднего)

Маркеры костной и жировой дифференцировок SPP1 и PPARG высоко экспрессированы в КОЕф, что подтверждает их более дифференцированный статус, чем ММСК, в иерархии стромальных предшественников. Повышенный уровень экспрессии FGFR2, VEGF и BMP4 в ММСК, в свою очередь, указывает на

их менее дифференцированную природу. Одновременно с этим в ММСК выявляется сниженная экспрессия таких дифференцировочных маркеров, как SPP1 и PPAR $\gamma$ , но не SOX9, маркера хрящевой дифференцировки. Относительный уровень экспрессии SOX9 в ММСК был достоверно выше, чем в КОЕф. Вероятно, это можно объяснить нетипичностью хрящевой дифференцировки для КОЕф, которая в ММСК утрачивается постепенно.

Полученные данные позволяют расположить ММСК выше КОЕф в иерархическом древе стромальных предшественников.

*Иерархия стромальных предшественников: взаимное расположение КОЕф и индуцибельных предшественников в КМ мыши*

Ранее было показано, что у облученных реципиентов очаг эктопического кроветворения, в 2-3 раза больше по размеру, чем у необлученных. Если ретрансплантировать очаги от облученных реципиентов к необлученным, то формируются очаги нормального размера. Это говорит о том, что за увеличение размера очага, сформированного в облученном реципиенте, ответственны не МСК, а другие стромальные клетки-предшественницы, не обладающие способностью к переносу кроветворного микроокружения. Для того, чтобы выяснить иерархические взаимоотношения «индуцибельных» предшественников и КОЕф, была исследована концентрация и количество КОЕф в очагах эктопического кроветворения, образованных у нормальных и облученных мышей.

Ранее КОЕф в очаге эктопического кроветворения не были охарактеризованы. Оказалось, что концентрация этих предшественников в очаге несколько снижена по сравнению с их концентрацией в КМ ( $34,39 \pm 13,49$  в очаге против  $51,13 \pm 5,38$  в КМ). Через 6 недель после облучения мышей дозой 6 Гр концентрация КОЕф в их КМ не отличалась от таковой у контрольных (интактных) животных. В контроле концентрация КОЕф на  $10^6$  клеток КМ составляла  $68,4 \pm 8,3$ , а после облучения –  $80,6 \pm 7,4$ . Как было показано ранее, размер очага эктопического кроветворения у облученных реципиентов существенно больше, чем у нормальных животных ( $9,4 \pm 1,4$  против  $29,2 \pm 4,7$ ,  $p < 0,05$ , данные нескольких исследований). Оказалось, что концентрация КОЕф в очаге эктопического кроветворения, сформировавшемся в облученных реципиентах, снижена в 20 раз по сравнению с таковой в очаге у необлученных ( $1,63 \pm 0,6$  против  $34,91 \pm 13,5$ ,  $p=0,03$ ). Так как размер очага у облученных реципиентов существенно больше, чем у нормальных

животных, то общее количество КОЕф в очаге у облученных реципиентов было в 3 раза меньше, чем в очаге у нормальных ( $53,95 \pm 21,5$  против  $188,1 \pm 43,6$ ,  $p < 0,02$ ).

Таким образом, можно предполагать, что КОЕф в иерархии стромальных стволовых клеток находятся выше «индуцибельных» предшественников, но ниже МСК.

Подводя итог исследованиям иерархического устройства отдела стромальных предшественников КМ человека и мыши, можно заключить следующее. На самой верхней ступени иерархии стромальных предшественников находятся МСК, обладающие способностью к самоподдержанию и дифференцировкам по всем мезенхимным направлениям, затем идут ММСК, способные к дифференцировкам, но в большинстве своем обладающие сильно сниженным пролиферативным потенциалом. Затем располагаются КОЕф, пролиферативный потенциал которых снижен еще сильнее, а дифференцированность клеток выражена выше, а следом находятся индуцибельные клетки, принимающие непосредственное участие в построении стромального микроокружения и способные пролиферировать в ответ на действие специфического индуктора. Схематическое представление описанной схемы отображено на рисунке 3.

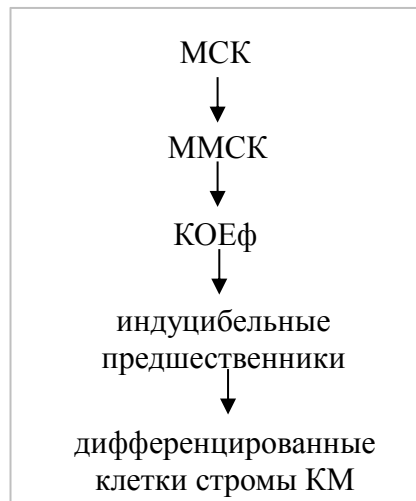


Рисунок 3 – Иерархическое древо стромальных клеток

#### *Системная регуляция стромальных предшественников: роль ПТГ*

Стромальное микроокружение КМ – это сложная многокомпонентная система, состоящая из клеточных и неклеточных элементов, способных взаимодействовать как локально, через межклеточные контакты, так и дистально, отвечая на воздействие растворимых факторов. Показано, что количество

кроветворных клеток-предшественниц у мышей изменяется после инъекций животным ПТГ. Одной из задач диссертационного исследования было изучить влияние ПТГ на стромальное микроокружение *ex vivo* и *in vivo*.

Действие ПТГ на кроветворное микроокружение было изучено *in vitro* на модели ДККМ мыши. ПТГ в культуру добавляли в концентрации  $10^{-7}$  М в течение 10 недель. Изменения в регулирующем кроветворение стромальном микроокружении оценивали по количеству продуцируемых кроветворных клеток и их предшественников в культуре. Добавление ПТГ не изменяло суммарную клеточную продукцию ( $35,22 \times 10^6$  клеток за 10 недель в контрольных культурах и в обработанных ПТГ –  $27,86 \times 10^6$ ). Концентрация КОЕ-ГМ на протяжении 6 недель не различалась в контрольных и опытных культурах, однако к 10 неделе культивирования в обработанных ПТГ культурах число КОЕ-ГМ возросло в 7 раз ( $p < 0,001$ ) (Таблица 1).

Таблица 1 – Концентрация кроветворных предшественников на 100 тыс. кроветворных клеток в ДККМ, культивировавшихся в присутствии ПТГ

Тип предшественника	Группа	Продолжительность культивирования ДККМ в присутствии ПТГ, недели		
		3	6	10
КОЕ-ГМ	Контроль	50±5,2	33±4	20±4,8
	ПТГ	77±5,6	31±5,9	147,5±3,5
КООБ 7	Контроль	21,56	25,99	0,92
	ПТГ	20,26	6,93	3,05
КООБ 14	Контроль	6,49	3,48	0,45
	ПТГ	4,18	4,58	11,22
КООБ 21	Контроль	1,01	0,43	0,28
	ПТГ	0,69	0,48	3,11
КООБ 28	Контроль	0,32	0,12	0,1
	ПТГ	0,55	0,14	0,82

Определение КООБ в ДККМ дает возможность изучить сразу большой спектр кроветворных клеток-предшественниц: от ранних, восстанавливающих кроветворение у летально облученных мышей (КООБ 28), до также полипотентных, но более зрелых предшественников, соответствующих колониобразующим единицам в селезенке (КООБ 7). Оказалось, что при

краткосрочном культивировании различий в концентрации данных предшественников нет, однако, длительное воздействие ПТГ приводит к увеличению концентрации КООБ 28 почти в 10 раз, концентрация более зрелых предшественников также увеличивается (Таблица 1). В контрольных культурах, напротив, концентрация исследованных предшественников заметно снижается по мере культивирования. Обработка ДККМ человека ПТГ в концентрации  $10^{-7}$ М в течение длительного времени не приводила ни к достоверному увеличению продукции кроветворных клеток, ни к изменению концентрации кроветворных предшественников.

Очевидно, что продолжительное воздействие ПТГ модифицирует стромальное микроокружение, увеличивая количество ниш для кроветворных предшественников. Однако в аналогичных исследованиях, проведенных нами на ДККМ человека, не было выявлено выраженного и статистически достоверного влияния ПТГ на концентрацию кроветворных предшественников. Увеличение концентрации ПТГ или продолжительности воздействия не влияло на характер ответа. Также в этих культурах были отмечены только незначительные изменения в экспрессии некоторых генов, регулирующих кроветворные ниши. Возможно, это объясняется методологическими трудностями. Известно, что для получения полноценной ДККМ, способной поддерживать кроветворные предшественники разной степени зрелости, необходимо помещать во флакон для культивирования целый, несуспендированный фрагмент КМ. Это условие выполняется при посадке длительных культур из КМ мыши, когда содержимое бедренной кости целиком имплантируется во флакон, однако, оно было невыполнимо в случае получения аспирата КМ человека. Вероятно, после механического разобщения микроокружения веретенновидные остеобласты, несущие рецептор к ПТГ и регулирующие кроветворные предшественники, в большинстве своем гибнут и не участвуют в формировании кроветворных ниш *in vitro*.

Для того, чтобы выяснить, являются ли остеобласты, на которых действует ПТГ, компонентами ниш истинных стволовых клеток-предшественниц, было проведено исследование с использованием метода конкурентной репопуляции. У химер, восстановленных смесью интактного и обработанного ПТГ КМ, количество конкурентно репопулирующих единиц (КРЕ) определялось по их клоногенным полипотентным потомкам в костном мозге – колониеобразующим единицам

селезеночным (КОЕс). Концентрация КОЕс в КМ мышей, восстановленных после летального облучения смесью необработанных и обработанных ПТГ клеток, не отличалась от контрольной в течение года после восстановления кроветворения у химер. Однако через 16 месяцев концентрация КОЕс была достоверно выше у мышей, получивших обработанный ПТГ КМ.

Пропорция Y+ КОЕс постепенно снижается в КМ мышей, восстановленных необработанными ПТГ стволовыми клетками. В то же время процент Y+ КОЕс в мышцах, восстановленных КМ, обработанным ПТГ, неуклонно возрастает и к 16 месяцам значительно превышает контрольный уровень ( $p=0,07$ ) (Рисунок 4).

