

*На правах рукописи*

**ДОРОФЕЕВА АЛЕНА ИГОРЕВНА**

**СТРОМАЛЬНЫЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ ИЗ КОСТНОГО  
МОЗГА ПРИ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ**

3.1.28. – Гематология и переливание крови

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2023

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

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук

**Шипунова Ирина Николаевна**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, доцент

**Андреева Елена Ромуальдовна**

ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук

доктор биологических наук

**Мартынкевич Ирина Степановна**

руководитель научно-исследовательского Центра клеточной и молекулярной патологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» Федерального медико-биологического агентства

**Ведущая организация:**

Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 года в \_\_\_\_\_ часов  
на заседании диссертационного совета 21.1.023.02 (Д 208.135.03) при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте [www.blood.ru](http://www.blood.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук

**Сысоева Елена Павловна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Кроветворение у человека происходит в костном мозге (КМ) при тесном взаимодействии стволовой кроветворной клетки (СКК) и кроветворного микроокружения (Méndez-Ferrer et al., 2010). Кроветворное микроокружение представляет собой совокупность клеток, внеклеточного матрикса, а также растворимых факторов, регулирующих процессы пролиферации и дифференцировки СКК (Wang, Wagers, 2011). Мезенхимные стволовые клетки (МСК) – один из основных компонентов кроветворного микроокружения. МСК характеризуются экспрессией гена промежуточного филамента нестина (*NES*), локализуются в нишах КМ вблизи СКК и поддерживают кроветворение при помощи сигнальных молекул, среди которых фактор 1, выделенный из стромальных клеток (*CXCL12*), фактор стволовых клеток (*KITLG*), остеопонтин (*SPP1*), ангиопоэтин-1 (*ANGPT1*) и васкулярная молекула клеточной адгезии 1 (*VCAM1*) (Méndez-Ferrer et al., 2010). МСК обладают высоким пролиферативным потенциалом и образуют кроветворную территорию при формировании очага эктопического кроветворения под капсулой почки у мышей (Chertkov, Gurevitch, 1984). Регуляция пролиферации МСК осуществляется при активации сигнальных путей с участием фактора роста фибробластов (*FGF*), фактора роста, выделенного из тромбоцитов (*PDGF*), и трансформирующего фактора роста бета (*TGF-β*) (Ng et al., 2008). МСК – это мультипотентные клетки, способные к дифференцировке в стромальные клетки мезенхимного происхождения (Dominici et al., 2006). МСК взаимодействуют с компонентами врожденного и приобретенного иммунитета и регулируют иммунный ответ посредством продукции белков, участвующих в иммуномодуляции: *TGF-β*, интерлейкина-10 (ИЛ-10), индоламин 2,3-диоксигеназы 1 (ИДО-1), лиганда рецептора программируемой гибели (PD-L1, или CD274), фактора комплемента Н (CFH) и др. (Augello et al., 2005; Mattar, Vieback, 2015; Tu et al., 2010). В культуре выделяют два типа стромальных предшественников: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) и колониобразующие единицы фибробластов (КОЕф).

Известно, что патогенез ряда гематологических заболеваний (например, острый миелоидный лейкоз, хронический миелолейкоз, множественная миелома, миелодиспластический синдром и др.) связан с нарушением функционирования стромальных предшественников (Manier et al., 2012; Medyouf, 2017).

Апластическая анемия (АА) – это редкое заболевание, при котором происходит снижение продукции клеточных элементов крови в результате уменьшения количества и нарушения функционирования СКК в КМ (Luzzatto, Risitano, 2018). По степени выраженности цитопении выделяют нетяжелую АА (НАА), тяжелую АА (ТАА) и сверхтяжелую АА (СТАА) (Camitta et al., 1982). Хотя для большинства больных АА подтвержден аутоиммунный механизм развития аплазии КМ, детали патогенеза остаются неизвестными. По-прежнему остается открытым вопрос, отличаются ли механизмы развития аплазии КМ у больных с разными формами заболевания. Также до сих пор неясно, почему не во всех случаях удается достичь полного ответа на иммуносупрессивную терапию. Возможно, изучение особенностей стромальных предшественников из КМ больных АА позволит получить ответы на данные вопросы и определить роль кроветворного микроокружения в развитии аплазии при данном заболевании.

### **Цель исследования**

Охарактеризовать стромальные предшественники из костного мозга больных апластической анемией в дебюте при разных формах заболевания.

### **Задачи исследования**

1. Проанализировать функциональные характеристики стромальных предшественников из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров (определить концентрацию колониобразующих единиц фибробластов, пролиферативный, дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, а также их способность к поддержанию кроветворных предшественников).

2. Определить скорость пролиферации мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из костного мозга больных апластической анемией при разных формах заболевания.

3. Выявить различия в экспрессии генов в колониеобразующих единицах фибробластов по сравнению с мультипотентными мезенхимными стромальными клетками из костного мозга здоровых доноров.

4. Сравнить уровень экспрессии генов, ассоциированных с пролиферацией (*FGF2*, *TGFB1*, *TGFB2*, *VEGFA*, *FGFR1*, *FGFR2*, *PDGFRA*, *PDGFRB*, *ИЛ-1P1*, *MYC*), дифференцировкой (*FABP4*, *PPARG*, *ALPL*, *PTH1R*), иммуномодуляцией (*CFH*, *ИЛ-1 $\beta$* , *ИДО-1*, *CD274*, *ИЛ-10*, *HLA-DRA*, *ИЛ-4P*), регуляцией кроветворения (*ANGPT1*, *CXCL12*, *VCAM1*, *SPP1*, *KITLG*), а также маркера наиболее ранних мезенхимных клеток (*NES*) в стромальных предшественниках, полученных из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров.

