

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

На правах рукописи

Дорофеева Алена Игоревна

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

3.1.28. – Гематология и переливание крови

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Шипунова Ирина Николаевна

Москва

2023 г.

Оглавление

Оглавление	2
Введение	5
Актуальность темы исследования	5
Степень разработанности темы исследования	6
Цели и задачи исследования.....	7
Научная новизна	8
Теоретическая и практическая значимость работы	8
Методология и методы исследования	8
Положения, выносимые на защиту.....	8
Степень достоверности и апробация результатов.....	9
Глава 1. Обзор литературы	10
1.1. Кроветворение	10
1.2. Кроветворное микроокружение	11
1.3. Мезенхимные стволовые клетки и их потомки	18
1.4. Апластическая анемия	27
Глава 2. Материалы и методы	38
2.1. Доноры костного мозга и больные апластической анемией.....	38
2.2. Методы выделения стромальных предшественников из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров	39
2.3. Методы анализа стромальных предшественников из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров	41
Глава 3. Результаты и обсуждение	51
3.1. Эффективность получения культуры клеток стромальных предшественников из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров.....	52

3.2. Концентрация колониеобразующих единиц фибробластов и доля стромальных клеток в костном мозге больных апластической анемией и здоровых доноров.....	53
3.3. Пролиферативные свойства мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров.....	56
3.4. Дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров.....	58
3.5. Способность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров к поддержанию кроветворных предшественников.....	63
3.6. Сравнение относительного уровня экспрессии генов в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках и колониеобразующих единицах фибробластов из костного мозга здоровых доноров	65
3.7. Экспрессия генов, ассоциированных с пролиферацией, в стромальных предшественниках из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров	71
3.8. Экспрессия генов, ассоциированных с дифференцировкой, в колониеобразующих единицах фибробластов из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров	76
3.9. Экспрессия маркера наиболее ранних мезенхимных клеток нестина в стромальных предшественниках из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров	77
3.10. Экспрессия генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения, в стромальных предшественниках из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров	79
3.11. Экспрессия генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, в стромальных предшественниках из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров	85
3.12. Сравнение профиля экспрессии генов в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках и колониеобразующих единицах фибробластов из костного мозга больных нетяжелой, тяжелой и сверхтяжелой апластической анемией.....	91
Заключение.....	97
Выводы	102
Список сокращений и условных обозначений	103
Список литературы.....	106

Приложение А.....	129
Приложение Б	132
Приложение В.....	136
Приложение Г	138

Введение

Актуальность темы исследования

Кроветворение у человека происходит в костном мозге (КМ) при тесном взаимодействии стволовой кроветворной клетки (СКК) и кроветворного микроокружения [166]. Кроветворное микроокружение представляет собой совокупность клеток, внеклеточного матрикса, а также растворимых факторов, регулирующих процессы пролиферации и дифференцировки СКК [245]. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) – один из основных компонентов кроветворного микроокружения. МСК характеризуются экспрессией гена промежуточного филамента нестина (*NES*), локализуются в нишах КМ в непосредственной близости от СКК и поддерживают кроветворение при помощи сигнальных молекул: фактора 1, выделенного из стромальных клеток (*CXCL12*), фактора стволовых клеток (*KITLG*), остеопонтина (*SPP1*), ангиопоэтина-1 (*ANGPT1*) и васкулярной молекулы клеточной адгезии 1 (*VCAM1*) [166]. МСК обладают высоким пролиферативным потенциалом и образуют кроветворную территорию при формировании очага эктопического кроветворения под капсулой почки у мышей [13]. 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*) [201]. МСК – это мультипотентные клетки, способные к дифференцировке в адипоциты, остеобласты и хондроциты, а также другие стромальные клетки мезенхимного происхождения [181]. 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. [47; 159; 172]. Известно, что патогенез ряда гематологических заболеваний (например, острый миелоидный лейкоз (*ОМЛ*), хронический миелолейкоз, множественная миелома, миелодиспластический синдром (*МДС*) и др.) связан с нарушением функционирования МСК [50; 160].