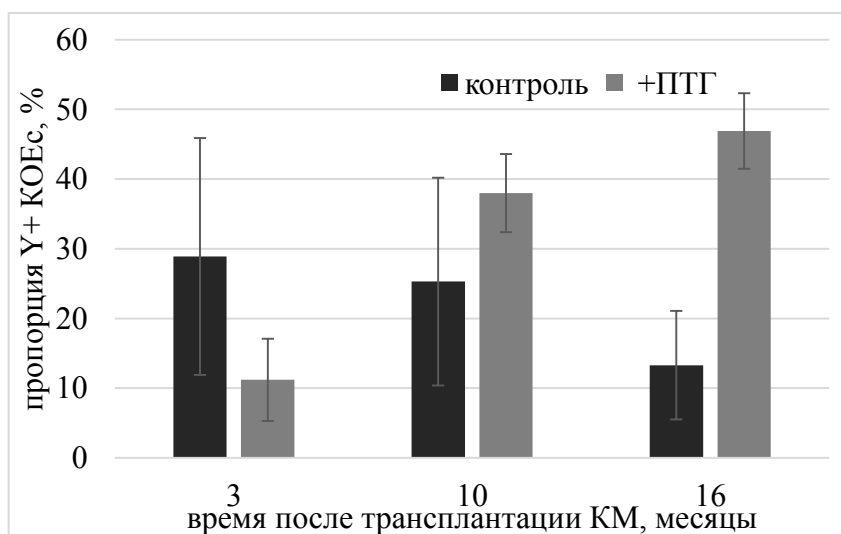


Рисунок 4 – Динамика изменения пропорции Y+ КОЕс в КМ мышей, восстановленных обработанным ПТГ (1:1) и необработанным КМ (среднее  $\pm$  ошибка среднего)

Частота Y+ КРЕ сильно изменялась в течение жизни мыши. Через 3 месяца после восстановления у контрольных животных Y+ КРЕ составляли 1 на  $38 \times 10^4$  клеток, а у мышей, восстановленных обработанным ПТГ КМ, 1 на  $68 \times 10^4$  клеток. Через 10 месяцев после восстановления частота Y+ КРЕ у экспериментальных мышей повышается в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой (1 на  $54 \times 10^4$  клеток) и составляет 1 на  $20 \times 10^4$  клеток, а еще через полгода частота Y+ КРЕ становится в 4 раза больше, чем в контрольной группе (1 на  $56 \times 10^4$  клеток) и составляет 1 на  $15 \times 10^4$  клеток.

Таким образом, очевидно, что ПТГ влияет на стромальное микроокружение очень ранних СКК, повышая их конкурентную способность восстанавливать кроветворение у летально облученных мышей. Необходимо было выяснить, участвуют ли в этом процессе самые ранние стромальные предшественники –



МСК, или же данная регуляция осуществляется только на уровне более дифференцированных клеток. Для этого было исследовано влияние ПТГ на формирование очагов эктопического кроветворения. Было показано, что из КМ мышей, получивших курс ПТГ, образуется очаг эктопического кроветворения такого же размера, как и из КМ контрольных животных (Рисунок 5).

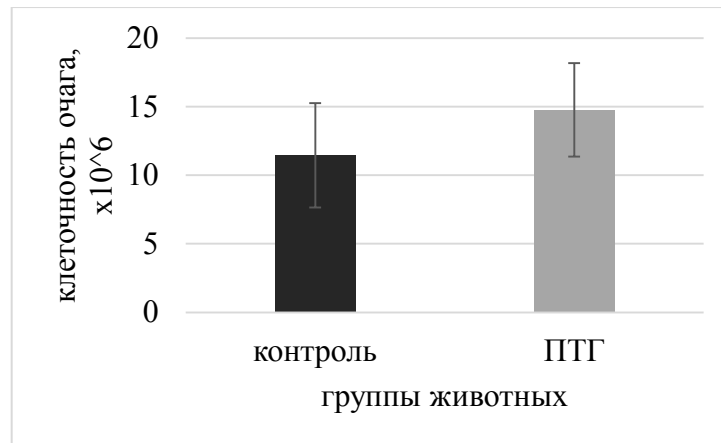


Рисунок 5 – Размер очага эктопического кроветворения, образованного из КМ мышей, получивших четырехнедельный курс ПТГ (среднее  $\pm$  ошибка среднего)

В результате экспериментов по ретрансплантации очагов, сформировавшихся в реципиентах, получавших и не получавших ПТГ, также было показано, что под воздействием паратиреоидного гормона МСК не утрачивают способности к самоподдержанию и стабильно переносят процедуру дополнительного переноса.

В представленных исследованиях продемонстрировано, что *in vivo* ПТГ не влияет на МСК ни в стабильных условиях, ни в процессе построения нового кроветворного микроокружения. Не было выявлено также значительного изменения количества остеобластов, формирующих костную раковину. Очевидно также, что ПТГ не влияет и на «индуцибельные» предшественники, участвующие в построении очага эктопического кроветворения. Вероятно, воздействие ПТГ приводит к незначительным изменениям количества остеобластов, но этого достаточно, чтобы вызвать значимые изменения в составе кроветворной ниши. Возможно, ПТГ воздействует на СКК через изменение концентрации ионов кальция. Также вероятно, что основными клетками, отвечающими за увеличение концентрации кроветворных предшественников в ответ на ПТГ, являются не собственно остеобласты, а другие, возможно, эндотелиальные клетки, для которых роль в прямой регуляции СКК неоднократно доказана. Исследования *in vitro* подтвердили тот факт, что клетки, несущие рецептор к ПТГ, входят в состав

кроветворной ниши и оказывают непосредственное влияние на регуляцию количества кроветворных предшественников разной степени зрелости. В исследованиях *in vivo*, проведенных методом конкурентной репопуляции, показано, что клетки, отвечающие на ПТГ, участвуют в регуляции количества и функционального статуса самых ранних кроветворных предшественников, способных длительно восстанавливать кроветворение у летально облученных мышей.

*Системная регуляция стромальных предшественников: влияние ГК на ММСК*

Глюкокортикоиды действуют на стромальное микроокружение разнообразно и противоречиво. ММСК культивировали с ГК в течение 6 пассажей. Добавление ГК в концентрации  $10^{-6}$ М снижало суммарную клеточную продукцию в 5 из 7 культур в  $2,2 \pm 0,2$  раза, и в 2 случаях суммарная клеточная продукция увеличилась в 1,5 и 2,5 раза (доноры ММСК - женщины 49 и 16 лет соответственно). Изучение эффективности клонирования ММСК при культивировании в присутствии ГК выявило различия при добавлении гормона к культурам, полученным от доноров мужчин и женщин (Рисунок 6).

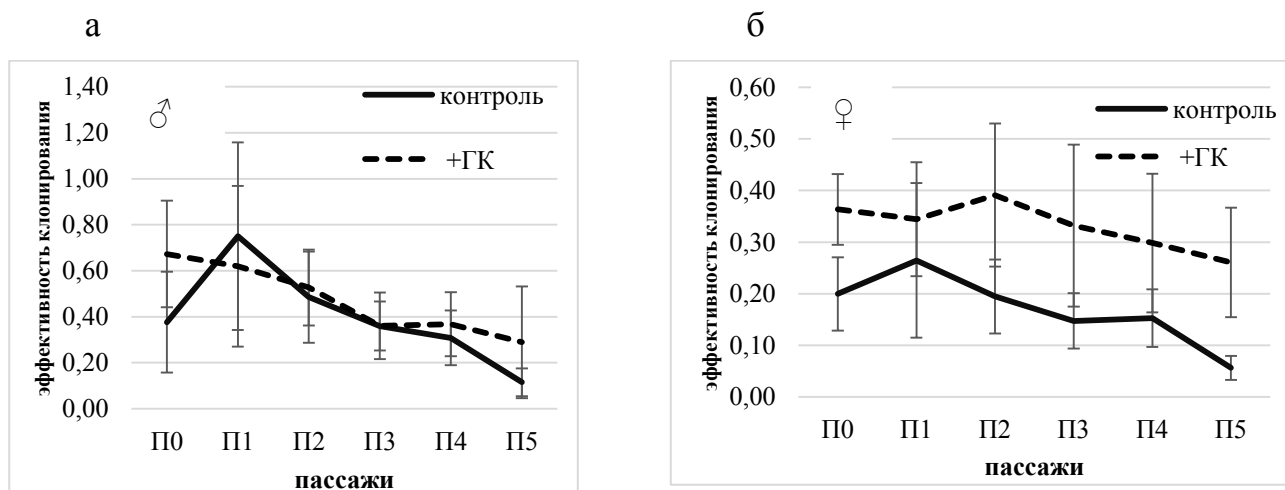


Рисунок 6 – Изменение эффективности клонирования ММСК мужчин (а) и женщин (б) под действием ГК (среднее  $\pm$  ошибка среднего)

Исследование относительного уровня экспрессии генов с помощью ПЦР-РВ выявило следующее. Уровень экспрессии генов, отвечающих за иммуномодулирующие свойства ММСК, достоверно снижается в присутствии ГК; культивирование не влияет на экспрессию этих генов. Уровень экспрессии *ВМР4* в начале культивирования не изменяется под действием ГК, затем экспрессия этого

гена в контрольных культурах несколько возрастает, тогда как культивирование в присутствии ГК приводит к 10-ти кратному снижению уровня экспрессии *BMP4* ( $p=0,03$ ). Культивируемые в стандартных условиях ММСК экспрессируют на невысоком уровне маркеры ранних и поздних стадий костной дифференцировки – *SPP1* и *BGLAP*, а также маркер жировой дифференцировки *PPARG*, другой маркер жировой дифференцировки, *FABP4*, не детектировался. Сравнивая значения, полученные на ранних и поздних пассажах, установили, что в процессе культивирования экспрессия маркеров костной дифференцировки незначительно возрастает, а гена *PPARG* – незначительно снижается. Культивирование в присутствии ГК на ранних пассажах не изменяет экспрессию маркеров костной дифференцировки, но в дальнейшем экспрессия *SPP1* полностью исчезает, а *BGLAP* – существенно снижается. Добавление в среду культивирования ГК сразу же индуцирует экспрессию гена *FABP4* на высоком уровне, но по мере культивирования экспрессия этого гена исчезает. Экспрессия гена *PPARG* также резко возрастает после добавления ГК ( $p=0,01$ ) и значимо не снижается в процессе культивирования. Изменение экспрессии генов в ММСК под действием ГК не зависело от пола донора. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ГК приводит к физиологической активации ММСК одновременно с частичным ингибированием их способности к пролиферации и иммуносупрессии, увеличением уровня экспрессии маркеров жировой и снижением уровня экспрессии маркеров костной дифференцировок.