5. Определить различия между формами апластической анемии на уровне экспрессии генов в костномозговых стромальных предшественниках.

6. Сравнить профиль экспрессии генов в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках и колониеобразующих единицах фибробластов из костного мозга больных апластической анемией разной степени тяжести.

### **Научная новизна**

Разнообразие функциональных методов одновременного исследования двух типов стромальных предшественников в сочетании с молекулярно-биологическими подходами, а также размер проанализированных выборок являются уникальными для исследований АА.

Впервые показано, что компартмент костномозговых стромальных предшественников принципиально различается при НАА и в группе, включающей ТАА и СТАА (ТАА+СТАА). Выявлены изменения свойств стромальных предшественников, отличающихся по степени зрелости, в условиях аплазии КМ, что имеет важное значение для понимания фундаментальных принципов организации кроветворного микроокружения.

### **Практическая значимость**

Результаты исследования указывают на различия между формами АА на уровне стромального микроокружения КМ, что может быть использовано в дальнейшем для разработки дополнительных дифференциальных терапевтических

подходов, направленных на увеличение эффективности стандартных методов лечения АА.

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

1. Концентрация КОЕф, а также пролиферативный, дифференцировочный потенциал ММСК и их способность к поддержанию кроветворных предшественников при АА сохранены. ММСК пациентов с НАА отличаются от ММСК здоровых доноров снижением скорости пролиферации, а также повышением способности к поддержанию ранних кроветворных предшественников.

2. Уровень экспрессии генов, ассоциированных с пролиферацией, регуляцией кроветворения и иммуномодуляцией, в стромальных предшественниках из КМ больных АА изменен по сравнению со значениями доноров.

3. Отличия в профиле экспрессии генов в ММСК и КОЕф из КМ больных НАА и ТАА+СТАА указывают на различия в механизмах развития аплазии при данных формах заболевания.

### **Апробация**

Результаты работы представлены в материалах и докладах на V, VI Конгрессе гематологов России в 2020, 2022 г. (Москва), на V Национальном конгрессе по регенеративной медицине в 2022 г. (Москва), на XXIV съезде Физиологического Общества им. И.П. Павлова в 2023 г. (Санкт-Петербург), на международном конгрессе ЕНА в 2019 г. (Амстердам), на международном конгрессе ЕНА в 2020, 2021, 2022, 2023 г. (онлайн), на международном конгрессе ASH в 2020, 2021 г. (онлайн).

Апробация диссертации состоялась 30 октября 2023 года на заседании проблемной комиссии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России «Фундаментальные и клинические исследования в гематологии» (протокол № 11).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Российской

Федерации для публикации результатов диссертационных исследований и индексируемых в реферативных базах Scopus и Web of Science.

### **Объем и структура работы**

Диссертация содержит главы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений и условных обозначений», «Список литературы» и «Приложения А-Г». Работа изложена на 141 странице машинописного текста и включает 18 рисунков и 8 таблиц. Список литературы содержит 253 источника, из них 14 отечественных.

### **Личный вклад автора**

Автор лично участвовал в формировании цели и задач исследования, в составлении дизайна исследования, непосредственно выполнял экспериментальную часть, проводил обработку и интерпретацию результатов, подготовку печатных работ, а также представлял полученные данные на российских и международных конференциях.

### **Благодарности**

Автор выражает искреннюю благодарность И.Н. Шипуновой за руководство на протяжении всего времени выполнения исследования и Е.А. Михайловой за наставничество и помощь на всех этапах работы. Также автор благодарит Н.И. Дризе за ценные советы и замечания. Автор признателен З.Т. Фидаровой и А.В. Лучкину за проявленный интерес и участие в исследовании. Автор благодарит И.В. Гальцеву, Н.М. Капранова, Ю.О. Давыдову и К.А. Никифорову за предоставленную возможность проведения иммунофенотипического анализа. Автор благодарит коллектив отделения химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с блоком трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток (зав. отделением З.Т. Фидарова) и отделения химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток (зав. отделением Л.А. Кузьмина). Автор выражает благодарность всем сотрудникам лаборатории физиологии кроветворения и лаборатории генной инженерии за моральную поддержку.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Доноры костного мозга и больные апластической анемией

Образцы костного мозга 43 больных апластической анемией с впервые установленным диагнозом и 31 здорового донора для трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток были получены после подписания информированного согласия и предоставлены сотрудниками отделения химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с блоком трансплантация костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (заведующая отделением к.м.н. Кузьмина Л. А.).

Диагностика АА проведена в соответствии с критериями, используемыми в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Общая характеристика групп больных АА и доноров представлена в Таблице 1. Группы больных НАА, ТАА и здоровых доноров не отличались по полу и возрасту. Группа больных СТАА была малочисленной и состояла только из мужчин, поэтому при статистической обработке данных была объединена с группой больных ТАА (ТАА+СТАА).