Апластическая анемия (*АА*) – это редкое заболевание, при котором происходит снижение продукции клеточных элементов крови в результате уменьшения количества и нарушения функционирования СКК в КМ [156]. По степени выраженности цитопении при *АА* выделяют нетяжелую *АА* (*НАА*), тяжелую *АА* (*ТАА*) и сверхтяжелую *АА* (*СТАА*) [6]. 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 (ИСТ) [4]. 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.

Степень разработанности темы исследования

АА была описана П. Эрлихом в 1888 г. В начале 20-го века Х. Вакес и Ч. Обертен ввели термин «апластическая» при обозначении данного типа анемии, а Р. Кэбот с коллегами охарактеризовали основные клинические проявления этого заболевания [156; 247]. Долгое время АА считалась неизлечимым заболеванием, пока в 1970х годах Г. Мате с коллегами не обнаружил, что иммуносупрессивный режим кондиционирования при трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) приводит к восстановлению кроветворения у некоторых больных АА даже после отторжения трансплантата [248]. С тех пор наряду с алло-ТГСК ИСТ используется в качестве основного метода лечения АА и позволяет достичь удовлетворительного результата в большинстве случаев. В 1976 г. Б. Камитта были сформулированы основные критерии степени тяжести АА на основании выраженности цитопении [56].

Наибольший вклад в изучение патогенеза, определение прогностических факторов и разработку современных протоколов лечения АА в нашей стране внесли исследования, выполненные под руководством Е. А. Михайловой, А. Д. Кулагина, А. А. Масчана [6; 12; 14]. Среди зарубежных коллег стоит отметить работы Н. Янга, Дж. Мачеевского, П. Шейнберга, А. Риситано [18; 117; 135; 249].

Открытие полипотентных мезенхимных клеток КМ, обладающих высоким пролиферативным потенциалом и образующих колонии *in vitro*, принадлежит А. Я. Фриденштейну, который дал им название колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) [105; 227]. Огромный вклад в понимание функционирования МСК из КМ внесли работы И. Л. Черткова с соавторами [1; 13]. Определению особенностей мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) при гематологических заболеваниях посвящены исследования Н. И. Дризе, И. Н. Шипуновой, Н. А. Петинати [2; 3].

Стромальные предшественники из КМ больных АА изучены недостаточно в связи с низкой частотой встречаемости данного заболевания. Сравнение функциональных свойств ММСК из КМ больных АА и доноров было выполнено в исследованиях под руководством Н. И. Дризе, А. Бачигалупо, И. Микелоцци, Э. Хамзич, Дж. Ли, однако опубликованные результаты содержат противоречивые данные [25; 64; 80; 119; 229]. Определение концентрации КОЕф в КМ больных

АА было проведено в работах Н. И. Дризе, А. Бачигалупо, Э. Хамзич с соавторами, но по этому вопросу у исследователей также не сформировалось единого мнения [25; 64; 229].

Нередко особенности стромальных предшественников из КМ больных АА изучают на небольшом числе образцов, полученных от когорты больных, различающихся по степени тяжести и стадии заболевания. Возможно, с этим связаны противоречия в данных, которые затрудняют определение роли стромального микроокружения в развитии аплазии при АА и диктуют необходимость определения функциональных свойств стромальных предшественников при разных формах в дебюте АА.

Цели и задачи исследования

Цель: охарактеризовать стромальные предшественники из костного мозга больных апластической анемией в дебюте при разных формах заболевания.

Задачи:

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 колониобразующих 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 β* , *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 колониобразующих 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.

Теоретическая и практическая значимость работы

Определение особенностей стромальных предшественников разной степени зрелости при гомеостазе и аплазии КМ расширяют представления об устройстве и функционировании кроветворного стромального микроокружения.

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.