#### *Системная регуляция стромальных клеток: старение организма*

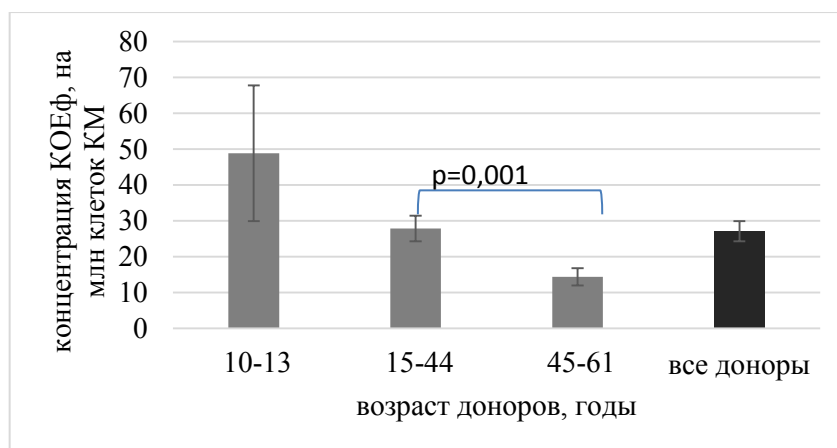
В ходе проведения исследований стромальных предшественников человека было проанализировано 96 независимых образцов КМ, из которых были получены ММСК и определена концентрация КОЕф. Это дало возможность провести сравнительный анализ ММСК и КОЕф, полученных от доноров разного возраста на большой выборке.

Все доноры были разделены на возрастные группы согласно рекомендациям ООН. В результате получилось 3 группы: доноры детского возраста ( $N=4$ , возраст от 10 до 13 лет), молодые доноры ( $N=71$ , возраст от 15 до 44 лет) и доноры среднего возраста ( $N=21$ , возраст от 45 до 61 года).

Концентрация КОЕф в КМ заметно снижается с возрастом, статистически достоверные отличия выявлены между группами доноров 15-44 лет и 45-61 лет

(Рисунок 7а). Аналогичная картина наблюдалась при анализе ростовых характеристик ММСК: достоверные отличия были выявлены при сравнении количества клеток на П0 и суммарной клеточной продукции за 3 пассажа (Рисунок 7б).

а. концентрация КОЕф в КМ



б. суммарная клеточная продукция ММСК за три пассажа

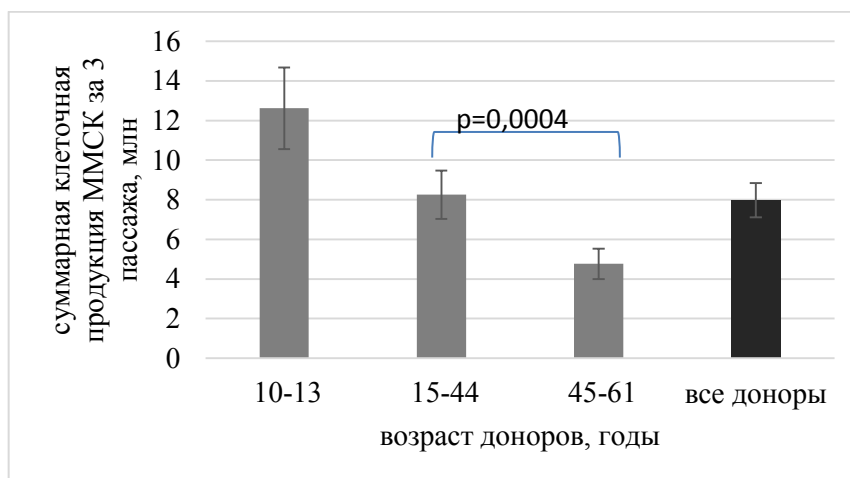
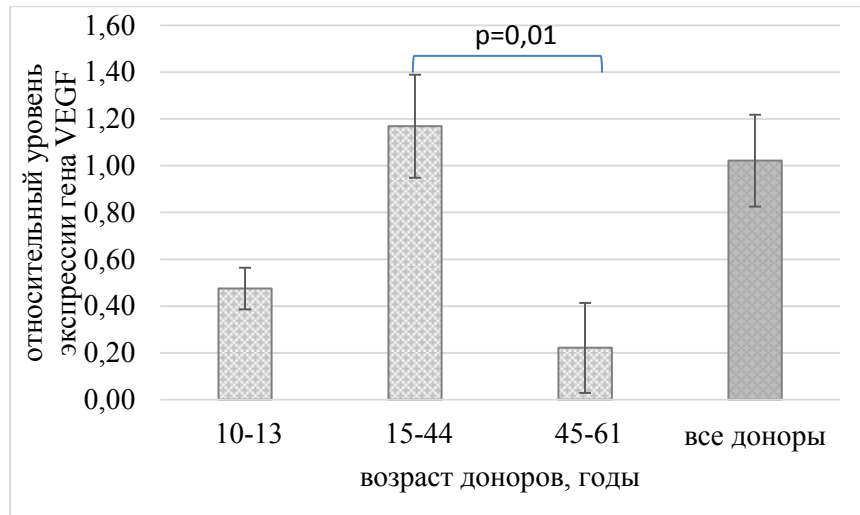


Рисунок 7 – Характеристики стромальных предшественников человека в зависимости от возраста донора КМ, данные по 96 образцам КМ (среднее  $\pm$  ошибка среднего)

При анализе относительного уровня экспрессии генов в КОЕф было выявлено, что между сравниваемыми возрастными группами существуют статистически достоверные отличия в экспрессии гена *VEGF* (Рисунок 8а). В ММСК доноров было показано связанное с возрастом снижение относительного уровня экспрессии генов *FGFR2* и *PDGFRB* (Рисунок 8б). Уровень экспрессии остальных проанализированных генов не отличался в ММСК доноров разных возрастных групп. В ММСК относительный уровень экспрессии генов *FGFR2* и

*PDGFRB* в группах молодых доноров и доноров среднего возраста повышен примерно в 1,5 - 3 раза по сравнению с донорами детского возраста.

а



б

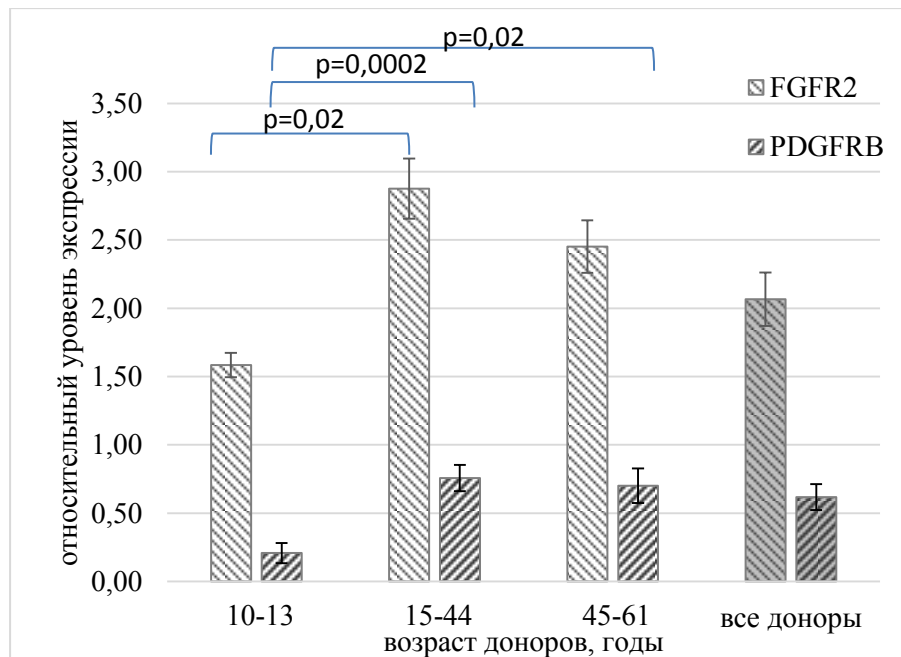


Рисунок 8 – Изменение относительного уровня экспрессии гена VEGF в КОЕф (а) и генов FGFR2 и PDGFRB в ММСК (б) доноров в разных возрастных группах (среднее  $\pm$  ошибка среднего)

Таким образом, показано, что в стромальных предшественниках доноров старшего возраста снижается способность к стимуляции роста сосудов, а также выявлено повышение экспрессии генов, участвующих в пролиферации клеток, что, однако, не приводит к улучшению ростовых характеристик.

В мировой литературе имеются данные, что концентрация КОЕф в КМ детей выше, чем в КМ взрослых. В нашем исследовании только 4 из 96 доноров были младше 15 лет, подавляющее большинство доноров были взрослыми. Тем не менее, оказалось, что концентрация КОЕф снижается с возрастом и во взрослой популяции. Кроме того было показано, что с возрастом в КОЕф снижается относительный уровень экспрессии гена фактора роста сосудов, *VEGF*. Возможно, это связано с уменьшением количества периваскулярных ниш в КМ с возрастом, что сопровождается ухудшением кроветворения. Однако роль КОЕф в регуляции роста сосудов в КМ ранее описана не была. На мышинных моделях было продемонстрировано, что с возрастом снижается количество и плотность кроветворных и лимфатических сосудов в коже и в мышцах, что обуславливает многие возрастные изменения организма. Выявленное нами в КОЕф снижение уровня экспрессии *VEGF* с возрастом указывает на механизм подобных изменений в организме человека.

Известно, что популяция ММСК является гетерогенной по своему пролиферативному потенциалу, который снижается с возрастом донора, что согласуется с полученными в наших работах данными. Интересно, что при этом наблюдается повышение уровня экспрессии генов, участвующих в двух сигнальных путях, регулирующих пролиферацию клеток. Это FGF2- и PDGF-опосредованные пути. Тем не менее, выявленное повышение экспрессии не является продуктивным, и не приводит к компенсации ухудшений возрастных характеристик стромальных предшественников.

В целом, представленное исследование уникально по количеству исследованных образцов и возрастному диапазону доноров. Полученные данные подтверждают непосредственное участие исследованных стромальных предшественников (КОЕф и ММСК) в процессах, связанных со старением, происходящих в организме человека.

*Влияние патологического кроветворения на свойства клеток-предшественниц стромального микроокружения: апластическая анемия*

Эффективность получения культур ММСК не отличалась у больных АА и доноров и была равна 100%. Суммарная клеточная продукция была сходной в культурах больных и доноров в течение первых 6 пассажей (Рисунок 9), затем рост культур от доноров практически прекращался, тогда как ММСК от больных

продолжали пролиферировать и были способны проделать еще, по крайней мере, 6 пассажей, удвоив тем самым суммарную клеточную продукцию. Анализ культур ММСК от больных АА, находившихся в момент взятия КМ в дебюте и на первом этапе течения болезни (до начала комбинированной иммуносупрессивной терапии (ИСТ)) не выявил отличий в суммарной клеточной продукции от таковой в донорских культурах. При сравнении ММСК от пациентов в дебюте выяснилось, что при ТАА ММСК пролиферируют активнее, чем при НАА, а для ММСК пациентов в ремиссии наблюдается обратная ситуация. ММСК больных РАА (отсутствие ответа на лечение в течение 6 месяцев) пролиферировали менее интенсивно и достоверно отличались от других подгрупп.