Таблица 1 – Общая характеристика групп больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров, включенных в исследование

Группа	Доноры	НАА	ТАА	СТАА
Число	31	22	16	5
Пол (мужчины/женщины)	17/14	11/11	8/8	5/0
Возраст, лет Медиана (диапазон)	29 (14-61)	31 (21-51)	27 (18-63)	26 (19-28)

### **Выделение и культивирование стромальных предшественников из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров**

#### Получение суспензии мононуклеаров из КМ больных АА и здоровых доноров

Для того, чтобы выделить мононуклеары, к образцу КМ добавляли равный объем среды  $\alpha$ MEM (ICN), содержащей 0,2 % метилцеллюлозы (плотность 1500 сП, Sigma), затем инкубировали 40 минут при комнатной температуре. После этого отбирали надосадочную фракцию, которую после анализа концентрации клеток центрифугировали. Осадок ресуспендировали в стандартной питательной среде



$\alpha$ MEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone), 2 mM глутамин (ICN), 100 ед./мл пенициллина (Ферейн) и 50 мкг/мл стрептомицина (Ферейн).

### Получение ММСК

Для выделения культуры ММСК  $3,0 \times 10^6$  мононуклеаров КМ высаживали во флакон (25 см<sup>2</sup>) в стандартной питательной среде  $\alpha$ MEM. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, проводя смену среды каждые 3-4 дня. При достижении конfluence ММСК пассировали, определяли их количество и высаживали по  $1,0 \times 10^5$  клеток на флакон. Первое пассирование обозначали как П0, при каждом последующем пассировании номер пассажа увеличивался соответственно. Культуру ММСК поддерживали до достижения П3, после чего замораживали.

### Анализ КОЕф

Для получения колоний КОЕф  $1,0 \times 10^6$  мононуклеаров КМ высаживали во флакон (25 см<sup>2</sup>) в среде  $\alpha$ MEM, содержащей 20% ЭТС, 2 mM глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 14 дней без смены среды. Затем часть флаконов использовали для выделения тотальной РНК с последующим анализом относительного уровня экспрессии (ОУЭ) генов, а в других определяли количество колоний после окрашивания 0,1 %-м раствором кристаллвиолета на 20 %-м метаноле (Реахим) и рассчитывали концентрацию КОЕф в 1 млн суспензии мононуклеаров КМ.

## **Методы анализа стромальных предшественников**

### Анализ пролиферативных характеристик ММСК

При анализе пролиферативных свойств ММСК определяли время от инициации культуры ММСК до П0 (время до П0), суммарную клеточную продукцию до П3 и среднее время удвоения популяции от П0 до П3.

### Анализ дифференцировочного потенциала ММСК

Анализ дифференцировочного потенциала ММСК больных АА и здоровых доноров проводили на П2. Среда для индукции остеогенной дифференцировки содержала 0,1 мкМ дексаметазона (Sigma), 0,15 mM 2-фосфата аскорбиновой кислоты тринатриевой соли (Sigma) и 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma), среда для индукции

адипогенной дифференцировки – 1 мкМ дексаметазона (Sigma), 60 мкМ индометацина (Sigma) и 5 мкг/мл инсулина (Sigma). Смену соответствующей среды проводили через каждые 3-4 дня. Клетки инкубировали в течение 14 дней в при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, после чего проводили анализ экспрессии маркерных генов остеогенной (*ALPL*, *PTH1R*) и адипогенной дифференцировки (*FABP4*, *PPARG*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

#### Анализ способности ММСК к поддержанию кроветворных предшественников

Способность ММСК больных АА и здоровых доноров к поддержанию кроветворных предшественников определяли с помощью метода, предложенного Р. Е. Пломахером (Ploemacher et al., 1991). Для этого в ячейки 96-луночной платы, предварительно обработанные 0,1 % желатином (Sigma), высаживали по  $1,0 \times 10^3$  тестируемых ММСК (П1-П4) в стандартной питательной среде. На следующий день среду отбирали, а в ячейки с ММСК высевали мононуклеары КМ одного и того же здорового донора в 4 последовательных разведениях (60; 30; 15;  $7,5 \times 10^3$  клеток на лунку) в среде  $\alpha$ MEM, содержащей 10 % ЭТС, 10 % лошадиной сыворотки (Gibco-BRL), 2 мМ L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и  $10^{-6}$ М гидрокортизона (Sigma). Клетки инкубировали при 33°C и 5% CO<sub>2</sub>, еженедельно осуществляя смену половины объема питательной среды. Через 7 и 28 дней определяли количество ячеек платы, не содержащих характерных скоплений клеток, напоминающих булыжную мостовую, обозначаемых КООБ7 и КООБ28, соответственно. Частоту встречаемости КООБ7 (поздние кроветворные предшественники) и КООБ28 (ранние кроветворные предшественники) определяли по методике, описанной ранее (Нифонтова и др., 2003).

#### **Анализ относительного уровня экспрессии генов**

Для определения ОУЭ генов из клеток выделяли тотальную РНК, которую использовали в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи ДНК в реакции обратной транскрипции с последующим анализом методом ПЦР в реальном времени в модификации Taqman. Последовательности праймеров и флуоресцентных зондов были подобраны сотрудниками лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ «НМИЦ гематологи» Минздрава России. Для обработки

данных применяли метод, предложенный Т. Шмиттгеном и К. Ливаком (Schmittgen, Livak, 2008). Нормализацию значений ОУЭ проводили с использованием в качестве референсных генов *GAPDH* и *ACTB*.

### **Статистическая обработка данных**

В зависимости от характера распределения данных для оценки значимости различий использовали t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна-Уитни в случае непарных сравнений, парный t-критерий Стьюдента и тест Уилкоксона при парных сравнениях. Статистически достоверными считали отличия при  $p < 0,05$ . Результаты представляли как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Концентрация КОЕф в костном мозге больных апластической анемией и здоровых доноров**

При анализе концентрации КОЕф в КМ больных НАА, ТАА+СТАА и здоровых доноров не выявлено достоверных различий между группами ( $27,2 \pm 11,2$ ;  $34,9 \pm 15,0$ ;  $25,4 \pm 6,6$  на  $10^6$  мононуклеаров КМ, соответственно). Отсутствие значимых различий концентрации КОЕф между группами больных АА и здоровых доноров свидетельствует о том, что при АА в КМ содержится достаточное количество клоногенных стромальных предшественников, способных к построению кроветворной территории.

