

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

Фастова Екатерина Александровна

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

3.1.28 – Гематология и переливание крови

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук

Научные руководители:

Доктор медицинских наук Магомедова Аминат Умарасхабовна;

Кандидат медицинских наук Петинати Наталия Арнольдовна

Москва, 2022

Оглавление

Оглавление	2
Глава 1. Введение	4
1.1 Актуальность темы исследования	4
1.2 Степень разработанности темы исследования	5
1.3 Цели и задачи исследования	5
1.4 Научная новизна исследования	6
1.5 Теоретическая и практическая значимость	6
1.6 Методология и методы исследования	7
1.7 Положения, выносимые на защиту	7
1.8 Степень достоверности и апробация результатов	8
1.9 Структура диссертации	9
Глава 2. Обзор литературы	10
2.1 Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома: клинические проявления, признаки прогноза, лечение и его последствия	10
2.2 Стромальное микроокружение костного мозга	15
Глава 3. Материалы и методы	33
3.1 Характеристика больных	33
3.2 Контрольные точки обследования	36
3.3 Основные программы химиотерапии	37
3.4 Метод получения мезенхимных стромальных клеток	37
3.5 Получение колониеобразующих единиц фибробластов	38
3.6 Определение иммунофенотипа мезенхимных стромальных клеток	38
3.7 Выделение рибонуклеиновых кислот из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и колониеобразующих единиц фибробластов	39

3.8 Построение комплементарных цепей дезоксирибонуклеиновых кислот	40
3.9 Анализ экспрессии генов	40
3.10 Методы исследования изменений в плазме больных, и ее влияние на мезенхимные стромальные клетки	45
3.11 Исследование метаболических изменений костной ткани.....	45
3.12 Анализ результатов	46
Глава 4. Результаты и обсуждение	47
4.1 Изменение культуральных свойств клеток-предшественниц стромального микроокружения при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме до и после терапевтического воздействия	47
4.2 Исследование влияния плазмы больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой на мезенхимные стромальные клетки здоровых доноров	83
4.3 Изменения костной ткани при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме в дебюте заболевания и на отдалённых сроках после терапии	86
Заключение	90
Выводы	93
Список сокращений и условных обозначений	95
Список литературы	97
Приложение А	125

Глава 1. Введение

1.1 Актуальность темы исследования

Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) – агрессивное лимфопролиферативное заболевание [165]. Эффективность лечения больных ДВККЛ зависит от наличия признаков неблагоприятного прогноза. Поэтому при наличии последних применяют интенсивную полихимиотерапию (ПХТ). Однако гематологическая токсичность при высокодозной ПХТ выше, чем при стандартной. Через 5–10 лет после высокодозной терапии по протоколу mNHL-BFM-90 цитопенические синдромы наблюдаются у 52 % пациентов в сравнении с 11 % из группы терапии CHOP/R-CHOP-21. У 78 % пациентов после высокодозной терапии в отдаленном периоде наблюдений снижается количество CD34+ кроветворных клеток в отличие от 42 % больных группы после терапии CHOP/R-CHOP. Кроме того, Е.И. Дорохиной были выявлены выраженные вторичные изменения стромы костного мозга (КМ) у 43 % больных после применения терапии mNHL-BFM-90 [10].

В работах И.Н. Шипуновой с соавторами было показано, что опухолевые клетки меняют стромальное микроокружение [111; 151; 152; 153; 154]. Исследования Дж. Котьяза с соавторами продемонстрировали, что различные опухолевые клетки секретируют цитокины и хемокины [94], которые возможно способны изменять стромальное микроокружение.

Поэтому изучение стромальных клеток-предшественниц (мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) и колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф)) до и после лечения, а также в отдаленном периоде после достижения ремиссии у больных ДВККЛ позволит уточнить степень повреждения стромы костного мозга и её способность к восстановлению. Полученные данные расширят понимание патогенеза костномозговых изменений при лимфопролиферативных заболеваниях.

1.2 Степень разработанности темы исследования

ДВККЛ – гетерогенная группа лимфатических опухолей с различными проявлениями и с разным ответом на терапию. По литературным данным И.В. Поддубной, А.У. Магомедовой, Н. Бартлет, Л. Сехн и других исследователей 5–летняя общая выживаемость больных ДВККЛ на стандартной терапии колеблется от 30 до 90 % в зависимости от наличия или отсутствия тех или иных прогностических факторов [12; 21; 145]. Больным ДВККЛ с признаками неблагоприятного прогноза необходимо проведение интенсивной терапии. Однако высокодозная ПХТ более токсична по сравнению со стандартной, а в отдаленном периоде сохраняются цитопении, не требующие заместительной терапии компонентами крови. Авторы предположили, что вероятнее всего это связано с повреждением стромального микроокружения цитостатическими препаратами.

Строма КМ поддерживает и регулирует не только нормальные гемопоэтические стволовые клетки, но и клетки опухоли, поражающей КМ. Множественные сложные взаимодействия со стромой КМ влияют на физиологию гемопоэтических стволовых клеток, а также на патофизиологию гематологических злокачественных новообразований.

Исследования стромального микроокружения КМ при лимфопролиферативных заболеваниях, в том числе при ДВККЛ, очень скудны, так как КМ при лимфопролиферативных заболеваниях не всегда вовлечен в опухолевый процесс. П. Свендзен с соавторами продемонстрировал изменения костной ткани у больных ДВККЛ после химиотерапии [164]. Результаты данной диссертационной работы расширят знания о стромальных предшественниках у больных ДВККЛ, при отсутствии детекции опухоли в КМ. Это может представлять интерес для международного научного сообщества.

1.3 Цели и задачи исследования

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

Задачи:

1. Оценить морфологические и функциональные характеристики стромальных клеток-предшественниц костного мозга –МСК и КОЕф у больных ДВККЛ в дебюте заболевания.
2. Проанализировать морфологические и функциональные характеристики стромальных клеток-предшественниц костного мозга у больных ДВККЛ на разных сроках после окончания химиотерапевтического лечения.
3. Изучить изменения стромальных клеток-предшественниц костного мозга у больных ДВККЛ более чем через 5 лет после различных курсов химиотерапии.
4. Проследить за изменениями костной ткани у пациентов с ДВККЛ в дебюте заболевания и после достижения ремиссии на отдаленных сроках после окончания лечения.
5. Исследовать влияние растворимых факторов в плазме больных ДВККЛ на стромальные клетки предшественницы *in vitro*.

1.4 Научная новизна исследования

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

1.5 Теоретическая и практическая значимость

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

1.6 Методология и методы исследования

Методологию данного исследования выстраивали в соответствии со стоящими задачами. *In vitro* изучали стромальные клетки-предшественницы – МСК и КОЕф – пациентов с ДВККЛ (n=87) и доноров (n=32) соответствующего возраста. Оценивали культуральные характеристики МСК, экспрессию поверхностных антигенов на них методом проточной цитофлуорометрии и относительный уровень экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Также оценивали концентрацию КОЕф в костном мозге. Для оценки влияния плазмы на стромальные клетки-предшественницы МСК здоровых доноров культивировали в бессывороточной среде с добавлением плазмы больных ДВККЛ и здоровых людей. Для оценки обмена костной ткани у пациентов с ДВККЛ выполняли общий анализ мочи, клинический анализ крови с лейкоцитарной формулой, исследования дезоксипиридинолина (ДПИД) в моче, ионизированного кальция, кальция, фосфора, альбумина, глобулина, общего белка, мочевины, креатинина, щелочной фосфатазы, остеокальцина, паратгормона, витамина Д3, b-cross-laps в крови, костную денситометрию сустава и позвоночника. Статистические отличия в группах оценивали при помощи t-критерия Стьюдента, U-критерия Манна-Уитни и T-критерия Уилкоксона.

1.7 Положения, выносимые на защиту

1. У пациентов ДВККЛ без поражения КМ в дебюте заболевания изменяются свойства стромальных клеток КМ.
2. Химиотерапия изменяет характеристики стромальных клеток-предшественниц и эти изменения носят долгосрочный характер.
3. Молекулярно-биологические и биохимические показатели морфогенеза костной ткани у больных ДВККЛ нарушены, однако нет изменений на уровне скелета.
4. Изменения стромальных предшественников костного мозга происходят под действием растворимых факторов, секретируемых опухолевыми клетками.

1.8 Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность выводов обеспечена кропотливой работой с литературными источниками по теме диссертации, детальной разработкой лабораторной, инструментальной и экспериментальной частей исследования, включением в исследование образцов КМ 87 пациентов и 32 здоровых доноров, что достаточно для достоверного использования методов статистического анализа.

Основные положения, результаты и материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на конференциях:

1. Всероссийская конференция с международным участием “StemCellBio–2018: Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины” 15.11.2018 – 17.11.2018, Санкт-Петербург, Россия «Влияние опухолевых клеток на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой без поражения костного мозга»

2. V Международная конференция «Постгеном’2018» 29.10.2018 – 02.11.2018 Казань. Россия «Изменение свойств МСК у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой без поражения костного мозга»

3. XXII Wilsede Meeting 2018 MODERN TRENDS IN HUMAN LEUKEMIA & CANCER, 30.10.2018 – 03.11.2018 Wilsede, Germany «Alterations in the bone marrow stromal microenvironment precursor cells in patients with Diffuse Large B-cell Lymphoma without bone marrow involvement»

4. IV Конгресс гематологов России 12.04.2018–14.04.2018, г. Москва, Россия «Клетки-предшественницы стромального микроокружения костного мозга у больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой на разных этапах терапевтического воздействия»

5. 23 Congress of the European Hematology Association, 14.06.2018 – 17.06.2018, Stockholm, Sweden «Bone marrow stromal microenvironment precursor cells in patients with Diffuse Large B-cell Lymphoma without bone marrow involvement»

6. 24 Congress of the European Hematology Association, July, 2019 Amsterdam, Netherlands «Changes in the secretome composition of multipotent mesenchymal stromal cells patients with diffuse large b-cell lymphoma without bone marrow involvement».

7. IV Национальный конгресс по регенеративной медицине, 20.10.2019 – 23.10.2019, Москва, Россия, «Влияние лимфоидной опухоли, не затрагивающей костный мозг, на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки».

По теме диссертации опубликовано 4 статьи, из которых – 4 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, а также 10 тезисных сообщений (4 на русском языке и 6 на английском языке).

1.9 Структура диссертации

Работа изложена на 126 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов, списка литературы, приложения. Текст работы содержит 13 таблиц, 32 рисунка.

Глава 2. Обзор литературы

2.1 Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома: клинические проявления, признаки прогноза, лечение и его последствия

ДВККЛ представляет собой наиболее распространенный подтип неходжкинской лимфомы и составляет до 25–35 % всех впервые диагностированных случаев [165]. Она характеризуется быстрым развитием, агрессивным течением и неизбежным летальным исходом без соответствующей терапии [4; 148]. ДВККЛ – гетерогенная группа заболеваний, которая различается по клиническим, гистологическим, иммуногистохимическим, молекулярно-генетическим характеристикам [41; 132].

Клиническая картина ДВККЛ разнородна по локализации, распространенности и наличию симптомов опухолевой интоксикации [165]. Локализация опухолевого процесса при ДВККЛ разнообразна, может встречаться как локальное поражение лимфатических узлов, так и генерализованная форма с и без вовлечения органов. Встречаются экстранодальные формы, при которых изолировано вовлечен в опухолевый процесс один орган или ткань – желудок, селезенка, кишечник, кожа, кости, печень, легкие, мягкие ткани, ЦНС и другие [45; 113; 161; 168].

В большинстве случаев ДВККЛ носит генерализованный характер, т.е. имеет III–IV стадию по классификации Ann Arbor. По данным разных авторов у 25 – 60 % на момент диагностики встречаются следующие В-симптомы (симптомы интоксикации): фебрильная лихорадка, профузная потливость, особенно в ночное время, снижение массы тела более 10 % за последние полгода [38]. Вовлечение КМ встречается в 10 – 25 % случаев и является независимым прогностически неблагоприятным фактором [11; 13; 165].

В зависимости от происхождения ДВККЛ разделяют на происходящие из В-клеток герминального центра (ГСВ) и из В-клеток, подобных активированным В-

клеткам периферической крови (АВС). Около 10–15 % случаев невозможно классифицировать [142; 167].

Поскольку результаты терапии зависят от наличия или отсутствия признаков неблагоприятного прогноза, постоянно ведется их активный поиск. Было показано, что одновременная экспрессия белков С-тус и Vcl-2 (двойной экспрессор), определяемая при иммуногистохимическом исследовании, ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [101]. Примерно в 30 % случаев встречается транслокация *BCL-6* в локусе хромосомы 3q27. В последующем случаи транслокации с вовлечением локусов гена *C-MYC* в сочетании с перестройкой локуса гена *BCL-2* и/или *BCL-6* были выделены всемирной организацией здравоохранения в отдельную нозологию [165]. Показано, что у пациентов, у которых выявлена транслокация с вовлечением локуса гена *C-MYC*, но без нарушений *BCL-2* или *BCL-6*, прогноз не отличается от такового у пациентов без этой транслокации [49].

В работе А. Патрашку было показано прогностическое значение выявляемых иммуногистохимически высоких уровней экспрессии белков *BCL-2*, *Ki67*, *C-MYC* и *P53*. У пациентов с высокой экспрессией *BCL-2*, *P53*, *C-MYC* достоверно ниже пятилетняя общая и безрецидивная выживаемость по сравнению с пациентами, у которых экспрессия этих генов отсутствовала [130; 186]. Мутации *TP53* – независимый предиктор плохого прогноза и присутствуют примерно в 20 % случаев ДВККЛ [5; 92].

В клинической практике в качестве основной прогностической модели используют Международный прогностический индекс (МПИ) [54; 155], в котором факторами риска являются: возраст старше 60 лет, распространенность процесса (стадии III–IV), активность лактатдегидрогеназы выше нормы, соматический статус по шкале восточной объединенной онкологической группы (ECOG) ≥ 2 , количество экстранодальных очагов поражения (более 1 зоны). В зависимости от количества выявляемых факторов риска выделяют следующие группы прогноза:

- низкая – 0–1 фактор,
- промежуточно-низкая – 2 фактора,

- промежуточно-высокая – 3 фактора,
- высокая – 4–5 факторов.

У больных моложе 60 лет наличие поражения экстранодалльных органов не сказывается на прогнозе, поэтому для этой категории пациентов применяют МПИ, скорректированный по возрасту [180]. К факторам риска относятся: соматический статус по шкале ECOG ≥ 2 , ЛДГ выше нормы и стадии заболевания III–IV. В зависимости от их количества сформированы следующие группы риска:

- низкая – 0 факторов,
- промежуточно-низкая – 1 фактор,
- промежуточно-высокая – 2 фактора,
- высокая – 3 фактора.

Целью лечения больных ДВККЛ является достижение длительных полных ремиссий.

Основной программой, применяемой в клинической практике, остается R-СНОР-21 и ему подобные курсы, которые эффективны у больных без признаков неблагоприятного прогноза. По данным M.D. Anderson Cancer Center при ПХТ СНОР-21 у больных ДВККЛ без признаков неблагоприятного прогноза частота полных ремиссий составила 81 % [54; 117], другие исследователи показали, что частота полных ремиссий у этой категории пациентов при применении курсов химиотерапии СНОР/R-СНОР-21 достигает 100 % [14]. Однако 5–летняя общая выживаемость не превышает 70 % пациентов в общей группе, и того меньше в группе с высоким риском развития рецидива.

К настоящему времени проведено довольно большое количество рандомизированных исследований: СНОР с этопозидом и без него, СНОР-14 и СНОР-21, 6 курсов против 8 курсов СНОР-14, R-СНОР против Обинутузумаб + СНОР, R-DA-EPOCH против R-СНОР [54; 131; 145; 174; 177; 182; 183].

Все эти исследования показали, что в группе неблагоприятного прогноза общая и бессобытийная выживаемость колеблется от 30 до 50 %. У 1/3 больных развивается рецидив заболевания и у такого же числа больных отмечается рефрактерность к проводимой терапии, что приводит к необходимости проведения

второй и последующих линий лечения, эффективность которых низка [45; 62; 79; 131; 136; 137].

Интенсификация терапии в случае рефрактерности и рецидива не приводит к желаемому результату. Это было продемонстрировано в проведенном крупном многоцентровом ретроспективном исследовании по эффективности терапии второй линии у больных рефрактерных к индукционной терапии указанными выше программами, в которое были включены 636 пациентов [60].

Пациентам, у которых достигнута только частичная ремиссия или же диагностирована прогрессия ДВККЛ, показано проведение второй линии ПХТ. Молодым больным при достижении ремиссии после второй линии терапии выполняют ПХТ с последующей трансплантацией аутологичных стволовых клеток (аутоТСКК). Режимы второй линии терапии (DHAP, ESHAP, ICE и другие) включают различные производные платины, ифосфамид, гемцитабин [78; 167].

По рекомендациям Американского общества по трансплантации крови и КМ проведение аутоТСКК возможно у пациентов с промежуточным и высоким МПИ. Результаты ПХТ с последующим выполнением аутоТСКК у больных ДВККЛ зависят от этапа лечения, на котором проводится трансплантация. При выполнении аутоТСКК в качестве консолидирующей терапии после достижения первой полной или частичной ремиссии общая выживаемость выше, чем у больных вне ремиссии заболевания [67; 80; 98]. Было показано, что аутоТСКК увеличивает выживаемость без прогрессии у пациентов с высоким или промежуточным риском, у которых получен ответ на индукционную терапию.

Рандомизированных проспективных исследований эффективности интенсивной терапии в первой полной ремиссии у пациентов с ДВККЛ с высоким риском очень мало. В имеющихся работах, например, по сравнению эффективности R-CHOP-14 и R-Mega-CHOP с и без аутоТСКК, не было обнаружено преимуществ в группе с аутоТСКК, где 5-летняя общая выживаемость составила – 78 %, а без аутоТСКК – 77 % [54].

В одном крупном рандомизированном исследовании доказана эффективность интенсивной консолидации, включающей аутоТСКК, в первой полной ремиссии по

сравнению с 8 курсами СНОР/R-СНОР у больных ДВККЛ в группе высокого риска, где двухлетняя выживаемость составила 82 % против 64 % соответственно [162].

Поэтому целесообразно проведение интенсивной индукционной терапия, например программы mNHL-BFM-90 или R-DA-EPOCH у пациентов с ДВККЛ и признаками неблагоприятного прогноза [16].

Несмотря на то, что применение высокодозной ПХТ приводит к лучшим результатам, чем терапия по программе R-СНОР, она имеет свои ограничения. Например, при использовании высокодозной ПХТ у пациентов отмечается более выраженная гематологическая и негематологическая токсичность. Это было подтверждено при рандомизированном исследовании при сравнении эффективности программ R-СНОР-21 и R-DA-EPOCH. При ПХТ R-СНОР-21 побочные эффекты, приводящие к прекращению лечения развивались у 1,7 % пациентов, нейтропения 4 степени отмечалась в 56 %, тромбоцитопения 4 степени в 6 %. У пациентов, получавших ПХТ по программе R-DA-EPOCH побочные эффекты, приводящие к прекращению лечения развивались у 5,6 %, нейтропения 4 степени в 90 % случаев, в 35 % тромбоцитопения, в 8 % анемия 3 степени [183].

По результатам других исследований токсичности курсов R-DA-EPOCH у пациентов с агрессивными В-клеточными лимфомами у 46 % пациентов наблюдались нейтропения 4 степени, тромбоцитопения 4 степени в 20 % и анемия 3–4 степени в 12,5 % случаев. Дозу винкристина снижали у 52 % в связи с периферической нейропатией. Повышение доз химиопрепаратов представлялось возможным у 73 % всей когорты пациентов, но только у 38 % лиц старше 65 лет [127].

Химиотерапия по программе mNHL-BFM-90 применяется в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ у пациентов моложе 60 лет с промежуточно-высоким и высоким риском по МПИ. Ее гематологическая токсичность соответствует 3–4 степени. У подавляющего большинства пациентов отмечалось развитие нейтропении и тромбоцитопении 4 степени. Основные инфекционные осложнения, наблюдаемые в период агранулоцитоза, включают некротическую энтеропатию, пневмонию и стоматит [13].

В связи с увеличением общей выживаемости пациентов в последние годы большое внимание уделяется не только непосредственному ответу на терапию, но и качеству жизни больных лимфомами в отдаленном периоде, а также отдаленным последствиям химиотерапии [33].

Существует зависимость качества жизни пациентов от проведенной химиотерапии, возраста, времени прошедшего после окончания лечения и отдаленной токсичности [22; 70].

В работе Дорохиной Е.И. изучалась отдаленная гематологическая и негематологическая токсичность, а также качество жизни пациентов с ДВККЛ, завершивших ПХТ более 10 лет назад. В исследование были включены больные, получавшие ПХТ по протоколу R±CHOP-21 или R±mNHL-BFM-90. По результатам проведенного анализа было доказано, что отдаленная кардио- и нефротоксичность у больных после высокодозной ПХТ не превышала таковую у пациентов получавших R-CHOP [9]. Кроме того, было показано отсутствие различий в качестве жизни у пациентов после ПХТ R±mNHL-BFM-90 или R ± CHOP-21. В этой же работе выявлены нарушения миелопоэза после терапии mNHL-BFM-90: гипоклеточность КМ у 38 % больных, у 33 % сужение эритроидного и у 48 % мегакариоцитарного ростков. Доказано снижение CD34+ клеток в периферической крови в отдаленном периоде у 78 % пациентов после mNHL-BFM-90 по сравнению с 42 % после CHOP/R-CHOP-21.

Показано, что лучевая и химиотерапия вызывают количественные и качественные повреждения стромы КМ [58].

2.2 Стромальное микроокружение костного мозга

Кроветворение у взрослого человека происходит в губчатых костях. Кроветворные клетки поддерживаются и регулируются стромальным микроокружением. Нормальное функционирование стволовых кроветворных клеток возможно при условии их пребывания в специальном микроокружении – нише [146]. Описано два типа ниш – периваскулярная и эндостальная. Полагается, что различные типы ниш регулируют функции разных кроветворных предшественников [55]. Гемопоэз регулируется стромой КМ: локально, в

кроветворных нишах, и дистантно, с помощью секреции ростовых факторов и цитокинов.

Предшественницей клеток стромального микроокружения считается мезенхимная стволовая клетка. Впервые существование стромальных предшественников в КМ было показано А.Я. Фриденштейном [71]. Позднее наличие клеток, способных сформировать полноценное стромальное микроокружение, было подтверждено И. Л. Чертковым [29]. Выделяют 2 типа ранних недифференцированных стромальных предшественников *in vitro* – МСК и КОЕф.

Основные характеристики мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

Арнольд Каплан обозначил МСК, как полипотентные клетки-предшественницы, выделенные из КМ взрослых млекопитающих, способные прилипать к пластику, обладающие высоким пролиферативным потенциалом и при индукции дифференцироваться в жировом, костном и хрящевом направлении [83]. В настоящее время термин МСК обозначает клоногенные полипотентные клетки-предшественницы способные к адгезии к пластику, дифференцировке *in vitro* во все элементы стромального микроокружения и обладающие определенным иммунофенотипом [19; 65; 133]. Источником МСК могут служить КМ, эмбриональная, жировая ткань, печень и др. При культивировании в отсутствие индукторов дифференцировки МСК образуют слой фибробластоподобных клеток, форма их разнообразна и варьируется от веретеновидной или звездчатой до широкой и уплощенной. Скорость роста МСК определяется по времени удвоения популяции и зависит от многих факторов: возраста и пола донора, источника клеток, числа проделанных пассажей и т.д. Для МСК из КМ человека время удвоения популяции в среднем составляет 30–33 ч [57].

МСК экспрессируют специфические поверхностные антигены CD73, CD90 и CD105 [24]. В связи с тем, что каждый из данных маркеров неспецифичен (CD73 экспрессируется на клетках лимфоидной ткани, CD90 экспрессируется стволовыми

кровообразительными клетками, CD105 экспрессируется на макрофагах, эндотелиальных клетках, фибробластах, синцитиотрофобласте), необходимо одновременное присутствие всех трех молекул для отнесения клеток к МСК [26; 110]. Кроме того, МСК не экспрессируют маркеры кровеносных клеток CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79a [85], антигены гистосовместимости I класса и практически не экспрессируют антигены гистосовместимости II класса [43]. Однако рекомендованные критерии не являются окончательными и могут уточняться.

На МСК имеются также другие молекулы: CD49e, CD29, CD44, CD54, CD166, CD106 и CD146. Они опосредуют адгезию МСК к клеткам и к компонентам внеклеточного матрикса. Также присутствуют рецепторы цитокинов и факторов роста, такие как CD105, CD71 [107]. Также экспрессированы на МСК CD13, участвующий в метаболизме пептидов, контроле роста и дифференцировки, фагоцитозе, CD59 – белок регулирующий системы комплемента, CD200 – белок суперсемейства иммуноглобулинов [110].

При анализе профиля экспрессии генов показано наличие в МСК транскриптов, характерных для эпителия, эндотелия, нервной ткани, остеобластов, хондроцитов, адипоцитов, миобластов, а также для стромы КМ [65].

Остеогенный потенциал клеток костного мозга впервые был выявлен А.Я. Фриденштейном в экспериментах с культивированием костного мозга в диффузионных камерах [71]. О дифференцировке МСК в направлении остеогенеза может свидетельствовать активность щелочной фосфатазы [35]. Данный фермент активен на ранних стадиях дифференцировки клеток в остеобласты. Дифференцировка МСК в остеогенном направлении включает в себя пролиферацию, выработку и созревание внеклеточного матрикса, а также его минерализацию. Внеклеточный матрикс, состоит из коллагена I типа, остеокальцина, остеопонтинина, остеоонектина и костного сиалопротеина. Маркером дифференцировки служит отложение в матриксе солей кальция [133]. Существуют исследования, показывающие индуцирующее действие дексаметазона на дифференцировку МСК в остеобласты. Аскорбиновая кислота и β -глицерофосфат также необходимы для остеогенеза [88].

Белок BMP-2 стимулирует остеогенную дифференцировку MSC [87]. Ингибирующее действие на остеогенез оказывают NOGGIN, LIF, онкостатин М, кальцитриол [72]. Для дифференцировки MSC в остеогенном направлении важен их контакт с внеклеточным матриксом, который осуществляется через интегрины. В регуляции дифференцировки MSC по остеогенному пути имеют значения молекулы адгезии экспрессированные на MSC, например, ALCAM и кадгерин 11. Также регуляторами остеогенеза являются факторы транскрипции RUNX2, который контролирует экспрессию генов, кодирующих белки костного матрикса, и Osterix, участвующий в Runx2-независимых путях регуляции остеогенеза, осуществляемых через BMP2 на более поздних стадиях дифференцировки, чем RUNX2. Важную роль в сигнальных путях играют протеинкиназы ERK, активирующиеся на ранних этапах, и JNK, функционирующие на стадии отложения и минерализации внеклеточного матрикса [87]. TGF β , белки WNT, костные морфогенетические белки (BMPs) также направляют MSC в сторону остеобластной дифференцировки. Данные пути ведут к экспрессии важнейших регуляторов транскрипции остеобластов, включая RUNX2 [27].

MSC способны к дифференцировке в адипоциты. Индукторами адипогенной дифференцировки *in vitro* служит дексаметазон, индометацин и инсулин. Маркером адипогенной дифференцировки может служить экспрессия гена *PPARG*. Третье направление дифференцировки MSC – хондроциты. Одним из ранних маркеров хондрогенной дифференцировки является экспрессия гена *SOX9* [106].

Гены, экспрессируемые мультипотентными мезенхимными стромальными клетками

MSC секретируют большой спектр цитокинов и хемокинов, в том числе ростовые факторы, интерлейкины и др. [25; 120; 201]. Профиль секреции MSC может меняться под действием различных факторов.

SDF1 – фактор, полученный из стромальных клеток (Stromal cell-derived factor 1, CXCL12), секретируется клетками эндотелия и стромы, участвует в

регуляции гемопоэза, в частности миграции, роста и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток через рецептор CXCR4 [128; 156].

Белок, кодируемый геном *SPP1* (secreted phosphoprotein), – остеопонтин, секретируемый хемокиноподобный гликофосфопротеин. Оверэкспрессия *SPP1* наблюдается на ранних этапах костной дифференцировки МСК [158]. Показано, что остеопонтин участвует в прогрессировании опухолей, в т.ч. в пролиферации клеток, ангиогенезе и метастазировании. Доказано, что экспрессия остеопонтинина в опухолевой ткани и плазме коррелирует с плохим прогнозом и снижением общей выживаемости у пациентов с раком молочной железы, раком простаты, плоскоклеточной карциномой пищевода [126; 176]. Также этот белок может стимулировать развитие фиброза легких, печени, сердца и почек [104].

BGLAP (bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein) – остеокальцин, ген, кодирующий костный белок, секретируемый остеобластами, который регулирует ремоделирование кости и энергетический обмен. Данный белок содержит гамма-карбоксихлутаминовую кислоту, обнаруженную в дентине и костной ткани. Она связывается с кальцием и гидроксиапатитом – минеральными компонентами кости. Повышение экспрессии *BGLAP* может служить маркером коммитированности МСК к остеогенной дифференцировке [69; 158].

BMP2 (bone morphogenetic protein 2) – ген, кодирующий лиганд суперсемейства белков TGF- β (трансформирующий фактор роста- β). Лиганды этого семейства связывают различные TGF- β -рецепторы, что приводит к рекрутированию и активации факторов транскрипции семейства SMAD, которые регулируют экспрессию генов. Этот белок играет роль в развитии костей и хрящей. [93]. Показана связь снижения транскрипционной активности промотора *BMP2* с остеопорозом [138].

Ген *BMP4* (bone morphogenetic protein 4) кодирует секретируемый лиганд суперсемейства белков TGF- β . Этот белок участвует в формировании костной ткани. Показано, что этот белок вовлечен в патогенез лейкемии. При остром лимфобластном лейкозе продукция BMP4 опухолевыми клетками вероятно

способствует образованию поддерживающего опухолевый процесс микроокружения [169; 172].

Ген *MMP2* (matrix metalloproteinase) – член семейства генов матричной металлопротеазы. Металлопротеазы представляют собой цинк-зависимые ферменты, способные расщеплять компоненты внеклеточного матрикса и молекулы, участвующие в трансдукции сигнала. В отличие от большинства членов семейства металлопротеаз активация *MMP2* может происходить на клеточной мембране. Физиологически *MMP2* необходима для нормального развития тканей, например, для скелета. *MMP2* имеет решающее значение для инвазии раковых клеток, воспалительных поражений костей и суставов, регуляции васкуляризации. Мутации в этом гене были описаны при синдроме Винчестера и синдроме нодулеза-артропатии-остеолиза [143].

Ген *SOX9* (SRY-box transcription factor 9) кодирует белок участвующий в дифференцировке хондроцитов [61]. Известно, что *SOX9* играет ключевую роль в патогенезе остеоартрита и может служить потенциальной мишенью при его лечении [125].