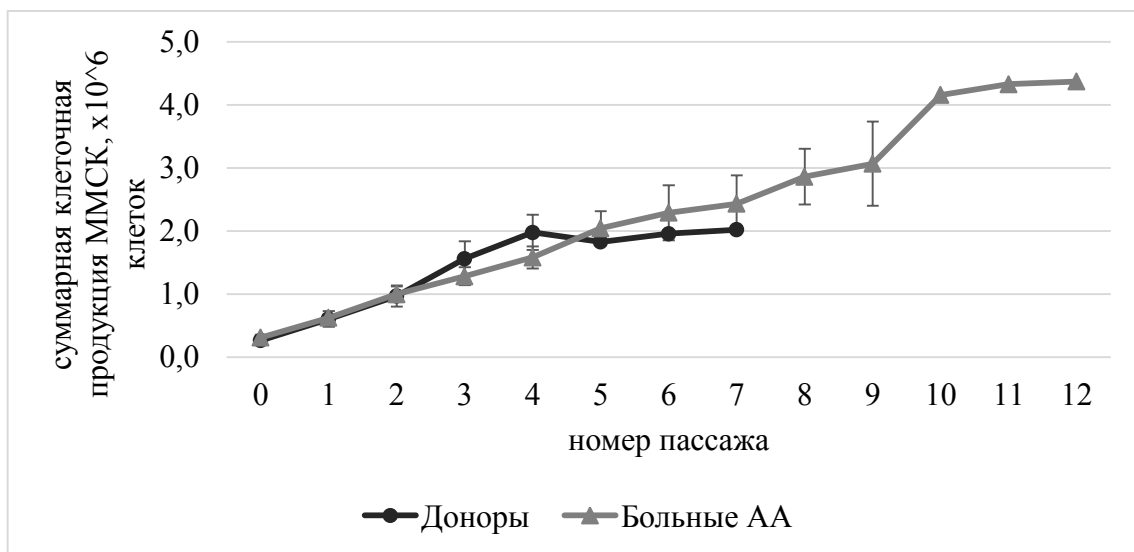


Рисунок 9 – Суммарная клеточная продукция ММСК здоровых доноров и больных АА

Время, необходимое для достижения конfluenceности после исходной посадки (время до П0) не отличалось в культурах ММСК больных АА и здоровых доноров ( $15,3 \pm 0,9$  дней в культурах больных против  $14,2 \pm 0,6$  дней в культурах доноров,  $p > 0,05$ ). Время до П0 является косвенным показателем исходного количества ММСК, присутствовавших в образце КМ. Отсутствие отличий по данному показателю указывает на то, что количество ММСК в исходных образцах КМ не отличалось у доноров и больных АА. Итак, ММСК из КМ больных АА способны к более длительной пролиферации в культуре, по сравнению с ММСК, полученных от доноров КМ. Среди всех форм апластической анемии, исследованных в нашей работе, только ММСК больных РАА оказались не способны к длительной пролиферации. Тот факт, что доля способных к длительному пассированию культур ММСК, полученных от больных,

находящихся как в периоде ремиссии, так и в дебюте заболевания была сравнима, указывает на то, что изменения в строме связаны непосредственно с патогенезом заболевания, а также на то, что строма медленнее отвечает на успешную терапию, чем кроветворная ткань.

Для того, чтобы охарактеризовать способность ММСК больных АА формировать функциональное кроветворное микроокружение, необходимо было выяснить, способны ли ММСК больных АА к индукции жировой и костной дифференцировок в культуре.

Оценка качества дифференцировки осуществлялась двумя методами: гистохимически – по характеру специфического окрашивания (краситель Oil Red О для выявления жировой и ализариновый красный для выявления костной дифференцировок), а также путем полуколичественного анализа относительного уровня экспрессии соответствующих маркерных генов.

В 17,5% культур донорских ММСК и 20% больных АА индуцировать жировую дифференцировку не удалось. Возможно, это отражает индивидуальные отличия ММСК или исходных образцов КМ. Полноценная жировая дифференцировка, сопровождающаяся такими морфологическими изменениями, как появление округлых клеток, содержащих большие липидные капли, проходила в культурах ММСК больных АА в несколько меньшем количестве случаев, чем в культурах ММСК доноров (Таблица 2).

Таблица 2 – Жировая дифференцировка в культурах ММСК доноров и больных АА

Доля культур ММСК с описанными признаками жировой дифференцировки, %			
	Морфология изменена, есть крупные жировые капли	ИЛИ морфология изменена, ИЛИ есть крупные жировые капли	НЕ изменена морфология, НЕТ крупных жировых капель
ММСК больных АА (N=15)	47	33	20
ММСК доноров (N=17)	59	23,5	17,6

Среди ММСК больных АА была выше доля культур, в которых жировая дифференцировка проходила частично (только с образованием капель жира в клетках без изменения их морфологии) или с изменением морфологии, но без образования жировых капель. При этом тяжесть аплазии не влияет на способность ММСК к дифференцировке, а проведенная ИСТ, напротив, угнетает адипогенез.



Уровень экспрессии IGF1 в недифференцированных ММСК не является прогностическим фактором успешности дифференцировки.

Известно, что в КМ больных АА повышено количество адипоцитов за счет угнетения остеогенеза. Мы не обнаружили статистически достоверных отличий в уровне экспрессии гена-маркера жировой дифференцировки *PPARG* ни при сравнении с донорскими ММСК всей группы больных в целом, ни при отдельном сравнении в зависимости от тяжести заболевания или от его стадии. Выборка больных, проанализированная в нашем исследовании, отличалась от других исследований заметно большим размером и доминированием среди пациентов мужчин.

В 16,7% культур ММСК доноров и в 24% культур ММСК от больных АА костную дифференцировку индуцировать не удалось, либо наблюдались единичные отложения кальция, выявляемые при окрашивании ализариновым красным. В остальных культурах была получена полноценная костная дифференцировка с образованием кристаллов кальция и изменением морфологии продифференцировавшихся ММСК. По морфологии и типу отложения кальция отличий выявлено не было. Среди тех пациентов, чьи ММСК не ответили на индукцию дифференцировки, у 80% была диагностирована тяжелая форма АА (ТАА). Таким образом, при анализе экспрессии маркерных генов в ММСК больных АА не было выявлено снижения способности к костной дифференцировке. В нашем исследовании, в отличие от большинства опубликованных работ, анализировали ММСК от довольно большого числа больных с разной тяжестью заболевания и этапом лечения. При этом изменений, описанных другими авторами (снижение способности к костной дифференцировке за счет увеличения жировой), не было выявлено ни при анализе всей группы больных в целом, ни при разделении на подгруппы по тяжести заболевания или его стадии. Однако было выявлено ухудшение ответа ММСК от больных в период ремиссии на индукторы дифференцировки, что может являться побочным эффектом терапии, применявшейся для лечения АА.

При сравнении концентрации КОЕф в КМ доноров и больных АА оказалось, что в КМ больных АА этот показатель повышен практически в 1,5 раза, хотя отличия статистически недостоверны ( $60,52 \pm 8,96$  у больных против  $39,6 \pm 5,98$  на 1 млн клеток КМ у доноров,  $p=0,06$ ). При анализе этого показателя в зависимости от

стадии лечения заболевания оказалось, что в дебюте (до начала ИСТ), а также в процессе данной терапии концентрация КОЕф в КМ больных АА (N=21) статистически достоверно превышает таковую в КМ здоровых доноров соответствующего возраста ( $82,93 \pm 15,01$  на 1 млн клеток КМ,  $p=0,02$ ). У больных РАА (N=10) этот показатель даже немного снижен по сравнению с донорами ( $31,38 \pm 8,72$  на 1 млн клеток КМ). Больные с нетяжелой формой АА (НАА) не отличались по данному показателю от больных с ТАА. В КМ больных в ремиссии заболевания (N=11) концентрация КОЕф в КМ практически не отличается от донорской ( $45,65 \pm 12,55$  на 1 млн клеток КМ).

Оказалось, что в КМ больных АА увеличена не только концентрация КОЕФ, но и размер получаемых из КОЕФ колоний (Рисунок 10). Размер колоний, образуемых КОЕф больных АА, равнялся  $29,3 \pm 2,68$  мм<sup>2</sup> и был (по средним значениям) в 1,9 раза больше ( $p=0,00001$ ), чем размер колоний, образуемых КОЕф доноров ( $15,96 \pm 1,54$  мм<sup>2</sup>).

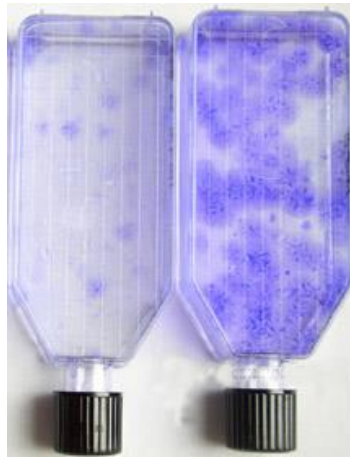


Рисунок 10 – Внешний вид фибробластных колоний, получаемых из КМ здоровых доноров (слева) и больных АА (справа, выбран типичный пример)

Принимая во внимание изложенные выше результаты, было решено проверить, зависит ли концентрация КОЕф и размер колоний от уровня экспрессии основного фактора роста фибробластов *FGF2*. Оказалось, что корреляции между размером колоний и уровнем экспрессии *FGF2*, а также между концентрацией КОЕф и уровнем экспрессии *FGF2* в них нет (коэффициент корреляции 0,2 в обоих случаях). В подтверждение этих данных, не было выявлено отличий в уровне экспрессии *FGF2* в КОЕф больных по сравнению с донорами

При анализе ММСК 3 больных АА до и после выполнения им алло-ТКМ было выявлено повышение пролиферативной активности и суммарной клеточной продукции как до, так и после алло-ТКМ. Это совпадает с данными, описанными выше.