Методология и методы исследования

Работа выполнена на образцах КМ здоровых доноров, полученных при плановой эксфузии для алло-ТГСК, и образцах КМ больных АА с установленным диагнозом до начала ИСТ, полученных при диагностической пункции. Мононуклеары КМ больных АА и здоровых доноров использованы для определения доли стромальных клеток методом проточной цитофлюориметрии, а также для получения культур мезенхимных предшественников двух типов: ММСК и КОЕф. Определение пролиферативных свойств, дифференцировочного потенциала, способности к поддержанию кроветворных предшественников и анализ относительного уровня экспрессии (ОУЭ) генов был проведен для ММСК, подсчет количества клоногенных предшественников в КМ и анализ ОУЭ генов – для КОЕф.

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.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты настоящего исследования получены на достаточно большом количестве образцов КМ больных и доноров, позволяющем выявить статистически значимые отличия. Работа выполнена с использованием методов, описанных в литературе и применяемых в мировом научном сообществе. Данные, полученные с использованием различных подходов, согласуются между собой.

Основные результаты работы были представлены на 11 российских и международных конференциях. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для публикации результатов диссертационных исследований.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Кроветворение

Кроветворение (гемопоз) – это процесс образования форменных элементов крови в результате пролиферации и дифференцировки СКК [245]. СКК обладает уникальным свойством – способностью поддерживать кроветворение на протяжении всей жизни организма [246]. СКК относят к наиболее ранним гемопозитическим клеткам. При гомеостазе большую часть времени они находятся в состоянии покоя (фазе G₀) и способны входить в клеточный цикл всего несколько раз за время жизни организма [26]. В результате ассиметричного деления СКК образуются две клетки с разными свойствами. Одна из них возвращается в состояние покоя и замещает материнскую, обеспечивая поддержание популяции ранних кроветворных предшественников. Другая клетка активно пролиферирует и пополняет пул поздних мультипотентных предшественников, которые дают начало полипотентным гемопозитическим клеткам: общему миелоидному, общему лимфоидному, а также лимфомиелоидному предшественникам [10; 143]. При дальнейшем созревании данные клетки образуют олиго- и монопотентные гемопозитические предшественники, которые впоследствии дифференцируются в зрелые форменные элементы крови. Общий лимфоидный предшественник дает начало Т- и В-лимфоцитам, натуральным киллерам и дендритным клеткам, общий миелоидный предшественник – гранулоцитам (базофилам, эозинофилам, нейтрофилам), моноцитам, эритроцитам и мегакариоцитам, продуцирующим тромбоциты, а лимфомиелоидный предшественник способен дифференцироваться во все типы зрелых клеток крови за исключением эритроцитов и мегакариоцитов. Гранулоциты, моноциты и лимфоциты представляют собой различные популяции лейкоцитов, осуществляющих защиту организма от патогенов. Эритроциты обеспечивают потребности всех клеток организма в кислороде, а тромбоциты участвуют в процессе свертывания крови при повреждении, препятствуя кровопотере.

В отличие от зрелых кроветворных клеток популяции ранних гемопозитических предшественников не различаются морфологически, однако могут быть идентифицированы по набору специфических поверхностных маркеров, определяемых при иммунофенотипировании клеток КМ. Такие молекулы принято обозначать с помощью числовых значений кластеров дифференцировки (CD) [63]. Например, характерным маркером ранних гемопозитических предшественников человека служит трансмембранный белок CD34, для выделения популяции этих клеток также дополнительно используют молекулы CD33, CD38 и другие [10].

Гемопоз регулируется локальным микроокружением КМ, или нишей. Ниша включает клетки и секретируемые ими молекулы, поддерживающие функционирование СКК, а также внеклеточный матрикс [245]. В норме кроветворное микроокружение обеспечивает регуляцию процессов пролиферации и дифференцировки СКК при гомеостазе и регенерации, а также сохранение пула этих предшественников на протяжении всего времени жизни организма. Нарушение функционирования клеток ниши при некоторых патологических состояниях (например, хронический миелолейкоз, ОМЛ и др.) приводит к утрате кроветворных предшественников и нарушению гемопоза [19; 190; 191].