Ген *PPARγ* (peroxisome proliferator activated receptor gamma) кодирует белок – регулятор метаболизма жирных кислот и дифференцировки адипоцитов. Повышение экспрессии *PPARγ* служит маркером жировой дифференцировки МСК. Показана роль этого белка в патогенезе многочисленных заболеваний, включая ожирение, диабет, атеросклероз и онкологические заболевания [66].

Ген *SMURF1* (SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1) кодирует убиквитинлигазу, которая специфична для регулируемых рецептором SMAD белков, участвующих в сигнальных путях белков семейства BMP. *SMURF1* участвует в модулировании клеточных процессов, включая морфогенез, аутофагию, рост и миграцию клеток. Исследования показали, что *SMURF1* участвует в патогенезе многих злокачественных опухолей у человека [50; 166].

Белок, кодируемый геном *VEGF* (vascular endothelial growth factor), – один из основных регуляторов ангиогенеза. Показано, что уровень экспрессии белка *VEGF* у пациентов с остеоартритом значительно выше, чем у здоровых людей [187].

Результаты метаанализа показали, что у больных ДВККЛ с повышенной экспрессией *VEGF* в опухолевой ткани более высокий риск по МПИ, чем у пациентов, у которых экспрессия *VEGF* в опухоли не определяется ($P < 0,001$) [163].

Ген *MCAM* (melanoma cell adhesion molecule) кодирует молекулу адгезии, ассоциированную с опухолевым процессом. *MCAM* широко экспрессируется в жировой ткани, плаценте и других тканях [53].

Ген *ICAM1* (intercellular adhesion molecule 1) кодирует молекулу адгезии – гликопротеин на поверхности клетки. Он связывается с интегринами типа CD11a/CD18 или CD11b/CD18. Данный ген экспрессируется в КМ, легочной и других тканях. В кроветворении эта молекула играет важную роль в прикреплении стволовых кроветворных клеток к строме КМ. Известно, что *ICAM1* участвует в прикреплении опухолевых бластов к строме КМ при остром миелобластном лейкозе [190].

Белок, кодируемый геном *FGF2* (fibroblast growth factor 2), принадлежит к семейству факторов роста фибробластов (*FGF*). Известно, что рост мезенхимных клеток регулируется через сигнальные пути *FGF*, *PDGF* и *TGF* [120]. Члены семейства *FGF* стимулируют пролиферацию клеток и ангиогенез. Эти белки участвуют в разнообразных биологических процессах, таких как заживление ран и рост новообразований. МСК КМ секретируют *FGF2* в составе экзосом, которые защищают лейкозные клетки от ингибиторов тирозинкиназы. Экспрессия *FGF2* и его рецептора *FGFR1* увеличена как в стромальных клеточных линиях, так и в первичной строме больных острым миелобластным лейкозом. Повышенная передача сигналов *FGF2/FGFR1* связана с увеличенной секрецией экзосом. Ингибирование *FGFR1* снижает секрецию экзосом, содержащих *FGF2*, что приводит к уменьшению защиты лейкозных клеток [90].

Белок, кодируемый геном *FGFR1* (fibroblast growth factor receptor 1), – член семейства рецепторов *FGFR*. Члены семейства *FGFR* отличаются по сродству к лиганду и распределению в тканях. Хромосомные aberrации с участием этого гена связаны с лимфопролиферативными и миелопролиферативными заболеваниями, а также лейкозами [106].

FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2) кодирует белок, который также относится к семейству рецепторов фактора роста фибробластов. На примере колоректального рака показано, что активированный *FGFR2* индуцирует экспрессию PD-L1 через сигнальный путь JAK/STAT3 в опухолевых клетках, что вызывает апоптоз Т-клеток. *FGFR2* также способствует экспрессии PD-L1 [100].

Белок, кодируемый геном *PDGFRβ* (platelet derived growth factor receptor β), – поверхностный рецептор тирозинкиназ семейства тромбоцитарных факторов роста. Это митогенные факторы для клеток мезенхимного происхождения. Рецидивирующие мутации *PDGFRβ* в стромальных клетках могут играть важную роль в патогенезе болезни Кастельмана [102].

Ген *TGFβ1* (transforming growth factor β1) кодирует секретируемый лиганд суперсемейства белков трансформирующего фактора роста. Этот белок регулирует пролиферацию, дифференцировку и рост клеток, и может модулировать экспрессию и активацию других факторов роста и провоспалительных факторов, включая гамма-интерферон и фактор некроза опухоли альфа (TNFα). Этот ген часто активирован в опухолевых клетках [188].

Ген *IL6* (интерлейкин 6) кодирует провоспалительный цитокин, участвующий в регуляции созревания В-клеток. Было показано, что кодируемый этим геном белок является эндогенным пирогеном, способным вызывать лихорадку у людей с аутоиммунными заболеваниями или инфекциями. Белок в основном продуцируется в местах острого и хронического воспаления, где он секретируется в плазму и вызывает транскрипционный воспалительный ответ через альфа рецептор интерлейкина-6. Описано участие этого фактора в широком спектре связанных с воспалением состояний, а также его вовлечение в патогенез онкологических процессов. Показано, что повышенная экспрессия рецептора интерлейкина-6 CD126 приводит к устойчивости клеток хронического лимфолейкоза к химиотерапии и ухудшает прогноз заболевания [175].

Белок, кодируемый *IL8* (интерлейкин 8), – член семейства хемокинов СХС и один из основных медиаторов воспалительного ответа. IL-8 секретируется мононуклеарными макрофагами, нейтрофилами, эозинофилами, Т-лимфоцитами,

эпителиальными клетками и фибробластами. Он действует как хемотаксический фактор, направляя нейтрофилы к очагу воспаления. IL-8 также участвует с другими цитокинами в каскадах провоспалительных реакций и играет роль в синдроме системного воспалительного ответа. Этот белок также секретируется опухолевыми клетками и способствует миграции опухолевых клеток, инвазии, ангиогенезу [189].

Колониеобразующие единицы фибробластов

КОЕф более зрелые, чем МСК, клетки-предшественницы. Впервые этот класс стромальных предшественников был описан А.Я. Фриденштейном. КОЕф – это полипотентные клетки-предшественницы, которые не способны к переносу кроветворного микроокружения *in vivo*, однако обладают пролиферативным потенциалом, достаточным для образования клеточных колоний *in vitro* [152]. КОЕф образуют колонии фибробластов, которые синтезируют коллаген I и III типа, фибронектин. Популяция КОЕф гетерогенна, из одного образца КМ образуются колонии разного размера, с различным пролиферативным потенциалом и различной степенью коммитированности к дифференцировке [71; 121].

По данным разных исследователей КОЕф могут экспрессировать молекулы Sca-1, CD29, CD44, CD106, CD6, CD49a, CD10, CD146, CD90, CD105, CD73, STRO-1, VCAM-1 [35]. Для выделения КОЕф при помощи проточной цитофлуориметрии исследователи используют различные сочетания указанных маркеров.

Изменения стромального микроокружения костного мозга при гемобластозах

Известно, что опухолевые клетки могут модифицировать стромальное микроокружение КМ [191]. Факторы, более активно продуцируемые стромальным микроокружением в этом случае способствуют активной пролиферации опухолевых клеток [176]. Показано, что изменения в МСК больных не одинаковы при различных нозологиях [23]. При острых лейкозах в КМ изменена концентрация КОЕф, некоторые свойства МСК, экспрессия генов в этих клетках-предшественницах [52; 118; 151]. У больных острыми лейкозами, которым выполнялась трансплантация аллогенного и аутологичного КМ, даже в отдаленные

сроки наблюдений клеточность КМ не восстанавливается. Помимо сокращения кроветворной территории у больных имеют место значительные изменения в строении КМ [7; 153].

Клетки острого лимфобластного лейкоза активно стимулируют неоваскуляризацию [170]. Клетки острого миелоидного лейкоза стимулируют остеогенную дифференцировку, но ингибируют адипогенную дифференцировку МСК [40]. При миелопролиферативной неоплазии происходит образование аномальных остеобластических клеток. При остром Т-лимфобластном лейкозе происходит быстрое ремоделирование эндостального пространства, что приводит к потере остеобластных клеток [82]. В МСК из КМ пациентов с хроническим миелолейкозом повышена экспрессия белков HIF1A, FOXO3, BCL2, TRP53, MAPK и STAT5 (phospho-Tyr694) [86]. При миелодиспластическом синдроме в МСК нарушаются и структура ДНК, и их функциональные характеристики [108; 114; 160; 173]. При множественной миеломе в МСК больных меняется молекулярный профиль и способность к иммуномодуляции. Они продуцируют VEGFA, IL-6, SCF, IL-10, увеличивающие неоваскуляризацию, что ассоциировано с худшим прогнозом [96]. У пациентов множественной миеломой в МСК отмечается повышенная экспрессия IL-1 β , TNF α и ряда других факторов, которые могут ингибировать нормальный рост клеток-предшественников. Пролиферация МСК при множественной миеломе и скорость остеогенной дифференцировки медленнее, чем у здоровых людей из-за сниженной экспрессии рецепторов факторов роста и повышенной экспрессии воспалительных цитокинов таких как TNF α [139].

Изменения стромального микроокружения происходят за счет различных механизмов. Описаны изменения сигнальных путей [42], выявлены генетические [44; 117; 149] и функциональные [56; 134; 181] нарушения в клетках стромы КМ больных с патологией кроветворения.

Многими исследователями показано, что опухоли изменяют стромальное микроокружение КМ не только за счет прямого межклеточного взаимодействия, но и за счет секретируемых факторов. Интерлейкин-1 β , продуцируемый опухолевыми клетками при миелопролиферативной неоплазии, вызывает повреждение МСК и

нейронов в КМ [34]. IL-8 увеличивает количество МСК при остром миелобластном лейкозе [95]. TNF α усиливает пролиферацию и выживание опухолевых клеток [73]. Секреция хемокина CCL3 клетками острого лимфобластного лейкоза приводит к уменьшению остеобластных клеток, минерализации кости, ингибированию функции остеобластов [72]. VEGF и ангиопоэтин 2, секретируемые лейкозными клетками, участвуют в пролиферации эндотелиальных клеток при остром лимфобластном лейкозе [170], остром миелобластном лейкозе [81] и хроническом лимфолейкозе [109].

При ДВККЛ у 25 % больных [165] выявляется поражение КМ. Считается, что КМ у остальных пациентов не вовлечен в опухолевой процесс. Однако исследования микроокружения КМ при неходжкинских лимфомах показали, что злокачественный процесс может вызвать значительное нарушение в равновесии этой микросреды. При исследовании микроокружения КМ у пациентов неходжкинской лимфомой (поражение КМ было диагностировано у 75 % пациентов) было выявлено повышение концентрации L-селектина, TNF α , увеличение числа стромальных клеток в КМ и снижение уровня фибронектина в сравнении с контрольной группой [157]. После завершения терапии, несмотря на достижение полной ремиссии, у этих пациентов уровни L-селектина и TNF α в КМ сохранялись повышенными. Показано, что МСК из КМ стимулируют прогрессию ДВККЛ через секрецию IL-6 и активацию IL-17A [192].

Влияние химиотерапии на стромальное микроокружение костного мозга

Наблюдаемые после терапии изменения могут иметь разную этиологию. МСК могут быть изменены за счет взаимодействия с опухолевыми клетками, находящимися в КМ, а также в результате повреждения цитостатическими препаратами в процессе лечения [99].

Стромальное микроокружение обладает более высокой, чем кроветворная ткань, радио- и химиорезистентностью, что, возможно, связано с низкой интенсивностью его самообновления [97]. При введении животным бусульфана, метотрексата, циклофосфамида или 5-фторурацила часть КОЕф выживают и

сохраняют свои характеристики. Клетки, входящие в состав популяции МСК, имеют разную чувствительностью к цитостатикам. Так, к цитозин арабинозиду наименее восприимчивы клетки с высокой пролиферативной активностью [99]. Отмечено увеличение апоптоза МСК под воздействием блеомицина, в то время как морфология, экспрессия поверхностных маркеров стволовых клеток и способность к адгезии и миграции остается неизменными. Обработка клеток блеомицетином также приводит к снижению адипогенной дифференцировки этих клеток [122].

В исследованиях показано, что ПХТ при онкологических заболеваниях повреждает клетки микроокружения КМ [74].

При обработке МСК КМ цитарабином, даунорубицином или винкристином происходит изменение морфологии, снижение пролиферации и способности МСК к дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях. Также происходит снижение экспрессии некоторых рецепторов на клеточной поверхности (CD13, CD29, CD44, CD49E). При удалении винкристина из среды МСК восстанавливают свои свойства, а действие цитарабина и даунорубицина обратимо не полностью, и клетки лишь частично возвращают свою способность к пролиферации и дифференцировке и исходный фенотип. При дальнейшем культивировании в среде без цитостатиков морфологическое строение МСК нормализовалось [159].

При исследовании КМ, полученного от пациентов с лимфомой Ходжкина и неходжкинской лимфомой, которым было проведено кондиционирование в режиме BEAM и аутоТСКК, показано достоверное снижение концентрации КОЕф и увеличение времени удвоения популяции в сравнении с контрольной группой [103].

Влияние онкогематологических процессов на костную ткань

В костной ткани протекает непрерывный процесс обновления, позволяющий поддерживать механическую прочность кости в условиях постоянной микротравматизации [3]. Образование костной ткани осуществляется остеобластами, дифференцирующимися из мезенхимных стволовых клеток.

Остеокласты – это основные медиаторы резорбции кости. От баланса работы этих двух структур зависит минеральная прочность кости (МПК).

Контроль над соотношением процессов костной резорбции и формированием костной ткани осуществляется местными и системными регулирующими факторами через основные системы остеобластогенеза (канонический wnt-сигнальный путь) и остеокластогенеза (RANKL/RANK/OPG) [68; 115]. Образование и активность остеокластов стимулируются цитокинами, гормонами, факторами роста и свободными радикалами. Также им требуется секреция макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) и рецепторного активатора лиганда NF-κB (RANKL) дополнительными клетками в кортикальном слое кости, в том числе остеобластами и иммунными клетками. Экспрессия фактора 6, связанного с рецептором фактора некроза опухоли, необходима предшественникам остеокластов для RANKL-индуцированной активации NF-κB, требуемой для образования и активности остеокластов. TRAF3, напротив, ограничивает RANKL-индуцированное образование остеокластов, стимулируя протеасомную деградацию NF-κB-индуцирующей киназы в комплексе с TRAF2 и клеточным ингибитором белков апоптоза (cIAP). TRAF3 также ограничивает образование остеокластов, индуцированное фактором некроза опухоли, который обеспечивает воспаление и разрушение суставов при различных заболеваниях [46].

Структура костной ткани зависит от паратиреоидного гормона, фосфорно-кальциевого обмена, гормона роста, витамина D, кальцитонина, тиреоидных гормонов, гормонов, глюкокортикоидов и т.д. [37; 48].

Несмотря на стабильную систему костеобразования и остеорезорбции, костная структура претерпевает изменения в зависимости от воздействия внутренних или внешних факторов на организм. Так, немаловажную роль играют сопутствующие патологические и физиологические процессы, протекающие в организме.

Считается, что стимулирующая остеобласты активность опухолевых клеток обусловлена способностью этих клеток экспрессировать многие из факторов, которые могут управлять образованием остеобластов. Опухолевые клетки благодаря белковым взаимодействиям, осуществляемым через интегрины

(например, $\alpha4\beta1$ – молекула адгезии сосудистых клеток 1) и хемокины, а именно CXCL12, BMP, Notch, нестин и остеопонтин, изменяют функции остеобластов и остеокластов, что приводит к деструкции костной ткани [178]. В последние годы достигнут прогресс в изучении процесса ремоделирования костной ткани путем определения изменений специфических молекулярных и генетических маркеров [32; 111].

Повреждение костной структуры чаще всего встречается при гемобластозах и раке молочной железы. В большинстве случаев резорбция костей связана с прямым воздействием опухолевых клеток или моноцитов, которые находятся в непосредственном контакте с костью [59; 150]. При множественной миеломе опухолевые клетки преимущественно располагаются в КМ, осуществляя непосредственное взаимодействие со стромальным микроокружением [6]. Наличие остеолитических поражений – отличительный признак миеломной болезни, оно связано с дисбалансом функционирования костной ткани [47]. Снижение количества и функциональной активности остеобластов приводит к увеличению остеолизиса и развитию деструкции костей [139]. В то же время цитокины и хемокины, секретируемые плазмоклеточной опухолью, увеличивают продукцию активированных остеокластов. В свою очередь, активированные остеокласты в ответ на воздействие секретируют IL-6, который стимулирует рост клеток множественной миеломы и тем самым поддерживает эту петлю обратной связи [30]. Повышенная функциональная активность остеокластов приводит к усилению остеорезорбции и высвобождению дополнительных факторов роста IGF1 и TGF β , которые способствуют прогрессии множественной миеломы [112; 120].

При острых лейкозах описано снижение массы костной ткани [184]. Механизм повреждения костной ткани при лейкозах может быть связан с непосредственным воздействием опухолевых клеток на кость. Т-клеточный лейкоз/лимфома связаны с инфекцией вируса Т-клеточного лейкоза человека типа 1. В исследовании Xiang показано, что оба онкогена данного вируса Tax и HBZ независимо друг от друга регулируют экспрессию клеточных генов, участвующих в активации и развитии остеокластов, и способствуют потере костной массы. Tax-

положительные опухолевые клетки продуцируют факторы IL-6, MCSF, IL-1 α и IL-1 β , TNF α и TGF- β , которые активируют остеокласты и ведут к потере костной массы [75].

Описаны деструктивные поражения костей при хроническом миелоидном лейкозе [123]. У пациентов с остеолитическими поражениями хронический миелоидный лейкоз чаще всего сопровождается гиперкальциемией [36; 150].

Известно, что при волосатоклеточном лейкозе TNF α участвует в контроле аутокринного роста и обладает сильным резорбтивным влиянием на кости [64].

Было показано, что в КОЕф больных хроническим миелолейкозом повышена экспрессия маркеров костной дифференцировки [20].

Показано, что при лимфоме костей, опухолевые клетки продуцируют растворимые медиаторы цитокинов, которые могут повышать остеокластическую активность. В этом случае происходит резорбция кости с замещением опухолевой тканью. Это один из механизмов, посредством которых лимфома выходит из интрамедуллярного пространства и распространяется на окружающие мягкие ткани [84].

Известно, что при лимфопролиферативных заболеваниях опухоль продуцирует факторы, активирующие остеокласты: IL-1 α , IL-6, TNF β , TGF- β , TNF α , а также белок воспаления макрофагов. Данные факторы в небольшом количестве продуцируются нормальными лимфоцитами, однако при онкологическом процессе происходит их гиперэкспрессия [144].

Прием цитостатиков и использование глюкокортикостероидов, применяемых при гематологических заболеваниях, влияют на костеобразование и костную резорбцию [91; 135].

У 30–50% пациентов, получающих длительную терапию глюкокортикостероидами, возникают патологические переломы костей, и у 9–40% - остеонекроз [179]. Это связано с тем, что глюкокортикостероиды снижают пролиферацию и активность остеобластов, экспрессию остеопротегерина. У больных, которые длительно или в больших суточных дозах, принимают

глюкокортикостероиды, происходит уменьшение МПК и разрежение костной ткани, приводящее к развитию переломов[1].

Известно, что метотрексат вызывает нарушение функций клеток, в том числе остеобластов и МСК [77]. Лечение высокими дозами этого препарата может привести к потере костной массы и повышает риск возникновения костных дефектов у пациентов [40]. Показано, что винкристин и даунорубицин ингибируют активность щелочной фосфатазы, опосредованную 1,25-дигидроксивитамином D₃ [63]. Исследования *in vitro* показывают, что цитостатические препараты влияют на функцию остеобластов, ухудшают их чувствительность к 1,25-дигидроксивитамину D₃ и могут вызывать неблагоприятные воздействия на минерализацию остеобластами [48; 63].

В доступной литературе почти нет работ, посвященных изменениям костной ткани у больных ДВККЛ до и после химиотерапии.

В единственной ретроспективной работе оценили изменения плотности костей позвоночника у 111 пациентов с ДВККЛ. После терапии R-СНОР плотность костей снизилась до 86 % от исходной ($p < 0,001$), и через два года после завершения лечения также оставалась ниже исходной ($p < 0,001$). Компрессионные переломы позвонков, визуализированные с помощью КТ, были обнаружены в этой работе у 14 % пациентов [164].

Методы диагностики повреждения костной ткани

Большинство исследований, посвященных резорбции кости, основаны на нарушении концентрации кальция в организме. Регулировка баланса сывороточного кальция осуществляется тремя гормонами: кальцитриолом (1,25-дигидроксивитамин D), кальцитонином и паратиреоидным гормоном. Паратгормон увеличивает выработку кальцитриола, реабсорбцию кальция и выделение фосфора [17]. Уменьшение костной ткани происходит вследствие изменений происходящих в почках и кишечнике, которые реагируют на воздействие паратгормона. При этом происходит усиление резорбции кости и компенсаторное уменьшение выведение ионов кальция [28]. Витамин D участвует в регуляции транспорта кальция в

кишечнике и активации остеогенеза, индуцируя дифференцировку и пролиферацию остеобластов. Помимо этого, он оказывает влияние на минерализацию и обновление костей, регулирует образование паратгормона и способствует восстановлению микроархитектоники костной ткани. Кальцитриол, связываясь с рецептором, обеспечивает всасывание фосфора и кальция в кишечнике, вместе с другими гормонами регулирует реабсорбцию кальция в почках. Повышение костного метаболизма при гиперпаратиреозе связано со снижением концентрации кальцитриола, что коррелирует с уменьшением МПК.

Для оценки резорбции костной ткани большое значение имеют инструментальные и лабораторные методы исследования костной структуры. Наиболее достоверным методом ранней диагностики остеодеструкции считается денситометрия костей [2]. Лабораторные параметры костного обмена используют для оценки скорости обмена и ремоделирования кости. Состояние костной ткани может быть оценено по активности ферментов, которые синтезируются преимущественно остеобластами и остеокластами, и при анализе компонентов костного матрикса, которые высвобождаются в кровь и выделяются с мочой. Остеобласты синтезируют и выделяют в кровь ряд факторов роста, цитокинов и ферментов. Концентрация этих веществ в крови отражает скорость формирования кости. К маркерам костеобразования относятся остеокальцин, общая щелочная фосфатаза и ее костный изофермент, карбокси- и аминотерминальные пропептиды проколлагена типа I [25]. При костной резорбции продукты распада выделяются в кровь и далее выводятся с мочой. Маркерами костной резорбции являются окси- и дезоксипиридинолины (ДПИД), кальций и оксипролин в моче, N- и C-телопептиды молекул коллагена I типа (b-Cross-laps), связанные поперечными сшивками, в сыворотке крови или моче, а также тартрат резистентная кислая фосфатаза в плазме крови, характеризующая активность остеокластов [76].

Несмотря на множество работ, описывающих изменения в строме КМ у больных гематологическими заболеваниями, строма больных ДВККЛ и ее клетки-предшественницы остаются мало исследованными. Работа посвящена изучению стромальных предшественников и изменению костной ткани больных ДВККЛ без

вовлечения КМ в динамике, до начала лечения и в различное время после достижения ремиссии заболевания. Такое исследование, с одной стороны, позволяет выявить изменения, связанные с развитием заболевания, а с другой, оценить влияние химиотерапии и ее отдаленные последствия.

Глава 3. Материалы и методы

3.1 Характеристика больных

В исследование включено 86 больных, 40 мужчин и 46 женщин, в возрасте от 30 до 79 лет (медиана – 60 лет), которым установлен диагноз ДВККЛ, без вовлечения КМ, согласившихся принять участие в исследовании. Всем пациентам выполнена трепанбиопсия с последующим гистологическим исследованием КМ для исключения поражения КМ.

Пациенты были разделены на две подгруппы по следующим критериям:

□ первая группа: 40 пациентов с впервые установленным диагнозом ДВККЛ, не получавших гормональную или цитостатическую терапию до включения в исследование (Таблица 1).

□ вторая группа: 46 пациентов, завершивших лечение 5 и более лет назад, которым химиотерапия была проведена с 2004 по 2014гг. в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Таблица 2).

Контрольную группу составили образцы КМ, полученные от здоровых доноров, в возрасте 30–78 лет.

Для каждой из исследуемых групп были подобраны группы доноров, сопоставимые с группой больных по возрасту (Таблица 1, 2).

У всех пациентов и доноров, включенных в исследование получено информированное согласие на обследование и обработку данных.

Таблица 1 – Характеристика пациентов с впервые установленным диагнозом ДВККЛ и доноров

Показатели	Всего	Ветвь терапии				Доноры
		R-СНОР	R-mNHL-BFM-90	R-DA-EPOCH	ПХТ+аутоТСКК (из 40 пациентов)	
Число пациентов	40	17	13	10	8	30
Возраст, годы	30–78	34–78	34–60	38–68	34–64	30–78
Медиана возраста, лет	54	68	51	50,5	51,5	54
Соотношение мужчин/женщин	14/26	3/14	7/6	4/6	3/5	10/20
МПИ:						-
0–1	11	7	4	0	0	
2	5	2	1	2	1	
3	9	0	5	4	5	
4-5	15	8	3	4	2	
Стадия по Ann Arbor						
I– II	14	8	5	1	1	
III–IV	26	9	8	9	7	
Более одного экстранодального очага, количество пациентов	26	8	6	7	5	
Наличие В-симптомов, количество пациентов	11	5	1	6	2	

Таблица 2 – Характеристика пациентов, завершивших лечение 5 и более лет назад, и доноров

Показатели	Всего	После R±СНОР	После R±mNHL-BFM-90	Доноры
Число пациентов	46	19	27	14
Возраст на момент исследования, годы	32–79	32–79	34–75	52–78
Медиана возраста, лет	61	63	61	59
Соотношение мужчин/женщин	26/20	13/6	13/14	10/4
МПИ:				-
0–1	16	11	5	
2	9	4	5	
3	12	3	9	
4-5	9	1	8	
Стадия по Ann Arbor:				
0–I	27	16	11	
III–IV	19	3	16	
Более одного экстранодального очага	20	5	15	
Наличие В-симптомов	27	10	17	

Диагноз пациентам установлен соответственно критериям классификации ВОЗ 2008, 2017 для опухолей гемопоэтической и лимфоидной ткани [165].

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

(заведующий отделением к.м.н. В.Е. Мамонов) после подписания информированного согласия.

Костная денситометрия и лабораторные исследования маркеров метаболизма костей осуществлялись ООО «Медикал Клуб Консилиум». Денситометрия проводилась на двухэнергетическом рентгеновском остеоденсиметре Discovery A, «Hologic».

3.2 Контрольные точки обследования

Пациентам, которые завершили ПХТ более 5 лет назад (вторая группа), проводилась стерильная пункция (в ходе которой отбирали 3–5 мл КМ), ПЭТ-КТ (для подтверждения ремиссии заболевания), лабораторные исследования мочи и крови.

В группе первичных пациентов с ДВККЛ (первая группа) перед началом ПХТ выполнялись все вышеперечисленные исследования. КМ у этих пациентов был исследован на следующих контрольных сроках:

- до начала ПХТ – 40 пациентов;
- через месяц после завершения ПХТ – 38 пациентов (один пациент умер вследствие осложнений ПХТ и одна больная проходила лечение в другом лечебном учреждении);
- через месяц после аутоТСКК – 8 пациентов;
- через 6 месяцев с момента завершения терапии – 32 пациента.

Остальные пациенты не смогли приехать на обследование, известно, что они находились в ремиссии заболевания.

Первичным пациентам выполнялось ПЭТ/КТ в дебюте заболевания, а также спустя месяц после окончания терапии (для определения первичного поражения и ремиссии заболевания).

Комплексное обследование костной ткани проведено 11 больным (8 женщин, 3 мужчин, медиана возраста 57 лет) ДВККЛ до начала химиотерапии, 24 больным, завершившим ПХТ по программе R±CHOP-21 (11 пациентов: 3 женщины, 8 мужчин, медиана возраста 50 лет) и по программе R±mNHL-BFM (13 пациентов: 9 женщины, 4 мужчин, медиана возраста 50 лет) более 5 лет назад. Контрольную группу

составили 14 человек соответствующего возраста, не имеющих гематологических заболеваний (медиана возраста 61 год).

3.3 Основные программы химиотерапии

Пациентам с первично установленным диагнозом ДВККЛ с промежуточным и высоким риском по МПИ проводилась ПХТ в рамках рандомизированного исследования ДВККЛ–2015. В протокол включали больных со впервые выявленной ДВККЛ моложе 60 лет с 2 и более признаками неблагоприятного прогноза (МПИ 2–4), не получавших ранее терапии и удовлетворяющих критериям включения в протокол [15].

Больные были рандомизированы на:

- R-DA-EPOCH-21;
- R-mNHL-BFM-90;
- R-DA-EPOCH-21+аутоТСКК;
- R-mNHL-BFM-90+аутоТСКК.

Пациентам было проведено 4–6 курсов химиотерапии и аутоТСКК при рандомизировании их на ветвь с трансплантацией.

Пациентам с возрастными противопоказаниями (возраст старше 60 лет) и/или низкой группы риска проводилась терапия по протоколу R-CHOP-21 (4–6 курсов химиотерапии).

3.4 Метод получения мезенхимных стромальных клеток

КМ получали при выполнении стеральной пункции. Его помещали в стерильные пробирки, содержащие гепарин (50 Ед/мл), разводили в 2 раза средой с аМЕМ (ICN) и 0,2 % метилцеллюлозы (1500 сП, Sigma). После этого при комнатной температуре оставляли на 45 минут. За 45 минут основная часть гранулоцитов и эритроцитов оседала, в то время, как мононуклеарные клетки оставались во взвеси. Собирали надосадочную жидкость и осаждали центрифугированием при температуре 10–12°C в течение 10 минут при 1500 оборотах в минуту. Определяли количество ядерных клеток при подсчете с генцианвиолетом (1 % раствор на 3 % уксусной кислоте) в камере Горяева. Далее

клетки сажали по 3×10^6 во флакон для культивирования с площадью поверхности дна 25 см^2 в среде альфа-МЕМ с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) (HyClone), 1 % раствором L-глутамин (ICN), 0,5 % раствором пенициллина (Ferein) и инкубировали в условиях гипоксии при 37°C с 5 % O_2 и 5 % CO_2 . После формирования монослоя клетки промывали раствором Версена (0,02 % раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты в физиологическом растворе (Sigma)) и обрабатывали 0,25 % раствором трипсина (ICN). После того, как клетки откреплялись от пластика, подсчитывали их количество и рассаживали по 100×10^3 на флакон. В камере Горяева определяли количество снятых со дна флакона клеток. По отсутствию окраски трипановым синим определяли жизнеспособность клеток. Остаток клеток нулевого, второго и третьего пассажа замораживали в среде с добавлением равного объёма полиглюкина (ОАО «Биохимик») и 10 % диметилсульфоксида (AppliChem). РНК выделяли из клеток первого пассажа.