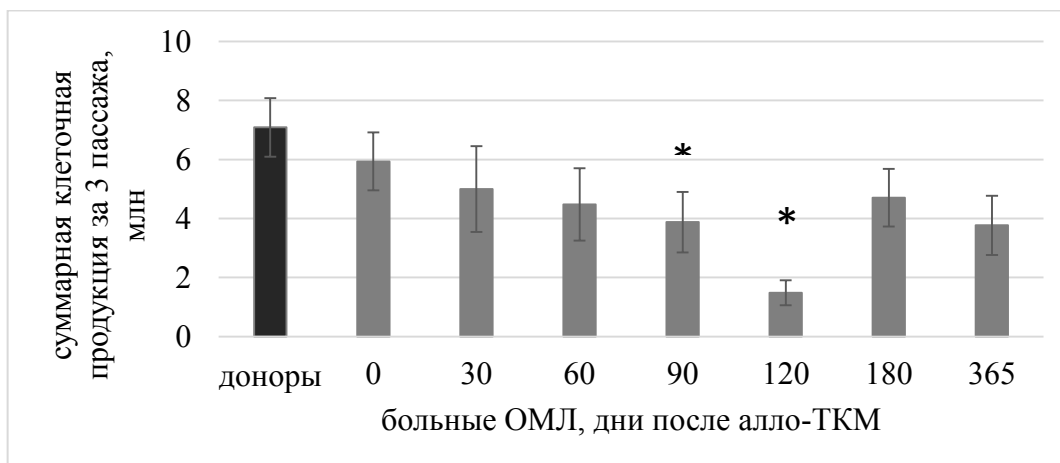
Таким образом, можно предположить, что механизмы физиологической активации стромального микроокружения, реализованные в патогенезе АА, сохраняются и в ремиссии, и даже предтрансплантационное кондиционирование принципиально их не нарушает.

*Изменения стромального микроокружения у больных ОМЛ и ОЛЛ до и после выполнения им алло-ТКМ*

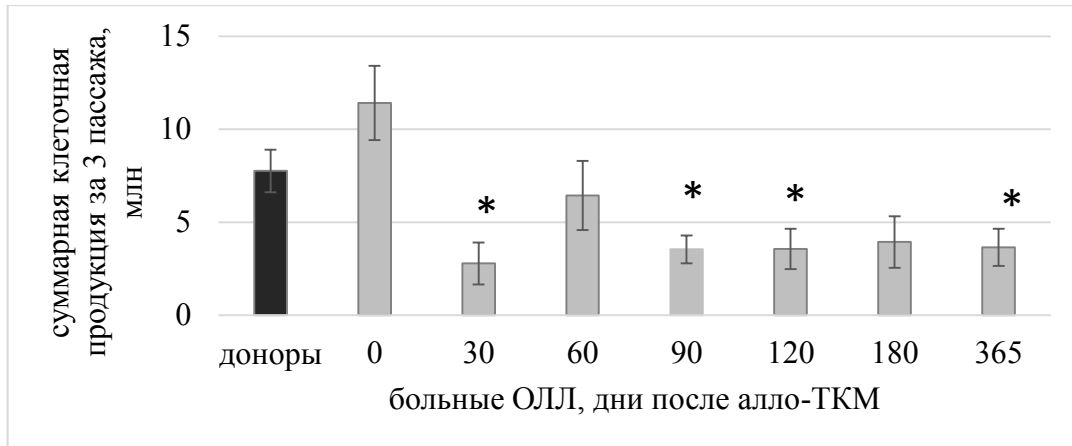
В процессе развития разных типов лейкозов опухолевые клетки заселяют кроветворную территорию КМ, тем самым угнетая и вытесняя собственные кроветворные клетки пациента. Не так давно было показано, что при некоторых нозологиях (например, ОМЛ или различные миелодисплазии) злокачественные клетки воздействуют на окружающие их стромальные клетки пациента таким образом, что последние повышают устойчивость лейкозных клеток к химиотерапии, зачастую при этом такое микроокружение становится малоприспособленным для поддержания здоровых СКК. В связи с этим было исследовано состояние ММСК и КОЕф у больных ОМЛ и ОЛЛ до проведения предтрансплантационного кондиционирования, а также в течение года после проведения алло-ТКМ.

Анализ суммарной клеточной продукции и времени до ПО показал, что перед алло-ТКМ эти характеристики ММСК больных ОМЛ и ОЛЛ не отличаются от таковых у ММСК, полученных из КМ здоровых доноров (Рисунок 11, точка 0).

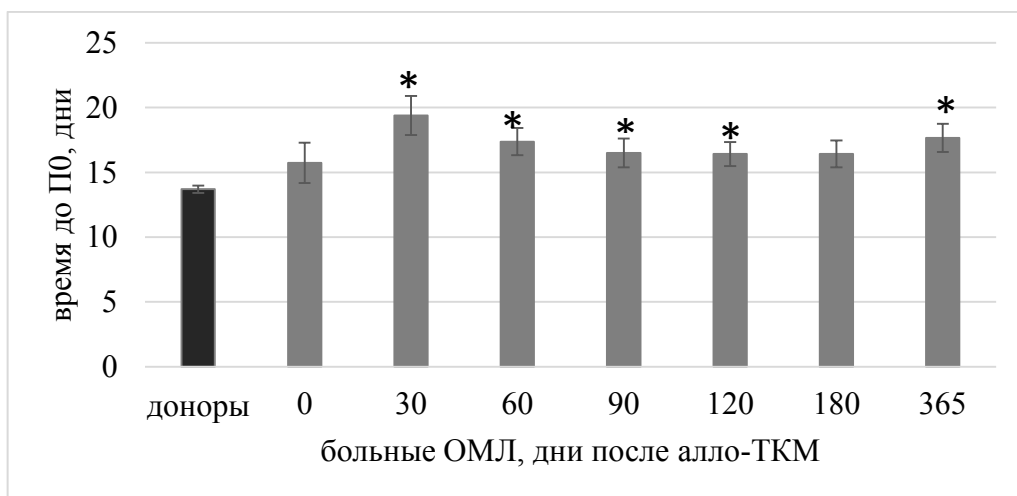
а



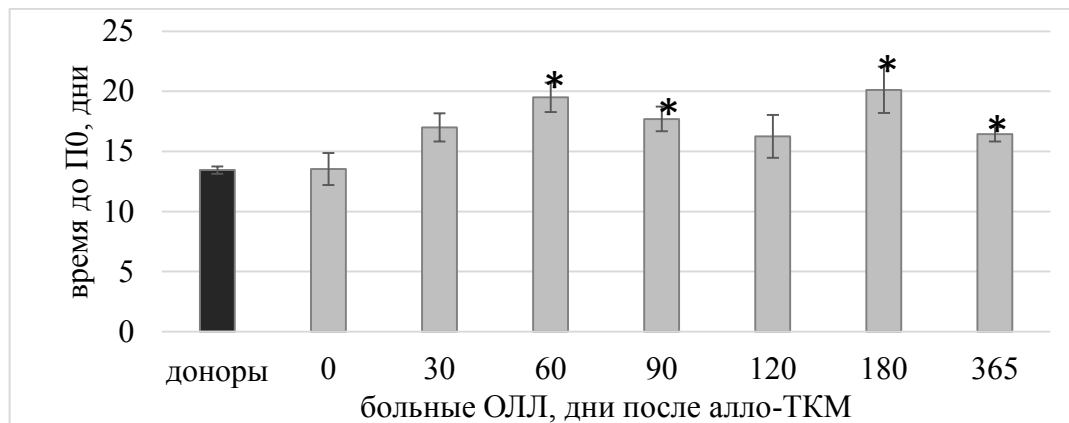
б



в



г



\* - означает  $p < 0,05$  при использовании *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок при сравнении с аналогичной группой ММСК доноров

Рисунок 11 – Пролиферативные характеристики ММСК больных ОМЛ и ОЛЛ до и после алло-ТКМ: суммарная клеточная продукция за 3 пассажа (а, б) и время до ПО (в, г) (среднее  $\pm$  ошибка среднего)

Следовательно, медикаментозные препараты, входящие в состав протоколов лечения, использованных для достижения ремиссии у этих пациентов, не подавляют пролиферацию ММСК. Однако были выявлены статистически достоверные изменения в относительном уровне экспрессии некоторых генов. Оказалось, что до проведения алло-ТКМ в ММСК больных ОМЛ относительный уровень экспрессии генов *CSF1* и *FGFR1* был снижен. В то же время, в ММСК больных ОЛЛ снижение уровня экспрессии гена *FGFR1* сопровождалось снижением относительного уровня экспрессии гена *PDGFRA*. Исходя из этого можно было предположить наличие изменений в пролиферативных способностях ММСК, так как сигнальный путь FGF2 оказался затронут при обеих нозологиях. Однако достоверных отличий в пролиферации ММСК до алло-ТКМ выявлено не было. Возможно, существует другой механизм регуляции пролиферации ММСК, способный компенсировать изменения сигнальных путей FGF2 и PDGF. Относительный уровень экспрессии *TGFB2* был достоверно повышен в ММСК больных ОЛЛ, однако, в ММСК больных ОМЛ уровень экспрессии *TGFB1*, и *TGFB2* не отличался от ММСК доноров. Таким образом, сигнальный путь TGF не может быть единственным, ответственным за сохранение пролиферативных свойств ММСК. Итак, при анализе ММСК до проведения алло-ТКМ были выявлены некоторые изменения экспрессии генов, однако, они были скомпенсированы другими факторами и не привели к функциональным изменениям ММСК.

После проведенного предтрансплантационного кондиционирования было показано значительное снижение пролиферативного потенциала ММСК, который не восстановился в течение первого года после алло-ТКМ ни у пациентов с ОМЛ, ни в случае ОЛЛ (Рисунок 11, точки 30-365). Одновременно было отмечено значительное увеличение времени до П0 в культурах ММСК больных ОМЛ и ОЛЛ по сравнению с донорскими. Результаты исследований ММСК человека показали, что данные стромальные клетки чувствительны к высоким дозам цитостатических препаратов, используемых в режимах предтрансплантационного кондиционирования. Это является дополнительным свидетельством в пользу того, что культивируемые ММСК, широко используемые в разнообразных исследованиях, не являются популяцией истинных стволовых клеток.

Предтрансплантационное кондиционирование выявило дополнительные гены, по-разному измененные в ММСК пациентов ОМЛ и ОЛЛ. Было обнаружено долговременное подавление сигнальных путей PDGF (сниженный относительный уровень экспрессии генов *PDGFRB* и *PDGFRA* в ММСК больных ОМЛ и ОЛЛ, соответственно) и FGF2 (сниженный относительный уровень экспрессии гена *FGFR1* в ММСК больных ОМЛ и ОЛЛ). В ММСК больных ОЛЛ также было выявлено длительное снижение относительного уровня экспрессии гена *SDF1*.