1.2. Кроветворное микроокружение

При определении локализации СКК в КМ оказалось, что данные клетки распределены не равномерно, но расположены преимущественно в районе эндоста [78; 131; 192], а также в околососудистом пространстве [224]. Показано, что существуют два типа ниш: остеобластная и сосудистая. Результаты последующих исследований позволили понять, какие типы клеток образуют эти ниши и каким образом они участвуют в регуляции СКК.

Остеобластная ниша

Остеобластная ниша формируется остеобластами, которые возникают в результате дифференцировки МСК, выстилают полость трубчатых костей и образуют эндост. СКК локализуются в районе эндоста в непосредственной близости к остеобластам, регулируя размер пула СКК посредством продукции SPP1 [78; 192; 199]. Хотя экспансия остеобластов приводит к активации пролиферации СКК [131; 195], селективная элиминация остеобластов не нарушает функционирование СКК [196]. Подавление экспрессии основных факторов ниши СКК (KITLG и CXCL12) в остеобластах также не влияет на регуляцию СКК, однако вызывает нарушение локализации и дифференцировки ранних лимфоидных предшественников [75; 82; 90; 196]. Результаты данных исследований указывают на то, что остеобласты оказывают влияние на функционирование кроветворных предшественников, однако не играют основную роль в поддержании СКК в нише.

Сосудистая ниша

КМ пронизан густой сетью кровеносных сосудов. Артерии проходят внутри костных каналов и разветвляются на артериолы, переходящие в области эндоста в синусоиды. Синусоиды образуют сложную сеть, пронизывающую КМ, которая обеспечивает выход в кровоток дифференцированных кроветворных клеток [32].

Выявление поверхностных маркеров наиболее ранних кроветворных предшественников позволило определить их локализацию в КМ в околососудистом пространстве вблизи

синусоидов и артериол [224]. Впоследствии было обнаружено, что примыкающие к эндотелиальным клеткам (ЭК) мезенхимные предшественники способны поддерживать СКК продуцируя растворимые факторы и молекулы адгезии, и этот процесс регулируется симпатическими нервными волокнами, немиелинизированными шванновскими клетками, макрофагами, мегакариоцитами и, возможно, адипоцитами [32; 164]. В создании сосудистой ниши принимают участие несколько типов клеток.

Эндотелиальные клетки

ЭК участвуют в образовании сосудов ниши, а также регулируют функционирование СКК. ЭК в КМ стимулируют пролиферацию и дифференцировку CD34+ кроветворных предшественников человека *in vitro*, секретируя регуляторные белки [55; 122], а также индуцируют пролиферацию СКК *in vivo* посредством продукции E-селектина [244]. Кроме того, ЭК необходимы для поддержания в культуре наиболее ранних кроветворных предшественников [91]. Экспрессия основных факторов ниши (KITLG, CXCL12) в ЭК невысока, однако селективное подавление данных факторов в этих клетках приводит к истощению пула СКК в КМ, что указывает на важную роль ЭК в сохранении функциональных свойств и количества СКК в КМ [82; 90]. Известно, что проницаемость сосудов КМ, образованных ЭК, определяет локализацию и/или физиологическую активность гемопоэтических предшественников, возможно за счет создания условий с различным уровнем активных форм кислорода. Покоящиеся СКК располагаются вокруг менее проницаемых артериол, а активно делящиеся – рядом с более проницаемыми синусоидами [83].

Стромальные предшественники

Способность стромальных предшественников КМ к регуляции кроветворения впервые была показана, когда исследователям удалось выявить популяцию клеток, расположенных вокруг синусоидов в непосредственной близости к СКК и характеризующихся высоким уровнем экспрессии CXCL12 (CAR клетки). При этом оказалось, что взаимодействие CXCL12 с рецептором CXCR4 на поверхности СКК играет ключевую роль в удержании СКК в нише в покоящемся состоянии [158]. Позже в модельной мышинной системе была выделена и охарактеризована популяция клеток мезенхимного происхождения, характеризующихся экспрессией зеленого флуоресцентного белка (GFP) под промотером гена *NES* (Nes-GFP⁺ клетки) и продуцирующих CXCL12, KITLG, а также другие молекулы, необходимые для регуляции пролиферации, дифференцировки и локализации СКК в КМ (SPP1, ANGPT1, VCAM1). Популяция Nes-GFP⁺ клеток включает наиболее ранние стромальные предшественники – МСК, способные к самоподдержанию *in vitro* и обладающие высоким дифференцировочным потенциалом [166]. Показано, что данную популяцию клеток характеризует наличие на

поверхности рецептора фактора роста, выделенного из тромбоцитов, альфа (PDGFRA) и интегрин альфа V (CD51) [203].