Клетки культивировали до третьего пассажа.

3.5 Получение колониеобразующих единиц фибробластов

Для подсчета КОЕ-Ф 1×10^6 ядродержащих клеток костного мозга сажали на флакон с площадью поверхности дна 25 см^2 . Всего производилась посадка 3 флаконов. Культивировали клетки в среде α МЕМ с 20 % ЭТС, 100 Ед пенициллина и 50 мкг стрептомицина (Ferein) и 2 мМ L-глутамин (ICN). Клетки культивировали в течение 2-х недель, при 5 % CO_2 37°C . После этого клетки окрашивали 0,1 % раствором кристаллического фиолетового на 20 % метаноле для подсчета колоний. Под бинокулярной лупой подсчитывали окрашенные колонии. Из клеток в двух других флаконах выделяли РНК.

3.6 Определение иммунофенотипа мезенхимных стромальных клеток

Методом проточной цитометрии определяли уровень экспрессии антигенов на поверхности МСК. МСК дважды отмывали раствором CellWash (BD Biosciences, США), а затем 2×10^4 клеток инкубировали в течение 20 минут в темноте с моноклональными антителами анти-CD90, мечеными PE (BD Pharmingen, США), анти-HLA-ABC, мечеными FITC (Biolegend, США), анти-HLA-DR, мечеными APC

(Biolegend, США), анти-CD54, мечеными APC (Biolegend, США), анти-CD73, мечеными PE (BD Pharmingen, США), анти-CD105, мечеными FITC (Biolegend, США), анти-CD146, мечеными PE (BD Pharmingen, США). Анализ данных осуществляли с помощью проточного цитометра FACSCanto II (BD Biosciences, США). Анализ полученных результаты происходил с помощью программы FACSDiva (BD Biosciences, США).

Популяцию МСК определяли по параметрам прямого и бокового светорассеяния и экспрессии на поверхности клеток антигена CD90. Оценивали средний уровень флуоресценции (MFI/СУФ) по каналам FITC, APC и PE.

3.7 Выделение рибонуклеиновых кислот из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и колониеобразующих единиц фибробластов

Для выделения РНК клетки промывали в фосфатно-солевом буфере 2–3 раза, далее к осадку добавляли 800 мкл тризола. Затем содержимое переносили в 2 мл пробирку и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. К образцам добавляли 160 мкл хлороформа. Далее пробирки перемешивали 15 секунд и инкубировали при комнатной температуре 2–3 минуты. Пробы центрифугировали при 4°C в течение 15 минут, при 12000 оборотах в минуту. Отбирали верхнюю фазу и переносили ее в новые пробирки 1,5 мл. В пробирки добавляли по 2 мкл раствора гликогена (RNase free, 5 мг/мл). Далее в каждую пробирку прибавляли 400 мкл изопропанола и инкубировали при комнатной температуре 10 минут. После этого пробирки центрифугировали при 4°C со скоростью 12000 оборотов в минуту 10 минут. Осадок РНК промывали 1 мл 75 % ледяного этанола, а после разбивали на Вортексе. Затем пробы центрифугировали при 4°C 5 минут на скорости 7500 оборотов в минуту. Этанол сливали, капли осаждали и отбирали. Осадок высушивали на воздухе 5–10 минут.

После очистки РНК растворяли в 100 мкл воды, обработанной ДЭПК. Аликвоту, равную 1/10 объема пробы, использовали для определения концентрации РНК на спектрофотометре, для чего РНК разводили водой

соответственно объему имеющейся кюветы. На спектрофотометре определяли поглощение на длинах волн 260, 280 и 320 нм.

Выход оценивали по A_{260} , 1 оптическая единица при $A_{260}=40$ мкг РНК/мл. Чистоту образца оценивали по соотношению A_{260}/A_{280} (допустимые значения 1,7 – 2,0). К оставшейся пробе добавляли 9 мкл ацетата натрия (3М, рН 5,2) и 225 мкл 96 % этанола. Пробы хранили при -20°C .

3.8 Построение комплементарных цепей дезоксирибонуклеиновых кислот

При построении комплементарной ДНК (кДНК) отбирали по 2 мкг РНК из каждой пробирки, растворенной в воде, обработанной ДЭПК (в концентрации 1 мкг в мкл). Присоединение затравки происходило следующим образом: 2 мкл РНК, 2,5 мкл смеси Т13-праймеров и случайных гексамеров (20 пкмоль/мкл), 5,5 мкл воды, обработанной ДЭПК, смешивали и инкубировали при 70°C 10 минут и при 4°C 10 минут в амплификаторе (Терцик, ДНК-Технология). Затем проводили ревертазную реакцию. Для этого в каждую пробирку добавляли по 5 мкл буфера для ревертазы, 2,5 мкл 10мМ дезоксинуклеотидтрифосфата, 1 мкл Рназина (40ЕД), 5,5 мкл воды и 1 мкл ревертазы М-MLV (200ЕД). Все это перемешивали и инкубировали в амплификаторе в течение 1 часа при 42°C , после чего пробы охлаждали, добавляли 75 мкл воды и использовали в качестве раствора кДНК соответствующего образца.

3.9 Анализ экспрессии генов

Интересующие гены определяли с помощью полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени, модификация Taqman, с использованием специфических праймеров и зондов, которые синтезированны фирмой Синтол. В качестве флуоресцентного красителя использовали карбокси-X-родамин (ROX) для генов «домашнего хозяйства» *GAPDH* и *BACT* и гена *ICAM1* и карбоксифлуоресцеин (FAM) для всех остальных генов. В качестве гасителей флуоресценции для флуорофора ROX использовали RTQ2, для флуорофора FAM – RTQ1. Все полимеразные цепные реакции в режиме реального времени проводили на приборе ABI Prism 7000 Applied Biosystems.

При проведении полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени брали 1 мкл кДНК на пробу. Реакцию проводили в объеме 25 мкл в ПЦР-буфере с рабочей концентрацией ионов Mg^{+2} 3,5мМ, 0,25мМ дезоксинуклеотидтрифосфата, с 0,4 пкмоль/мкл соответствующих праймеров, 0,2 пкмоль/мкл флуоресцентного зонда и 0,05 ЕД/мкл SmarTaq полимеразы с ингибирующими активностью антителами. Нуклеотидные последовательности специфичных к соответствующим генам праймеров и зондов приведены в Таблице 3.

Таблица 3 – Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов к исследуемым генам

Название гена	Праймер/ зонд	Нуклеотидная последовательность
<i>ВАСТ</i>	Прямой	CAACCGCGAGAAGATGACC
	Обратный	CAGAGGCGTACAGGGATAGC
	Зонд	ROX-AGACCTTCAACACCCCAGCCATGTACG-RTQ2
<i>GAPDH</i>	Прямой	GGTGAAGGTCGGAGTCAACG
	Обратный	TGGGTGGAATCATATTGGAACA
	Зонд	ROX-CTCTGGTAAAGTGGATATTGTTGCCATCA-RTQ2
<i>IL-6</i>	Прямой	ACCTGAACCTTCCAAAGATG
	Обратный	CTCCAAAAGACCAGTGATGA
	Зонд	FAM-ATTCAATGAGGAGACTTGCCTGGTG-RTQ1
<i>IL-10</i>	Прямой	CCGTGGAGCAGGTGAAGA
	Обратный	TTGTCATGTAGGCTTCTATGTAGT
	Зонд	FAM-ATAAGCTCCAAGAGAAAGGCATCTAC-RTQ1
<i>SMURF</i>	Прямой	AAACGGATTCGATAACCATTAG
	Обратный	GATCTGAGGGGTTTAGTTTG
	Зонд	FAM-CCAGCTCCCTGTTTCTTGTGAATTTTC-RTQ1
<i>PPARG</i>	Прямой	TACTGTCCGGTTTCAGAAATGC
	Обратный	CAACAGCTTCTCCTTCTCG
	Зонд	FAM-CCATCAGGTTTGGGCGGATGCC-RTQ1
<i>SOX9</i>	Прямой	AGCAAGACGCTGGGCAAG
	Обратный	GTTCTTCACCGACTTCCTC
	Зонд	FAM-CTGGAGACTTCTGAACGAGAGC-RTQ1
<i>FGF2</i>	Прямой	GAAGAGCGACCCTCACATCAAG
	Обратный	TCCGTAACACATTTAGAAGCCAGTA
	Зонд	FAM-TCATAGCCAGGTAACGGTTAGCACACACTCCT-RTQ1
<i>FGFR1</i>	Прямой	CAGAATTGGAGGCTACAAGG
	Обратный	TGATGCTGCCGTAATTC
	Зонд	FAM-CATCATAATGGACTCTGTGGTGC-RTQ1
<i>FGFR2</i>	Прямой	GCAGCGAGGTAGTGAAGAG
	Обратный	GAAAGCCGATGTGGTCAG
	Зонд	FAM-CTCCCAGCCATTGATACAGGTAGC-RTQ1

Название гена	Праймер/ зонд	Нуклеотидная последовательность
<i>VEGF</i>	Прямой	AGG CGA GGC AGC TTG AGT TA
	Обратный	ACC CTG AGG GAG GCT CCT T
	Зонд	FAM-CCT CGG CTT GTC ACA TCT GCA AGT ACG T-RTQ1
<i>SPP1</i>	Прямой	ATAGTGTGGTTTATGGACTGAG
	Обратный	ATTCAACTCCTCGCTTTCC
	Зонд	FAM-CCAGTACCCTGATGCTACAGACGAG-RTQ1
<i>ICAM1</i>	Прямой	GCAATGTGCAAGAAGATAGC
	Обратный	CTCCACCTGGCAGCGTAG
	Зонд	ROX-CACGGTGAGGAAGGTTTTAGCTGTT-RTQ2
<i>BGLAP</i>	Прямой	GCAGCGAGGTAGTGAAGAG
	Обратный	GAAAGCCGATGTGGTCAG
	Зонд	FAM-CTCCCAGCCATTGATACAGGTAGC-RTQ1
<i>BMP4</i>	Прямой	ACAGCACTGGTCTTGAGTATC
	Обратный	TGGGATGTTCTCCAGATGTTC
	Зонд	FAM- AACACCGTGAGGAGCTTCCACCA -RTQ1
<i>MMP2</i>	Прямой	TGAGAAGGATGGCAAGTACG
	Обратный	TGCGGCCCTCAGTGGTGC
	Зонд	FAM-CCGCTTCCAGGGCACATCCTATGAC-RTQ1
<i>BMP2</i>	Прямой	AGCCGAGCCAACACTGTGC
	Обратный	TCTCGGAAAACCTGAAGCTC
	Зонд	FAM-TTTAATTTAAGTTCTATCCCCACGG-RTQ1
<i>TGFB1</i>	Прямой	TGCGTCTGCTGAGGCTCAA
	Обратный	CGGTGACATCAAAAGATAACC
	Зонд	FAM-AGGAATTGTTGCTGTATTTCTGGTAC-RTQ1
<i>PDGFRβ</i>	Прямой	CTCCCTTATCATCCTCATCA
	Обратный	TCCACGTAGATGTAICTCATG
	Зонд	FAM-TCACAGACTCAATCACCTTCCATC-RTQ1

Режим ПЦР включал предварительную денатурацию образца длительностью 10 мин при температуре 95 °С, циклическую денатурацию в течение 20 секунд при 95°С, гибридизацию матрицы с праймерами и элонгацию в течение 60 с при

температуре 60°C. Реакцию проводили в 3 повторах для каждого образца. Для каждого гена в программе 7500 System SDS software был подобран уровень базовой флуоресценции. На основании измерений сигнала репортерной флуоресценции с учетом уровня базовой флуоресценции программа рассчитывала пороговый цикл C_t , т.е. такой цикл, на котором достигается некий заданный уровень репортерной флуоресценции. Значение C_t прямо пропорционально логарифму количества субстрата для каждого образца.

Использовали метод дельта C_t для анализа полученных данных. После проведения полимеразной цепной реакцией вычисляли средние значения порогового цикла C_t из 3-х проб для каждого из образцов. Вычисляли разницу средних значений порогового цикла для исследуемого гена между опытным и референсным образцом (в качестве референсного образца была взята смесь кДНК из проб от 8 доноров). Ненормированную разницу экспрессии гена вычисляли по формуле:

$$D = 2^{-\Delta C_t} \quad (1),$$

где D – ненормированная разница в экспрессии исследуемого гена, а ΔC_t – разница средних значений порогового цикла опытного и референсного образцов.

Для нормирования количества кДНК в исходных пробах использовали гены «домашнего хозяйства», кодирующие *GAPDH* и *BACT*. Для каждого из этих генов проводили полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени с соответствующими праймерами и зондом. Определяли показатель D по каждому из этих генов. Показатель D в случае гена «домашнего хозяйства» отражает разницу в количестве исходного материала (тотальной РНК) в разных пробах. Суммарный фактор нормализации вычисляли как среднее геометрическое из факторов нормализации по отдельным генам «домашнего хозяйства». Нормированную разницу экспрессии интересующих нас генов вычисляли по формуле:

$$D_n \square \frac{D}{NF} \quad (2),$$

где D_n – нормированная разница экспрессии гена, D – ненормированная разница экспрессии гена, NF – суммарный фактор нормализации по 2 генам «домашнего хозяйства».

3.10 Методы исследования изменений в плазме больных, и ее влияние на мезенхимные стромальные клетки

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

3.11 Исследование метаболических изменений костной ткани

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

Оценка осуществлялась на основании двух параметров: T- и Z-критериев. Алгоритм расшифровки исследования установлен и рекомендован Российской Ассоциацией по Остеопорозу и Всемирной организацией здравоохранения. Вышеописанные критерии сравнивают плотность костей пациентов с идеальным показателем (среднее значение у молодых людей 30–35 лет соответствующего пола). Для мужчин старше 50–ти лет и для женщин после менопаузы используется T-критерий. Нормой является значение в 1 одно стандартное отклонение. Если стандартное отклонение варьирует от –1 до –2.5, то диагностируется остеопения, значение менее –2,5 – остеопороз [8; 18].

Проводили остеоденситометрию в стандартных участках скелета, для которых имеются референсные нормативные значения (шейке бедра и поясничных позвонках L1-L4). В губчатой кости позвонков идет активное кроветворение, остеобласты и МСК участвуют в формировании ниши для кроветворных стволовых клеток. Кроме того, в этих областях происходят активные обменные процессы.

Маркеры ремоделирования костной ткани оценивались до начала лечения в группе пациентов до начала химиотерапевтического воздействия и в группе больных, которые завершили терапию более чем 5 лет назад.

Исследование крови (остеокальцин, b-cross-laps, паратгормон, витамин Д3) и мочи (ДПИД и общий анализ мочи) проводилось в лаборатории ООО «Медикал Клуб Консилиум». Ионизированный кальций определяли с помощью ионселективных электродов на приборе Thermo Scientific Konelab Prime 60S. Неорганический фосфор определяли колориметрическим методом с молибдатом аммония на анализаторе Architect4000. ДПИД и N-остеокальцин анализировали с помощью иммунохимического метода на приборе Immulite2000. 25-ОН витамин Д и паратиреоидный гормон исследовали иммунохимическим методом на анализаторе Architect4000. В-cross-laps определяли на приборе Elecsys 2010 иммунохимическим методом.

3.12 Анализ результатов

Статистические отличия в группах оценивали при помощи t-критерия Стьюдента, U-критерия Манна-Уитни и T-критерия Уилкоксона. Достоверными считали отличия при $p \leq 0,05$. Тесноту и направление корреляционной связи при анализе относительного уровня экспрессии генов определяли методом ранговой корреляции Спирмена. Коэффициент более 0,7 считали показателем высокой тесноты связи, от 0,4 до 0,7 – умеренной тесноты связи. Результаты были обработаны с помощью программ GraphPad Prism.

Глава 4. Результаты и обсуждение

4.1 Изменение культуральных свойств клеток-предшественниц стромального микроокружения при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме до и после терапевтического воздействия

Изменение стромального микроокружения у больных ДВККЛ в дебюте заболевания

В исследование были включены образцы КМ 40 больных ДВККЛ в дебюте заболевания. Известно, что у больных острыми лейкозами МСК отличаются от клеток здоровых людей [129; 147; 153]. Практически отсутствуют данные о стромальных клетках-предшественницах (МСК и КОЕф) у больных ДВККЛ.

Было выдвинуто предположение, что у пациентов с ДВККЛ без поражения КМ стромальные предшественники не затронуты опухолью и не отличаются по своим характеристикам от донорских. Оказалось, что несмотря на отсутствие признаков поражения КМ, суммарная клеточная продукция МСК за 4 пассажа у пациентов в дебюте заболевания была достоверно выше по сравнению с донорами соответствующего возраста (Рисунок 1).

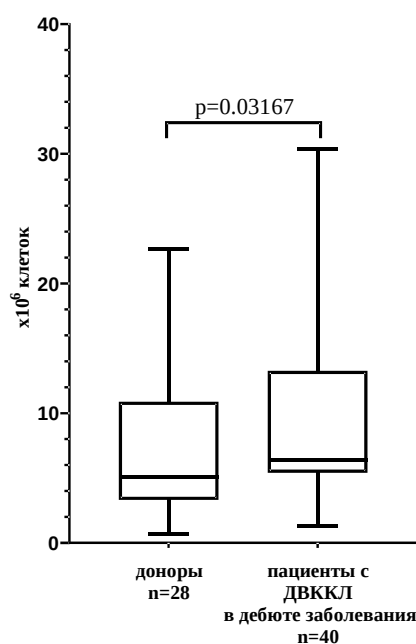


Рисунок 1 – Суммарная клеточная продукция МСК за 4 пассажа здоровых доноров и больных ДВККЛ до ПХТ. Границы бокса — первый и третий квартили (5–й и 95–й процентиля), линия в центре ранжированного ряда — медиана (50–й процентиль). Концы усов — минимальное и максимальное значения данных.

Время, необходимое для достижения конfluентности после исходной посадки (время до P0), не отличалось в культурах МСК больных ДВККЛ и здоровых доноров. Концентрация КОЕф в КМ пациентов с ДВККЛ также достоверно не отличалась от таковой у доноров (Таблица 4).

Таблица 4 – Культуральные характеристики МСК и концентрация КОЕф на 10⁶ клеток КМ у пациентов до начала терапии

Исследуемые группы	Суммарная продукция МСК за 4 пассажа, x10 ⁶	Концентрация КОЕф на 10 ⁶ клеток КМ	Время до P0, сутки
Доноры	6,8 ± 1,0	19,2 ± 5,5	13,7 ± 0,5
Пациенты с ДВККЛ перед ПХТ	9,6 ± 1,1*	11,8 ± 2,1	12,9 ± 0,3

* – достоверные различия между МСК контрольной группы и пациентов в дебюте заболевания

Анализ морфологических и иммунофенотипических характеристик МСК из КМ больных ДВККЛ показал, что МСК доноров имеют более высокий показатель прямого светорассеяния в сравнении с МСК пациентов до начала ПХТ ($p < 0,0001$) (Рисунок 2). Это говорит о том, что изменены не только культуральные характеристики клеток-предшественниц КМ, но и морфологические. Изменение прямого светорассеяния отражает изменения размера клеток и состояния цитоскелета МСК у пациентов в дебюте заболевания [124].

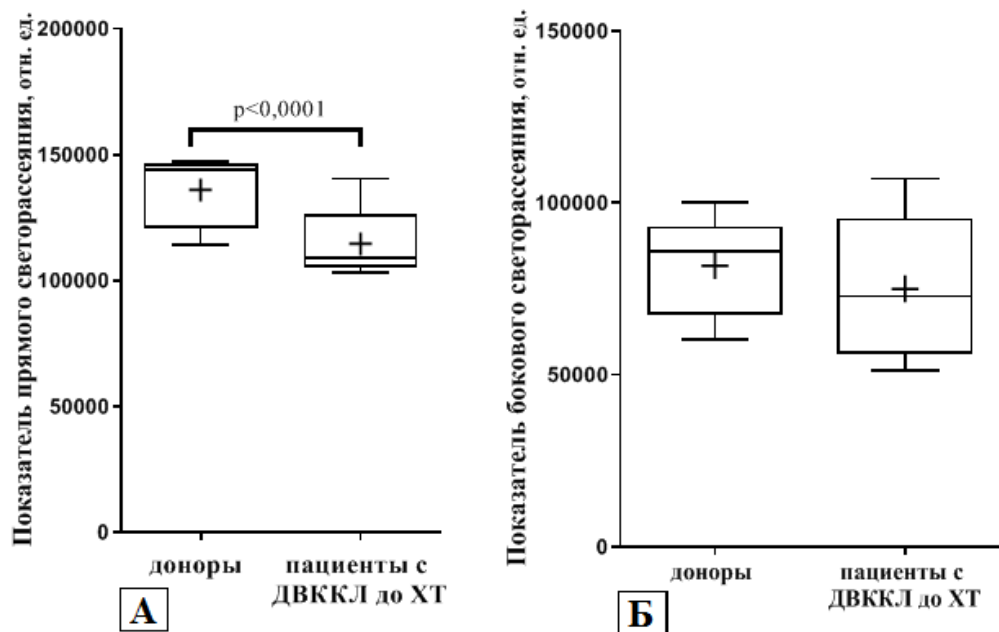


Рисунок 2 – Анализ светорассеивания МСК доноров и пациентов с ДВККЛ в дебюте заболевания. А. Показатель прямого светорассеяния. Б – показатель бокового светорассеяния. Границы бокса — первый и третий квартили (5–й и 95–й процентиля), линия в центре ранжированного ряда — медиана (50–й процентиль). Концы усов — минимальное и максимальное значения полученных данных.

Анализ СУФ поверхностных антигенов выявил отличия МСК больных по сравнению с донорами. В дебюте заболевания отмечено повышение уровня экспрессии CD54 на МСК больных по сравнению с клетками доноров. CD54

(ICAM-1) экспрессируется на поверхности различных типов клеток, в том числе МСК КМ. Усиление экспрессии этого белка происходит в ответ на нарушение гомеостаза, а также при воздействии различных медиаторов воспаления, включая провоспалительные цитокины и гормоны. Эти явления увеличивают экспрессию ICAM-1 главным образом посредством активации гена *ICAM-1* [141]. Возможно, повышение СУФ данного антигена связано с воспалительной реакцией, которая сопровождает онкологический процесс. Отмечено повышение в дебюте заболевания CD73 – маркера МСК, молекулы, способной индуцировать адгезию и дифференцировку лимфоцитов и моноцитов [31]. Вероятно, увеличение экспрессии молекул адгезии – признак активного взаимодействия МСК с кроветворными клетками. CD105 (ENG) – эндоглин, который является компонентом рецептора TGFβ1, обладающий высокой аффинностью [140]. TGFβ1 – один из регуляторов состояния покоя кроветворных стволовых клеток [185]. Отмечено повышение экспрессии этой молекулы в 2 раза на МСК больных ДВККЛ в дебюте заболевания по сравнению с донорами. CD90 (THY1) предположительно вовлечен в межклеточное взаимодействие. Экспрессия данной молекулы на МСК пациентов снижена в дебюте заболевания в 1,3 раза по сравнению с донорами (Таблица 5).

Таблица 5 – Средний уровень флуоресценции основных поверхностных антигенов МСК

Исследуемые группы	CD54 (ICAM1)	CD146 (MCAM)	CD73 (NT5E)	CD90 (THY1)	CD105 (ENG)
Доноры	72 ± 16	291 ± 69	632 ± 57	6760 ± 761	610 ± 139
Пациенты с ДВККЛ в дебюте заболевания	110 ± 28	292 ± 130	907 ± 285	5130 ± 980	1147 ± 431

Была проанализирована экспрессия генов *IL-6*, *IL-8*, *SPP1*, *BGLAP*, *FGF2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *VEGF*, *PDGFRβ*, *MCAM*, *ICAM*, *SOX9*, *PPARγ*, *BMP2*, *BMP4*,

SMURF1, *SDF1*, *FGFRb1*, *MMP2* в МСК пациентов с ДВККЛ в дебюте заболевания. Было обнаружено достоверное повышение относительного уровня экспрессии гена *FGF2* (Рисунок 3), его рецептора *FGFR2* и снижение *FGFR1* (Рисунок 4). Повышение *FGF2*, одного из основных факторов роста МСК согласуется с увеличением суммарной клеточной продукции МСК больных в дебюте заболевания (Таблица 6). Описано участие *FGF2* в прогрессе опухоли, в том числе при ДВККЛ [171]. Показано, что *FGF2* секретируется стромальными клетками костного мозга в экзосомах, которые поглощаются опухолевыми клетками и увеличивают их устойчивость к терапии [89].

Таблица 6 – Относительный уровень экспрессии генов в МСК доноров и у пациентов до начала терапии

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

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

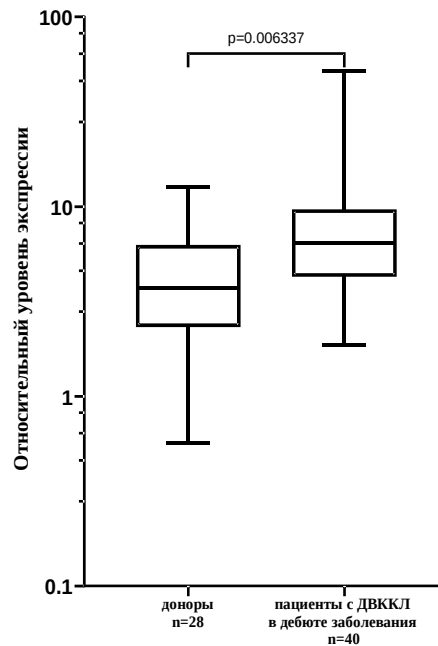


Рисунок 3 – Относительный уровень экспрессии *FGF2* в МСК у доноров и пациентов с ДВККЛ до начала терапии. Границы бокса — первый и третий квартили (5-й и 95-й процентиля), линия в центре ранжированного ряда — медиана (50-й процентиль). Концы усов — минимальное и максимальное значения полученных данных.

Снижение в МСК экспрессии *FGFR1* у пациентов с ДВККЛ в дебюте заболевания может изменять стромальное микроокружение и снижать устойчивость опухоли к терапии, как это было показано для ОМЛ [90]. Повышение *FGFR2* возможно отражается на состоянии костной ткани, так как нарушение экспрессии *FGFR2* и мутации в нем ведут к деструкции костей [181].

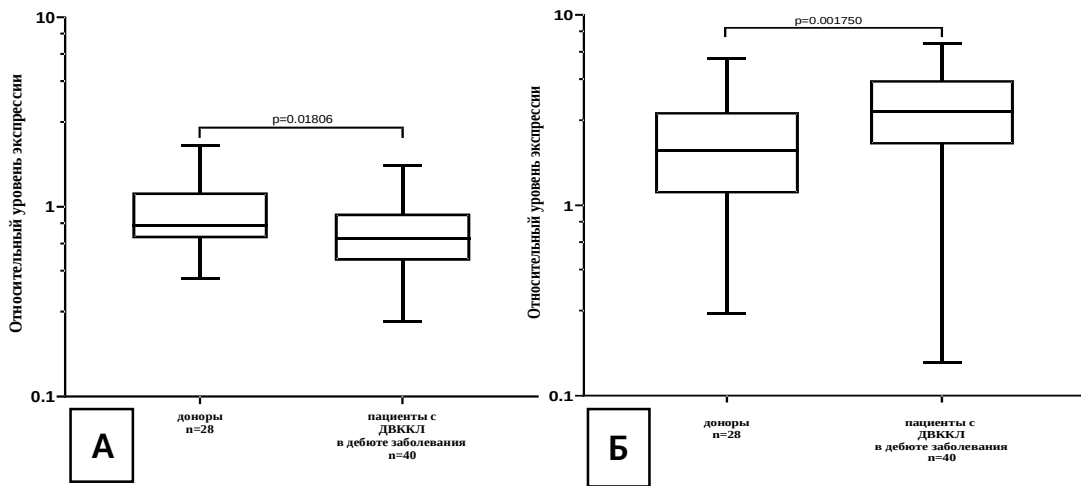


Рисунок 4 – Исследование относительного уровня экспрессии в МСК. А. Экспрессия гена *FGFR1* у доноров и пациентов с ДВККЛ до начала терапии. Б. Экспрессия гена *FGFR2* у доноров и пациентов с ДВККЛ до начала терапии. Границы бокса — первый и третий квартили (5–й и 95–й процентиля), линия в центре ранжированного ряда — медиана (50–й процентиль). Концы усов — минимальное и максимальное значения полученных данных.

Показано достоверное повышение экспрессии гена фактора, регулирующего миграцию гемопоэтических клеток в КМ – *SDF1* (Рисунок 5). Известно, что повышение экспрессии его рецептора *CXCR4* на кроветворных клетках способствует выживанию клеток лимфомы и способствует прогрессии заболевания, при этом экспрессия *SDF1* в опухолевом микроокружении снижается [51]. Таким образом, можно предполагать, что повышение экспрессии *SDF1* в клетках-предшественницах КМ отражает один из путей подготовки для распространения опухоли. Вместе с тем, экспрессия *SDF1* в МСК больных с локализованным опухолевым поражением была достоверно выше, чем при генерализованном процессе.

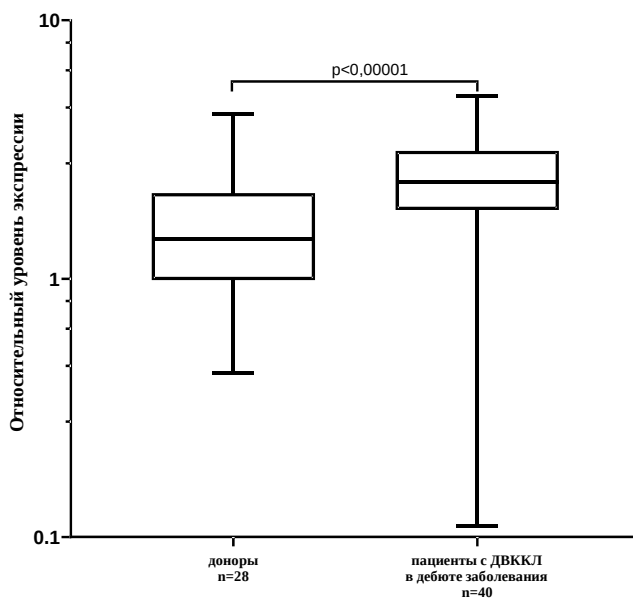


Рисунок 5 – Относительный уровень экспрессии *SDF1* в МСК у пациентов до начала терапии

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

Выявлено достоверное повышение экспрессии гена провоспалительного фактора *IL-8*, что может быть связано с системным ответом организма на опухолевый процесс (Рисунок 6).