### **Пролиферативные свойства ММСК из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров**

Суммарная клеточная продукция ММСК не различается между группами больных НАА, ТАА+СТАА и здоровых доноров ( $21,4 \pm 5,7$ ;  $13,0 \pm 3,3$ ;  $14,5 \pm 1,9 \times 10^6$  клеток, соответственно), значит, пролиферативный потенциал ММСК при АА не изменен, и их способность к образованию кроветворной ниши полноценного размера сохранена. Однако среднее время удвоения популяции ММСК больных НАА увеличено по сравнению с донорами ( $5,9 \pm 0,8$ ;  $3,8 \pm 0,5$  дней, соответственно), что указывает на замедление пролиферации данных клеток и нарушение функционирования стромального микроокружения КМ при НАА. Среднее время удвоения популяции ММСК недостоверно повышено и в группе больных

ТАА+СТАА ( $6,0 \pm 1,0$  дней). Время до ПО достоверно увеличено в группах больных НАА и ТАА+СТАА по сравнению с донорами ( $20,5 \pm 2,3$ ;  $19,9 \pm 2,3$ ;  $13,4 \pm 0,6$  дней, соответственно), значит, для образования конфлуентного моно слоя ММСК больных АА требуется больше времени, чем ММСК здоровых доноров, что свидетельствует о нарушении функции этих клеток при АА и требует дальнейшего изучения.

### **Дифференцировочный потенциал ММСК из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров**

ММСК – полипотентные клетки взрослого организма, способные к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении (Domínicí et al., 2006). Анализ способности ММСК к дифференцировке показал, что добавление в среду инкубации индукторов остеогенной и адипогенной дифференцировки приводит к достоверному повышению экспрессии соответствующих маркерных генов в ММСК больных НАА, ТАА+СТАА и здоровых доноров (Таблица 2).

Таблица 2 – ОУЭ маркерных генов остеогенной и адипогенной дифференцировки в ММСК больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров. (контроль обозначает ОУЭ в контрольных образцах ММСК, остео, адипо – в ММСК, инкубированных с индукторами остеогенной и адипогенной дифференцировки, соответственно). \* – достоверные отличия от соответствующего контроля ( $p < 0,05$ )

Направление дифференцировки	Ген	Группа	Доноры (N=15)	НАА (N=16)	ТАА+СТАА (N=11)
Остеогенная	<i>ALPL</i>	контроль	$0,067 \pm 0,023$	$0,068 \pm 0,019$	$0,122 \pm 0,049$
		остео	$0,36 \pm 0,07$ *	$0,29 \pm 0,07$ *	$0,41 \pm 0,20$ *
	<i>PTH1R</i>	контроль	$0,030 \pm 0,006$	$0,037 \pm 0,012$	$0,037 \pm 0,029$
		остео	$0,56 \pm 0,14$ *	$1,42 \pm 0,76$ *	$0,68 \pm 0,25$ *
Адипогенная	<i>FABP4</i>	контроль	$0,0021 \pm 0,0012$	$0,0018 \pm 0,0005$	$0,0031 \pm 0,002$
		адипо	$0,30 \pm 0,13$ *	$0,74 \pm 0,32$ *	$0,40 \pm 0,19$ *
	<i>PPARG</i>	контроль	$0,16 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,02$
		адипо	$0,68 \pm 0,12$ *	$0,67 \pm 0,11$ *	$0,81 \pm 0,22$ *

При этом значимых различий между группами больных и доноров не было выявлено ни в образцах ММСК, культивированных в присутствии индуктора, ни в контрольных образцах ММСК.

Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что способность ММСК из КМ больных АА к ответу на индукцию остеогенной и адипогенной дифференцировки сохранена, их дифференцировочный потенциал не изменен. Известно, что развитие АА сопровождается замещением кроветворной ткани на жировую и нарушением функционирования остеобластной ниши (Medinger et al., 2018; Wu et al., 2017). Считалось, что данные изменения могут возникать в результате изменения дифференцировочного потенциала стромальных предшественников КМ (Medinger et al., 2018). Однако полученные в настоящем исследовании результаты опровергают это предположение и указывают на сохранение дифференцировочного потенциала ММСК при АА.

#### **Способность ММСК из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров к поддержанию кроветворных предшественников**

При анализе способности ММСК к поддержанию кроветворных предшественников не было выявлено значимых различий частоты встречаемости КООБ7 между группами больных НАА, ТАА+СТАА и здоровых доноров ( $9,6 \pm 2,7$ ;  $6,7 \pm 1,8$ ;  $5,6 \pm 1,1 \times 10^5$  клеток, соответственно), что указывает на сохранение способности ММСК к поддержанию поздних кроветворных предшественников при АА. Частота встречаемости КООБ28 оказалась достоверно выше у больных НАА, чем у доноров ( $2,4 \pm 0,4$ ;  $1,1 \pm 0,3 \times 10^5$  клеток, соответственно), значит, при данной форме заболевания ММСК способны поддерживать большее число ранних кроветворных предшественников. Это может быть связано с компенсаторной активацией, направленной на сохранение СКК в нише КМ в условиях аутоиммунной атаки. Частота встречаемости КООБ28 у больных ТАА+СТАА ( $1,9 \pm 0,5 \times 10^5$  клеток) также оказалась выше, чем у доноров, однако различия недостоверны.