Попытки выявить популяцию клеток, осуществляющих поддержание функциональных свойств СКК в составе ниши посредством секреции CXCL12 и KITLG, привели к обнаружению периваскулярных мезенхимных клеток, характеризующихся экспрессией рецептора к лептину (LepR⁺ клетки). Лептин – это гормон, выделяемый адипоцитами. Показано, что подавление экспрессии KITLG или CXCL12 в LepR⁺ клетках приводит к истощению пула СКК в КМ [82; 90].

Различные популяции ранних стромальных клеток-предшественниц (CAR клетки, Nes-GFP⁺, LepR⁺ клетки) идентифицированы при помощи разных маркеров и с использованием различных методов, однако эти популяции пересекаются между собой и имеют общие функциональные свойства (мультипотентность, локализация в непосредственной близости к эндотелию и СКК, способность к поддержанию СКК в КМ посредством продукции KITLG и CXCL12) [79]. Популяции CAR клеток и LepR⁺ клеток, локализующихся вокруг синусоидов, в значительной степени перекрываются между собой [32], а популяция Nes-GFP⁺ клеток гетерогенна и состоит из клеток с высоким и с низким уровнем экспрессии GFP под промотером NES: Nes-GFP^{bright} и Nes-GFP^{dim}, соответственно. Уровень экспрессии GFP отражает в данной модели уровень экспрессии NES. Nes-GFP^{bright} клетки встречаются реже, локализованы в непосредственной близости к артериолам и характеризуются экспрессией классического маркера перицитов хондроитинсульфат протеогликана 4 (NG2). Nes-GFP^{dim} более многочисленны, расположены вокруг синусоидов и на 80% пересекаются с популяцией стромальных LepR⁺ клеток. Хотя обе субпопуляции Nes-GFP⁺ клеток способны образовывать фибробластные колонии *in vitro* (то есть, содержат КОЕф), Nes-GFP^{bright} дают больше таких колоний, чем Nes-GFP^{dim}, и находятся в покое *in vivo*, что позволяет сделать предположение о том, что Nes-GFP^{bright} – более ранние мезенхимные предшественники, а Nes-GFP^{dim} – более поздние. Nes-GFP^{bright} поддерживают СКК в состоянии покоя и обладают более высоким уровнем экспрессии факторов регуляции СКК, чем Nes-GFP^{dim}. В отличие от Nes-GFP^{dim} клетки субпопуляции Nes-GFP^{bright} расположены в непосредственной близости к иннервирующим артериолы симпатическим нервным волокнам и окружающим их шванновским клеткам, которые регулируют процессы пролиферации и миграции СКК в артериолярной нише. Деплеция Nes-GFP^{bright} клеток приводит к истощению пула СКК, что отражает важную роль этих клеток в поддержании популяции наиболее ранних гемопоэтических предшественников в КМ [31]. Результаты данного исследования позволяют сделать вывод о том, что Nes-GFP^{bright} и Nes-GFP^{dim} клетки различаются по функциональным свойствам и соответствуют разным популяциям мезенхимных предшественников, выявленным ранее (Nes-GFP^{bright} - NG2⁺ клеткам, а Nes-GFP^{dim} - LepR⁺ и CAR клеткам) [32].

Симпатические нервные волокна и немиелинизированные шванновские клетки

Результаты недавних исследований показали, что симпатические нервные волокна и покрывающие их немиелинизированные шванновские клетки играют важную роль в регуляции пролиферации и миграции СКК. При этом шванновские клетки воздействуют непосредственно на СКК, а нервные волокна оказывают влияние на МСК.