В представленной работе были проанализированы ММСК пациентов, находящихся в рецидиве ОМЛ и ОЛЛ. Суммарная клеточная продукция ММСК больных ОМЛ в рецидиве не отличалась от таковой у больных в ремиссии, у больных ОЛЛ – у одного была существенно снижена, тогда как у второго этот показатель не отличался от такового у больных ОЛЛ в ремиссии. Однако в случае, когда рецидив происходил после проведения алло-ТКМ, рост ММСК наблюдали только в 2 из 7 случаев ОМЛ и в 1 из 2 случаев ОЛЛ, что указывает на дополнительное нарушение пролиферативных свойств ММСК после алло-ТКМ под воздействием бластных клеток и химиотерапевтических препаратов.

В ММСК больных ОМЛ в рецидиве до проведения им алло-ТКМ относительный уровень экспрессии генов *IDO1*, *IL6*, *TGFB2* и *ICAM1* был снижен. У пациентов в рецидиве ОЛЛ до проведения им алло-ТКМ вообще не было выявлено экспрессии гена *IDO1* (выявлена во всех образцах ММСК пациентов в ремиссии), экспрессия генов *TGFB2* и *ICAM1* была существенно снижена. В то же время относительный уровень экспрессии гена *PTGES* был повышен. Таким образом, на небольшой выборке больных ОМЛ и ОЛЛ можно видеть, что в рецидиве заболевания основные характеристики стромальных предшественников изменяются, причем, преимущественно на генном уровне. Выявлены как общие для двух нозологий нарушения экспрессии генов, участвующих в регуляции пролиферации и иммунного ответа (*IDO1*, *TGFB2*, *ICAM1*), так и различные (снижение экспрессии гена *IL6* в случае ОМЛ и повышение экспрессии гена *PTGES* в случае ОЛЛ).

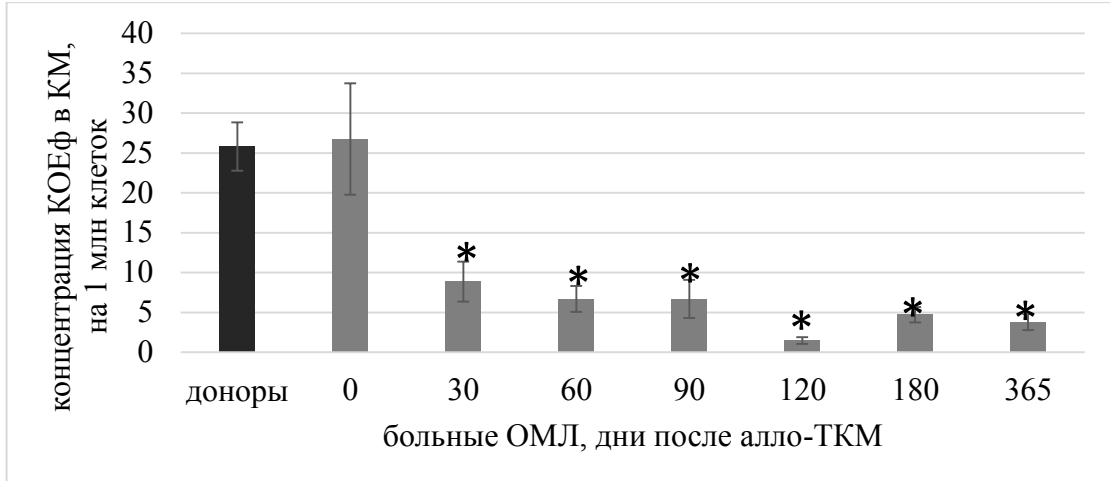
Из результатов, полученных в экспериментах на мышинной модели, а также при анализе стромальных предшественников у пациентов до и после алло-ТКМ, стало очевидно, что режим предтрансплантационного кондиционирования оказывает существенное воздействие на свойства стромальных клеток-

предшественниц, в частности, на ММСК. Поэтому решено было сравнить ММСК пациентов, получавших миелоаблативное кондиционирование, с ММСК пациентов, получавших кондиционирование в режиме пониженной интенсивности. При сравнении ростовых характеристик ММСК от больных, получивших разные режимы кондиционирования, не было выявлено статистически достоверных различий. Сравнение уровней экспрессии различных генов также не выявило единой картины изменений. В целом, пока нет оснований утверждать, что режим пониженной интенсивности в меньшей мере повреждает стромальные клетки.

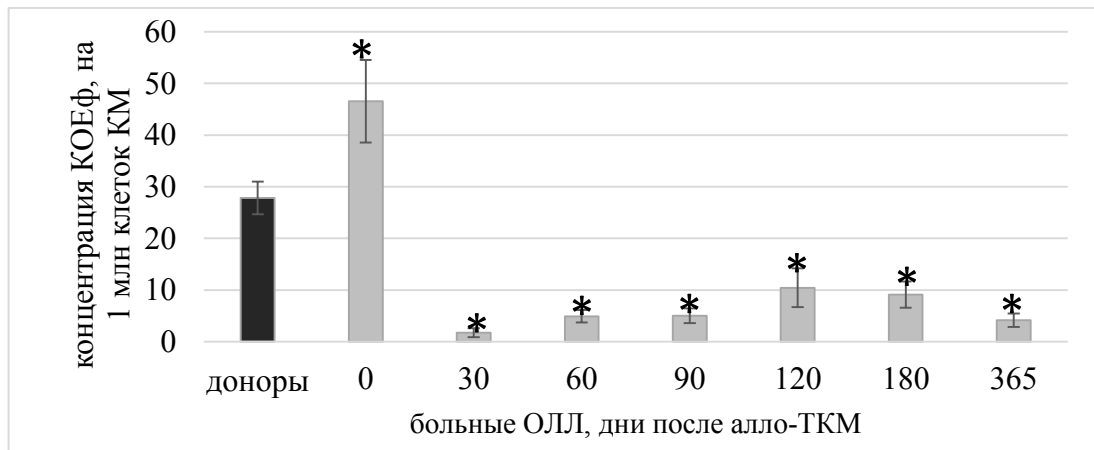
После алло-ТКМ у некоторых больных развилась оРТПХ. Прежде всего, ММСК всех больных были ретроспективно проанализированы в точке 0 с целью выявления возможных прогностических факторов. В группе ОМЛ не было выявлено достоверных отличий между пролиферативными свойствами ММСК пациентов, у которых развилась и не развилась оРТПХ. Однако в группе ОЛЛ суммарная клеточная продукция была достоверно ниже в культурах пациентов, у которых впоследствии развилась оРТПХ. При анализе экспрессии генов в ММСК тех пациентов, у которых оРТПХ развилась в первый месяц после алло-ТКМ, было обнаружено достоверное снижение относительного уровня экспрессии гена *CFH*. Конечно, небольшое количество образцов не дает возможности сделать достоверные выводы, однако, можно предположить, что снижение относительного уровня экспрессии гена *CFH* в ММСК больных до начала алло-ТКМ может указывать на вероятность развития оРТПХ в первый месяц после алло-ТКМ. Более того, в 4 из 5 проанализированных культур ММСК в момент манифестации оРТПХ было обнаружено снижение экспрессии гена *CFH*. Несомненно, изучение экспрессии этого гена в стромальных клетках больных с целью выяснения его участия в механизмах развития оРТПХ, позволит в дальнейшем определять группы риска пациентов с тенденцией к развитию данного серьезного осложнения.

Также в КМ больных ОМЛ и ОЛЛ были исследованы КОЕф (Рисунок 12).

а



б



\* - означает  $p < 0,05$  при использовании *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок при сравнении с аналогичной группой ММСК доноров

Рисунок 12 – Изменение концентрации КОЕф в КМ больных ОМЛ (а) и ОЛЛ (б) до и после алло-ТКМ

Ответ КОЕф на предтрансплантационное кондиционирование был аналогичен тому, что наблюдалось ранее в мышинной модели. Если до алло-ТКМ концентрация КОЕф в КМ больных ОМЛ не отличалась от таковой у доноров, а в КМ больных ОЛЛ даже превышала ее, то после алло-ТКМ она снизилась практически до нуля и оставалась сниженной на протяжении всего времени наблюдения. Не было выявлено отличий между миелоаблативным режимом и режимом пониженной интенсивности. По-видимому, режимы предтрансплантационного кондиционирования наносят практически невозполнимый ущерб этому классу стромальных предшественников. Снижение относительного уровня экспрессии генов *FGFR1*, *FGFR2* и *VEGF* было выявлено в КОЕф из КМ больных ОМЛ после алло-ТКМ. Похоже, сигнальный путь FGF2



существенно поражен в строме больных после алло-ТКМ, что является причиной снижения пролиферативного потенциала КОЕф и их неспособности формировать колонии. Однако у больных ОЛЛ аналогичного снижения экспрессии генов выявлено не было. По всей вероятности, существенное снижение концентрации КОЕф, наблюдаемое у больных ОЛЛ после алло-ТКМ, обусловлено нарушениями в других сигнальных путях, а не в пути FGF2. Полученные данные позволяют предположить, что ответ более поздних предшественников стромы, КОЕф, различен в зависимости от формы заболевания – ОМЛ или ОЛЛ. Известно, что при ОМЛ некоторые бластные клетки локализуются преимущественно рядом с кровеносными сосудами и способны вызвать неоваскуляризацию. Вероятно, они воздействуют на стромальные клетки, что вызывает снижение одного из факторов, регулирующих васкуляризацию, VEGF.