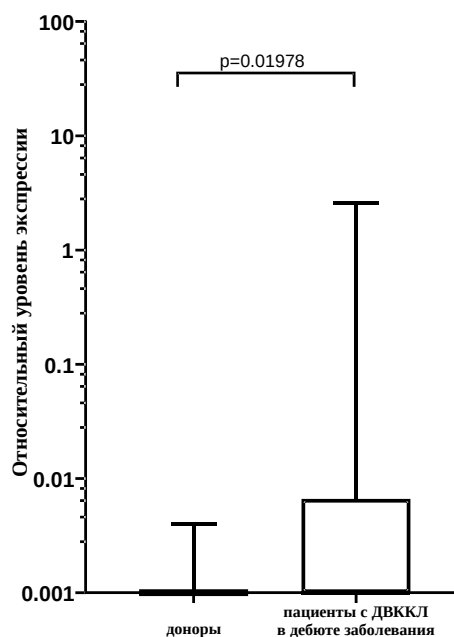


Рисунок 6 – Относительный уровень экспрессии *IL8* в МСК у доноров и пациентов с ДВККЛ до начала терапии.

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

Таким образом, культуральные, морфологические и функциональные характеристики МСК у больных ДВККЛ в дебюте заболевания изменены. Наличие данных изменений позволяет предположить влияние внекостномозговых опухолевых клеток на стромальные клетки-предшественницы КМ, несмотря на отсутствие непосредственного взаимодействия между ними.

Изменение стромального микроокружения у больных ДВККЛ через месяц и 6 месяцев после проведения терапии

Через месяц после завершения ПХТ, у 38 из описанных выше первичных пациентов с ДВККЛ были получены образцы КМ. У двух пациентов материал получен не был, поскольку один пациент умер от осложнений ПХТ и одна пациентка проходила лечение в другом лечебном учреждении. Восемь образцов

КМ больных ДВККЛ были набраны через месяц после проведения аутоТСКК. Тридцать два образца КМ пациентов взяты через 6 месяцев после завершения всех курсов ПХТ. Остальные пациенты на этом сроке не смогли приехать на обследование. Все пациенты, включенные в исследование, находились в ремиссии заболевания.

В работе приведена единая группа пациентов после окончания терапии, так как различий в МСК пациентов через месяц и полгода после окончания терапии в зависимости от проведенного лечения выявлено не было. Вероятнее всего это связано с тем, что стромальные клетки-предшественники КМ более резистентны к химиотерапии, чем гемопоэтические клетки-предшественники и физиологически медленнее обмениваются в организме.

Не было выявлено достоверных отличий в культуральных свойствах МСК через месяц, 6 месяцев после окончания терапии и после аутоТСКК по сравнению с дебютом заболевания (Таблица 7).

Таблица 7 – Культуральные характеристики МСК и концентрация КОЕф у пациентов после окончания терапии

Исследуемые группы	Суммарная продукция МСК за 4 пассажа, $\times 10^6$	Концентрация КОЕф на 10^6 клеток КМ	Время до P0, сутки
Доноры	$6,8 \pm 1,01$	$19,3 \pm 5,5$	$13,7 \pm 0,5$
Пациенты с ДВККЛ до начала ПХТ	$9,6 \pm 1,1^*$	$11,8 \pm 2,1$	$12,9 \pm 0,3$
Пациенты с ДВККЛ через месяц после ПХТ:	$10,8 \pm 1,1^*$	$22,6 \pm 4,5$	$12,3 \pm 0,3$
Пациенты с ДВККЛ через 6 месяцев после ПХТ	$10,7 \pm 1,9$	$15,4 \pm 3,5$	$12,0 \pm 0,3$

* достоверные различия по сравнению с донорами

У пациентов через месяц после окончания терапии сохранялись достоверные отличия суммарной клеточной продукции МСК за 4 пассажа по сравнению с донорами (Рисунок 7).

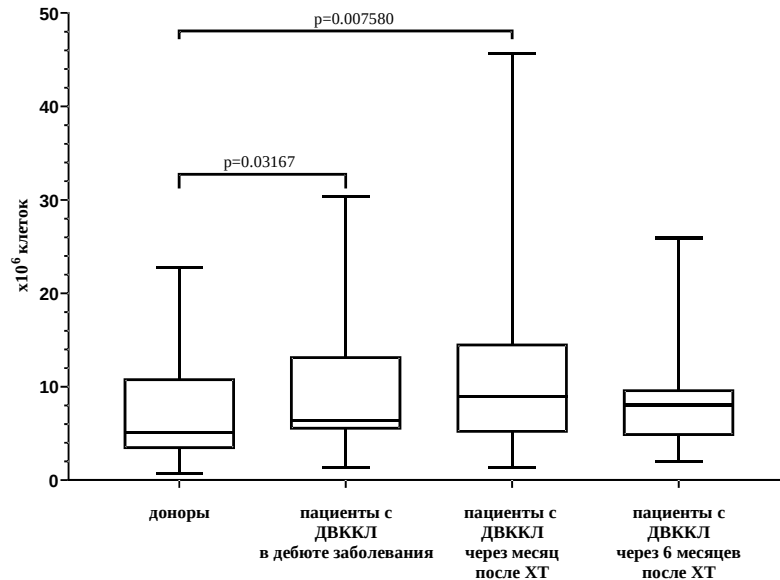


Рисунок 7 – Суммарная клеточная продукция МСК за 4 пассажа здоровых доноров и больных ДВККЛ на разных этапах терапии

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

У пациентов до начала терапии наблюдалась тенденция к снижению концентрации КОЕф в КМ по сравнению с донорами, однако разница недостоверна. Через месяц после завершения ПХТ концентрация КОЕф в КМ пациентов была достоверно выше по сравнению с дебютом заболевания (Рисунок 8) и при этом приближена к таковой у здоровых доноров. Это свидетельствует о восстановлении клеток-предшественниц после достижения ремиссии.

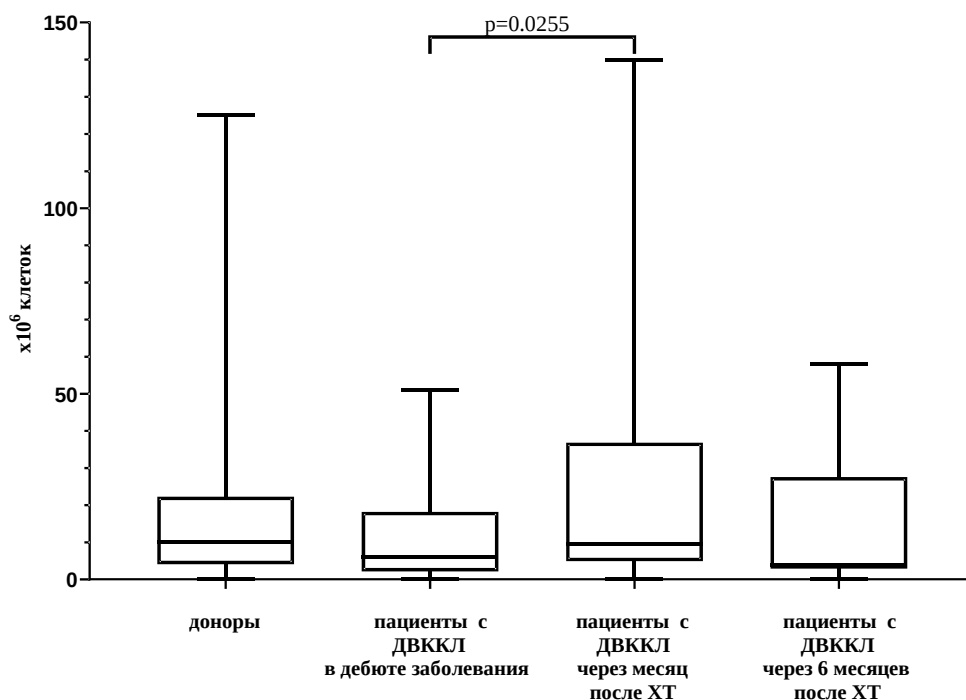


Рисунок 8 – Концентрация КОЕф в КМ доноров и больных ДВККЛ на разных этапах терапии

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

В остальных группах сравнения достоверных различий в концентрации КОЕф и времени до P0 выявлено не было.

Таким образом, культуральные свойства МСК изменены не только в дебюте заболевания, но и через месяц после окончания терапии. После элиминации опухоли, которая повреждала МСК, отмечалось постепенное восстановление большинства свойств клеток-предшественниц КМ. Т.к. МСК и КОЕф более устойчивы к действию химиотерапии, чем гемопоэтические стволовые клетки, то через месяц после окончания ПХТ в большинстве их культуральных характеристик отсутствовали достоверные изменения.

Показатель прямого светорассеяния МСК у пациентов через месяц после завершения ПХТ был более высоким, чем у тех же пациентов в дебюте заболевания, при этом достоверно не отличался от значения у МСК доноров

(Рисунок 9). Показатель бокового светорассеяния у больных ДВККЛ через месяц после окончания лечения возрастал по сравнению с дебютом заболевания.

Таким образом морфологические характеристики МСК у больных ДВККЛ после завершения терапии частично восстанавливаются.

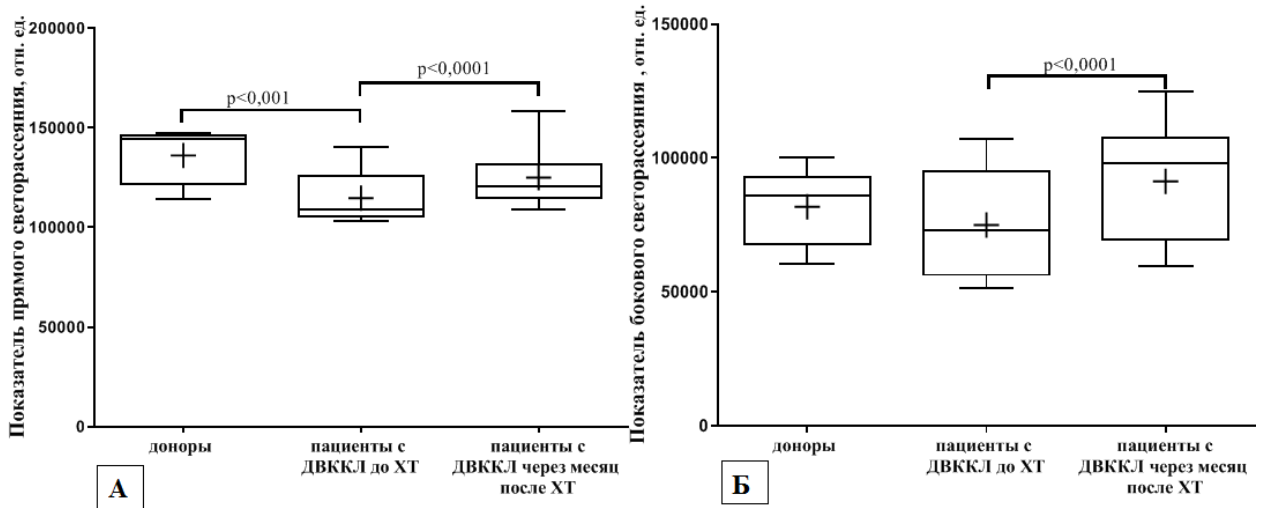


Рисунок 9 – Анализ светорассеивания МСК доноров и больных ДВККЛ на разных этапах терапии. А. Показатель прямого светорассеяния. Б показатель бокового светорассеяния. Границы бокса — первый и третий квартили (5-й и 95-й процентиля), линия в центре ранжированного ряда — медиана (50-й процентиль). Концы усов — минимальное и максимальное значения полученных данных.

При анализе СУФ некоторых антигенов в МСК больных после завершения терапии в сравнении с МСК пациентов до начала лечения были выявлены значительных отличия (Таблица 8).

Таблица 8 – Средний уровень флуоресценции основных поверхностных антигенов МСК через месяц после завершения терапии

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

Δ – достоверное отличие от доноров

** – достоверное отличие между группами до и после лечения

После лечения достоверно возрастала экспрессия молекул адгезии ICAM1 (CD54), повышенной и в дебюте заболевания, и MCAM (CD146). Также через месяц после завершения ПХТ достоверно увеличивалась экспрессия CD73. Все эти молекулы регулируют удержание кроветворных клеток в нише.

Таким образом, после достижения ремиссии происходит дальнейшее усиление взаимодействия МСК больных ДВККЛ с кроветворными клетками, что, наиболее вероятно, связано с проведенной химиотерапией. Также после достижения ремиссии на МСК продолжала достоверно возрастать экспрессия CD105 (ENG), отвечая не на присутствие опухоли в организме, а на воздействие химиопрепаратов.

После проведения химиотерапии отмечено изменение экспрессии генов в МСК (Таблица 9).

Таблица 9 – Относительный уровень экспрессии генов в МСК пациентов на разных этапах терапии

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

* достоверные различия по сравнению с контрольной группой

× достоверные различия по сравнению с больными ДВККЛ в дебюте заболевания

IL6 – провоспалительный цитокин. У пациентов через месяц после ПХТ экспрессия *IL6* достоверно возросла по сравнению с дебютом заболевания (Рисунок 10). По мере лечения экспрессия данного гена постепенно снижалась, однако все равно оставалась достоверно выше, чем у доноров.

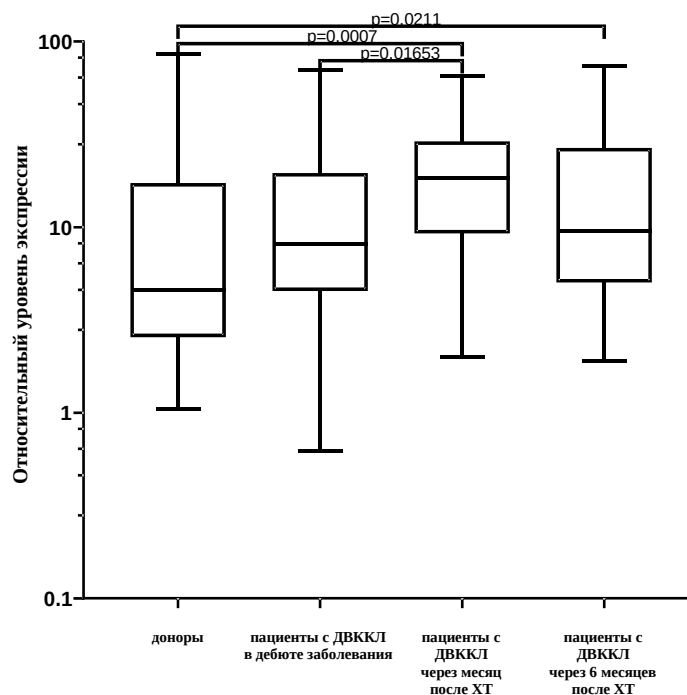


Рисунок 10 – Относительный уровень экспрессии *IL6* в МСК доноров и больных ДВККЛ на разных этапах терапии

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

У пациентов с ДВККЛ до начала терапии была увеличена экспрессия *IL8* по сравнению с донорами (Рисунок 11). Через месяц после завершения курсов ПХТ экспрессия *IL8* достоверно продолжала повышаться. После 6 месяцев наблюдалась тенденция к нормализации, однако уровень все еще сохранялся достоверно выше, чем у пациентов до начала терапии и здоровых доноров.

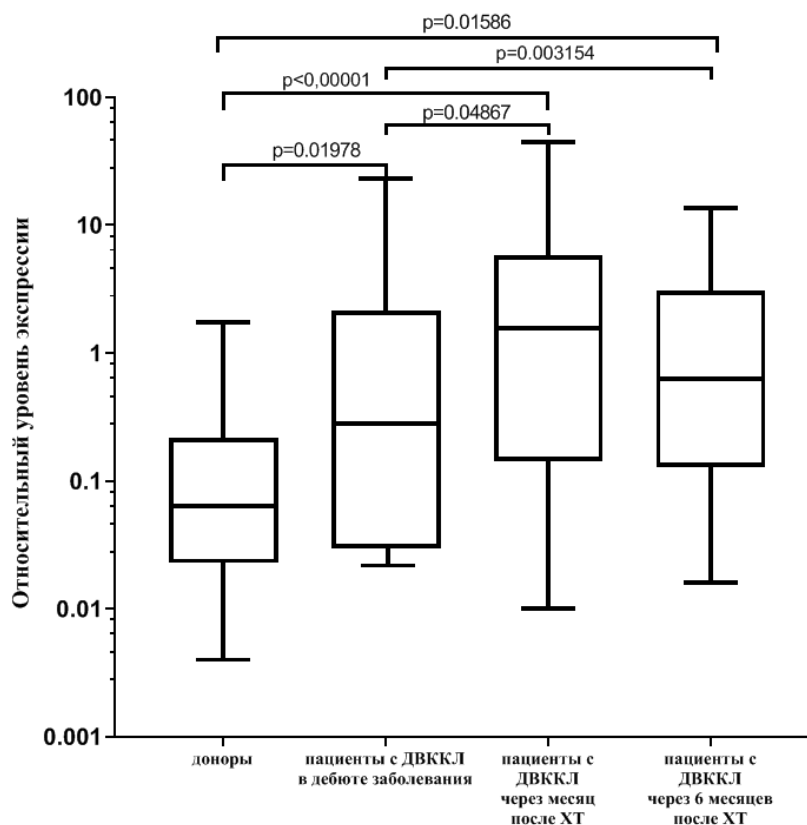


Рисунок 11 – Относительный уровень экспрессии *IL8* в МСК доноров и больных ДВККЛ на разных этапах терапии

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

Повышение провоспалительных цитокинов через месяц после окончания лечения может быть обусловлено реакцией организма на распад опухолевой ткани, а также инфекционными процессами, которыми осложняются межкурсовые периоды. В пользу данных предположений свидетельствует дальнейшее постепенное снижение уровней экспрессии этих интерлейкинов. Аналогичная картина описана при острых лейкозах [153].

Экспрессия *FGF2* была повышена в МСК больных по сравнению с донорами, что хорошо согласуется с повышением суммарной клеточной продукции МСК у пациентов с ДВККЛ (Рисунок 12). Не отмечалось достоверной разницы в

экспрессии *FGF2* в МСК из КМ пациентов в дебюте заболевания и в течение полугода после завершения терапии. Экспрессия *FGF2* оставалась повышенной, и только после 6 месяцев отличия от здоровых доноров становились недостоверными.

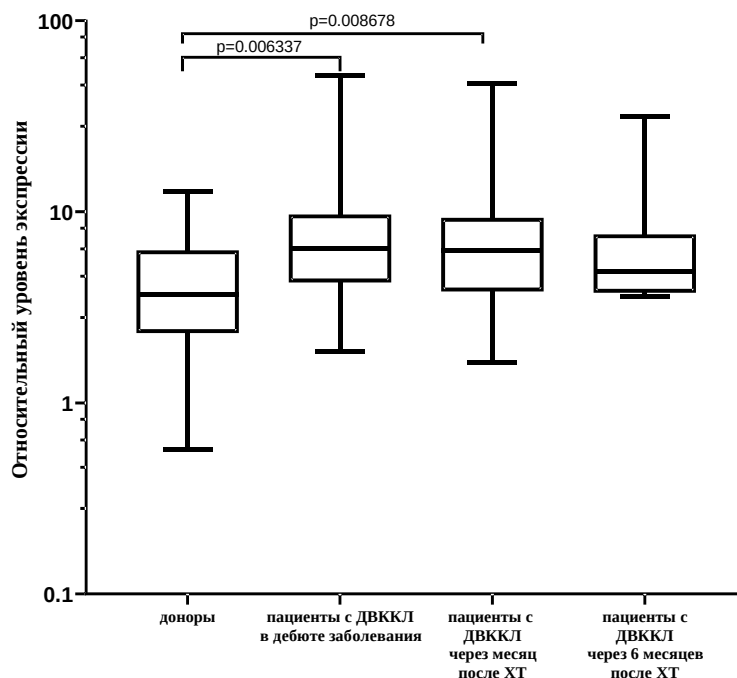


Рисунок 12 – Относительный уровень экспрессии *FGF2* в МСК доноров и больных ДВККЛ на разных этапах терапии

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

В МСК КМ больных в дебюте заболевания отмечено достоверное снижение экспрессии *FGFR1* по сравнению с донорами (Рисунок 13). Возможно, это снижение происходит в результате компенсаторной реакции МСК на повышение экспрессии *FGF2*. После ПХТ отмечается дальнейшее снижение экспрессии этого

гена. При этом снижена суммарная клеточная продукция МСК (Рисунок 7). Достоверность отличий от доноров при этом возрастает (Рисунок 13).

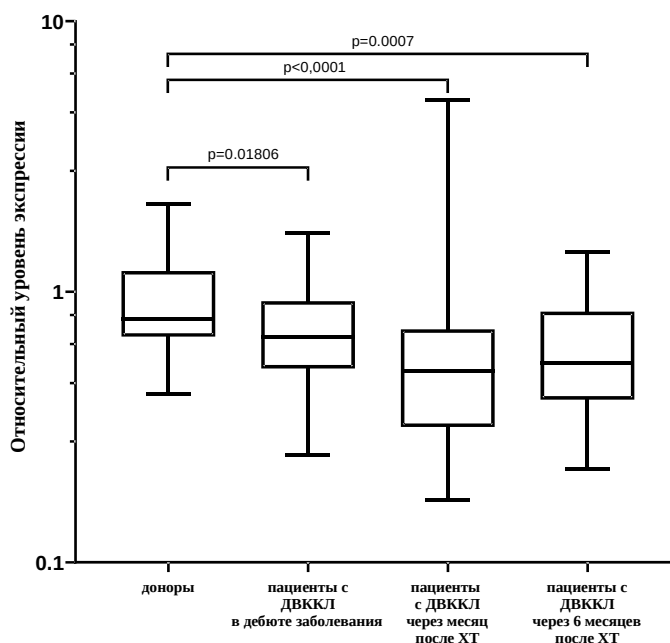


Рисунок 13 – Относительный уровень экспрессии *FGFR1* в МСК доноров и больных ДВККЛ на разных этапах терапии

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

Описано снижение уровня экспрессии *FGFR1* в МСК пациентов после трансплантации аллогенных стволовых клеточных клеток. Это свидетельствует от том, что экспрессия этого гена в МСК меняется под действием ПХТ [153].

Относительный уровень экспрессии *FGFR2* в МСК больных ДВККЛ достоверно снижен через месяц после окончания лечения, и отмечено его частичное восстановление после 6 месяцев по сравнению с дебютом заболевания (Рисунок 14).

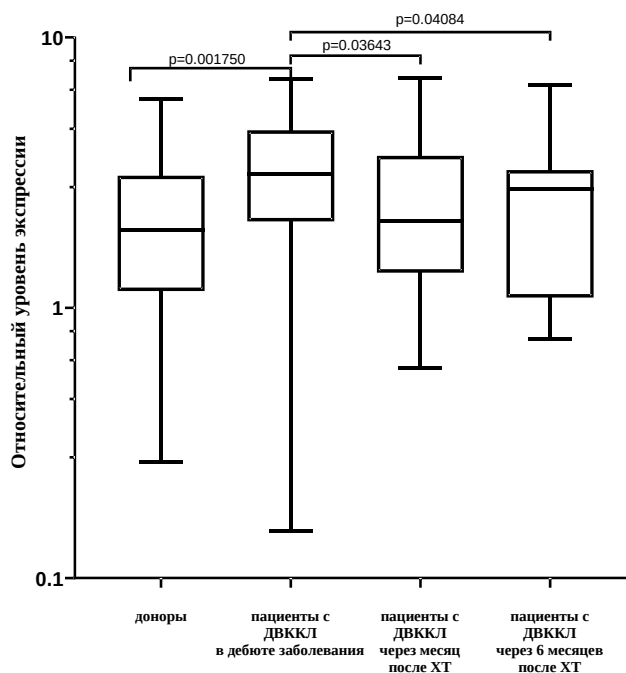


Рисунок 14 – Относительный уровень экспрессии *FGFR2* в МСК доноров и больных ДВККЛ на разных этапах терапии

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

FGFR1 и *FGFR2* – рецепторы, отличающиеся своими связывающими свойствами и каталитическими киназными доменами. Описано повышение экспрессии *FGFR1* при адипогенной дифференцировке МСК, и *FGFR2* при остеогенной [181]. Показано повышение *FGFR1* в различных опухолевых клетках. Через него происходит активация FSS2-MARK сигнального пути. *FGFR2* стимулирует клеточную пролиферацию и миграцию опухолевых клеток. Также через него происходит активация *TGFb* [26].

В дебюте заболевания отсутствовали достоверные различия экспрессии в МСК КМ гена *TGFb*. Однако через 1 и 6 месяцев после завершения ПХТ отмечено достоверное снижение экспрессии этого гена (Рисунок 15).

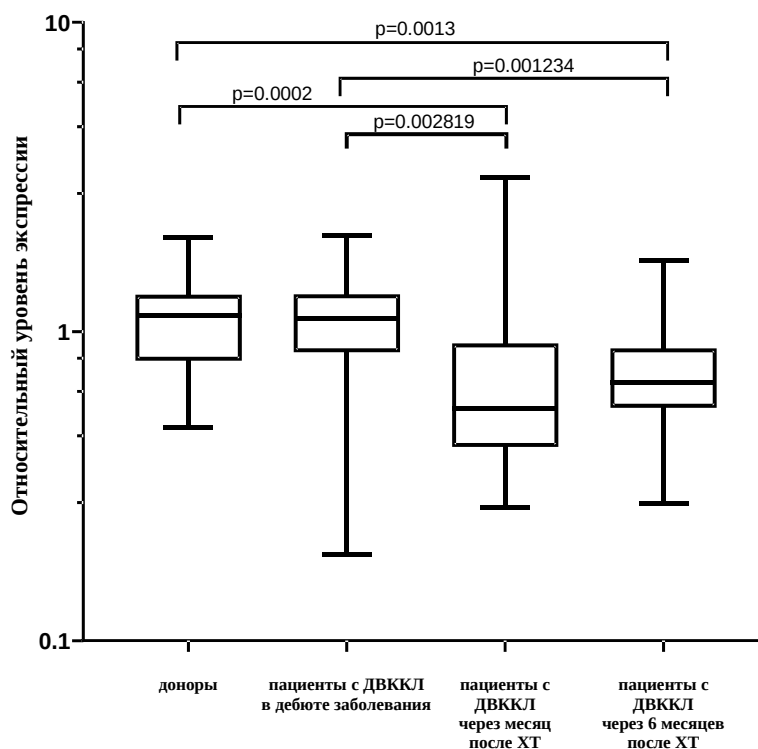


Рисунок 15 – Относительный уровень экспрессии *TGFβ* в МСК доноров и больных ДВККЛ на разных этапах терапии

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

TGFβ удерживает стволовые гемопоэтические клетки в состоянии покоя. Снижение экспрессии гена этого фактора указывает на опосредованную стимуляцию СКК в ответ на ПХТ [126].

В МСК не выявлено изменение экспрессии *PDGFRβ* у пациентов в дебюте заболевания в сравнении с МСК доноров. После окончания ПХТ отмечено постепенное снижение экспрессии данного гена в МСК (Рисунок 16).

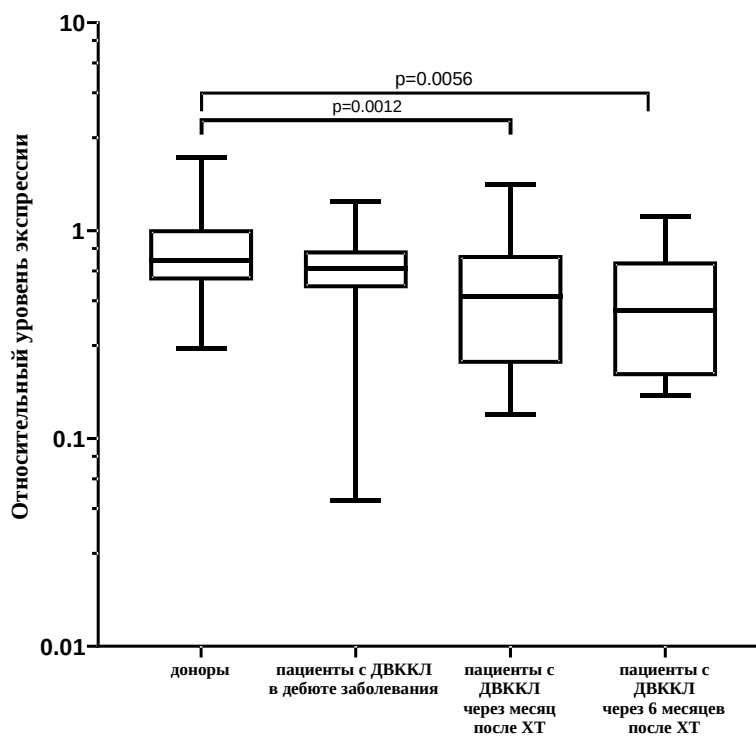


Рисунок 16 – Относительный уровень экспрессии *PDGFRb* в МСК доноров и больных ДВККЛ на разных этапах терапии

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

Пролиферация МСК активируется через сигнальные пути FGF, PDGF и TGFb [120]. Отсутствие изменений в экспрессии *PDGFRb* и *TGFb* в дебюте заболевания и постепенное ее снижение после окончания ПХТ может носить компенсаторный характер, связанный с сохраняющейся повышенной экспрессией *FGF2* и повышенной пролиферативной активностью МСК.

Несмотря на отсутствие достоверных различий в экспрессии *SPP1* в МСК первичных пациентов и доноров, экспрессия данного гена у пациентов через 6 месяцев после окончания терапии была достоверно выше по сравнению с донорами (Рисунок 17). Это может свидетельствовать о нарушениях остеогенной

дифференцировки, которые проявляются лишь через некоторое время после начала болезни.

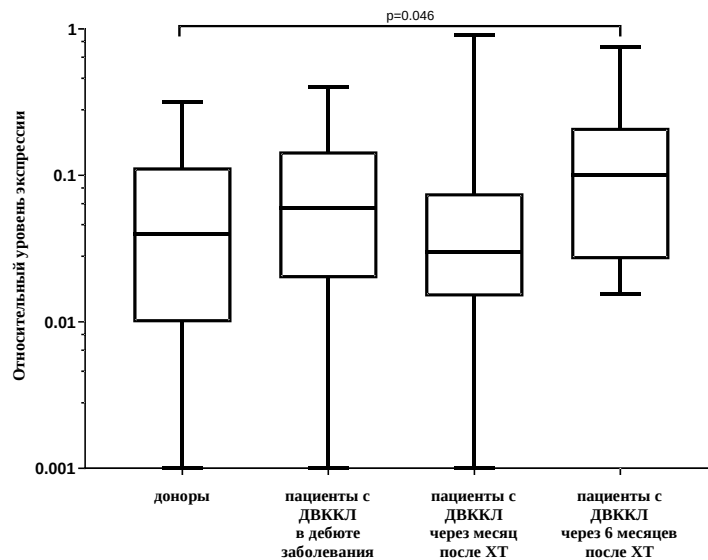


Рисунок 17 – Относительный уровень экспрессии *SPP1* в МСК доноров и больных ДВККЛ на разных этапах терапии

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

В МСК больных ДВККЛ в дебюте заболевания экспрессия *SMURF* не была изменена. После окончания лечения экспрессия этого гена снижена и остается таковой, как минимум на протяжении 6 месяцев (Рисунок 18).