### Анализ относительного уровня экспрессии генов в ММСК и КОЕф из костного мозга здоровых доноров

Известно, что ММСК обладают способностью к иммуномодуляции и регуляции кроветворения, а также что КОЕф являются их потомками, однако различия между данными популяциями клеток на молекулярном уровне изучены недостаточно.

Показано, что по сравнению с ММСК в КОЕф достоверно повышена экспрессия генов *SPP1*, *CXCL12*, *KITLG*, ассоциированных с поддержанием СКК в нише КМ, а также генов *ИДО-1*, *ИЛ-1 $\beta$* , *ИЛ-10*, *CD274* и *HLA-DRA*, ассоциированных с иммуносупрессией и активацией стромальных предшественников (Таблица 3), что свидетельствует о важной и ранее не описанной роли КОЕф в регуляции кроветворения и иммуномодуляции.

Таблица 3 – ОУЭ генов в ММСК и КОЕф из КМ здоровых доноров. \* – достоверные отличия от ММСК ( $p < 0,05$ )

Функциональная группа	Ген	ММСК (N=19)	КОЕф (N=22)
Регуляция кроветворения	<i>SPP1</i>	9,3 $\pm$ 3,5	552,5 $\pm$ 168,2 *
	<i>CXCL12</i>	0,6 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2 *
	<i>KITLG</i>	0,4 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,2 *
Иммуномодуляция	<i>ИДО-1</i>	0,0006 $\pm$ 0,0006	0,002 $\pm$ 0,0004 *
	<i>ИЛ-1<math>\beta</math></i>	0,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1 *
	<i>ИЛ-10</i>	14 $\pm$ 4	123 $\pm$ 19*
	<i>CD274</i>	0,3 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1 *
	<i>HLA-DRA</i>	1,2 $\pm$ 0,3	6,1 $\pm$ 1,0 *

### Анализ относительного уровня экспрессии генов в ММСК и КОЕф из костного мозга больных апластической анемией

Анализ ОУЭ генов в стромальных предшественниках выявил достоверные различия между группами больных АА и здоровых доноров (Таблица 4).

Наиболее выраженные по сравнению с донорами изменения ОУЭ генов, ассоциированных с пролиферацией, характерны для ММСК больных НАА и для КОЕф больных ТАА+СТАА, что указывает на различия между формами

заболевания на уровне стромальных предшественников. Повышение экспрессии генов рецепторов ростовых факторов (*FGFR1*, *FGFR2*, *PDGFRA*, *PDGFRB*) в стромальных предшественниках из КМ больных АА указывает на нарушение путей передачи сигнала от соответствующих факторов роста и свидетельствует об изменении пролиферативных свойств этих клеток.

Таблица 4 – ОУЭ генов в стромальных предшественниках из КМ больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров. \* – достоверные отличия от доноров ( $p < 0,05$ ), \*\* – достоверные отличия от больных НАА ( $p < 0,05$ )

<b>Пролиферация</b>			
<b>ММСК</b>			
Ген	Доноры (N=19)	НАА (N=17)	ТАА+СТАА (N=11)
<i>FGFR1</i>	0,08±0,02	1,1±0,2 *	0,9±0,4 *
<i>FGFR2</i>	0,24±0,06	1,7±0,6 *	1,4±0,6
<i>PDGFRA</i>	0,4±0,1	1,5±0,3 *	0,7±0,1
<i>PDGFRB</i>	0,05±0,02	1,3±0,4 *	0,6±0,2 *
<b>КОЕф</b>			
Ген	Доноры (N=22)	НАА (N=17)	ТАА+СТАА (N=11)
<i>TGFB1</i>	1,2±0,1	0,9±0,2 *	0,8±0,1
<i>TGFB2</i>	0,16±0,02	0,36±0,14	0,39±0,13 *
<i>FGFR1</i>	1,2±0,1	1,1±0,2	1,7±0,1 *, **
<i>PDGFRA</i>	0,6±0,1	1,0±0,2	1,4±0,2 *
<i>PDGFRB</i>	1,0±0,2	1,8±0,4	2,5±0,5 *
<b>Маркер ранних стромальных клеток</b>			
<b>ММСК</b>			
Ген	Доноры (N=19)	НАА (N=17)	ТАА+СТАА (N=11)
<i>NES</i>	0,4±0,1	0,9±0,3	0,8±0,2 *
<b>КОЕф</b>			
Ген	Доноры (N=22)	НАА (N=17)	ТАА+СТАА (N=11)
<i>NES</i>	0,22±0,04	0,4±0,1 *	0,7±0,1 *

Продолжение таблицы 4

<b>Регуляция кроветворения</b>			
<b>ММСК</b>			
Ген	Доноры (N=19)	НАА (N=17)	ТАА+СТАА (N=11)
<i>ANGPT1</i>	2,8±0,4	2,0±0,7	0,8±0,2 *
<b>КОЕф</b>			
Ген	Доноры (N=22)	НАА (N=17)	ТАА+СТАА (N=11)
<i>KITLG</i>	1,2±0,2	2,1±0,5 *	1,8±0,3
<i>VCAM1</i>	0,18±0,05	0,4±0,2	0,4±0,1 *
<i>SPP1</i>	553±168	204±41	129±51 *
<b>Иммуномодуляция</b>			
<b>ММСК</b>			
Ген	Доноры (N=19)	НАА (N=17)	ТАА+СТАА (N=11)
<i>ИЛ-10</i>	13,8±3,8	7,3±4,4 *	6,3±2,4
<i>HLA-DRA</i>	1,2±0,3	1,7±0,9	0,5±0,3 *
<b>КОЕф</b>			
Ген	Доноры (N=22)	НАА (N=17)	ТАА+СТАА (N=11)
<i>ИЛ-1β</i>	0,4±0,1	0,4±0,1	0,11±0,03 *, **
<i>ИДО-1</i>	0,0019±0,0004	0,0032±0,0025	0,0008±0,0003 *
<i>ИЛ-10</i>	123±19	172±47	45±10 *
<i>HLA-DRA</i>	6,1±1,0	7,3±2,1	2,6±0,5 *