Итак, ростовые характеристики ММСК и концентрация КОЕф в КМ больных острыми лейкозами в ремиссии до выполнения им алло-ТКМ были изменены статистически незначимо, однако, были выявлены изменения в экспрессии генов. Предтрансплантационное кондиционирование привело к длительному и значимому нарушению пролиферативных характеристик ММСК, снижению количества ММСК и концентрации КОЕф в КМ пациентов. Характер изменения экспрессии генов позволил выделить несколько общих сигнальных путей, затронутых и при ОМЛ, и при ОЛЛ, например, сигнальные пути PDGF и FGF2, а также уникальных для каждого заболевания генов. Результаты данной работы выявили возможные механизмы повреждения костномозговой стромы после алло-ТКМ у больных ОМЛ и ОЛЛ. Повреждения, наносимые стромальным клеткам лекарственными препаратами, применяемыми при различных протоколах лечения лейкозов, также должны приниматься во внимание. Два исследованных типа предшественников повреждаются по-разному, что еще раз подтверждает их различное положение в иерархии стромальных клеток.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Для стромальных клеток КМ иерархическое расположение предшественников ранее было установлено довольно приблизительно. В связи с этим были проведены исследования по установлению взаимного расположения известных стромальных клеток-предшественниц. Были поставлены как эксперименты *in vivo* (на мышинной модели), так и *in vitro*, с использованием стромальных предшественников мыши и

человека. В процессе исследования чувствительности стромальных предшественников к цитостатическим препаратам было показано, что истинные МСК, способные к переносу полноценного кроветворного микроокружения, очевидно, находятся в состоянии покоя, так как нечувствительны к такого рода воздействиям. КОЕф же, будучи пролиферирующими клоногенными стромальными предшественниками, сильно страдают при введении цитостатических препаратов, более того, повреждения являются долгосрочными и не компенсируются в течение продолжительного времени. Очевидно, что КОЕф находятся в иерархии стромальных предшественников ниже МСК. Также в нескольких независимых экспериментах разными методами была продемонстрирована гетерогенность этого отряда стромальных клеток-предшественниц. Ввиду активного использования во всем мире ММСК из различных тканей человека в представленной работе впервые был поставлен вопрос об иерархической позиции данного типа предшественников. Показано, что ММСК являются менее дифференцированными в сравнении с КОЕф, а значит, располагаются выше в иерархическом древе. В лаборатории Физиологии кроветворения ранее было показано существование индуцибельных предшественников, способных активно пролиферировать в ответ на IL1. В настоящей работе продемонстрировано, что эти клетки нужно располагать в иерархии стромальных предшественников ниже КОЕф. Итого, установлено следующее иерархическое расположение стромальных клеток-предшественниц: наименее дифференцированными являются МСК, затем следуют ММСК, КОЕф, индуцибельные предшественники, дифференцированные клетки стромы. Исследований подобного плана ранее не проводилось, результаты являются оригинальными и представляют ценность как для понимания устройства отдела стромальных предшественников в КМ, так и для более точного представления о свойствах клеток-мишеней и о возможных последствиях для системы стромальных клеток при планировании дальнейших экспериментов и клинических исследований.

В работе были охарактеризованы некоторые пути регуляции стромальных предшественников. Впервые однозначно было показано, что ПТГ не влияет на истинные МСК, не было выявлено и заметных изменений в количестве дифференцированных остеобластов. Однако было продемонстрировано, что ПТГ

влияет на клетки, входящие в состав кроветворной ниши и регулирующие количество и функциональный статус самых ранних кроветворных предшественников, способных длительно восстанавливать кроветворение у летально облученных мышей. Эти данные были впервые получены в экспериментах *in vivo*, включающих в себя оценку не только выживания, но и функционального состояния стволовых кроветворных клеток. Поэтому полученные результаты обладают высокой степенью достоверности для понимания регуляции кроветворных клеток стромальным микроокружением. Также было показано, что ГК приводит к физиологической активации ММСК одновременно с частичным ингибированием их способности к пролиферации и иммуносупрессии, увеличением уровня экспрессии маркеров жировой и снижением уровня экспрессии маркеров костной дифференцировок. Эти результаты впервые были получены в исследованиях ММСК здоровых доноров и потому обладают большой теоретической и практической значимостью.

В качестве еще одного системного воздействия на отдел стромальных предшественников рассматривали процессы старения организма. В проведенных нами исследованиях КМ 113 здоровых доноров в возрасте от 10 до 61 года были выявлены следующие изменения: с возрастом снижается концентрация КОЕф в КМ и снижается экспрессия гена *VEGF*; среди ММСК снижается количество клоногенных клеток, падает клеточная продукция, но возрастает экспрессия генов *FGFR2* и *PDGFRB*. Данное исследование уникально по количеству исследованных образцов и возрастному диапазону доноров. Полученные данные подтверждают непосредственное участие исследованных стромальных предшественников (КОЕф и ММСК) в происходящих в организме человека процессах, связанных со старением.

Существует взаимосвязь качества кроветворения и функционального состояния стромального микроокружения. Нарушение функционирования стромы может вести к угнетению гемопоэза и наоборот. Подтверждение этого предположения было получено при изучении стромальных предшественников у больных заболеваниями системы крови. Одной из возможных причин развития апластической анемии является нарушения именно в стромальном микроокружении костного мозга. В данной работе впервые был проведен разносторонний анализ двух типов стромальных клеток-предшественниц (ММСК

и КОЕф), полученных из КМ больных АА разной степени тяжести и на различных стадиях лечения. Показано, что при АА происходит физиологическая активация стромального микроокружения у больных АА. Эти данные оригинальны и достоверны, так как получены на достаточно большой выборке больных разного возраста; исследований, аналогичных этому, в мировой литературе нет. Результаты его вносят вклад в понимание процессов, происходящих в КМ больных АА, что важно как с теоретической, так и с практической точек зрения. При различных формах лейкозов опухолевые клетки заселяют территорию костного мозга, подавляя собственное кроветворение больного. Более того, для некоторых заболеваний показано, что злокачественные клетки изменяют окружающие их стромальные клетки, при этом такое микроокружение становится малоприспособленным для поддержания здоровых СКК. В связи с этим было исследовано состояние ММСК и КОЕф у больных ОМЛ и ОЛЛ до проведения предтрансплантационного кондиционирования, а также в течение года после проведения алло-ТКМ. Работа уникальна по количеству пациентов, стромальные предшественники которых были тщательно исследованы как до, так и в 6 временных точках после проведения алло-ТКМ. Показано, что пролиферативные характеристики ММСК больных ОМЛ и ОЛЛ необратимо не повреждаются при химиотерапии, используемой для достижения ремиссии. Однако были выявлены изменения в относительном уровне экспрессии некоторых генов, тем не менее, они были скомпенсированы другими факторами и не привели к функциональным изменениям ММСК. В ММСК больных ОМЛ до алло-ТКМ также был снижен относительный уровень экспрессии генов *CSF1* (макрофагальный фактор роста) и *FGFR1* (рецептор 1 типа к основному фактору роста фибробластов). Видимо, экспрессия этих генов была необратимо повреждена либо в ходе развития заболевания, либо под воздействием препаратов, использованных для достижения ремиссии. В ММСК больных ОЛЛ было выявлено длительное снижение относительного уровня экспрессии гена *SDF1*, отвечающего за нахождение СКК в нише. В работе продемонстрировано, что при ОЛЛ и ОМЛ даже у пациентов в ремиссии наблюдаются несхожие изменения в строме КМ. Очевидно, в процессе развития разных лейкозов разные типы бластных клеток по-разному поражают костномозговое микроокружение. Тот факт, что изменения сохраняются в течение длительного времени даже в отсутствие бластных клеток, представляется важным

для понимания состояния пациента. Предтрансплантационное кондиционирование выявило дополнительные гены, по-разному измененные в ММСК пациентов ОМЛ и ОЛЛ, также было выявлено значительное снижение пролиферативного потенциала ММСК, который не восстановился в течение первого года после алло-ТКМ ни у пациентов с ОМЛ, ни с ОЛЛ. Более того, полученные данные позволяют предположить снижение количества ММСК в КМ пациентов с ОМЛ и ОЛЛ после проведенного кондиционирования. На уровне экспрессии генов было обнаружено долговременное подавление сигнальных путей PDGF и FGF2. В ММСК больных ОЛЛ после алло-ТКМ относительный уровень экспрессии гена *SDF1* существенно и необратимо снижается. Очевидно, данный сигнальный путь глубоко поражен у пациентов с ОЛЛ.

До алло-ТКМ концентрация КОЕф в КМ больных ОМЛ не отличалась от таковой у доноров, а в КМ больных ОЛЛ даже превышала ее, а после алло-ТКМ она снизилась практически до нуля и оставалась сниженной на протяжении всего времени наблюдения. По-видимому, режимы предтрансплантационного кондиционирования наносят практически невосполнимый ущерб этому классу стромальных предшественников.

Итак, ростовые характеристики ММСК и концентрация КОЕф в КМ больных острыми лейкозами в ремиссии до проведения им алло-ТКМ были изменены статистически незначимо, однако, в генной экспрессии были выявлены изменения. Предтрансплантационное кондиционирование привело к длительному и значимому нарушению пролиферативных характеристик ММСК, снижению количества ММСК и концентрации КОЕф в КМ пациентов. Характер изменения экспрессии генов позволил выделить несколько общих сигнальных путей, затронутых и при ОМЛ, и при ОЛЛ, например, сигнальные пути PDGF и FGF2, а также уникальных для каждого заболевания генов. Результаты представленной работы выявили возможные механизмы повреждения костномозговой стромы после алло-ТКМ у больных ОМЛ и ОЛЛ. Повреждение, наносимое стромальным клеткам различными протоколами лечения лейкозов должно приниматься во внимание при лечении пациентов и при оценке возможных долгосрочных осложнений.

### ***Практические рекомендации***

Практическая значимость исследования состоит в возможности использования результатов исследования при планировании экспериментов и клинических исследований, включающих в себя стромальные клетки человека. Выявленные возрастные, а также связанные с полом донора, изменения стромальных предшественников необходимо учитывать при проведении экспериментов и особенно клинических исследований. Выявленные эффекты паратиреоидного гормона, гидрокортизона, цитостатических препаратов, а также протоколов, сопровождающих трансплантацию аллогенного костного мозга, на стромальные предшественники разной степени зрелости необходимо учитывать в лечении пациентов. Такие эффекты могут быть причиной осложнений, причем, так как стромальная ткань обновляется медленно, побочные эффекты могут проявляться через длительное время или в стрессовой ситуации. Подтвержденная иерархическая структура отдела мезенхимных стромальных клеток обеспечивает дальнейших исследователей всеми необходимыми знаниями о функциях и потенциале каждого исследованного типа предшественников, что необходимо для грамотного планирования экспериментов и адекватного анализа полученных данных.

### ***Выводы***

1. Структура отдела мезенхимных клеток устроена аналогично отделу кроветворных клеток. Во главе расположены мезенхимные стволовые клетки, далее следуют мультипотентные мезенхимные стромальные клетки. Представители обеих категорий обладают способностью к дифференцировке во все линии стромальных клеток. Следующими в иерархической структуре отдела представлены олигопотентные клетки-предшественницы – колониобразующие единицы фибробластов, из которых дифференцируются индуцибельные клетки-предшественницы, в свою очередь формирующие зрелые клетки стромы костного мозга.
2. Паратиреоидный гормон увеличивает количество ниш для стволовых кроветворных клеток, но не оказывает влияния на мезенхимные стволовые клетки.
3. Свойства стромальных клеток-предшественниц отличаются в разных возрастных группах: с возрастом снижается их пролиферативный потенциал и

концентрация колониеобразующих единиц фибробластов, изменяется профиль экспрессии генов.