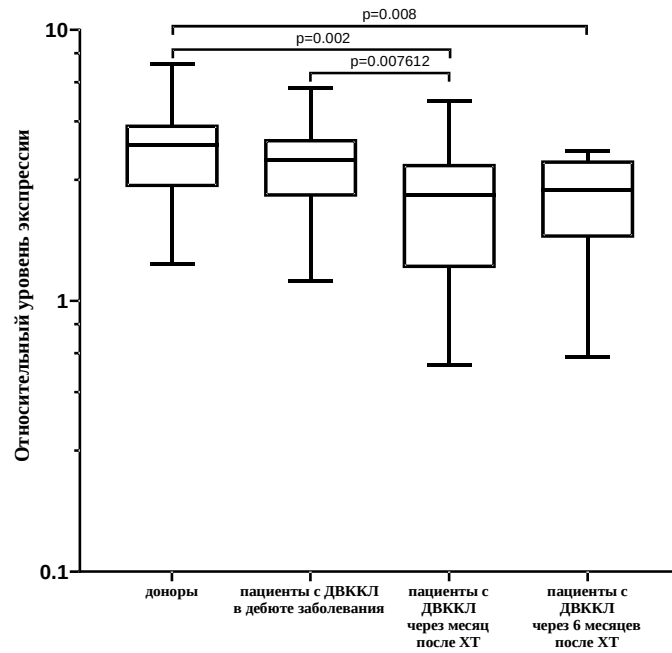


Рисунок 18 – Относительный уровень экспрессии *SMURF* в МСК доноров и больных ДВККЛ на разных этапах терапии

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

Кодируемый этим геном белок участвует в морфогенезе кости и изменение его экспрессии подтверждает нарушение костной дифференцировки МСК.

Выявлено достоверное снижение уровня экспрессии *PPAR γ* через месяц после окончания терапии ($p = 0,027$). Через 6 месяцев различия в экспрессии этого гена по сравнению с дебютом заболевания и здоровыми донорами не было. Возможно, это связано с нормализацией адипогенной дифференцировки МСК.

В данном разделе описаны изменения, связанные с наличием лимфоидной опухоли в организме и проводимым лечением, и показано, что некоторые из них сохраняются, как минимум, полгода после окончания терапии. Следующий раздел описывает отдаленные последствия заболевания и химиотерапии, которые были выявлены более чем через 5 лет после окончания лечения.

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

По данным ПЭТ-КТ у всех пациентов на момент взятия КМ сохранялась ремиссия заболевания.

Культуральные характеристики МСК более чем через 5 лет после ПХТ нормализовались. Суммарная клеточная продукция МСК за 4 пассажа, время до P0, концентрация КОЕф не отличались в культурах клеток-предшественниц из КМ пациентов с ДВККЛ, которые завершили ПХТ более 5 лет назад, по сравнению с донорами и пациентами до начала ПХТ (Таблица 10).

Таблица 10 – Культуральные характеристики МСК и концентрация КОЕф у пациентов, более 5 лет после окончания терапии

Параметр	Доноры n=19	Пациенты с ДВККЛ через 5 лет и более после R±СНОР n=16	Пациенты с ДВККЛ через 5 лет после и более после R±mNHL-BFM-90 n=23
Суммарная продукция МСК за 4 пассажа, $\times 10^6$	7,306 ± 1,3	8,426 ± 1,3	11,42 ± 1,4
Концентрация КОЕф на 10^6 клеток КМ	19,86 ± 7,9	8,1 ± 2,4	22,65 ± 5,6
время до P0, сутки	13,38 ± 0,5	13,8 ± 0,5	12,54 ± 0,5

У пациентов, которых лечили по программе R±mNHL-BFM-90, отмечалось повышение концентрации КОЕф и суммарной клеточной продукции МСК. Несмотря на то, что изменения недостоверны, можно предполагать, что после тяжелых курсов ПХТ стромальные клетки-предшественницы кроветворного микроокружения активированы. Это может быть связано с необходимостью

поддержания нормального кроветворения после повреждения стромального микроокружения.

МСК доноров имели достоверно более высокий показатель прямого светорассеяния в сравнении с больными на отдаленных сроках после проведенной терапии независимо от проведенного курса ПХТ (Рисунок 19). Показатель бокового светорассеяния у больных ДВККЛ на отдаленных сроках после терапии по программе R±mNHL-BFM-90 был достоверно ниже, чем в группе доноров.

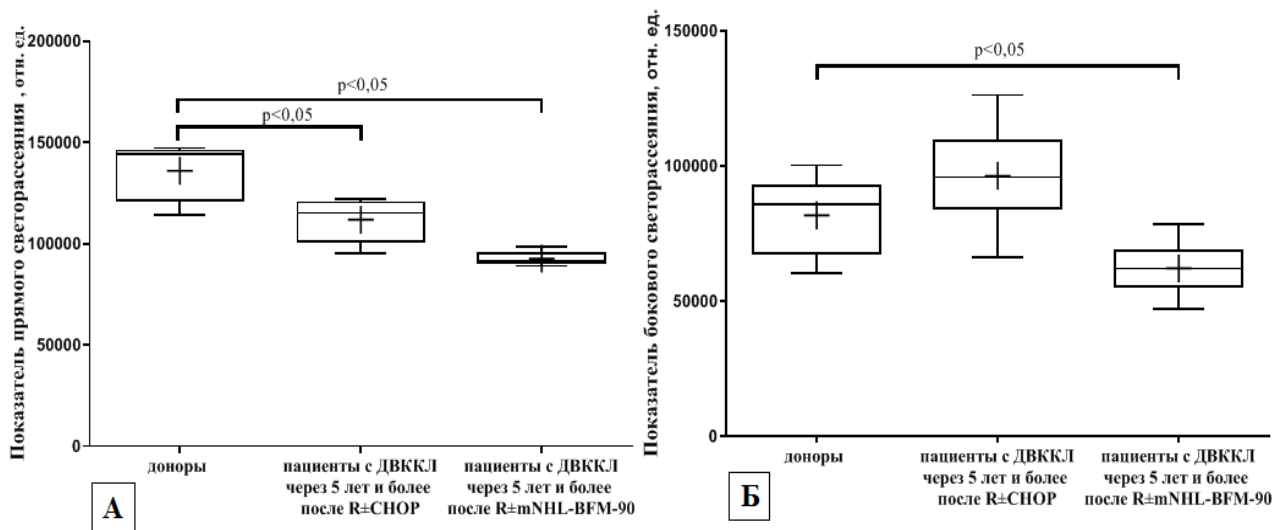


Рисунок 19 – Показатель прямого и бокового светорассеивания МСК доноров и больных ДВККЛ на разных этапах терапии

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

Несмотря на то, что включенные в исследование больные ДВККЛ в течение многих лет находились в полной ремиссии, не все характеристики их МСК нормализовались. Полученные данные указывают на изменения морфологических характеристик МСК, сохраняющихся в течение многих лет у пациентов с полной ремиссией заболевания.

При анализе среднего уровня флуоресценции антигенов были выявлены изменения, сохраняющиеся у пациентов в отдаленном периоде после завершения ПХТ.

Таблица 11 – Средний уровень флуоресценции основных поверхностных антигенов МСК у пациентов с ДВККЛ через 5 и более лет после завершения ПХТ

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

Δ – достоверное отличие от доноров

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

Через годы после ПХТ по программе R±mNHL-BFM-90 экспрессия CD54 на поверхности МСК пациентов оставалась достоверно повышенной в сравнении с МСК доноров. Уровень экспрессии CD146 нормализовался, однако, после ПХТ по программе R±СНОР он был достоверно выше, чем на МСК больных после R±mNHL-BFM-90. Экспрессия CD73 сохранялась повышенной в течение многих лет после завершения ПХТ, и эти изменения более выражены после R±СНОР, чем после R±mNHL-BFM-90. Описанные поверхностные антигены – молекулы адгезии, и увеличение их экспрессии говорит о более активном взаимодействии МСК больных ДВККЛ после лечения с кроветворными клетками, несмотря на длительное отсутствие химиотерапевтических препаратов. Через много лет после лечения экспрессия CD105 оставалась достоверно выше, чем в контрольной группе. Несмотря на то, что экспрессия CD90 (THY1) через месяц после лечения

не отличалась от доноров, через много лет после ПХТ по программе R±СНОР она была достоверно ниже в сравнении с донорами. Учитывая, что в дебюте заболевания достоверных отличий от поверхностных антигенов доноров выявлено не было, вероятнее всего эта активация – следствие цитостатической терапии.

Экспрессия некоторых генов сохраняется изменённой даже через годы после завершения ПХТ (Таблица 12).

Таблица 12 – Относительный уровень экспрессии генов в МСК пациентов с ДВККЛ через многие годы после завершения ПХТ

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

* достоверные различия МСК по сравнению с донорами

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

У пациентов с ДВККЛ в отдаленном периоде после ПХТ нормализовалась экспрессия генов *FGF2* и *FGFR2*. Однако, снижение *FGFR1*, наблюдаемое в дебюте заболевания, сохранялось и через 5 лет после окончания терапии (Рисунок 20).

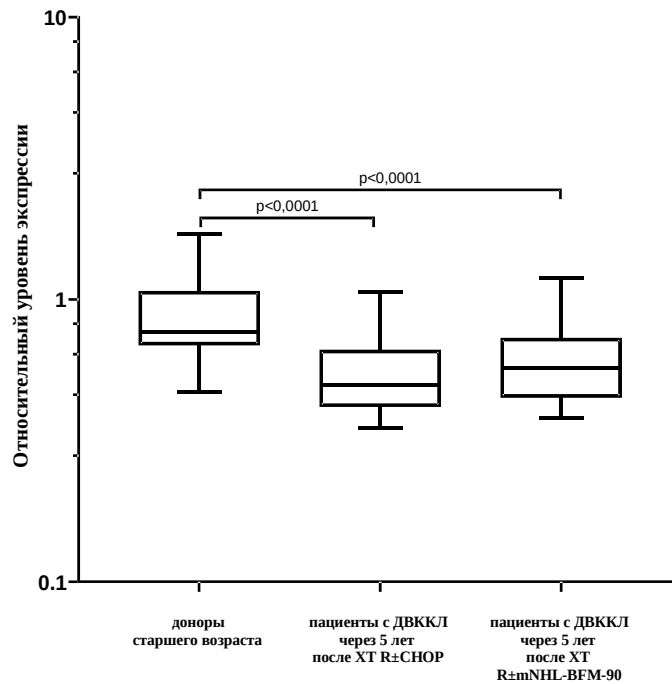


Рисунок 20 – Относительный уровень экспрессии *FGFR1* в МСК доноров и больных ДВККЛ через 5 и более лет после ПХТ

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

Экспрессия *TGFb* в МСК пациентов с ДВККЛ через 5 лет после курсов R±mNHL-BFM-90 достоверно была снижена (Рисунок 21), это говорит о том, что СКК, взаимодействующие с МСК, могут находиться в активированном состоянии.

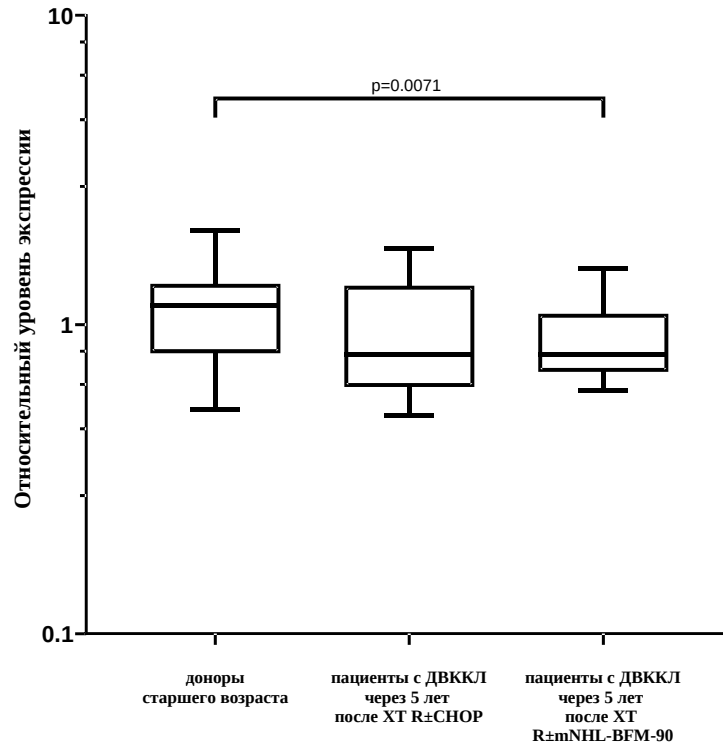


Рисунок 21 – Относительный уровень экспрессии *TGFβ* в МСК доноров и больных ДВККЛ через 5 и более лет после ПХТ

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

Таким образом, даже через много лет после окончания терапии не наблюдается полного восстановления сигнальных путей регуляции пролиферации МСК.

Экспрессия *SPP1* достоверно была повышена через 6 месяцев после окончания ПХТ и осталась повышенной через годы после завершения терапии в обеих группах (Рисунок 22).

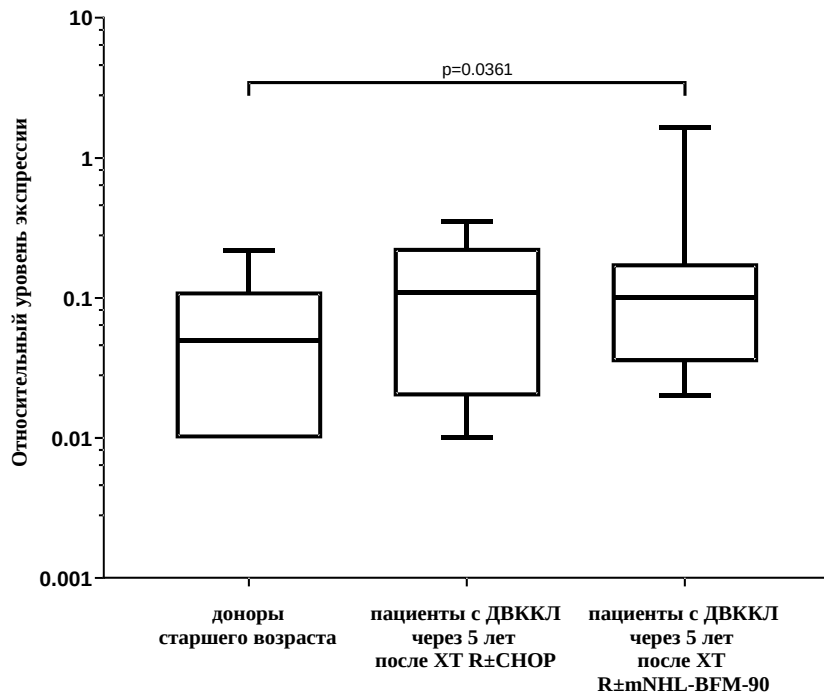


Рисунок 22 – Относительный уровень экспрессии *SPP1* в МСК доноров и больных ДВККЛ через 5 и более лет после ПХТ

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

Изменения были достоверны после лечения по программе R±mNHL-BFM-90.

Тенденция к снижению *MMP2* наблюдалась у всех пациентов с ДВККЛ через 1 и 6 месяцев после окончания терапии. Через много лет эти изменения не только не уменьшились, но и стали достоверными в МСК пациентов, которым проведена терапия R±CHOP (Рисунок 23).

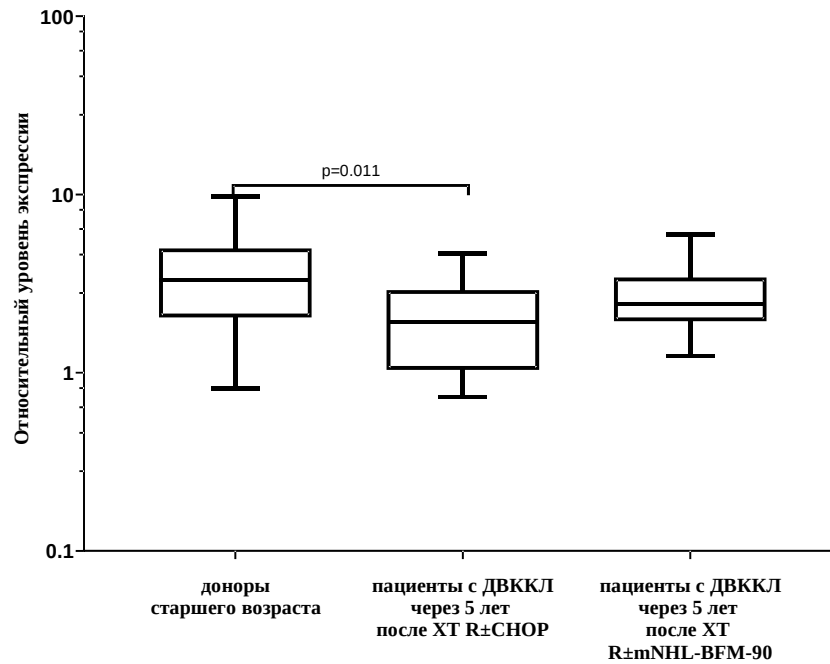


Рисунок 22 – Относительный уровень экспрессии *MMP2* в МСК доноров и больных ДВККЛ через 5 и более лет после ПХТ

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

Экспрессия гена *BMP4* в МСК пациентов с ДВККЛ в обеих группах через много лет после окончания лечения была достоверно ниже в сравнении с группой доноров (Рисунок 24).

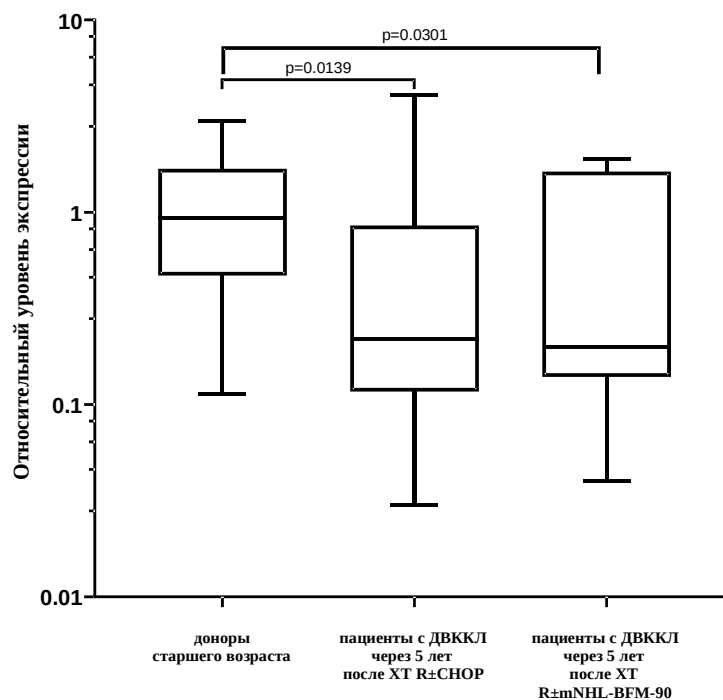


Рисунок 24 – Относительный уровень экспрессии *BMP4* в МСК доноров и больных ДВККЛ через 5 и более лет после ПХТ

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

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

Достоверных изменений экспрессии *PPAR γ* в МСК у пациентов с ДВККЛ через 5 и более лет по сравнению с донорами не было выявлено (Рисунок 25).

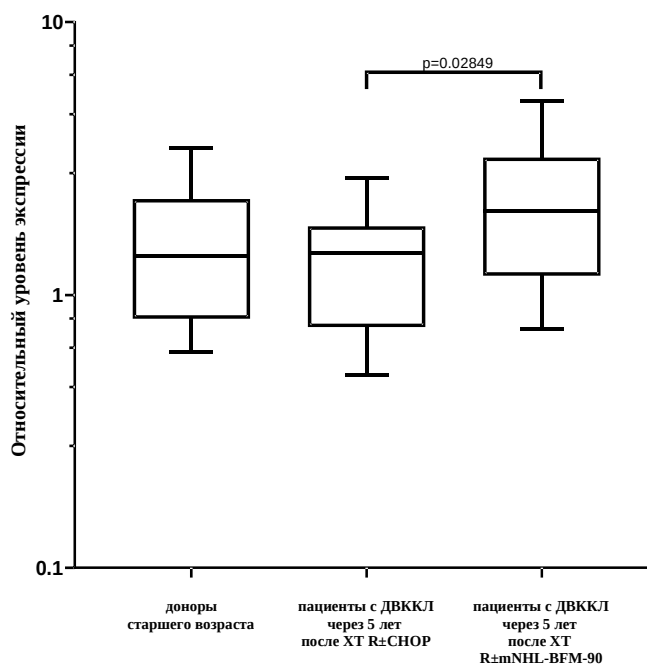


Рисунок 25 – Относительный уровень экспрессии *PPARγ* в МСК доноров и больных ДВККЛ через 5 и более лет после ПХТ

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

Однако выявлена достоверная разница в экспрессии *PPARγ* между двумя группами в зависимости от проведенной терапии. Это свидетельствует о том, что различные курсы химиотерапии по-разному влияют на строму КМ.

Экспрессия *SOX9* достоверно снижалась у пациентов с ДВККЛ через многие годы после R±CHOP (Рисунок 26).

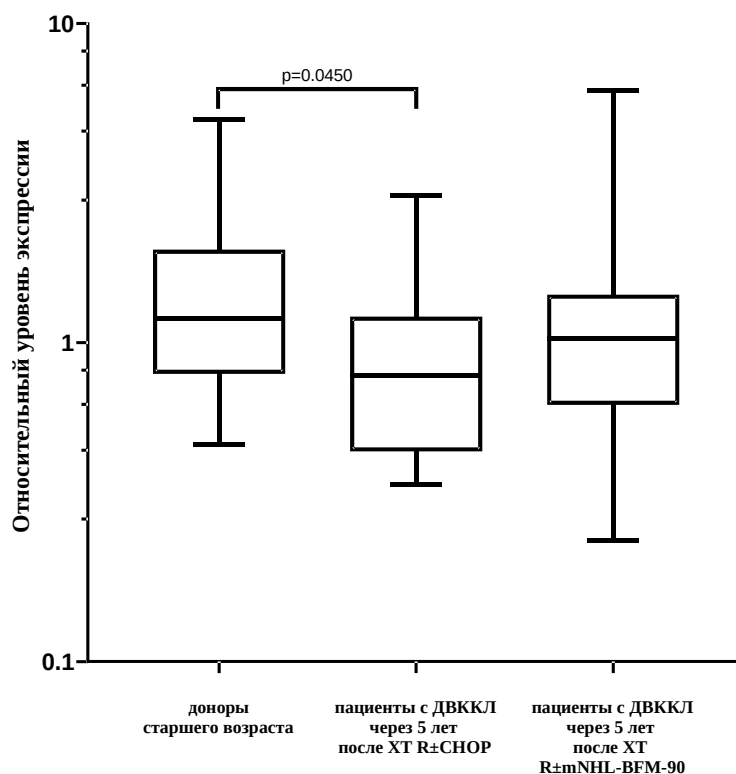


Рисунок 26 – Относительный уровень экспрессии *SOX9* в МСК доноров и больных ДВККЛ через 5 и более лет после ПХТ

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

Несмотря на то, что терапия R±mNHL-BFM-90 является более токсичной, в отдаленные периоды снижение экспрессии *SOX9* было более выражено после терапии R±CHOP.

Экспрессия *SDF1* была повышена у всех пациентов с ДВККЛ на разных этапах терапии. В дебюте заболевания — это повышение было достоверно. Через много лет после окончания терапии повышение экспрессии *SDF1* оставалось достоверным в МСК пациентов, которых лечили по программе R±mNHL-BFM-90 (Рисунок 27).

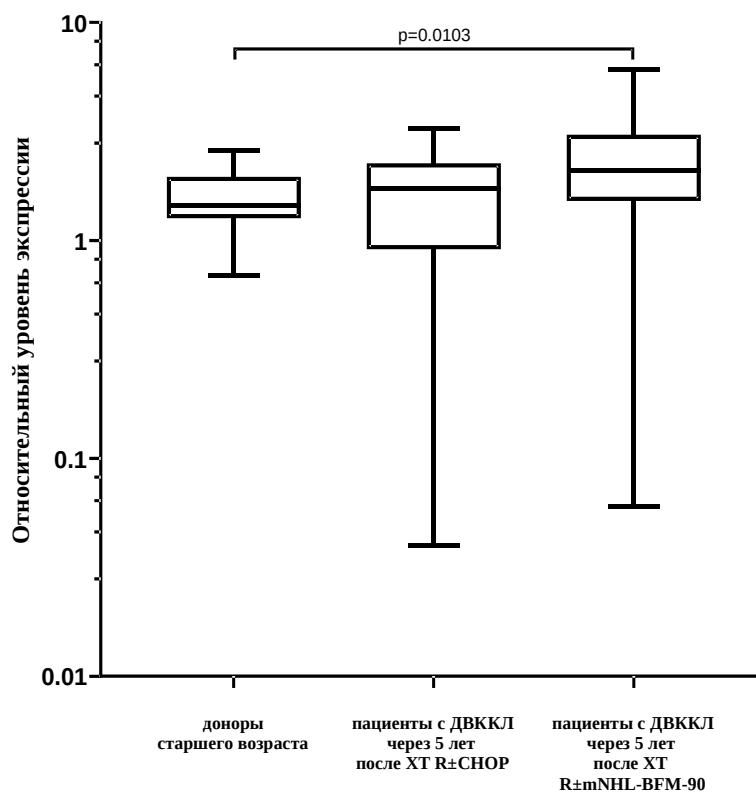


Рисунок 27 – Относительный уровень экспрессии *SDF1* в МСК доноров и больных ДВККЛ через 5 и более лет после ПХТ

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

Суммируя изменения в морфологических и функциональных характеристиках МСК больных, находящихся в полной ремиссии заболевания более 5 лет после проведения различных курсов химиотерапии, можно предполагать, что тяжесть курса ПХТ неоднозначно влияет на различные морфофункциональные параметры МСК. У изученных пациентов восстановление стромальных клеток-предшественниц происходило лучше после более тяжелого курса R±mNHL-BFM-90. Это наблюдение требует дальнейшего внимательного изучения, которое может выявить влияние отдельных препаратов, их концентрации и длительности применения на строму КМ.

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

4.2 Исследование влияния плазмы больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой на мезенхимные стромальные клетки здоровых доноров

Культивирование МСК доноров в присутствии плазмы доноров и больных ДВККЛ до и через месяц после окончания лечения выявило достоверные изменения в суммарной клеточной продукции МСК за 2 исследованных пассажа (3 и 4 пассажи) (Рисунок 28).

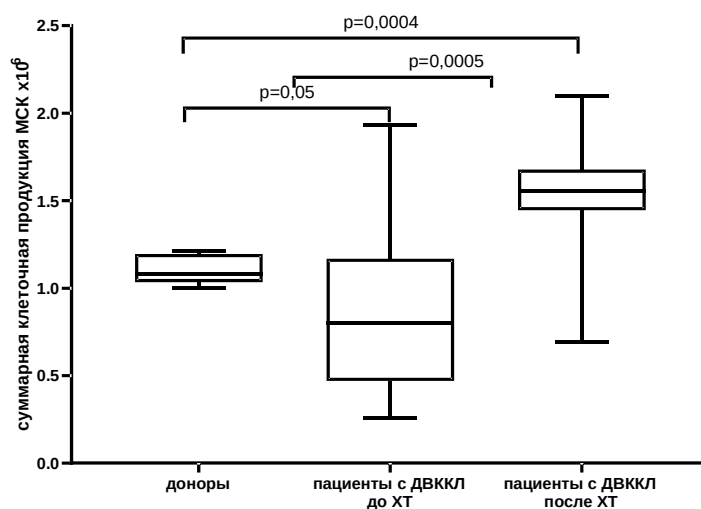


Рисунок 28 – Суммарная клеточная продукция МСК доноров. Клетки культивировали в присутствии плазмы здоровых доноров и больных ДВККЛ до и после окончания лечения.

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

Культивирование МСК доноров в присутствии плазмы больных до лечения снижало клеточную продукцию МСК, а плазма больных после окончания лечения повышала ее (Рисунок 28). Это полностью противоречит тому, что наблюдалось при анализе МСК больных. Повышение клеточной продукции в МСК больных может быть компенсаторной реакцией на ингибиторы, находящиеся в плазме. Опухоль развивается в организме более 10 дней (время культивирования МСК в присутствии плазмы больных и здоровых) и отсутствие этого эффекта *in vitro* может быть связано с недостаточной длительностью взаимодействия растворимых в плазме веществ с МСК. После проведения ПХТ в плазме вероятно содержатся не угнетающие пролиферацию МСК, а активирующие ее вещества.

Анализ поверхностных маркеров МСК доноров после культивирования в присутствии плазмы здоровых доноров и больных ДВККЛ показал, что экспрессия HLA-DR и CD146 (МСАМ) повышены при культивировании МСК доноров с плазмой больных (Рисунок 29).

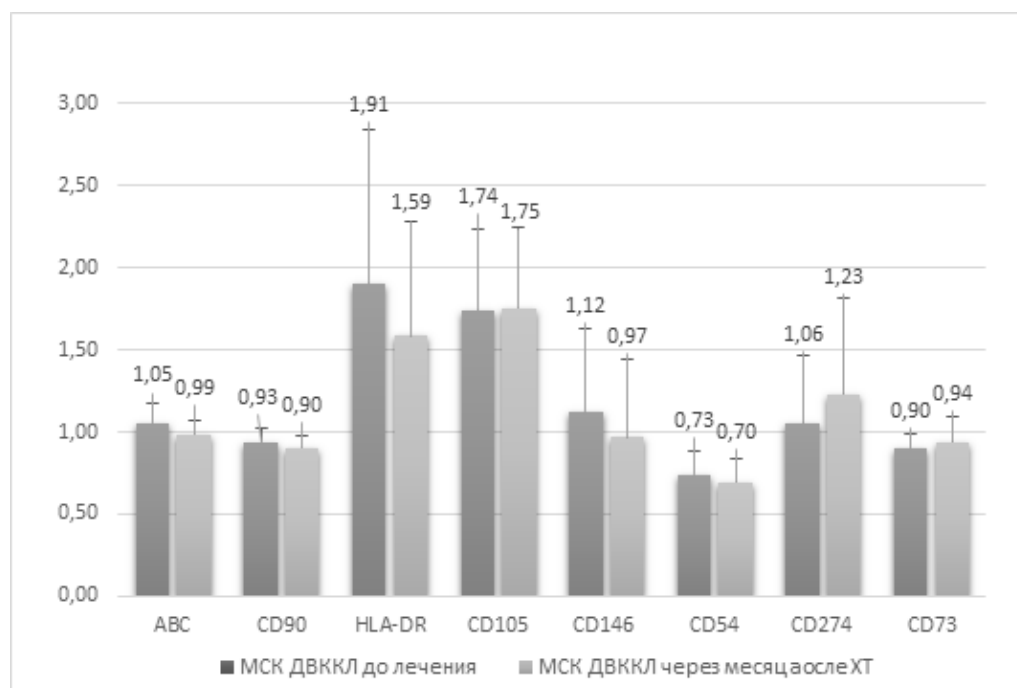


Рисунок 29 – Анализ поверхностных маркеров МСК здоровых доноров, культивированных в присутствии плазмы пациентов с ДВККЛ до и после ПХТ. За единицу принято значение доноров.