Экспрессия *NES* характерна для МСК, образующих нишу СКК *in vivo*. В настоящей работе показано, что *NES* экспрессируется в ММСК и КОЕф здоровых доноров и больных АА, при этом его экспрессия повышена в стромальных предшественниках больных НАА и ТАА+СТАА по сравнению с донорами. Популяция ММСК и колонии КОЕф гетерогенны (Colter et al., 2001) и состоят из клеток, различающихся по степени зрелости (Bigildeev et al., 2012; Lee et al., 2010). Повышение ОУЭ *NES* может быть связано с усилением транскрипции этого гена в популяции наиболее ранних предшественников и изменением их свойств, либо с увеличением доли этих клеток в культуре, а также в КМ больных АА. Возможно,



повышение *NES* в стромальных предшественниках больных АА носит компенсаторный характер и направлено на поддержание размера кроветворной территории в условиях аплазии.

Способность стромальных предшественников КМ к регуляции кроветворения реализуется за счет продукции факторов, необходимых для поддержания СКК в нише, таких как *CXCL12*, *KITLG*, *ANGPT1*, *SPP1*, *VCAM1* (Méndez-Ferrer et al., 2010). ММСК больных НАА достоверно не отличались от донорских по ОУЭ генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения, что согласуется с сохранением способности данных клеток к поддержанию ранних и поздних кроветворных предшественников, показанным в настоящем исследовании. Хотя ММСК больных ТАА+СТАА также сохраняют способность к поддержанию гемопоэтических предшественников, в этих клетках выявлено достоверное снижение ОУЭ *ANGPT1* по сравнению с донорами. Известно, что подавление транскрипции данного гена в стромальных клетках не влияет на функционирование СКК при гомеостазе, но стимулирует ангиогенез и восстановление гемопоэза после облучения (Zhou et al., 2015). Возможно, снижение ОУЭ *ANGPT1* в ММСК носит компенсаторный характер и направлено на стимуляцию ангиогенеза и гемопоэза в условиях аплазии КМ.

Анализ экспрессии генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения, в КОЕф больных АА показал достоверное усиление транскрипции *KITLG* при НАА по сравнению с донорами. Взаимодействие мембраносвязанного *KITLG* с рецептором С-КИТ на поверхности СКК необходимо для поддержания этих клеток в нише (Barker, 1994; Barker, 1997; Ding et al., 2012). Увеличение экспрессии *KITLG* на поверхности стромальных клеток способствует удержанию большего числа СКК в нише КМ. Возможно, повышение ОУЭ *KITLG* в КОЕф больных НАА носит компенсаторный характер и направлено на удержание большего числа СКК в нише и сохранению их в условиях аутоиммунной атаки, что препятствует развитию более выраженной аплазии, наблюдаемой при ТАА и СТАА.

В КОЕф больных ТАА+СТАА показано достоверное повышение ОУЭ *VCAM1* и снижение *SPP1* по сравнению с КОЕф здоровых доноров. *VCAM1* определяет

локализацию в нише КМ кроветворных предшественников (Papaannopoulou et al., 1995; Simmons et al., 1992). Возможно, усиление транскрипции этого гена носит компенсаторный характер и направлено на удержание гемопоэтических клеток в нише КМ. *SPP1* способствует удержанию СКК в нише, а также подавляет пролиферацию СКК, препятствуя истощению пула данных клеток в КМ. Снижение ОУЭ *SPP1* в КОЕф больных ТАА+СТАА, с одной стороны, указывает на стимуляцию пролиферации СКК в КМ при данных формах заболевания, а с другой стороны, может приводить к мобилизации этих клеток в кровотоки и истощению их пула в КМ при ТАА и СТАА.

При анализе экспрессии генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, выявлено достоверное снижение ОУЭ *ИЛ-10* в ММСК больных НАА и *HLA-DRA* в ММСК больных ТАА+СТАА по сравнению с донорами. Транскрипция генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, в КОЕф больных НАА достоверно не отличалась от таковой у доноров, а в КОЕф больных ТАА+СТАА показано достоверное снижение ОУЭ *ИЛ-1 $\beta$* , *ИДО-1*, *ИЛ-10*, *HLA-DRA* по сравнению с донорами. *ИДО-1* и *ИЛ-10* ингибируют развитие иммунного ответа за счет супрессорного воздействия на пролиферацию и активацию Т-лимфоцитов и НК-клеток (Cagliani et al., 2017). Повышение экспрессии *HLA-DRA* в стромальных клетках ассоциировано с их активацией, а воздействие *ИЛ-1 $\beta$*  способствует приобретению ими иммуносупрессорного фенотипа. Подавление транскрипции данных генов в стромальных предшественниках больных АА свидетельствует о нарушении способности данных клеток к активации и иммуномодуляции.