4. Мезенхимные стволовые клетки не чувствительны к цитостатическим препаратам, тогда как их более дифференцированные потомки повреждаются от воздействия этих препаратов, что приводит к продолжительному снижению количества колониеобразующих единиц фибробластов в костном мозге.

5. При апластической анемии, несмотря на угнетение собственного кроветворения больного, стромальные предшественники кроветворного микроокружения функционально активны. Выявлено повышение пролиферативной активности ММСК и КОЕф, а также концентрации КОЕф в костном мозге.

6. Лечение, применяемое для достижения ремиссии острого миелоидного лейкоза, вызывает изменения в экспрессии генов: повышается экспрессия генов *FGF2* и *LIF*, снижается – генов *CSF1* и *FGFR1*. Пролиферативная активность ММСК при этом не нарушена. После проведения пациентам предтрансплантационного кондиционирования наблюдается длительное, в течение 1 года, снижение концентрации КОЕф в костном мозге, снижение пролиферативной активности ММСК, а также дополнительно снижается экспрессия гена *PDGFRB*.

7. Лечение, применяемое для достижения ремиссии острого лимфобластного лейкоза, вызывает изменения в экспрессии генов: повышается экспрессия генов *SOX9* и *TGFB1*, снижается – генов *PDGFRA* и *FGFR1*. Пролиферативная активность ММСК при этом не нарушена. После проведения пациентам предтрансплантационного кондиционирования наблюдается длительное, в течение 1 года, снижение концентрации КОЕф в костном мозге, снижение пролиферативной активности ММСК, а нормализуется экспрессия генов *SOX9*, *TGFB1* и *FGFR1*, однако дополнительно снижается экспрессия гена *SDF1*.

### ***Список работ, опубликованных по теме диссертации***

Научные статьи, опубликованные по теме диссертации:

1. Свинаярева, Д. А. Влияние паратиреоидного гормона /ПТГ (1-34)/ на кроветворные и стромальные стволовые клетки / Д. А. Свинаярева, И. Н. Нифонтова, Н. И. Дризе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – т.138. – №12. – с.645-648.

2. Свинаярева, Д. А. Экспансия кроветворных клеток-предшественников *ex vivo* на подслое, обработанном паратиреоидным гормоном / Д. А. Свинаярева, И. Н. Нифонтова, И. Л. Чертков, Н. И. Дризе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – т.140. – №9. – с. 320-325.
3. Свинаярева, Д. А. Влияние паратиреоидного гормона /ПТГ (1-34)/ на кроветворение в длительных культурах костного мозга человека / Д. А. Свинаярева, И. Н. Нифонтова, К. С. Момотюк, В. Г. Савченко, И. Л. Чертков, Н. И. Дризе. – Терапевтический архив. – 2006. – т. 78. – № 7. – с.73-76.
4. Петрова, Т. В. Стромальная регуляция стволовых кроветворных клеток в длительных культурах костного мозга человека под действием паратиреоидного гормона / Т. В. Петрова, Д. А. Свинаярева, И. Н. Нифонтова, К. С. Момотюк, В. Г. Савченко, Н. И. Дризе // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2006. – №4. – с.218-223.
5. Nifontova, I. N. Sensitivity of mesenchymal stem cells and their progeny to medicines used for the treatment of hematoproliferative diseases / I. N. Nifontova, D. A. Svinareva, T. V. Petrova, N. I. Drize // Acta Haematologica. – 2008. – vol. 119. – p. 98-103.
6. Петрова, Т. В. Нарушение экспрессии генов, регулирующих гомеостаз стволовых кроветворных клеток, в стромальных клетках больных апластической анемией / Т. В. Петрова, И. Н. Нифонтова, Д. А. Свинаярева, М. А. Виноградова, Е. А. Михайлова, Н. И. Дризе // Терапевтический архив. – 2008. – т.80. – №1. – с. 61-65.
7. Нифонтова, И. Н. Стромальные клоногенные предшественники кроветворного микроокружения и их место в иерархии мезенхимных стволовых клеток / И. Н. Нифонтова, Д. А. Свинаярева, Н. И. Дризе // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2008. – № 2. – с. 115-120.
8. Герасимова, Л. П. Нарушения стромального микроокружения у больных с различными заболеваниями системы крови / Л. П. Герасимова, Н. И. Дризе, О. Н. Лубкова, Т. Е. Манакова, И. Н. Нифонтова, Т. В. Петрова, Д. А. Свинаярева, К. С. Момотюк, Е. А. Михайлова, Ю. В. Ольшанская, М. А. Соколова, А. Г. Туркина, Н. В. Цветаева // Гематология и трансфузиология, 2008. – т.53. – №5. – с. 59-62.
9. Shipounova (Nifontova), I. N. Mesenchymal stem cells: precursor hierarchy / I. N. Shipounova (Nifontova), D. A. Svinareva, J. L. Chertkov, N. I. Drize // Cellular Therapy and Transplantation (CTT). – 2008. – vol. 1. – №. 2. – Режим доступа: doi 10.3205/ctt-2008-en-000022.01.
10. Shipounova, I. N. Alteration in Hematopoietic Microenvironment in Patients with Aplastic Anemia / I. N. Shipounova, T. V. Petrova, D. A. Svinareva, K. S. Momotuk, E. A. Mikhailova, N. I. Drize // Clinical and Translational Science (CTS). – 2009. – vol. 2. – №. 4. – p.67-74.



11. Свинаярева, Д. А. Исследование параметров дифференцировки мезенхимных стромальных клеток у здоровых доноров и больных апластической анемией / Д. А. Свинаярева, Т. В. Петрова, И. Н. Шипунова (Нифонтова), К. С. Момотюк, Е. А. Михайлова, Н. И. Дризе. *Терапевтический Архив*. – 2009. – т.81. – №7. – с.66-70.
12. Chertkov, J. L. Precursor cells in the hematopoietic stromal microenvironment / J. L. Chertkov, O. A. Gurevitch, G. A. Udalov, I. N. Shipounova, N. J. Drize // *Cellular Therapy and Transplantation (CTT)*. – 2010. – vol. 2. – №. 6. – p.1-11. – Режим доступа: doi: 10.3205/ctt-2010-en-000081.01
13. Свинаярева, Д. А. Основные свойства мезенхимных стромальных клеток из костного мозга доноров: поверхностные маркеры / Д. А. Свинаярева, И. Н. Шипунова, Ю. В. Ольшанская, К. С. Момотюк, Н. И. Дризе, В. Г. Савченко // *Терапевтический Архив*. – 2010. – №7. – с. 52-57.
14. Жиронкина, О. А. Проллиферативный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из костного мозга человека / О. А. Жиронкина, И. Н. Шипунова, А. Е. Бигильдеев, Н. В. Сац, Н. А. Петинати, Н. И. Дризе // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. – 2011. – №4. – с. 230-235.
15. Петинати, Н. А. Анализ экспрессии генов, участвующих в модуляции иммунного ответа, в неактивированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках / Н. А. Петинати, И. Н. Шипунова, А. Е. Бигильдеев, Л. А. Кузьмина, К. С. Момотюк, Е. Н. Паровичникова, Н. И. Дризе, В. Г. Савченко // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2012. – Том 153. – № 2. – с. 211-216.
16. Шипунова, И. Н. Влияние гидрокортизона на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки человека / И. Н. Шипунова, Н. А. Петинати, Н. И. Дризе // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. – 2013. – №1. – с. 42-46.
17. Shipounova, I. N. Hierarchy of mesenchymal stem cells: comparison of multipotent mesenchymal stromal cells with fibroblast colony forming units / I. N. Shipounova, N. A. Petinati, A. E. Bigildeev, N. V. Sats, N. J. Drize, L. A. Kuzmina, E. N. Parovichnikova, V. G. Savchenko // *Journal of Biomedical Science and Engineering*. – 2013. – vol. 6. – p. 66-73.
18. Петинати, Н. А. Характеристики стромальных клеток-предшественников у больных после аллогенной трансплантации костного мозга / Н. А. Петинати, И. Н. Шипунова, А. Е. Бигильдеев, Л. А. Кузьмина, Р. А. Сарибекян, И. В. Гальцева, А. В. Мисюрин, Е. Н. Паровичникова, В. Г. Савченко, Н. И. Дризе // *Терапевтический архив*, 2013. – т. 12. – с. 95-99.
19. Shipounova, I. N. Properties of the bone marrow stromal microenvironment in adult patients with acute lymphoblastic leukemia before and after allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells / I. N. Shipounova, N. A. Petinati, A. E. Bigildeev, N. J. Drize, T. V. Sorokina, L. A. Kuzmina, E. N. Parovichnikova, V. G.

Savchenko // Journal of leukemia. – 2014. – vol. 2. – №4. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6917.1000153>.

20. Shipounova, I. N. Alterations of the bone marrow stromal microenvironment in adult patients with acute myeloid and lymphoblastic leukemias before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / I. N. Shipounova, N. A. Petinati, A. E. Bigildeev, N. J. Drize, T. V. Sorokina, L. A. Kuzmina, E. N. Parovichnikova, V. G. Savchenko // Leukemia&Lymphoma. – 2017. – vol. 58. – №2. – p. 408-417.

### ***Список сокращений и условных обозначений***

АА – апластическая анемия,  
 Алло-ТКМ – трансплантация аллогенного костного мозга,  
 ИСТ – иммуносупрессивная терапия,  
 КМ – костный мозг,  
 КОЕ-ГМ – колониеобразующие единицы гранулоцитарно-макрофагальные,  
 КОЕ-К – колониеобразующие единицы в культуре,  
 КОЕс – колониеобразующие единицы в селезенке,  
 КОЕф – колониеобразующие единицы фибробластов,  
 КООБ – клетки, образующие области бульжника,  
 КРЕ – конкурентно репопулирующие единицы,  
 ММСК – мультипотентная мезенхимная стромальная клетка,  
 МСК – мезенхимная стволовая клетка,  
 НАА – нетяжелая апластическая анемия (гранулоциты – менее  $1,5 \times 10^9$ /л; тромбоциты – менее  $100 \times 10^9$ /л),  
 ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз,  
 ОМЛ – острый миелоидный лейкоз,  
 оРТПХ – острая реакция трансплантат против хозяина,  
 ПТГ – паратиреоидный гормон, паратгормон,  
 ПЦР – полимеразная цепная реакция,  
 ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени,  
 СКК – стволовая кроветворная клетка,  
 ТАА – тяжелая апластическая анемия (гранулоциты – менее  $0,5 \times 10^9$ /л; тромбоциты – менее  $20 \times 10^9$ /л).