СУФ CD105(ENG) и CD274 (PD-L1) повышались на МСК при добавлении плазмы больных в дебюте и еще больше возрастали при добавлении плазмы больных после лечения. Это указывает на активацию МСК в ответ на вещества, растворенные в плазме пациентов. Экспрессия CD54+ была снижена в МСК, культивированных в присутствии плазмы пациентов, как до, так и после окончания лечения. Однако, пропорция МСК экспрессирующих CD54+ повышалась при культивировании МСК совместно с плазмой пациентов до ПХТ, а затем нормализовалась и не отличалась от доноров при добавлении плазмы пациентов после ПХТ ($p < 0,005$).

При анализе относительного уровня экспрессии генов выяснилось, что в МСК, обработанных плазмой больных, снижалась экспрессия *IL-1b*, *IL-8*, *SDF1* и *LIF* (Рисунок 30).

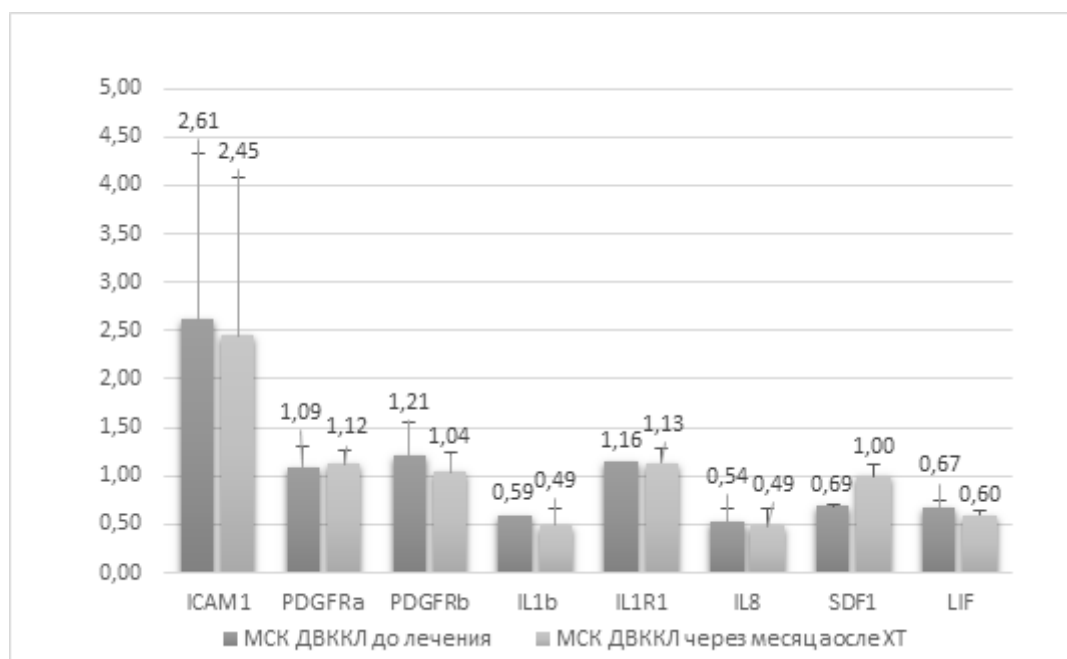


Рисунок 30 – Анализ экспрессии генов в МСК здоровых доноров, культивированных в присутствии плазмы больных ДВККЛ в дебюте заболевания и после окончания лечения. За единицу принято значение доноров.

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

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

Таким образом, культивирование МСК здоровых доноров в присутствии плазмы больных ДВККЛ приводит к изменению МСК. Совокупность полученных данных свидетельствует о влиянии опухолевого процесса на стромальное микроокружение КМ у больных ДВККЛ независимо от межклеточного контакта МСК с опухолевыми клетками.

4.3 Изменения костной ткани при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме в дебюте заболевания и на отдалённых сроках после терапии

Опухолевые клетки, которые контактируют с костной тканью, способны изменять экспрессию некоторых генов и белков, таких как: матриксные металлопротеиназы, $TGF\beta$, $IL6$, $JAG1$, $GLI2$, $RUNX2$, $HIF1\alpha$, $PTHrP$ и $CaSR$ [178]. У пациентов с ДВККЛ до начала ПХТ достоверно были увеличены маркеры резорбции кости: соотношение ДПИД/креатинин в моче и b -cross-laps в крови. Одновременно наблюдалось снижение концентрации витамина Д₃ в крови в сравнении с контрольной группой (Таблица 13). У данных больных прямого контакта опухоли с костной тканью не было (так как отсутствие вовлечения КМ в опухолевый процесс было критерием включения больных в исследование). Несмотря на это оказалось, что у пациентов с ДВККЛ на метаболическом уровне имелись изменения костной ткани. ДПИД – молекула, которая образует поперечные связи между субъединицами коллагена, b -cross-laps – является белковым фрагментом деградации коллагена. Увеличение обоих веществ у больных до начала ПХТ свидетельствует об активном распаде кости. Витамин Д₃ участвует во всасывании кальция в кишечнике, а также нормальном остеогенезе и

минерализации кости. Его снижение в крови вероятно связано с компенсаторной активацией данных процессов. Прямой корреляции между биохимическими показателями и изменениями в экспрессии генов в МСК с обнаружено не было. Однако все эти изменения свидетельствуют о нарушении обмена костной ткани.

При обследовании пациентов через много лет после окончания лечения при сохранении длительной ремиссии основного заболевания все биохимические показатели нормализовались (Таблица 13) (Рисунок 31).

Таблица 13 – Биохимические показатели пациентов с ДВККЛ

Группа	Норма	Контрольная группа	Больные ДВККЛ до ПХТ	Пациенты много лет после ПХТ
ДПД/Креатинин в соотношении в моче	2,3 – 5,4 нМ/мм СРЕ	6,4 ± 0,52	12,7 ± 1,9*	5,4 ± 0,26
ДПД	2,3 – 7,4 нмоль/л	66,50 ± 8,79	193,9 ± 58,8*	72,9 ± 7,47
Витамин Д3	10 – 55 нг/мл	21,3 ± 2,2	12,7 ± 2,1*	18,3 ± 1,5
Паратгормон	1,6 – 6,9 пкмоль/л	2,9 ± 0,5	3,9 ± 1,0	4,2 ± 0,6
Остеокальцин	14 – 46 нг/мл	19,7 ± 1,8	15,8 ± 2,2	17,3 ± 1,2
b-cross-laps	< 0,854 нг/мл	0,4 ± 0,04	0,7 ± 0,1*	0,4 ± 0,03
Общий белок	66 – 83 г/л	73,3 ± 1,2	69,5 ± 3,4	74,5 ± 0,7
Альбумин	35 – 52 г/л	43,4 ± 0,4	39,0 ± 2,1	43,0 ± 0,5
Глобулин	25 – 35 г/л	30,1 ± 0,9	30,5 ± 2,2	30,8 ± 0,9
Кальций	2,2 – 2,65 г/л	2,4 ± 0,03	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,02
Фосфор	0,81 – 1,45 ммоль/л	1,0 ± 0,03	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,03
Щелочная фосфатаза	30 – 120 е/л	77,9 ± 6,5	148,5 ± 68,4	86,7 ± 8,3
Са ⁺⁺	1,03 – 1,23 ммоль/л	1,2 ± 0,02	1,2 ± 0,0	1,1 ± 0,01
Креатинин	64 – 104 мкмоль/л	69,7 ± 3,0	63,4 ± 3,1	84,5 ± 5,0
Мочевина	2,8–7,2 ммоль/л	5,6 ± 0,3	4,9 ± 0,5	6,3 ± 0,5

* достоверные различия между МСК контрольной группы и первичных больных

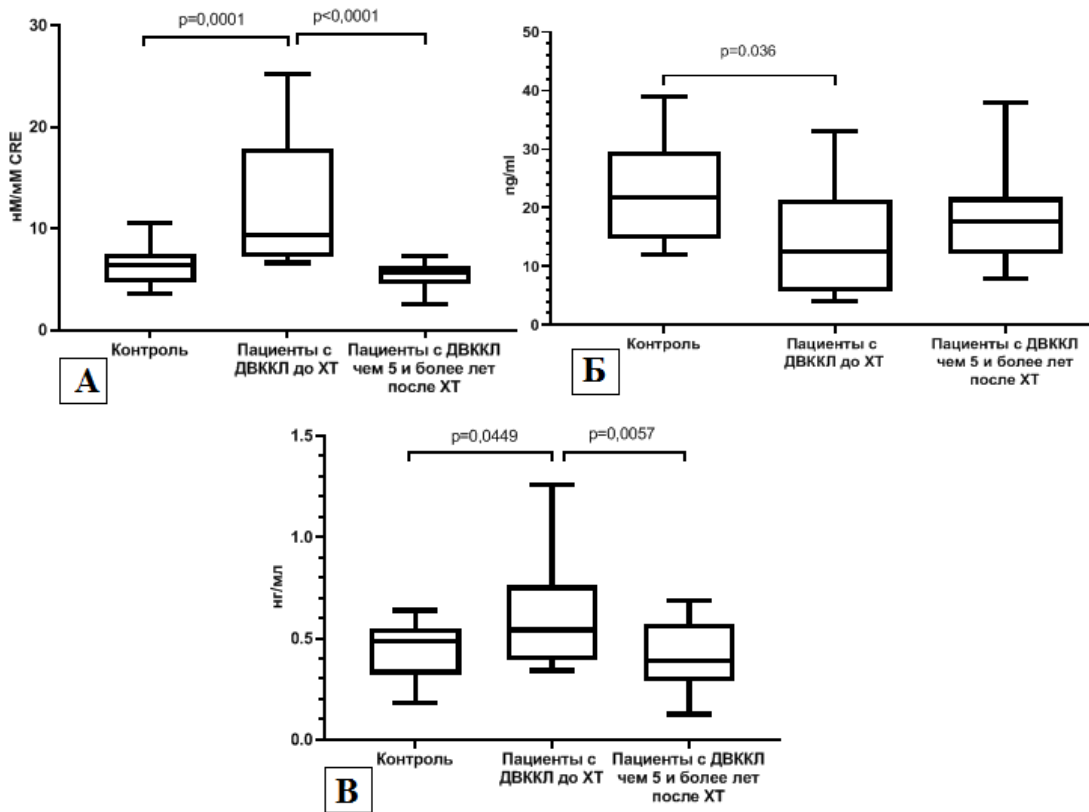


Рисунок 31 – Анализ показателей состояния костной ткани у больных ДВККЛ. А. ДПДД/креатинин в моче. Б. Витамин Д3 в крови. В. b-cross-laps в крови

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

Несмотря на видимые на молекулярном и клеточном уровнях изменения, при денситометрии различий в МПК у пациентов с ДВККЛ выявлено не было (Рисунок 32). У пациентов через много лет после достижения ремиссии плотность кости оставалась нормальной.

Таким образом, достоверного увеличения частоты остеопороза и остеопении не наблюдалось.

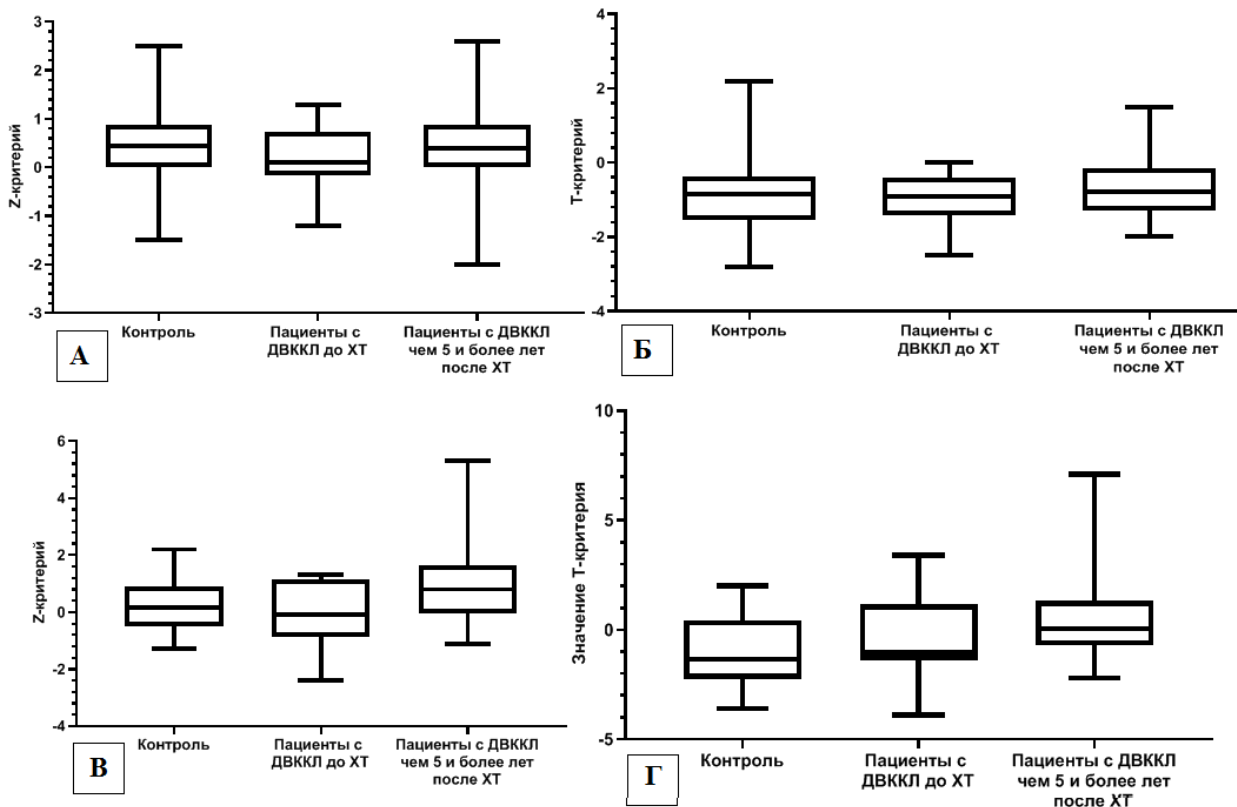


Рисунок 32 – Анализ МПК пациентов с ДВККЛ. А. Z-критерий шейка бедра. Б. Т-критерий шейка бедра. В. Z-критерий позвоночный отдел (L1-L4). Г. Т-критерий позвоночный отдел (L1-L4).

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

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

Заключение

Проведенные исследования продемонстрировали, что несмотря на отсутствие признаков поражения КМ опухолевыми клетками, у больных ДВККЛ изменены характеристики стромальных клеток-предшественниц. Суммарная клеточная продукция за 4 пассажа МСК из КМ пациентов с ДВККЛ в дебюте заболевания была повышена. Морфология МСК была изменена по сравнению с МСК здоровых доноров, так как эти клетки имели более низкий показатель прямого светорассеяния. Кроме того, изменялся профиль экспрессии генов: выявлено достоверное повышение уровня экспрессии *FGF2*, *FGFR2*, *IL8*, *SDF1* и снижение *FGFR1* по сравнению с МСК доноров.

Таким образом, наличие опухоли в организме изменяет культуральные и морфологические характеристики клеток-предшественниц КМ, а также меняет уровень экспрессии генов в МСК из КМ пациентов с ДВККЛ. Эти изменения могут способствовать поддержанию опухоли и ее распространению в костный мозг.

Через месяц после завершения ПХТ сохранялось снижение суммарной клеточной продукции МСК за 4 пассажа. Отмечалось достоверное повышение концентрации КОЕф через месяц после окончания терапии по сравнению с дебютом заболевания. После завершения ПХТ в МСК из КМ пациентов с ДВККЛ отмечено достоверное повышение значений не только прямого, но и бокового светорассеяния. Через месяц после цитостатической терапии достоверно возростала экспрессия молекул адгезии: ICAM1, MCAM и CD105, что вероятнее всего связано с проведенной терапией. Также в МСК наблюдалось достоверное увеличение экспрессии генов провоспалительных маркеров (*IL8*, *IL6*), которая через полгода постепенно снижалась. Вероятно, это следствие опухолевого распада и возникавших инфекционных осложнений после ПХТ. Экспрессия *FGF2* была повышена в МСК пациентов в дебюте заболевания и снижалась после завершения терапии, однако, оставалась достоверно выше, чем в МСК доноров. В тоже время *FGFR1*, *PDGFRβ* и *TGFβ* оставались достоверно сниженными в МСК больных

ДВККЛ по сравнению с донорами через 1 и 6 месяцев после ПХТ. Экспрессия гена *FGFR2*, наоборот, снижалась относительно дебюта заболевания, но оставалась достоверно высокой по сравнению с экспрессией у доноров.

Спустя более чем 5 лет после окончания лечения показатель прямого светорассеяния МСК не нормализовался, а бокового светорассеяния снижался и становился достоверно ниже, чем в клетках доноров. Сохранялось достоверное повышение поверхностных антигенов CD73 и CD105 на МСК из КМ пациентов. В МСК больных была снижена экспрессия генов *FGFR1* и *BMP4*.

Таким образом, культуральные и морфологические характеристики клеток-предшественниц КМ больных ДВККЛ до и после лечения изменены, некоторые изменения частично регрессировали после ПХТ.

Экспрессия CD54 на МСК пациентов после R±mNHL-BFM-90 сохранялась повышенной более 5 лет. На МСК пациентов после R±CHOP была снижена экспрессия CD90. В МСК пациентов через 5 и более лет после курсов R±CHOP было отмечено достоверное снижение экспрессии *MMP2* и *SOX9* по сравнению с клетками доноров. Одновременно с этим у пациентов с ДВККЛ после R±mNHL-BFM-90 в МСК достоверно была увеличена экспрессия *SPP1*, *SDF1* и снижена экспрессия *TGFβ1* по сравнению с донорами.

Таким образом, программы терапии R±CHOP и R±mNHL-BFM-90 по-разному влияют на стромальные клетки-предшественницы КМ, и изменения, наблюдаемые при более интенсивной программе терапии, не по всем параметрам имеют более выраженный характер.

Учитывая отсутствие непосредственного контакта опухоли и клеток-предшественниц КМ было предположено, что изменения стромальных клеток-предшественниц вызваны растворимыми факторами, которые секретирует опухоль. Показано, что добавление плазмы больных в дебюте заболевания в культуральную среду достоверно снижали суммарную клеточную продукцию

МСК здоровых доноров, тогда как добавление плазмы больных после окончания лечения повышали. Таким образом подтверждено, что в плазме больных находятся факторы, влияющие на стромальные клетки-предшественницы костного мозга.

Учитывая наличие изменений на молекулярном и клеточном уровне, пациентам было проведено исследование костной ткани.

У больных ДВККЛ в дебюте заболевания достоверно были повышены ДПИД/креатинин в моче и b-cross-laps в крови, что свидетельствует об активации процессов остеодеструкции. Одновременно с этим был снижен витамин ДЗ в крови по сравнению с контрольной группой. При обследовании пациентов через много лет после окончания лечения при сохранении длительной ремиссии основного заболевания все биохимические показатели нормализовались.

Изучение денситометрии в позвоночнике и шейке бедра не выявило различий между группами. То есть идущие на молекулярном и клеточном уровне процессы не успели отразиться на общем состоянии костной ткани.

Совокупность полученных данных свидетельствует о влиянии опухолевого процесса на стромальное микроокружение КМ у больных ДВККЛ независимо от межклеточного контакта МСК с опухолевыми клетками и эти некоторые из этих изменений сохраняются, как минимум, 5 лет.

Выводы

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

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

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

($p < 0,05$). Достоверно снижена экспрессия *MMP2* в 2 раза, *SOX9* в 1,6 раз, *FGFR1* в 1,5 раза, *VMP4* в 1,7 раз по сравнению с клетками доноров ($p < 0,05$).

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

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

Список сокращений и условных обозначений

- АутоТСКК – трансплантация аутологичных стволовых кроветворных клеток,
ДВККЛ – Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома,
ДПД – дезоксипиридинолин,
ДЭПК – диэтилпирокарбонат,
КОЕф – колониеобразующие единицы фибробластов,
КМ – костный мозг,
КТ – компьютерная томография,
ЛДГ – лактатдегидрогеназа,
МСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки,
МПИ – международный прогностический индекс,
МПК – минеральная плотность кости,
ОС – остеокальцин,
ПХТ – полихимиотерапия,
ПЭТ-КТ – позитронно-эмиссионная томография совмещенная с компьютерной томографией,
СУФ – средний уровень флуоресценции,
АСТВ – actin- β ,
BGLAP – bone gamma-carboxyglutamate protein,
BMP2 – bone morphogenetic protein 2,
BMP4 – bone morphogenetic protein 4,
CXCL12 (SDF1) – C-X-C motif chemokine ligand 12,
FGF2 – fibroblast growth factor 2,
FGFR1 – fibroblast growth factor receptor 1,
FGFR2 – fibroblast growth factor receptor 2,
FGFRb1 – fibroblast growth factor receptor beta 1,
TGF- β – фактор роста опухоли бета,
TNF α – фактор некроза опухоли альфа,

GAPDH – glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase,
ICAM1 – intercellular adhesion molecule 1,
IL-6 – interleukin 6,
IL-8 – interleukin 8,
HLA – human leukocyte antigen,
HLA-DR – antigen D related,
MCAM – melanoma cell adhesion molecule,
MMP2 – matrix metalloproteinase,
PDGFRB – platelet derived growth factor receptor beta,
PPARG – peroxisome proliferator activated receptor gamma,
SDF1 – stroma derived factor 1
SOX9 – sex determining region Y (SRY) – box 9,
SPP1 – secreted phosphoprotein 1,
SMURF1 – SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1
VEGF – vascular endothelial growth factor.

Список литературы

1. Баранова, И. А. Новые возможности лечения глюкокортикоидного остеопороза / И. А. Баранова // Современная ревматология. - 2014. - №2. - с. 107-110
2. Беневоленская, Л. И. Проблема остеопороза в современной медицине/ Л.И. Беневоленская // Научно-практическая ревматология. - 2005. - №1. - с. 4-7.
3. Волков, Н. М. Физиология метаболизма костной ткани и механизм развития метастазов в кости / Н. М. Волков // Практическая онкология. - 2011. - № 3. - с. 97-102.
4. Воробьев, А. И. Руководство по гематологии / под ред. А. И. Воробьева - М.: Ньюдиамед, 2003. - в 2 т.
5. Воропаева, Е. Н. Значение аномалий гена TP53 в опухолевой прогрессии диффузной в крупноклеточной лимфомы / Е. Н. Воропаева, Т. И. Пospelова, М. И. Воевода, В. Н. Максимов // Вестник гематологии. - 2017. - т. 13. - №2. - с. 4-20.
6. Гальцева, И. В. Диагностика минимальной остаточной болезни при множественной миеломе методом проточной цитофлуориметрии / И. В. Гальцева, Л. П. Менделеева, Ю. О. Давыдова, Н. М. Капранов // Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови. Под ред. В.Г. Савченко. М.: Практика. - 2018. - т.1. - с. 167-179.
7. Грибанова, Е. О. Кроветворение после аллогенной и аутологичной трансплантации костного мозга: диссертация на соискание степени кандидата медицинских наук: 14.00.29 / Грибанова Елена Олеговна - М., 2003.
8. Губанова Е. И. Развитие остеопороза у женщин пожилого возраста с избыточной массой тела / Е. И. Губанова, Т. А. Коцеруба, Н. В. Севастьянова, О. А. Кузнецова, Г. В. Панкова, Е. А. Фастова е.а. // Вестник новых медицинских технологий. - 2013. - т. 20. - № 2. - с. 41-44.
9. Дорохина, Е. И. Отдаленная кардиотоксичность высокодозной химиотерапии по модифицированной программе NHL-BFM-90 у взрослых

больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой / Е. И. Дорохина, А. У. Магомедова, А. А. Шевелев, С. М. Куликов, М. К. Гитис, А. В. Ведерников, А. И. Воробьев, С. К. Кравченко // Терапевтический архив. - 2015. - т.87. - №7. - с. 51-57.

10. Дорохина, Е. И. Отдаленные результаты и токсичность высокодозной химиотерапии взрослых больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой по модифицированной программе NHL-BFM-90: диссертация на соискание степени доктора медицинских наук: 14.00.29 / Дорохина Елена Игоревна, - М., 2016.

11. Магомедова, А.У. Прогностическое значение очагового поражения костного мозга при диффузной В-крупноклеточной лимфосаркоме / А. У. Магомедова, А. М. Кременецкая, И. А. Воробьев, С. К. Кравченко, И. Б. Капланская, Р. С. Самойлова, Э. Г. Гемджян, А. И. Воробьев // Терапевтический архив. - 2004. - № 7. - с 60-63.

12. Магомедова, А.У. Эффективность курса СНОР-21 в терапии диффузной В-крупноклеточной лимфосаркомы / А. У. Магомедова, С. К. Кравченко, А. М. Кременецкая, Е. Е. Звонков, Т. Н. Моисеева, Е. Е. Зыбунова, И. Б. Капланская, Р. С. Самойлова, И. А. Воробьев, Ю. Ю. Лорие, О. В. Марголин, Е. А. Гилязитдинова, А. В. Губкин, Н. Г. Чернова, В. В. Рыжко, Э. Г. Гемджян // Терапевтический архив. - 2005. - т. 77. - №7. - с. 58-61.

13. Магомедова, А. У. Диффузная В-крупноклеточная лимфосаркома лимфоидных органов: клинические формы и лечение: диссертация на соискание степени доктора медицинских наук: 14.00.29 / Магомедова Аминат Умарасхабовна - М., 2008.

14. Магомедова, А. У. Девятилетний опыт лечения больных диффузной В-крупноклеточной лимфосаркомой/ А. У. Магомедова, С. К. Кравченко, А. М. Кременецкая, Е. Е. Звонков, Е.А. Барях, Я.К. Мангасарова, И.Б. Капланская, Р.С. Самойлова, И.А. Воробьев, Т.Н. Обухова, С.Р. Карагюлян, Е.М. Шулутко, Г.М. Галстян, Д.С. Марьян, Н. Г. Габеева, А.И. Воробьев // Терапевтический архив. - 2011. - № 7. - с. 5-10.

15. Магомедова, А. У. Протокол лечения взрослых больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой / А. У. Магомедова, А. Е. Мисюрина, А. М.

Ковригина, Т. Н. Обухова, С. М. Куликов, С. К. Кравченко // Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови. Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови. Под ред. В.Г. Савченко. М.: Практика. - 2018. - т.2. - с. 557-583.

16. Магомедова, А. У. Промежуточные результаты многоцентрового, рандомизированного, контролируемого (сравнительного) открытого, проспективного исследования по оценке эффективности программ R-DA-EPOCH-21, R-mNHLBFM-90 и трансплантации аутологичных стволовых кроветворных клеток у нелеченых больных диффузной в-клеточной крупноклеточной лимфой с признаками неблагоприятного прогноза - протокол ДВККЛ-2015 / А. У. Магомедова, К. Н. Сычевская, Т. Н. Моисеева, А. М. Ковригина, Т. Н. Обухова, В. Л. Сурин, С. К. Кравченко, Я. К. Мангасарова, А. Е. Мисюрина, О. В. Марголин, М. О. Багова, Л. Г. Горенкова, Е. А. Фастова, Е. А. Нестерова, Ф. Э. Бабаева, Т. В. Шелехова, Ю. В. Аржанухина, Е. Е. Зинина, И. В. Крючкова, С. А. Сизикова, Т. И. Ксензова, Е. В. Аникина, К. Д. Капланов, Т. С. Константинова, О. Д. Сердюк, И. Н. Нечунаева, Т. В. Чагорова, Т. М. Сычева, И. Э. Костина, С. М. Куликов, Ю. М. Чабаева, В. Г. Савченко // Материалы V Конгресса гематологов России. Гематология и трансфузиология. - 2020. - т. 65. - №1. - с. 35.

17. Мазуров, В. И. Роль препаратов кальция в комплексном лечении постменопаузального остеопороза / В. И. Мазуров, А. А. Сергеева Е. А. Трофимов // Медицинский совет. - 2016. -№5. - с. 114-119.

18. Новиков, В. Е. Минеральная плотность костной ткани и молекулярно-генетические маркеры ее ремоделирования в крови у космонавтов после длительных полетов на международной космической станции / В. Е. Новиков, М. П. Рыкова, Е. Н. Антропова, Т. А. Берендеева, С. А. Калинин, Г. Ю. Васильева, С. А. Пономарев // Физиология человека. - 2017. - № 6. - с. 88-94.

19. Паюшина, О.В. Мезенхимные стволовые клетки: источники, фенотип и потенции к дифференцировке / О.В. Паюшина, Е.И. Домарацкая, В.И. Старостин // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. - 2006. - №1. - с. 6-25.

20. Петинати, Н. А. Изменения в клетках-предшественницах стромального микроокружения костного мозга больных хроническим миелолейкозом в дебюте заболевания и в ходе лечения/ Н. А. Петинати, И. Н. Шипунова, А. Е. Бигильдеев, Н. В. Сац, Е. Ю. Чельшева, А.Н.Петрова, А.Г. Туркина, Н. И.Дризе // Гематология и трансфузиология. - 2019. - т. 64. - №4 . - с.424-435.

21. Поддубная, И.В. Факторы прогноза при диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме/ И. В. Поддубная, Л. Г. Бабичева // Онкогематология. - 2005. - с. 8088.

22. Пospelова, Т. И. Качество жизни больных неходжкинскими злокачественными лимфомами / Т. И. Пospelова, Л. Н. Грицай, М. И. Лосева, Л. М. Маслова, И. Н. Нечунаева // Бюллетень сибирской медицины. - 2008. - с. 100-105.

23. Савченко, В. Г. Модификация стромального микроокружения у больных лейкозами до и после терапии / В. Г. Савченко, И. Н. Шипунова, А. Е. Бигильдеев, Н. И.Дризе, А. Г. Туркина, Л. А. Кузьмина, С. Т. Викторова, Е. Н. Паровичникова // Гематология и трансфузиология. - 2016. - №3. - с. 122-126.

24. 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. - том 82. - №7. - pp. 52-57.

25. Торопцова, Н.В. Прогноз эффективности терапии с помощью биохимических маркеров костного метаболизма / Н. В.Торопцова, О. А. Никитинская // Эффективная фармакотерапия. - 2010. - № 38. - с. 24-29.

26. Федянин, М.Ю. Рецепторы фактора роста фибробластов при злокачественных опухолях / М. Ю. Федянин, Д. Н. Хмелькова, Т. С. Серебряйская, Т. А. Никольская, С. А. Тюляндин // Злокачественные опухоли. - 2014. - №4. - с. 19-34.