Известно, что при гомеостазе небольшое число СКК и более поздних кроветворных предшественников циркулирует в кровотоке. Флуктуации содержания гемопоэтических клеток в крови подчинены циркадным ритмам и регулируются симпатической нервной системой [111]. Это происходит в результате снижения экспрессии генов *CXCL12*, *KITLG*, *ANGPT1* и *VCAM1* в МСК под воздействием сигнала от нервных волокон, приводящего к мобилизации гемопоэтических предшественников в кровотоки. Известно, что мобилизация СКК при воздействии гранулоцитарного колониестимулирующего фактора происходит по такому же механизму [166; 223].

Немиелинизированные шванновские клетки – глиальные клетки, покрывающие волокна симпатической нервной системы в КМ. Они локализуются в непосредственной близости к СКК и поддерживают их в состоянии покоя посредством активации трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) [193].

Макрофаги

Макрофаги – это дифференцированные кроветворные клетки, играющие важную роль в регуляции СКК. Показано, что истощение пула макрофагов в КМ приводит к мобилизации СКК в кровь [46]. Как и симпатические нервные волокна, макрофаги регулируют поддержание СКК в КМ посредством изменения экспрессии *CXCL12* в МСК, однако данное воздействие носит антагонистический характер, обеспечивая дополнительный механизм контроля функций СКК в нише [44].

Мегакариоциты

Большинство СКК КМ локализуется в непосредственной близости к мегакариоцитам и поддерживается ими в состоянии покоя. Истощение пула мегакариоцитов в КМ приводит к активации пролиферации СКК [163]. Влияние мегакариоцитов на СКК может быть опосредовано секрецией хемокина *CXCL4*, продукцией TGF- β 1 или тромбопоэтина, так как подавление экспрессии каждого из этих белков в мегакариоцитах сопровождалось экспансией СКК [161; 162; 163]. Хотя в настоящее время неизвестно, какой из перечисленных факторов имеет наибольшее значение для поддержания СКК в покое, непосредственная регуляция функций СКК мегакариоцитами отражает наличие обратной связи от дифференцированных потомков к наиболее ранним гемопоэтическим предшественникам.

Адиipoциты

Адиipoциты, или жировые клетки, образуются в КМ в результате дифференцировки МСК. Известно, что количество адиipoцитов в КМ увеличивается с возрастом, а также после облучения и применения химиотерапии. Преобладание жировой ткани в пунктате КМ – один из диагностических критериев патологических состояний, ассоциированных с аплазией КМ, в том числе АА [32; 42]. До недавнего времени было неясно, способны ли адиipoциты регулировать гемопоэз, однако исследование последних лет показало, что увеличение количества жировых клеток ассоциировано со снижением числа гемопоэтических предшественников в КМ, а подавление адиipoгенеза у реципиента ускоряет приживание КМ донора после трансплантации [42]. В другой работе было обнаружено, что ингибирование адиipoгенеза способствует восстановлению кроветворения после воздействия химиотерапии [114]. Однако при индукции адиipoгенеза *in vivo* оказалось, что увеличение количества адиipoцитов, а также объема жировой ткани не приводит к изменению числа ранних кроветворных предшественников в КМ [21]. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что адиipoциты могут оказывать негативное влияние на функционирование СКК при регенерации, однако их участие в регуляции СКК при гомеостазе не доказано.

Итак, регуляция СКК в сосудистой нише происходит при участии клеток нескольких типов, однако непосредственное поддержание гемопоэтических предшественников осуществляется эндотелиоцитами, МСК, шванновскими клетками и мегакариоцитами, а симпатические нервные волокна и макрофаги воздействуют на МСК. Наибольшее количество факторов, необходимых для поддержания СКК в нише, продуцируют МСК, что определяет ключевую роль данных клеток в регуляции кроветворения.