В настоящей работе впервые было получено свидетельство важной роли КОЕф в иммунорегуляции у здоровых доноров. Возможно, в норме их присутствие в КМ способствует поддержанию иммунологической толерантности СКК. Выраженное подавление экспрессии генов, ассоциированных с иммунорегуляцией, в КОЕф больных ТАА+СТАА указывает на нарушение иммуносупрессорных свойств этих клеток и их способности к поддержанию иммунологической толерантности, что может приводить к усилению аутоиммунной агрессии и развитию более выраженной аплазии при данных формах заболевания.

При сравнении групп АА между собой выявлены достоверные различия на уровне экспрессии генов в стромальных предшественниках: различия между формами заболевания затрагивают экспрессию генов рецепторов ростовых факторов (*FGFR1*, *PDGFRA*), что указывает на различные механизмы нарушения передачи сигнала от ростовых факторов в стромальных предшественниках при разных формах заболевания. Подавление транскрипции *ИЛ-1 $\beta$*  в КОЕф свидетельствует о нарушении их способности к иммунорегуляции у больных ТАА+СТАА по сравнению с больными НАА.

Таким образом, хотя изменения транскрипции некоторых генов в стромальных предшественниках являются общими для обеих групп АА, профиль экспрессии генов, ассоциированных с пролиферацией, регуляцией кроветворения и иммуномодуляцией, различается у больных НАА и ТАА+СТАА, что указывает на отличия в механизмах развития аплазии при АА разной степени тяжести.

### **Выводы**

1. В костном мозге больных апластической анемией концентрация колониеобразующих единиц фибробластов, пролиферативный и дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, а также их способность к поддержанию кроветворных предшественников не отличаются от таковых у доноров, следовательно, стромальные предшественники больных способны формировать полноценные кроветворные ниши.

2. Скорость пролиферации мультипотентных мезенхимных стромальных клеток больных нетяжелой апластической анемией достоверно ( $p < 0,05$ ) снижена (в 1,6 раза) по сравнению с донорами, при этом они способны поддерживать в 2,2 раза больше ранних кроветворных предшественников по сравнению с мультипотентными мезенхимными стромальными клетками доноров.

3. В колониеобразующих единицах фибробластов из костного мозга здоровых доноров достоверно ( $p < 0,05$ ) повышены относительные уровни экспрессии генов *SPP1*, *CXCL12*, *KITLG*, *ИДО-1*, *ИЛ-1 $\beta$* , *ИЛ-10*, *CD274* и *HLA-DRA* по сравнению с мультипотентными мезенхимными стромальными клетками, что

указывает на важную роль колониобразующих единиц фибробластов в регуляции кроветворения и иммуномодуляции.

4. В колониобразующих единицах фибробластов больных по сравнению с донорами достоверно ( $p < 0,05$ ) изменены уровни экспрессии генов, ответственных за регуляцию кроветворения (*KITLG* повышен в 1,7 раз при нетяжелой апластической анемии, *VCAM1* повышен в 2,4 раза, а *SPP1* снижен в 4,3 раза при тяжелой и сверхтяжелой апластической анемии) и при тяжелой и сверхтяжелой форме заболевания снижена экспрессия генов, ассоциированных с иммунорегуляцией (*ИДО-1* в 2,4 раза, *ИЛ-1 $\beta$*  в 3,9 раз, *ИЛ-10* в 2,7 раза и *HLA-DRA* в 2,3 раза).

5. Стромальные предшественники из костного мозга больных нетяжелой апластической анемией и группы, включающей больных тяжелой и сверхтяжелой апластической анемией, достоверно ( $p < 0,05$ ) различаются по уровню экспрессии генов. В колониобразующих единицах фибробластов больных тяжелой и сверхтяжелой апластической анемией уровень экспрессии *FGFR1* выше в 1,5 раза, а *ИЛ-1 $\beta$*  ниже в 3,6 раза по сравнению с нетяжелой апластической анемией. В мультипотентных мезенхимных стромальных клетках больных тяжелой апластической анемией экспрессия *PDGFRA* в 2,5 раза ниже, чем у больных нетяжелой апластической анемией.

6. Профиль экспрессии генов в стромальных предшественниках различается в зависимости от формы заболевания, что указывает на отличия в механизмах развития аплазии при апластической анемии разной степени тяжести.

### Список сокращений и условных обозначений

АА — апластическая анемия,  
 ИДО-1 – индоламин 2,3-диоксигеназа 1,  
 ИЛ – интерлейкин,  
 КМ — костный мозг,  
 КОЕф – колониобразующие единицы фибробластов,  
 КООБ — клетки, образующие области булыжника,  
 ММСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки,  
 МСК – мезенхимные стволовые клетки,