27. Хныкова, О.Н. Влияние компонентов внеклеточного матрикса на клональный рост и остеогенную дифференцировку мезенхимных стромальных клеток крысы / О.Н. Хныкова, О.В. Паюшина, Н.Н. Буторина, Э.И. Буеверова, В.И.

Старостин // Клеточные культуры. Информационный бюллетень. - 2010. - №25. - с. 37-47.

28. Чернов, Ю.Н. Остеопороз: критические звенья патогенеза и пути фармакологической коррекции / Ю. Н. Чернов, Л. К. Пешехонова, Г. А. Батищева // В мире лекарств. - 2000. - №2. - с. 44-50.

29. Чертков, И. Л. Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение / И. Л. Чертков, О. А. Гуревич. - М.: Медицина. - 1984. - с. 239.

30. Abe, M. Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: a vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion / M. Abe, K. Hiura, J. Wilde, A. Shioyasono, K. Moriyama, T. Hashimoto, S. Kido, T. Oshima, H. Shibata, S. Ozaki, D. Inoue, T. Matsumoto // Blood. - 2004. - т. 104. - № 8. - с. 2484-2491.

31. Adrian, K. Expression of purinergic receptors (ionotropic P2X1-7 and metabotropic P2Y1-11) during myeloid differentiation of HL60 cells / K. Adrian, M. K. Bernhard, H. G. Breiting, A. Ogilvie // Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression. - 2000. - vol. 1492. - № 1. - pp. 127-138.

32. Almalki, S. G. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells / S. G. Almalki, D. K. Agrawal // Differentiation; research in biological diversity. - 2016. - vol. 92. - № 1. -pp. 41-51.

33. Andrea, K. Ng. Long-term complications of lymphoma and its treatment / K. Ng. Andrea, A. LaCasce, L. B. Travis // Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. - 2011. - pp. 885-1892.

34. Arranz, L. Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms / L. Arranz, A. Sánchez-Aguilera, D. Martín-Pérez, J. Isern, X. Langa, A. Tzankov, P. Lundberg, S. Muntión, Y. S. Tzeng, D. M. Lai, J. Schwaller, R. C. Skoda, S. Méndez-Ferrer // Nature. - 2014. - vol. 512. - № 1. - pp. 78-81.

35. Baddoo, M. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection / M. Baddoo, K. Hill, R. Wilkinson, D. Gaupp, C.

Hughes, G. C. Kopen, D. G. Phinney // *Journal of Cellular Biochemistry*. - 2003. - vol. 89. - № 6. pp. 1235-1249.

36. Ballard, H. S. Hypercalcemia in Chronic Myelogenous Leukemia / H. S. Ballard, A. J. Marcus // *New England Journal of Medicine*. - 1970. - vol. 282. - № 12. - pp. 663-665.

37. Baranova, I. A., Analysis of the state of the art of consulting medical care to patients with glucocorticoid-induced osteoporosis or its risk according to the data of a questionnaire survey (GLUCOST study) / I. A. Baranova, O. B. Ershova, E. K. Anaev, T. N. Anokhina, O. N. Anoshenkova, S. Z. Batyn, E.A. Belyaeva, T. Y. Bolshakova, I. A. Volkorezov, L. N. Eliseeva, E. V. Kashnazarova, M. F. Kinyaikin, M. N. Kirpikova, E. P. Klyuchnikova, M. A. Korolev, I. V. Kuneevskaya, L. V. Masneva, A. A. Muradyants, E. N. Otteva, T. N. Petrachkova, L. K. Peshekhonova, A. S. Povzun, T. A. Raskina, M. L. Smirnova, N. V. Toroptsova, R. B. Khasanova, N. G. Shamsutdinova, N. L. Shaporova, N. S. Shitova, S. Y. Shkireeva, N.A. Shostak, O.M. Lesnyak // *Terapevticheskii arkhiv*. - 2015. - vol. 87. - № 5. - p. 58.

38. Bartlett, N. L. Dose-adjusted EPOCH-R compared with R-CHOP as frontline therapy for diffuse large B-cell lymphoma: Clinical outcomes of the Phase III intergroup trial alliance (CALGB 50303) / N. L. Bartlett, W. H. Wilson, S. H. Jung, E. D. Hsi, M. J. Maurer, L. D. Pederson, M. Y. C. Polley, B. N. Pitcher, B. D. Cheson, B. S. Kahl, J. W. Friedberg, L. M. Staudt, N. D. Wagner-Johnston, K. A. Blum, J. S. Abramson, N. M. Reddy, J. N. Winter, J. E. Chang, A. K. Gopal, C. Amy // *Journal of Clinical Oncology*. - 2019. - vol. 37. - № 21. - pp. 1790-1799.

39. Battula, V. L. AML-induced osteogenic differentiation in mesenchymal stromal cells supports leukemia growth / V. L. Battula, P. M. Le, J. C. Sun, K. Nguyen, B. Yuan, X. Zhou, S. Sonnylal, T. McQueen, V. Ruvolo, K. A. Michel, X. Ling, R. Jacamo, E. Shpall, Z. Wang, A. Rao, G. Al-Atrash, M. Konopleva, R. E. Davis, M. A. Harrington, C. W. Cahill, C. Bueso-Ramos, M. Andreeff // *JCI insight*. - 2017. - vol.2. - № 13. - p. e90036.

40. Beane, O. S. Disparate Response to Methotrexate in Stem Versus Non-Stem Cells / O. S. Beane, L. E. O. Darling, V. C. Fonseca, E. M. Darling // *Stem Cell Reviews and Reports*. - 2016. - vol. 12. - № 3. pp. 340-351.

41. Beltran, B. E. Response and survival benefit with chemoimmunotherapy in Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma / B. E. Beltran, P. Quiñones, D. Morales, J. M. Malaga, J. C. Chavez, E. M. Sotomayor, J. J. Castillo // *Hematological Oncology*. - 2018. - vol. 1. - № 36. pp. 93-97.

42. van den Berk, L. C. J. Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia / L. C. J. van den Berk, A. van der Veer, M. E. Willemsse, M. J. G. A. Theeuwes, M. W. Luijendijk, W. H. Tong, I. M. van der Sluis, R. Pieters, M. L. den Boer // *British Journal of Haematology*. - 2014. - vol. 166. - № 2. pp. 240-249.

43. Le Blanc, K. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells / K. Le Blanc, C. Tammik, K. Rosendahl, E. Zetterberg, O. Ringdén // *Experimental Hematology*. - 2003. - vol. 31. - № 10. - pp. 890-896.

44. Blau, O. Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts / O. Blau, C. D. Baldus, W.-K. Hofmann, G. Thiel, F. Nolte, T. Burmeister, S. Türkmen, O. Benlasfer, E. Schümann, A. Sindram, M. Molkenkin, S. Mundlos, U. Keilholz, E. Thiel, I. W. Blau. // *Blood*. - 2011. - vol. 118. - № 20. - pp. 5583-5592.

45. Boehme, V. CNS events in elderly patients with aggressive lymphoma treated with modern chemotherapy (CHOP-14) with or without rituximab: An analysis of patients treated in the RICOVER-60 trial of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL) / V. Boehme, N. Schmitz, S. Zeynalova, M. Loeffler, M. Pfreundschuh // *Blood*. - 2009. - vol. 113. - № 17. - pp. 3896-3902.

46. Boyce, B. F. Bone Remodeling and the Role of TRAF3 in Osteoclastic Bone Resorption / B. F. Boyce, J. Li, L. Xing, Z. Yao // *Frontiers in immunology*. - 2018. - №9. - p. 2263.

47. Brigle, K. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma / K. Brigle, B. Rogers // *Seminars in Oncology Nursing*. - 2017. - vol. 33. - № 3. - pp. 225-236.
48. Camacho, P. M. American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis / P. M. Camacho, S. M. Petak, N. Binkley, B. L. Clarke, S. T. Harris, D. L. Hurley, M. Kleerekoper, E. M. Lewiecki, P. D. Miller, H. S. Narula, R. Pessah-Pollack, V. Tangpricha, S. J. Wimalawansa, N. B. Watts // *Endocrine Practice*. - 2016. - vol. 22. - №4. - pp. 1-42.
49. Caponetti, G. C. Isolated MYC cytogenetic abnormalities in diffuse large B-cell lymphoma do not predict an adverse clinical outcome / G. C. Caponetti, B. J. Dave, A. M. Perry, L. M. Smith, S. Jain, P. N. Meyer, M. Bast, P. J. Bierman, R. G. Bociek, J. M. Vose, J. O. Armitage, P. Aoun, K. Fu, T. C. Greiner, W. C. Chan, W. G. Sanger, D. D. Weisenburger // *Leukemia and Lymphoma*. - 2015. - vol. 56. - № 11. - pp. 3082-3089.
50. Chang, H. Suppression of the Smurf1 Expression Inhibits Tumor Progression in Gliomas / H. Chang, J. Zhang, Z. Miao, Y. Ding, X. Xu, X. Zhao, P. Xu, Q. Wang, Y. Lin // *Cellular and Molecular Neurobiology*. - 2018. - vol. 38. - № 2. - pp. 421-430.
51. Chen, J. Dysregulated CXCR4 expression promotes lymphoma cell survival and independently predicts disease progression in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma / J. Chen, Z. Y. Xu-Monette, L. Deng, Q. Shen, G. C. Manyam, A. Martinez-Lopez, L. Zhang, S. Montes-Moreno, C. Visco, A. Tzankov, L. Yin, K. Dybkaer, A. Chiu, A. Orazi, Y. Zu, G. Bhagat, K. L. Richards, E. D. Hsi, W. W. L. Choi, J. Han van Krieken, J. Huh, M. Ponzoni, A. J. M. Ferreri, X. Zhao, M. B. Møller, J. P. Farnen, J. N. Winter, M. A. Piris, L. Pham, K. H. Young // *Oncotarget*. - 2015. - vol. 6. - № 8. - pp. 5597-5614.
52. Chen, Q. Morphology, differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cells from acute myeloid leukemia patients / Q. Chen, Y. Yuan, T. Chen // *Mol. Med. Rep.* - 2014. - vol. 9. - №1. - pp. 293-298.
53. Chen, Y. Melanoma cell adhesion molecule is the driving force behind the dissemination of melanoma upon S100A8/A9 binding in the original skin lesion / Y. Chen, I. W. Sumardika, N. Tomonobu, I. M. Winarsa Ruma, R. Kinoshita, E. Kondo, Y.

Inoue, H. Sato, A. Yamauchi, H. Murata, K. Yamamoto, S. Tomida, K. Shien, H. Yamamoto, J. Soh, M. Liu, J. Futami, K. Sasai, H. Katayama, M. Kubo, E. W. Putranto, T. Hibino, B. Sun, M. Nishibori, S. Toyooka, M. Sakaguchi // *Cancer Letters*. - 2019. - №452. - pp. 178-190.

54. Chiappella, A. State of the art therapy for advanced-stage Diffuse Large B-cell lymphoma / A. Chiappella, A. Castellino, U. Vitolo // *Hematology/Oncology Clinics of North America*. - 2016. - vol. 30. - № 6. -pp. 1147-1162.

55. Chitteti, B. R. Impact of interactions of cellular components of the bone marrow microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cell function / B. R. Chitteti, Y. H.Cheng, B. Poteat, S. Rodriguez-Rodriguez, W. S. Goebel, N. Carlesso, M. A. Kacena, E. F. Srour // *Blood*. - 2010. - vol. 115. - № 16. - pp. 3239-3248.

56. Conforti, A. Biological, functional and genetic characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from pediatric patients affected by acute lymphoblastic leukemia / A. Conforti, S. Biagini, F. Del Bufalo, P. Sirleto, A. Angioni, N. Starc, G. Li Pira, F. Moretta, A. Proia, B. Contoli, S. Genovese, C. Ciardi, M. A. Avanzini, V. Rosti, F. Lo-Coco, F. Locatelli, M. E. Bernardo // *PLoS One*. - 2013. - vol. 8. - №11. - p. e76989.

57. Conget, P. A. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells / P. A. Conget, J. J. Minguell // *Journal of Cellular Physiology*. - 1999. - vol. 181. - № 1. - pp. 67-73.

58. Corre, J. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma / J. Corre, K. Mahtouk, M. Attal, M. Gadelorge, A. Huynh, S. Fleury-Cappellesso, C. Danho, P. Laharrague, B. Klein, T. Rème, P. Bourin // *Leukemia*. - 2007. - vol. 21. - № 5. - pp. 1079-1088.

59. Cosman, F. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis / F. Cosman, S. J. de Beur, M. S. LeBoff, E. M. Lewiecki, B. Tanner, S. Randall, R. Lindsay // *Osteoporosis International*. -2014. -vol. 10. -№25. 2359-2381.

60. Crump, M. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: Results from the international SCHOLAR-1 study / M. Crump, S. S. Neelapu, U. Farooq, E. Van Den Neste, J. Kuruvilla, J. Westin, B. K. Link, A. Hay, J. R. Cerhan, L. Zhu, S. Boussetta, L.

Feng, M. J. Maurer, L. Navale, J. Wiezorek, W. Y. Go, C. Gisselbrecht // *Blood*. - 2017. - vol. 130. - № 16. - pp. 1800-1808.

61. Csukasi, F. Dominant-negative SOX9 mutations in campomelic dysplasia / F. Csukasi, I. Duran, W. Zhang, J. H. Martin, M. Barad, M. Bamshad, M. A. Weis, D. Eyre, D. Krakow, D. H. Cohn // *Human Mutation*. - 2019. - vol. 40. - № 12. - pp. 2344-2352.

62. Cunningham, D. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: A phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles / D. Cunningham, E. A. Hawkes, A. Jack, W. Qian, P. Smith, P. Mouncey, C. Pocock, K. M. Ardeshtna, J. A. Radford, A. McMillan, J. Davies, D. Turner, A. Kruger, P. Johnson, J. Gambell, D. Linch // *The Lancet*. - 2013. - vol. 381. - № 9880. - pp. 1817-1826.

63. Davies, J. H. Effects of Chemotherapeutic Agents on the Function of Primary Human Osteoblast-Like Cells Derived from Children / J. H. Davies, B. A. J. Evans, M. E. M. Jenney, J. W. Gregory // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. - 2003. - vol. 88. - № 12. - pp. 6088-6097.

64. Demeter, J. Bone densitometry and histomorphometry in patients with hairy cell leukemia / J. Demeter, H. J. Grottes, C. Horváth, W. D. Gassel, G. Delling, J. M. Friedrich, F. Porzsolt // *Leukemia & lymphoma*. - 1994. - pp. 73-77.

65. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz // *Cytotherapy*. - 2006. - vol. 8. - №4. - pp. 315-317.

66. Elix, C. C. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma controls prostate cancer cell growth through AR-dependent and independent mechanisms / C. C. Elix, M. M. Salgia, M. Otto-Duessel, B. T. Copeland, C. Yoo, M. Lee, B. Y. Tew, D. Ann, S. K. Pal, J. O. Jones // *Prostate*. - 2020. - vol. 80. - № 2. - pp. 162-172.

67. Epperla, N. Hematopoietic cell transplantation for diffuse large B-cell and follicular lymphoma: current controversies and advances / N. Epperla, M. Hamadani // *Hematology Oncology and Stem Cell Therapy*. - 2017. - vol. 10. - № 4. - pp. 277-284.

68. Eriksen, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling / E. F. Eriksen // *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. - 2010. - vol. 11. - №4. - pp. 219-227.
69. Fernandez-Moure, J. S. Enhanced osteogenic potential of mesenchymal stem cells from cortical bone: a comparative analysis / J. S. Fernandez-Moure, B. Corradetti, P. Chan, J. L. Van Eps, T. Janecek, P. Rameshwar, B. K. Weiner, E. Tasciotti // *Stem Cell Res. Ther.* - 2015. - vol. 6. - p. 203.
70. Floortje, M. Better quality of life among 10-15 year survivors of Hodgkin's lymphoma compared to 5-9 year survivors: a population-based study / M. Floortje, A. J. J. M. Vingerhoets, J. W. Coebergh, G. Vreugdenhil; N. K. Aaronson, M. L. M. Lybeert, L. V. van de Poll-Franse // *European journal of cancer*. - 2007. - pp. 2794-2801.
71. Friedenstein, A. J. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo / A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhyan, N. V. Latsinik, A. F. Panasyuk, I. V. Keiliss-Borok // *Transplantation*. - 1974. - vol. 17. - №4. - pp. 331-340.
72. Frisch, B. J. Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia / B. J. Frisch, J. M. Ashton, L. Xing, M. W. Becker, C. T. Jordan, L. M. Calvi // *Blood*. - 2012. - vol. 119. - №2. - pp. 540-550.
73. Gallipoli, P. Autocrine TNF- α production supports CML stem and progenitor cell survival and enhances their proliferation / P. Gallipoli, F. Pellicano, H. Morrison, K. Laidlaw, E. K. Allan, R. Bhatia, M. Copland, H. G. Jørgensen, T. L. Holyoake // *Blood*. - 2013. - vol. 12. - №122. - pp. 3335-3339.
74. Galotto, M. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients / M. Galotto, G. Berisso, L. Delfino, M. Podesta, L. Ottaggio, S. Dallorso, C. Dufour, G. B. Ferrara, A. Abbondandolo, G. Dini, A. Bacigalupo, R. Cancedda, R. Quarto // *Exp. Hematol.* - 1999. - vol. 27. - №9. - pp. 1460-1466.
75. Gao, L. HTLV-1 Tax transgenic mice develop spontaneous osteolytic bone metastases prevented by osteoclast inhibition / L. Gao, H. Deng, H. Zhao, A. Hirbe, J. Harding, L. Ratner, K. Weilbaecher // *Blood*. - 2005. - vol. 107. - №13. - pp. 4294-4302.

76. Garnero, P. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY study / P. Garnero, E. Sornay-Rendu, B. Claustrat, P. D. Delmas // *Journal of Bone and Mineral Research*. - 2000. - vol. 15. - №8. - pp. 1526-1536.

77. Georgiou, K. R. Methotrexate chemotherapy reduces osteogenesis but increases adipogenic potential in the bone marrow / K. R. Georgiou, M. A. Scherer, C.-M. Fan, J. C. Cool, T. J. King, B. K. Foster, C. J. Xian // *J. Cell. Physiol.* - 2012. - vol. 227. - №3. - pp. 909-918.

78. Gisselbrecht, C. How I manage patients with relapsed/refractory diffuse large B cell lymphoma / C. Gisselbrecht, Van Den Neste // *British journal of haematology*. - 2018. - vol. 182. - № 5. - pp. 633-643.

79. Gleeson, M. Central nervous system relapse of diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: results of the UK NCRI R-CHOP-14 versus 21 trial - ScienceDirect / M. Gleeson, N. Counsell, D. N. C. Cunningham // *Annals of Oncology*. - 2017. - pp. 2511-2516.

80. Hamlin, P. A. Age-adjusted International Prognostic Index predicts autologous stem cell transplantation outcome for patients with relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma / P. A. Hamlin, A. D. Zelenetz, T. Kewalramani, J. Qin, J. M. Satagopan, D. Verbel, A. Noy, C. S. Portlock, D. J. Straus, J. Yahalom, S. D. Nimer, C. H. Moskowitz // *Blood*. - 2003. - vol. 102. - № 6. pp. 1989-1996.

81. Hatfield, K. Primary human acute myeloid leukaemia cells increase the proliferation of microvascular endothelial cells through the release of soluble mediators / K. Hatfield, A. M. Øyan, E. Ersvaer, K. H. Kalland, P. Lassalle, B. T. Gjertsen, Ø. Bruserud // *British Journal of Haematology*. - 2009. - vol. 144. - № 1. - pp. 53-68.

82. Hawkins, E. D. T-cell acute leukaemia exhibits dynamic interactions with bone marrow microenvironments / D. Duarte, O. Akinduro, R. A. Khorshed, D. Passaro, M. Nowicka, L. Straszowski, M. K. Scott, S. Rothery, N. Ruivo, K. Foster, M. Waibel, R. W. Johnstone, S. J. Harrison, D. A. Westerman, H. Quach, J. Gribben, M. D. Robinson, L. E. Purton, D. Bonnet, C. L. Celso. // *Nature*. - 2016. - vol. 538. - № 7626. - pp. 518-522.

83. Haynesworth, S. E. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies / S. E. Haynesworth, M. A. Baber, A. I. Caplan // *Bone*. - 1992. - vol. 13. - № 1. - pp. 69-80.

84. Hicks, D. G. Primary lymphoma of bone. Correlation of magnetic resonance imaging features with cytokine production by tumor cells / D. G. Hicks, T. Gokan, R. J. O'Keefe, S. M. Totterman, P. J. Fultz, A. R. Judkins, S. P. Meyers, D. J. Rubens, J. Z. Sickel, R. N. Rosier // *Cancer*. - 1995. - vol. 75. - № 4. pp. 973-980.

85. Horwitz, E. M. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement / E. M. Horwitz, K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. SlaperCortenbach, F. C. Marini, R. J. Deans, D. S. Krause, A. Keating // *Cytotherapy*. - 2005. - vol. 7. - №5. - pp. 393-395.

86. Jacamo, R. Tumor Trp53 status and genotype affect the bone marrow microenvironment in acute myeloid leukemia/ R. Jacamo, R. E. Davis, X. Ling, S. Sonnylal, Z. Wang, W. Ma, M. Zhang, P. Ruvolo, V. Ruvolo, R. Y. Wang, T. McQueen, S. Lowe, J. Zuber, S. M. Kornblau, M. Konopleva, M. Andreeff // *Oncotarget*. - 2017. - vol. 8. - № 48. pp. 83354-83369.

87. Jaiswal, N. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro/ N. Jaiswal, S. E. Haynesworth, A. I. Caplan, S. P. Bruder // *Journal of Cellular Biochemistry*. - 1997. - vol. 64. - № 2. - pp. 295-312.

88. Jaiswal, N. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase/R. K. Jaiswal, N. Jaiswal, S. P. Bruder, G. Mbalaviele, D. R. Marshak, M. F Pittenger // *Journal of Biological Chemistry*. - 2000. - vol. 275. - № 13. - pp. 9645-9652.

89. Javidi-Sharifi, N. Crosstalk between KIT and FGFR3 Promotes Gastrointestinal Stromal Tumor Cell Growth and Drug Resistance / N. Javidi-Sharifi, E. Traer, J. Martinez, A. Gupta, T. Taguchi, J. Dunlap, M. C. Heinrich, C. L. Corless, B. P. Rubin, B. J. Druker, J. W. Tyner // *Cancer Research*. - 2015. - vol. 75. - pp. 880-891.

90. Javidi-Sharifi, N. FGF2-FGFR1 signaling regulates release of Leukemia-Protective exosomes from bone marrow stromal cells / N. Javidi-Sharifi, J. Martinez, I.

English, S. K. Joshi, R. Scopim-Ribeiro, S. K. Viola, D. K. Edwards, A. Agarwal, C. Lopez, D. Jorgens, J. W. Tyner, B. J. Druker, E. Traer // *eLife*. - 2019. - №8. - p. e40033.

91. Joseph, J. C. Corticosteroid-induced osteoporosis / J. C. Joseph // *American journal of hospital pharmacy*. - 1994. - vol. 51. - № 2. - pp. 188-197.

92. Karube, K. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets / K. Karube, A. Enjuanes, I. Dlouhy, P. Jares, D. Martin-Garcia, F. Nadeu, G. R. Ordóñez, J. Rovira, G. Clot, C. Royo, A. Navarro, B. Gonzalez-Farre, A. Vaghefi, G. Castellano, C. Rubio-Perez, D. Tamborero, J. Briones, A. Salar, J. M. Sancho, S. Mercadal, E. Gonzalez-Barca, L. Escoda, H. Miyoshi, K. Ohshima, K. Miyawaki, K. Kato, K. Akashi, A. Mozos, L. Colomo, M. Alcoceba, A. Valera, A. Carrió, D. Costa, N. Lopez-Bigas, R. Schmitz, L. M. Staudt, I. Salaverria, A. López-Guillermo, E. Campo // *Leukemia*. - 2018. - vol. 32. - № 3. - pp. 675-684.

93. Kim, K. J. Bone Morphogenetic Protein 2-Conjugated Silica Particles Enhanced Early Osteogenic Differentiation of Adipose Stem Cells on the Polycaprolactone Scaffold / K. J. Kim, M. S. Choi, J. H. Shim, J. W. Rhie // *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. - 2019. - vol. 16. - № 4. - pp. 395-403.

94. Kotyza, J. Chemokines in tumor proximal fluids / J. Kotyza // *Biomedical Papers*. - 2017. - vol. 161. - № 1. - pp. 41-49.

95. Kuett, A. IL-8 as mediator in the microenvironment-leukaemia network in acute myeloid leukaemia / A. Kuett, C. Rieger, D. Perathoner, T. Herold, M. Wagner, S. Sironi, K. Sotlar, H. P. Horny, C. Deniffel, H. Drolle, M. Fiegl // *Scientific Reports*. - 2015. - vol. 5. - №1. - pp. 1-11.

96. Kumar, R. The bone marrow microenvironment in health and disease at a glance / R. Kumar, P. S. Godavarthy, D. S. Krause // *Journal of Cell Science*. - 2018. - vol.131. - № 4. - p. jcs201707.

97. Kuznetsov, S. A. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro / S. A. Kuznetsov, A. J. Friedenstein, P. G. Robey // *British Journal of Haematology*. - 1997. - vol. 97. - № 3. - pp. 561-570.

98. Lemieux, C. Outcome of autologous hematopoietic stem cell transplant in older patients with B cell lymphoma when selected for fitness and chemosensitive disease / C. Lemieux, I. Ahmad, N. M. Bambace, L. Bernard, S. Cohen, J.-S. Delisle, I. Fleury, T. Kiss, L. Mollica, D. C. Roy, G. Sauvageau, J. Roy, S. Lachance // *Leukemia Research*. - 2019. - vol. 79. - pp. 75-80.

99. Li, J. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents / J. Li, H. K. W. Law, Y. L. Lau, G. C. F. Chan // *British Journal of Haematology*. - 2004. - vol. 127. - № 3. - pp. 326-334.

100. Li, P. FGFR2 promotes expression of PD-L1 in colorectal cancer via the JAK/STAT3 signaling pathway / P. Li, T. Huang, Q. Zou, D. Liu, Y. Wang, X. Tan, Y. Wei, H. Qiu // *The Journal of Immunology*. - 2019. - vol. 202. - №10. - pp. 3065-3075.

101. Li, S. Diffuse large B-cell lymphoma / S. Li, K. H. Young, L. J. Medeiros // *Pathology*. - 2018. - vol. 50. - № 1. - pp. 74-87.

102. Li, Z. Recurrent PDGFRB mutations in unicentric Castleman disease / Z. Li, X. Lan, C. Li, Y. Zhang, Y. Wang, W. Xue, L. Lu, M. Jin, Z. Zhou, X. Wang, L. Li, L. Zhang, X. Li, X. Fu, Z. Sun, J. Wu, X. Zhang, H. Yu, F. Nan, Y. Chang, J. Yan, X. Wu, G. Wang, D. Zhang, Y. Zhang, K. H. Young, M. Zhang. // *Leukemia*. - 2019. - vol. 33. - № 4. - pp. 1035-1038.

103. de Lima Prata, K. Effects of high-dose chemotherapy on bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells isolated from lymphoma patients / K. de Lima Prata, M. D. Orellana, G. C. De Santis, S. Kashima, A. M. Fontes, R. de Cássia Viu Carrara, P. V. B. Palma, L. Neder, D. T. Covas // *Experimental Hematology*. - 2010. - vol. 38. - № 4. - pp. 292-300.

104. Lin, R. Osteopontin induces atrial fibrosis by activating Akt/GSK-3 β / β -catenin pathway and suppressing autophagy / R. Lin, S. Wu, D. Zhu, M. Qin, X. Liu // *Life Sciences*. - 2020. - vol. 245. - p. 117328.

105. Lin, Y. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo / Y. Lin, E. Luo, X. Chen, L. Liu, J. Qiao, Z. Yan, Z. Li, W. Tang, X. Zheng, W. Tian // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. - 2005. - vol. 9. - № 4. - pp. 929-939.

106. Liu, Y. T. Myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia and FGFR1 rearrangement: 5 cases report and literatures review / Y. T. Liu, J. W. Zhao, J. Feng, Q. H. Li, Y. M. Chen, L. G. Qiu, Z. J. Xiao, Y. Li, B. F. Gong, X. Y. Gong, Y. C. Mi, J. X Wang // *Zhonghua xue ye xue za zhi*. - 2019. - vol. 40. - № 10. -pp. 848-852.

107. Lodie, T. A. Systematic Analysis of Reportedly Distinct Populations of Multipotent Bone Marrow-Derived Stem Cells Reveals a Lack of Distinction /

T. A. Lodie, C. E. Blickarz, T. J. Devarakonda, C. He, A. B. Dash, J. Clarke, K. Gleneck, L. Shihabuddin, R. Tubo // *Tissue Engineering*. - 2002. - vol. 8. - № 5. - pp. 739-751.

108. Lopez-Villar, O. Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q-syndrome / O. Lopez-Villar, J. L. Garcia, F. M. Sanchez-Guijo, C. Robledo, E. M. Villaron, P. Hernández-Campo, N. Lopez-Holgado, M. Diez-Campelo, M. V Barbado, J. A. Perez-Simon, J. M. Hernández-Rivas, J. F. San-Miguel, M.-C. del Cañizo // *Leukemia*. - 2009. - 23. - № 4. - pp. 664-672.

109. Maffei, R. Angiopoietin-2 plasma dosage predicts time to first treatment and overall survival in chronic lymphocytic leukemia / R. Maffei, S. Martinelli, R. Santachiara, D. Rossi, C. Guarnotta, E. Sozzi, A. Zucchetto, G. M. Rigolin, S. Fiorcari, I. Castelli, M. Fontana, V. Coluccio, G. Leonardi, P. Zucchini, C. Tripodo, A. Cuneo, V. Gattei, G. D. Poeta, F. Forconi, G. Gaidano, G. Torelli, R. Marasca // *Blood*. - 2010. - vol. - 116. - № 4. - pp. 584-592.

110. Majumdar, M. K. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells / M. K. Majumdar, M. Keane-Moore, D. Buyaner, W. B. Hardy, M. A. Moorman, K. R. McIntosh, J. D. Mosca // *Journal of Biomedical Science*. - 2003. - vol. 10. - № 2. - pp. 228-241.

111. Mamonov, V. E. Participation of cultured mesenchymal multipotent stromal cells in regeneration of a large persisting defect of rabbit radius bone / V. E. Mamonov, I. N. Shipounova, N. V. Sats, A. E. Bigildeev, D. A. Svinareva, N. V. Proskurina, M. M. Riashentsev, A. G. Chemis, N. I. Drize // *Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*. - 2012. - vol. 5. - № 1. - pp. 1-8.

112. Marino, S. Multiple Myeloma and Bone: The Fatal Interaction / S. Marino, G. D. Roodman // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. - 2018. - vol. 8. - № 8. pp. a031286.