НАА — нетяжелая апластическая анемия,  
 ОУЭ – относительный уровень экспрессии,  
 ПЦР – полимеразная цепная реакция,  
 СКК — стволовые кроветворные клетки,  
 СТАА — сверхтяжелая апластическая анемия,  
 ТАА — тяжелая апластическая анемия,  
 ТАА+СТАА – группа, включающая больных ТАА и СТАА,  
 ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Dorofeeva, A. Proliferation capacity of stromal precursors from the bone marrow of untreated aplastic anemia patients / I. Shipounova, N. Petinati, A. Dorofeeva, N. Drize, A. Luchkin, Z. Fidarova, E. Mikhailova, V. Savchenko // *HemaSphere*. – 2019. – Т. 3. – №. S1. – С. 845.
2. Дорофеева, А.И. Изменение дифференцировочного потенциала стромальных предшественников в костном мозге больных апластической анемией в дебюте заболевания / И.Н. Шипунова, А.И. Дорофеева, Н.А. Петинати, Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, А.В. Лучкин, З.Т. Фидарова, Е.А. Михайлова // *Гематология и трансфузиология*. – 2020. – Т. 65. – №. S1. – С. 244.
3. Dorofeeva, A. Stromal precursors in the bone marrow of untreated aplastic anemia patients / A. Dorofeeva, I. Shipounova, N. Kapranov, A. Luchkin, Z. Fidarova, E. Mikhailova, V. Savchenko // *HemaSphere*. – 2020. – Т. 4. – №. S1. – С. 382.
4. Dorofeeva, A. Stromal Precursors in the Bone Marrow of Untreated Patients with Severe and Non-Severe Aplastic Anemia Differ in the Proliferative Potential / I. Shipounova, A. Dorofeeva, N. Kapranov, A. Luchkin, Z. Fidarova, E. Mikhailova, V. Savchenko // *Blood*. – 2020. – Т. 136. – №. S1. – С. 10.
5. Dorofeeva, A. Aplastic anemia patients could be divided into two subgroups based on the gene expression in their bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells / A. Dorofeeva, I. Shipounova, A. Luchkin, Z. Fidarova, E. Mikhailova, V. Savchenko // *HemaSphere*. – 2021. – Т. 5. – №. S2. – С. 700-701.
6. Dorofeeva, A. Multipotent Mesenchymal Stromal Cells from the Bone Marrow of Untreated Aplastic Anemia Patients Preserve Their Ability to Support Hematopoietic Precursors However Display the Pronounced Changes in Gene Expression / A. Dorofeeva, I. Shipounova, N. Drize, A. Luchkin, Z. Fidarova, E. Mikhaylova // *Blood*. – 2021. – Т. 138. – №. S1. – С. 1131.
7. Dorofeeva, A.I. Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells from patients with aplastic anemia retain their ability to support hematopoietic precursors despite pronounced changes in gene expression / A.I. Dorofeeva, I.N. Shipunova, N.I. Drize, A.V. Luchkin, A.V. Abramova, Z.T. Fidarova, V.N. Dvirnyk, I.V. Gal'tseva, E.A. Mikhailova, E.N. Parovichnikova // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2022. – Т. 172. – №. 5. – С. 637-641 (Дорофеева, А.И. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга

больных апластической анемией сохраняют способность к поддержанию кроветворных предшественников, несмотря на выраженные изменения экспрессии генов / А.И. Дорофеева, И.Н. Шипунова, Н.И. Дризе, А.В. Лучкин, А.В. Абрамова, З.Т. Фидарова, В.Н. Двирнык, И.В. Гальцева, Е.А. Михайлова, Е.Н. Паровичникова // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2021. – №. 4. – С. 233-237).

8. Dorofeeva, A. Differentiation potential and relative gene expression levels are changed in CFU-f from bone marrow of aplastic anemia patients at the onset of the disease / A. Dorofeeva, I. Shipounova, A. Luchkin, Z. Fidarova, E. Mikhailova // HemaSphere. – 2022. – Т. 6. – №. S3. – С. 689-690.

9. Дорофеева, А.И. Характеристики мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, полученных из костного мозга больных апластической анемией до начала лечения / А.И. Дорофеева, И.Н. Шипунова, А.В. Лучкин, З.Т. Фидарова, Е.А. Михайлова // Гематология и трансфузиология. – 2022. – Т. 67. – №. S2. – С. 193-194.

10. Дорофеева, А.И. Различия в экспрессии генов в мезенхимных клетках-предшественницах из костного мозга больных апластической анемией в дебюте при разных формах заболевания / А.И. Дорофеева, И.Н. Шипунова, А.В. Лучкин, З.Т. Фидарова, Е.А. Михайлова // Гены и Клетки. – 2022. – Т. 17. – №. 3. – С. 77.

11. Dorofeeva, A.I. Differences in the differentiation potential and relative levels of gene expression in the bone marrow-derived fibroblast colony-forming units in patients during the onset of aplastic anemia depending on the disease severity / A.I. Dorofeeva, I.N. Shipunova, A.V. Luchkin, A.V. Abramova, Z.T. Fidarova, V.N. Dvirnyk, I.V. Galtseva, E.A. Mikhailova, E.N. Parovichnikova // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2023. – Т. 174. – №. 4. – С. 538-543. (Дорофеева, А.И. Различия в дифференцировочном потенциале и относительном уровне экспрессии генов в колониеобразующих единицах фибробластов из костного мозга больных в дебюте апластической анемии в зависимости от тяжести заболевания / А.И. Дорофеева, И.Н. Шипунова, А.В. Лучкин, А.В. Абрамова, З.Т. Фидарова, В.Н. Двирнык, И.В. Гальцева, Е.А. Михайлова, Е.Н. Паровичникова // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2022. – №. 4. – С. 228-233).

12. Dorofeeva, A. Comparison of proliferative, differentiation potential and gene expression in multipotent mesenchymal stromal cells of patients with non-severe and severe aplastic anemia in the debut / A. Dorofeeva, I. Shipounova, A. Luchkin, Z. Fidarova, E. Mikhailova // HemaSphere. – 2023. – Т. 7. – №. S3. – С. e253066c.

13. Дорофеева, А.И. Нарушения пролиферации и экспрессии некоторых генов в стромальных клетках кроветворного микроокружения больных апластической анемией / И.Н. Шипунова, А.И. Дорофеева, А.В. Лучкин, З.Т. Фидарова, Е.А. Михайлова // Сборник тезисов XXIV съезда физиологического общества им. И. П. Павлова. – Санкт-Петербург : ВВМ. – 2023. – С. 121.