113. Martelli, M. Diffuse large B-cell lymphoma / M. Martelli, A. J. M. Ferreri, C. Agostinelli, A. Di Rocco, M. Pfreundschuh, S. A. Pileri // Critical Reviews in Oncology/Hematology. - 2013. - vol. 87. - № 2. - pp. 146-171.

114. Medyouf, H. Myelodysplastic Cells in Patients Reprogram Mesenchymal Stromal Cells to Establish a Transplantable Stem Cell Niche Disease Unit / H. Medyouf, M. Mossner, J.C. Jann, F. Nolte, S., Raffel, C. Herrmann, A. Lier, C. Eisen, V. Nowak, B. Zens, K. Mudder, C. Klein, J. Oblander, S. Fey, J. Vogler, A. Fabarius, E. Riedl, H. Roehl, A. Kohlmann, M. Staller, C. Haferlach, N. Muller, T. John, U. Platzbecker, G. Metzgeroth, W.K. Hofmann, A. Trumpp, D. Nowak// Cell stem cell. - 2014. - vol. 6. - № 14. - pp. 824-37.

115. Mel'Nichenko, G. A. Russian federal clinical guidelines on the diagnostics, treatment, and prevention of osteoporosis / G.A. Mel'nichenko, Zh.E. Belaya, L.Ya. Rozhinskaya, N.V. Toroptsova, L.I. Alekseeva, E.V. Biryukova, T.A. Grebennikova, L.K. Dzeranova, A.V. Dreval, N.V. Zagorodniy, A.V. Il'in, I.V. Kryukova, O.M. Lesnyak, E.O. Mamedova, O.A. Nikitinskaya, E.A. Pigarova, S.S. Rodionova, I.A. Skripnikova, N.V. Tarbaeva, L.Ya. Farba, T.T. Tsoriev, T.O. Chernova, S.V. Yureneva, O.V. Yakushevskaya, I.I. Dedov // Problemy Endokrinologii. - 2017. - vol. 63. - № 6. - pp. 392-426.

116. Menendez, P. Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene / P. Menendez, P. Catalina, R. Rodríguez, G. J. Melen, C. Bueno, M. Arriero, F. García-Sánchez, A. Lassaletta, R. García-Sanz, J. García-Castro // The Journal of experimental medicine. - 2009. - vol. 206. - № 13. - pp. 3131-3141.

117. Meyer, P. N. Immunohistochemical Methods for Predicting Cell of Origin and Survival in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab / P. N. Meyer, K. Fu, T. C. Greiner, L. M. Smith, J. Delabie, R. D. Gascoyne, G. Ott, A.

Rosenwald, R. M. Braziel, E. Campo, J. M. Vose, G. Lenz, L. M. Staudt, W. C. Chan, D. D. Weisenburger // *Journal of Clinical Oncology*. - 2011. - vol. 29. - № 2. - pp. 200-207.

118. Momotjuk, K. Influence of Different Conditioning Regimens on Stroma Precursors Springer / K. Momotjuk, L. Gerasimova, V. Savchenko, S. Kulikov, L. Mendeleeva, L. Lubimova // *Acute Leukemias V*. - 1996. - pp. 345-349.

119. Morgan, G. J. First-line treatment with zoledronic acid as compared with clodronic acid in multiple myeloma (MRC Myeloma IX): A randomised controlled trial / G. J. Morgan, F. E. Davies, W. M. Gregory, K. Cocks, S. E. Bell, A. J. Szubert, N. Navarro-Coy, M. T. Drayson, R. G. Owen, S. Feyler, A. J. Ashcroft, F. Ross, J. Byrne, H. Roddie, C. Rudin, G. Cook, G. H. Jackson, J. A. Child // *The Lancet*. - 2010. - vol. 376. - № 9757. - pp. 1989-1999.

120. Ng, F. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages / F. Ng, S. Boucher, S. Koh, K. S. R. Sastry, L. Chase, U. Lakshmiathy, C. Choong, Z. Yang, M. C. Vemuri, M. S. Rao, V. Tanavde // *Blood*. - 2008. - vol. 112. - №2. - pp. 295-307.

121. Nifontova, I. Sensitivity of mesenchymal stem cells and their progeny to medicines used for the treatment of hematoproliferative diseases / I. Nifontova, D. Svinareva, T. Petrova, N. Drize // *Acta Haematol*. - 2008. - vol. 119. - №2. - pp. 98-103.

122. Nils, N. H. Mesenchymal stem cells are sensitive to bleomycin treatment / N. H. Nils, A. Rühle, R. L. Perez, T. Trinh, S. Sisombath, K. J. Weber, A. D. Ho, J. Debus, R. Saffrich, P. E. Huber // *Scientific Reports*. - 2016. - №6. - p. 26645

123. Noguchi, M. Extensive bone marrow necrosis and symptomatic hypercalcemia in B cell blastic transformation of chronic myeloid leukemia: report of a case and review of the literature / M. Noguchi, K. Oshimi // *Acta Haematologica*. - 2007. - vol. 118. - № 2. - pp. 111-116.

124. Nolan, J. P. Flow cytometry of extracellular vesicles: potential, pitfalls, and prospects / J. P. Nolan // *Current Protocols in Cytometry*. - 2015. - vol. 73. - № 1. - pp. 13-16.

125. Ouyang, Y. Overexpression of SOX9 alleviates the progression of human osteoarthritis in vitro and in vivo / W. Wang, B. Tu, Y. Zhu, C. Fan, Y. Li // *Drug Design, Development and Therapy*. - 2019. - № 13. -pp. 2833-2842.

126. Pang, X. Osteopontin as a multifaceted driver of bone metastasis and drug resistance / X. Pang, K. Gong, X. Zhang, S. Wu, Y. Cui, B. Z. Qian // *Pharmacological Research*. - 2019. - № 144. -pp. 235-244.

127. Panny, M. Treatment of High Risk Aggressive B Cell Lymphomas with DA EPOCH R- a Retrospective Analysis / M. Panny, K. Troppan, P. Neumeister, T. Nösslinger, F. Keil // *Blood*. - 2016. - vol. 128. - № 22. - pp. 334-335.

128. Park, D. The hematopoietic stem cell niche / D. Park, D. B. Sykes, D. T. Scadden // *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. - 2012. - vol. 17. - pp. 30-39.

129. Passaro, D. Increased Vascular Permeability in the Bone Marrow Microenvironment Contributes to Disease Progression and Drug Response in Acute Myeloid Leukemia / D. Passaro, A. Di Tullio, A. Abarrategi, K. Rouault-Pierre, K. Foster, L. Ariza-McNaughton, B. Montaner, P. Chakravarty, L. Bhaw, G. Diana, F. Lassailly, J. Gribben, D. Bonnet // *Cancer Cell*. - 2017. - vol. 32. - № 3. - pp. 324-341.

130. Patrascu, A. M. The prognostic role of Bcl-2, Ki67, c-MYC and p53 in diffuse large B-cell lymphoma / A. M. Patrascu, I. Rotaru, L. Olar, S. Patrascu, M. C. Ghilusi, S. D. Neamtu, J. G. Nacea, A. Gluhovschi // *Romanian journal of morphology and embryology*. - 2017. - vol. 58. - № 3. - pp. 837-843.

131. Pfreundschuh, M. Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60) / M. Pfreundschuh, J. Schubert, M. Ziepert, R. Schmits, M. Mohren, E. Lengfelder, M. Reiser, C. Nickenig, M. Clemens, N. Peter, C. Bokemeyer, H. Eimermacher, A. Ho, M. Hoffmann, R. Mertelsmann, L. Trümper, L. Balleisen, R. Liersch, B. Metzner, F. Hartmann, B. Glass, V. Poeschel, N. Schmitz, C. Ruebe, A. C. Feller, M. Loeffler. // *The Lancet Oncology*. - 2008. - vol. 9. - № 2. - pp. 105-116.

132. Phang, K. C. Characterisation of immunogenotypes of diffuse large B-cell lymphoma / K. C. Phang, N. H. Hussin, F. Abdul Rahman, N. M. S. Tizen, A. Mansoor, N. Masir // *The Malaysian journal of pathology*. - 2019. - vol. 41. - №2. - pp. 101-124.

133. Pittenger, M. F. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, Moorman, M. A., D. W. Simonetti, S. Craig, D. R. Marshak // *Science*. - 1999. - vol. 284. - №5411. - pp. 143-147.

134. Pontikoglou, C. Study of the quantitative, functional, cytogenetic, and immunoregulatory properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia / C. Pontikoglou, M. C. Kastrinaki, M. Klaus, C. Kalpadakis, P. Katonis, K. Alpantaki, G. A. Pangalis, H. A. Papadaki // *Stem cells and development*. - 2013. - vol. 22. - №9. - pp. 1329-1341.

135. Popp, A. W. Glucocorticosteroid-induced spinal osteoporosis: scientific update on pathophysiology and treatment / A. W. Popp, J. Isenegger, E. M. Buergi, U. Buergi, K. Lippuner // *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. - 2006. - vol. 15. - №7. - pp. 1035-1049.

136. Purroy, N. Long-term follow-up of dose-adjusted EPOCH plus rituximab (DA-EPOCH-R) in untreated patients with poor prognosis large B-cell lymphoma. A phase II study conducted by the Spanish PETHEMA Group / N. Purroy, J. Bergua, L. Gallur, J. Prieto, L. A. Lopez, J. M. Sancho, J. A. García-Marco, J. Castellví, S. Montes-Moreno, A. Batlle, S. G. de Villambrosia, F. Carnicero, L. Ferrando-Lamana, M. A. Piris, A. Lopez // *British Journal of Haematology*. - 2015. - vol. 169. - № 2. - pp. 188-198.

137. Qualls, D. Advances in risk assessment and prophylaxis for central nervous system relapse in diffuse large B-cell lymphoma / D. Qualls, J. S. Abramson // *Haematologica*. - 2019. - vol. 104. - №1. - pp. 25-34.

138. Rajee, M. M. Epigenetic regulation of BMP2 gene in osteoporosis: a DNA methylation study / M. M. Rajee, R. Ashma // *Molecular Biology Reports*. - 2019. - vol. 46. - № 2. - pp. 1667-1674.

139. Reagan, M. R. Dynamic interplay between bone and multiple myeloma: Emerging roles of the osteoblast / M. R. Reagan, L. Liaw, C. J. Rosen, I. M. Ghobrial // *Bone*. - 2015. - vol. 75. - pp. 161-169.

140. Ríus, C. Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 / C. Ríus, J. D. Smith, N. Almendro, C. Langa, L. M. Botella, D. A. Marchuk, C. P. Vary, C. Bernabéu // *Blood*. - 1998. - № 12 (92). - pp. 4677-4690.

141. Roebuck, K. A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression / K. A. Roebuck, A. Finnegan // *Journal of Leukocyte Biology*. - 1999. - vol. 66. - № 6. - pp. 876-888.

142. Rosenwald, A. The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma / A. Rosenwald, G. Wright, W. C. Chan, J. Connors, E. Campo, R. Fisher, R. Gascoyne, H. K. Muller-Hermelink, E. Smeland, J. Giltane, E. Hurt, H. Zhao, L. Averett, L. Yang, W. Wilson, E. Jaffe, R. Simon, R. Klausner, J. Powell, P. Duffey, D. Longo, T. Greiner, D. Weisenburger, W. Sanger, B. Dave, J. Lynch, J. Vose, J. Armitage, E. Montserrat, A. López-Guillermo, T. Grogan, T. Miller, Michel Leblanc, G. Ott, S. Kvaløy, J. Delabie, H. Holte, Peter Krajci, T. Stokke, L. Staudt // *New England Journal of Medicine*. - 2002. - vol. 346. - № 25. - pp. 1937-1947.

143. Ruiz-Gómez, G. Glycosaminoglycans influence enzyme activity of MMP2 and MMP2/TIMP3 complex formation - Insights at cellular and molecular level / G. Ruiz-Gómez, S. Vogel, S. Möller, M. T. Pisabarro, U. Hempel // *Scientific Reports*. - 2019. - vol. 9. - № 1. - p. 4905.

144. Sargent, J. T. S. Haematological emergencies managing hypercalcaemia in adults and children with haematological disorders: State of the art review / J. T. S. Sargent, O. P. Smith // *British Journal of Haematology*. - 2010. - vol. 149. - № 4. - pp. 465-477.

145. Schmits, R. The Best Treatment for Diffuse Large B-cell Lymphoma: A German Perspective / R. Schmits, S. Norbert, M. Pfreundschuh // *Oncology*. - 2005. - pp. 16-25.

146. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell / R. Schofield // *Blood Cells*. - 1978. - vol. 4. - №1-2. - pp. 7-25.
147. Schroeder, T., Geyh, S., Germing, U., Haas, R. Mesenchymal stromal cells in myeloid malignancies. // *Blood research*. 2016. № 4 (51). C. 225-232.
148. Sehn, L. H. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity / L. H. Sehn, R. D. Gascoyne // *Blood*. - 2015. - vol. 125. -№ 1. - pp. 22-32.
149. Shalapur, S. Leukemia-associated genetic aberrations in mesenchymal stem cells of children with acute lymphoblastic leukemia / S. Shalapur, C. Eckert, K. Seeger, M. Pfau, J. Prada, G. Henze, T. Blankenstein, T. Kammertoens // *Journal of molecular medicine*. - 2010. - vol. 88. - № 3. - pp. 249-265.
150. Sharma, N. Hypercalcaemia with radiographic abnormalities in chronic myeloid leukaemia / N.Sharma // *Postgraduate Medical Journal*. - 1998. - vol. 74. - № 871. - pp. 301-303.
151. Shipounova, I. N. Alterations 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*. - 2009. - vol. 2. - № 1. - pp. 67-74.
152. 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. - p. e1000153
153. 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. - pp. 408-417.
154. Shipounova, I. N. Alterations in multipotent mesenchymal stromal cells from the bone marrow of acute myeloid leukemia patients at diagnosis and during treatment /

I. N. Shipounova, N. A. Petinati, A. E. Bigildeev, T. V Sorokina, L. A. Kuzmina, E. N. Parovichnikova, V. G. Savchenko // *Leukemia & lymphoma*. - 2019. - vol. 60. - №8. - pp. 2042-2049.

155. Shipp, V. F. Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma / V. F. Shipp, D. P. Harrington // *New England Journal of Medicine*. - 1993. - vol. 329. - № 14. - pp. 987-994.

156. Singh, P. CXCR4 expression in the bone marrow microenvironment is required for hematopoietic stem and progenitor cell maintenance and early hematopoietic regeneration after myeloablation / P. Singh, K. S. Mohammad, L. M. Pelus // *Stem Cells*. - 2020. - vol. 38. - № 7. pp. 849-859.

157. Soliman, A. H. Diagnostic and Prognostic Relevance of Bone Marrow Microenvironment Components in Non-Hodgkin's Lymphoma Cases Before and After Therapy / A. H. Soliman // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*. . - 2016. - vol. 17. - №12. - p. 5273.

158. Soltanoff, C. S. Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells / C. S. Soltanoff, S. Yang, W. Chen, Y.-P. Li // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr*. - 2009. - vol. 19. - №1. - pp. 1-46.

159. Somaiah, C. Mesenchymal stem cells show functional defect and decreased anti-cancer effect after exposure to chemotherapeutic drugs / C. Somaiah, A. Kumar, R. Sharma, A. Sharma, T. Anand, J. Bhattacharyya, D., Das, S. Deka Talukdar, B. G. Jaganathan // *Journal of Biomedical Science*. - 2018. - vol. 25. - №1. - p. 5.

160. Song, L.-X. Cytogenetic abnormalities in bone marrow mesenchymal stem cells from patients with myelodysplastic syndrome / L.-X. Song, J. Guo, Q. He, F. Xu, L.-P. Yang, X. Li, C.-K. Chang // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. Chinese Association of Pathophysiology. - 2011. - vol. 19. - №2. - pp. 372-378.

161. Spetsieris, N. Isolated skeletal muscle recurrence of an originally nodal diffuse large B cell lymphoma / N. Spetsieris, N. Giannakopoulou, E. Variami, K. Zervakis, N. Rougala, G. Garefalakis, V. Skarlatou, N.-A. Viniou, P. Diamantopoulos // *Medicine*. - 2018. - vol. 97. - № 3. p. e9608.

162. Stiff, P. J. Autologous Transplantation as Consolidation for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma / P. J. Stiff*, J. M. Unger, J. R. Cook, L. S. Constine, S. Couban, D. A. Stewart, T. C. Shea, P. Porcu, J. N. Winter, B. S. Kahl, T. P. Miller, R. R. Tubbs, D. Marcellus, J. W. Friedberg, K. P. Barton, G. M. Mills, M. LeBlanc, L. M. Rimsza, S. J. Forman, R. I. Fisher // *New England Journal of Medicine*. - 2013. - vol. 369. - № 18. - pp. 1681-1690.

163. Sui, L. Relationships between VEGF protein expression and pathological characteristics of diffuse large B cell lymphoma: a meta-analysis / L. Sui, K. Liu, W. Shen, L. Zhang // *Tumor Biology*. - 2014. - vol. 35. - № 9. - pp. 9085-9093.

164. Svendsen, P. R-CHOP (-like) treatment of diffuse large B-cell lymphoma significantly reduces CT-assessed vertebral bone density: a single center study of 111 patients / P. Svendsen, N. Shekhrjka, K. L. Nielsen, P. Vestergaard, M. Ø. Poulsen, A. K. Vistisen, P. S. Munksgaard, M. T. Severinsen, P. Jensen, H. E. Johnsen, L. H. Jakobsen, M. Bøgsted, J. B. Frøkjær, T. C. El-Galaly // *Leukemia and Lymphoma*. - 2017. - vol. 58. - № 5. - pp. 1105-1113.

165. Swerdlow, S. H. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / S. H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, D. A. Arber, R. P. Hasserjian, M. M. L. Beau, A. Orazi, R. Siebert // International Agency for Research on Cancer, edited by Swerdlow, S. H., Lyon. - 2017. - pp. 291-297.

166. Tao, Y. SMURF1 promotes the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells / Y. Tao, C. Sun, Z. Tao, S. Yan // *Oncology Reports*. - 2017. - vol. 38. - № 3. - pp. 1806-1814.

167. Thieblemont, C. The germinal center/activated B-cell subclassification has a prognostic impact for response to salvage therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a bio-CORAL study / C. Thieblemont, J. Briere, N. Mounier, H-U. Voelker, W. Cuccuini, E. Hirsch, A. Rosenwald, A. Jack, C. Sundstrom, S. Cogliatti, P. Trougouboff, L. Boudova, L. Ysebaert, J. Soulier, C. Chevalier, D. Bron, N. Schmitz, P. Gaulard, R. Houlgatte, C. Gisselbrecht // *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. - 2011. - vol. 29. - № 31. - pp. 4079-4087.

168. Twa, D. D. W. The pathobiology of primary testicular diffuse large B-cell lymphoma: Implications for novel therapies / D. D. W. Twa, A. Mottok, K. J. Savage, C. Steidl // *Blood Reviews*. - 2018. - vol. 32. - № 3. - pp. 249-255.

169. Valencia, J. M. Acute lymphoblastic leukaemia cells impair dendritic cell and macrophage differentiation: role of BMP4 / J. M. Valencia, L. Fernández-Sevilla, A. Fraile-Ramos, R. Sacedón, E. Jiménez, A. Vicente, A. Varas // *Cells*. - 2019. - vol. 8. - № 7. - p. 722.

170. Veiga, J. P. Leukemia-stimulated bone marrow endothelium promotes leukemia cell survival / J. P. Veiga, L. F. Costa, S. E. Allan, L. M. Nadler, A. A. Cardoso // *Experimental Hematology*. - 2006. - 34. - № 5. - pp. 610-621.

171. Vermeulen, R. Pre-diagnostic blood immune markers, incidence and progression of B-cell lymphoma and multiple myeloma: Univariate and functionally informed multivariate analyses / R. Vermeulen, F. S. Hosnijeh, B. Bodinier, L. Portengen, B. Liqueur, J. Garrido-Manriquez, H. Lokhorst, I. A. Bergdahl, S. A. Kyrtopoulos, A-S. Johansson, P. Georgiadis, B. Melin, D. Palli, V. Krogh, S. P., C. Sacerdote, R. Tumino, P. Vineis, R. Castagné, M. Chadeau-Hyam, M. Botsivali, A. Chatziioannou, I. Valavanis, J. C. S. Kleinjans, T. M. C. M. de Kok, H. C. Keun, T. J. Athersuch, R. Kelly, P. Lenner, G. Hallmans, E. G. Stephanou, A. Myridakis, M. Kogevinas, L. Fazzo, M. De Santis, P. Comba, B. Bendinelli, H. Kiviranta, P. Rantakokko, R. Airaksinen, P. Ruokojarvi, M. Gilthorpe, S. Fleming, T. Fleming, Y-K Tu, T. Lundh, K-L. Chien, W. J. Chen, W-C. Lee, C. K. Hsiao, Po-Hsiu Kuo, H. Hung, S-F. Liao // *International Journal of Cancer*. - 2018. - vol. 143. - № 6. - pp. 1335-1347.

172. Vicente López, Á. Mesenchymal stromal cells derived from the bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients show altered BMP4 production: correlations with the course of disease / Á. Vicente López, M. N. Vázquez García, G. J. Melen, A. Entrena Martínez, I. Cubillo Moreno, J. García-Castro, M. R. Orellana, A. G. Z. González // *PLoS One*. - 2014. - vol. 9. - №1. - p. e84496.

173. Visconte, V. Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease / V. Visconte, R. V Tiu, H. J. Rogers // *Blood research*. - 2014. - vol. 49. - № 4. - pp. 216-227.

174. Vitolo, U. Obinutuzumab or Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma / U. Vitolo, M. T. Trněný, D. Belada, J. M. Burke, A. M. Carella, N. Chua, P. Abrisqueta, J. Demeter, I. Flinn, X. Hong, S. Kim, A. Pinto, Y.-K. Shi, Y. Tatsumi, M. Z. Oestergaard, M. Wenger, G. Fingerle-Rowson, O. Catalani, T. Nielsen, M. Martelli, L. H. Sehn // *Journal of clinical oncology* // - 2017. - №35. pp. 3529-3537.

175. Wang, H. Q. Increased autocrine interleukin-6 production is significantly associated with worse clinical outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia / H. Q. Wang, L. Jia, Y. T. Li, T. Farren, S. G. Agrawal, F. T. Liu // *Journal of Cellular Physiology*. - 2019. - vol. 234. - № 8. - pp. 13994-14006.

176. Wang, Y. Prognostic value of osteopontin expression in esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis / Y. Wang, Y. Lu, W. Xu, Y. Wang, Y. Wu, G. Che // *Pathology Research and Practice*. - 2019. - vol. 215. - № 10. - p. 152571.

177. Wei, E. X. Pediatric pulmonary Epstein-Barr virus-positive Diffuse Large B-cell lymphoma: a case report and review of the literature / E. X. Wei, R. F. Silva, J. D. Cotelingam, R. E. Shackelford // *Case reports in pathology*. - 2017. - pp. 8946807.

178. Weilbaecher, K. N. Cancer to bone: a fatal attraction / K. N. Weilbaecher, T. A. Guise, L. K. McCauley // *Nature Reviews Cancer*. - 2011. - vol. 11. - № 6. - pp. 411-425.

179. Weinstein, R. S. Clinical practice. Glucocorticoid-induced bone disease / R. S. Weinstein // *The New England journal of medicine*. - 2011. - vol. 1. - № 365. - pp. 62-70.

180. Wilder, R. B. International prognostic index-based outcomes for diffuse large B-cell lymphomas / R. B. Wilder, M. A. Rodriguez, L. J. Medeiros, S. L. Tucker, C. S. Ha, J. E. Romaguera, B. Pro, M. A. Hess, F. Cabanillas, J. D. Cox // *Cancer*. - 2002. - vol. 94. - № 12. - pp. 3083-3088.

181. Wilkie, A. O. M. FGFs, their receptors, and human limb malformations: Clinical and molecular correlations / A. O. M. Wilkie, S. J. Patey, S. Kan, A. M. W. van den Ouweland, B. C. J. Hamel // *American Journal of Medical Genetics*. - 2002. - vol. 112. - № 3. - pp. 266-278.

182. Wilson, W.H. Dose-adjusted EPOCH chemotherapy for untreated large B-cell lymphomas: a pharmacodynamic approach with high efficacy / W.H. Wilson, M.L. Grossbard, P. S. Pittaluga, D. Cole, D. Pearson [et al.] // *Blood*. - 2002. - №99. - pp. 2685-2693.

183. Wilson, W.H. Phase II Study of Dose-Adjusted EPOCH and Rituximab in Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma With Analysis of Germinal Center and Post-Germinal Center Biomarkers / W.H. Wilson, K. Dunleavy, S. Pittaluga [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. - 2008. - T.26. - №16. - pp. 2717-2724.

184. Xiang, J. HTLV-1 viral oncogene HBZ drives bone destruction in adult T cell leukemia / J. Xiang, D. A. Rauch, D. D. Huey, A. R. Panfil, X. Cheng, A. K. Esser, X. Su, J. C. Harding, Y. Xu, G. C. Fox, F. Fontana, T. Kobayashi, J. Su, H. Sundaramoorthi, W. H. Wong, Y. Jia, T. J. Rosol, D. J. Veis, P. L. Green, S. Niewiesk, L. Ratner, K. N. Weilbaecher // *JCI Insight*. - 2019. - vol. 4. - № 19. - p. e128713.

185. Yahata, T. TGF- β -induced intracellular PAI-1 is responsible for retaining hematopoietic stem cells in the niche / T. Yahata, A. A. Ibrahim, Y. Muguruma, M. Eren, A. M. Shaffer, N. Watanabe, S. Kaneko, T. Nakabayashi, T. Dan, N. Hirayama, D. E. Vaughan, T. Miyata, K. Ando // *Blood*. - 2017. - vol. 130. - № 21. - pp. 2283-2294.

186. Yu, W. J. Prognostic significance of proteins expression by immunohistochemical method in diffuse large B cell lymphoma / W. J. Yu, L. H. Cao, J. H. Wang, Z. M. Wang, W. B. Qian, H. Y. Tong, H. T. Meng, W. Y. Mai, L. P. Mao, J. J. Qian, J. Jin // *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. - 2017. - vol. 38. - № 9. - pp. 784-788.

187. Yuan, Q. Elevated VEGF levels contribute to the pathogenesis of osteoarthritis / Q. Yuan, L. Sun, J. Li, C. An // *BMC Musculoskeletal Disorders*. - 2014. - vol. 15. - № 1. - p.e437.

188. Zhang, H. Hyaluronan-mediated motility receptor confers resistance to chemotherapy via TGF β /Smad2-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer / H. Zhang, L. Ren, Y. Ding, F. Li, X. Chen, Y. Ouyang, Y. Zhang, D. Zhang // *FASEB Journal*. - 2019. - vol. 33. - № 5. - pp. 6365-6377.

189. Zhang, Q. Association between interleukin-8 gene -251 A/T polymorphism and the risk of coronary artery disease: A meta-analysis / Q. Zhang, Z. Lian, W. Zhang,

Y. Cui, Wang, W., J.Wu, Z. Chen, W. Wang // *Medicine*. - 2019. - vol. 98. - № 48. - p. e17866.

190. Zhang, W. The role of intercellular adhesion molecule-1 in binding of acute myeloid leukemic blasts cells to human umbilical vein endothelial cells / W. Zhang, Z. Qiao, X. Fan, X. Zhang, D.-Q. Li // *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. - 2003. - vol. 6. - №42. - pp. 413-416.

191. Zhao, Z.-G. Phenotypic and functional comparison of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of normal adults and patients with hematologic malignant diseases / Z.-G. Zhao, Y. Liang, K. Li, W.-M. Li, Q.-B. Li, Z.-C. Chen, P. Zou // *Stem cells and development*. - 2007. - vol.16. - № 4. - pp. 637-648.

192. Zhong, W. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote the growth and drug-resistance of diffuse large B-cell lymphoma by secreting IL-6 and elevating IL-17A levels / W. Zhong, Z. Zhu, X. Xu, H. Zhang, H. Xiong, Q. Li, Y. Wei // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. - 2019. - vol. 38. - № 1. - p. 73.

Приложение А

Программа R-DA-EPOCH-21:

- ритуксимаб 375 мг/м²— 0 день,
- этопозид 50 мг/м²/сутки непрерывно 24 часа, 1—4 день,
- доксорубин 10 мг/м²/сутки непрерывно 24 часа, 1—4 день,
- винкристин 0,4 мг/м²/сутки непрерывно 24 часа, 1—4 день,
- преднизолон 60 мг/м² 2 раза в сутки внутрь 1—5 день,
- циклофосфан 750 мг/м² внутривенно в 5 день.

Следующий цикл проводится на 22 день. Коррекция доз химиопрепаратов в программе R-DA-EPOCH-21 осуществляется в зависимости от индивидуальной токсичности (NCT00001337).

Программа R-mNHL-BFM-90:

Блок А:

- Ритуксимаб 375 мг/м² внутривенно 0 день,
- Ифосфамид 800 мг/м² внутривенно 1–5 день,
- Метотрексат 1000мг/м² внутривенно в течение 12 часов 1день,
- Винкристин 2мг внутривенно струйно 1день,
- Доксорубин 25мг/м² внутривенно 1–2 день,
- Цитарабин 100мг/м² внутривенно 2 раза в день 4–5 день,
- Этопозид 100мг/м² внутривенно 1 раз в день 4–5 день,
- Дексаметазон 10мг/м² внутривенно 1–5 день.

Блок В:

- Ритуксимаб 375 мг/м² внутривенно 0 день,
- Циклофосфамид 200 мг/м² внутривенно 1–5 день,
- Метотрексат 1000 мг/м² внутривенно в течение 12 часов, 1 день
- Винкристин 2 мг внутривенно 1 день,

- Доксорубин 25 мг/м² внутривенно, 4–5 день,
- Дексаметазон 10 мг/м² внутривенно 1–5 день.

Следующий цикл проводился на 22 день от начала предыдущего курса.

Курсы химиотерапии ротируются между собой.

Кондиционирование в режиме SEAM:

- Ритуксимаб 375 мг/м² внутривенно 0 день,
- Ломустин 200 мг/м² внутрь 1 день,
- Этопозид 150 мг/м² внутривенно 2 раза в день, 2–5 сутки,
- Цитарабин 200 мг/м² внутривенно 2 раза в день, 2–5 сутки,
- Мелфалан 140 мг/м² внутривенно, 6 день,
- аутоТСКК не менее 2,0 млн. CD34+ клеток/кг 7 день.

Программа R-CHOP-21:

- Ритуксимаб 375 мг/м² внутривенно в 0 день,
- Циклофосфамид 750 мг/м² внутривенно в 1 день,
- Доксорубин 50 мг/м² внутривенно в 1 день,
- Винкристин 2 мг внутривенно в 1 день,
- Преднизолон – 100 мг внутривенно или перорально 1–5 день.

Следующий цикл проводится на 22 день от начала предыдущего курса.