Сигнальные молекулы ниши стволовой кроветворной клетки

Клетки кроветворного микроокружения регулируют функционирование СКК посредством продукции растворимых факторов и молекул адгезии. К основным сигнальным молекулам, необходимым для поддержания СКК, относятся CXCL12, KITLG, ANGPT1, SPP1, VCAM1, TGF- β .

CXCL12 – содержащий C-X-C мотив хемокиновый лиганд 12, или фактор 1, выделенный из стромальных клеток (SDF-1), кодируется геном *CXCL12*. Связывание CXCL12 с рецептором CXCR4 на поверхности СКК необходимо для поддержания СКК в нише. При нарушении данного взаимодействия происходит истощение пула СКК в КМ и выход этих клеток из состояния покоя [154; 158]. *CXCL12* экспрессируется преимущественно стромальными предшественниками, и, в меньшей степени, эндотелиальными клетками, остеобластами, а также некоторыми гемопоэтическими клетками. Показано, что подавление транскрипции *CXCL12* в ЭК приводит к истощению пула СКК в КМ, а уменьшение продукции CXCL12 остеобластами не влияет на

функционирование СКК [82]. Интересно, что нарушение секреции CXCL12 разными субпопуляциями стромальных предшественников приводит к различным физиологическим эффектам: снижение продукции данного фактора NG2⁺ клетками приводит к уменьшению количества СКК в КМ, выходу оставшихся клеток из состояния покоя и изменению их локализации, а подавление экспрессии CXCL12 в LepR⁺ мезенхимных клетках не оказывает влияние на количество, распределение и пролиферативную активность СКК в КМ, однако вызывает миграцию этих клеток в кровь и селезенку [79; 82]. Таким образом, реализация действия CXCL12 на функционирование СКК зависит от типа клеток, секретирующих данный фактор: ЭК и периартериолярные NG2⁺ клетки посредством продукции CXCL12 удерживают СКК в нише в состоянии покоя, а расположенные вокруг синусоидов LepR⁺ клетки препятствуют их мобилизации в кровотоки.

KITLG, или фактор стволовых клеток (SCF), – белок, кодируемый геном *KITLG*. KITLG продуцируется клетками ниши КМ как в растворимой, так и в мембраносвязанной форме. Взаимодействие мембраносвязанного KITLG с рецептором С-Kit на поверхности СКК необходимо для поддержания этих клеток в нише [38; 39; 54; 87; 98]. В КМ продукция KITLG происходит преимущественно в ЭК и стромальных предшественниках. Подавление транскрипции *KITLG* в остеобластах и гемопоэтических клетках не влияет на функционирование СКК, а нарушение экспрессии данного фактора в ЭК и LepR⁺ мезенхимных клетках приводит к истощению пула СКК в КМ, что отражает способность данных клеток к удержанию СКК в нише посредством продукции KITLG [90].

ANGPT1, или ангиопоэтин-1, – белок, кодируемый геном *ANGPT1*. ANGPT1 реализует свое действие при связывании с рецептором TIE2, экспрессирующемся на поверхности СКК и ЭК [238; 239]. Взаимодействие ANGPT1 с TIE2 играет важную роль в ангиогенезе, поскольку регулирует процессы пролиферации, дифференцировки и миграции ЭК. При этом ключевая функция ANGPT1 заключается в снижении проницаемости сосудов, возможно, за счет усиления контактов между ЭК [27; 28]. Изначально считалось, что значение данного фактора в регуляции гемопоэза связано с продукцией ANGPT1 остеобластами, которые осуществляют удержание экспрессирующих TIE2 СКК в нише КМ в состоянии покоя [238]. Позже выяснилось, что ANGPT1 не экспрессируется в остеобластах, однако продуцируется СКК и, в меньшей степени, некоторыми гемопоэтическими предшественниками, мегакариоцитами, а также LepR⁺ стромальными клетками [252]. Подавление транскрипции *ANGPT1* в этих клетках не оказывает влияние на гемопоэз и на поддержание СКК при гомеостазе, однако снижение продукции ANGPT1 СКК и LepR⁺ стромальными клетками ускоряет восстановление гемопоэза после облучения, а также стимулирует образование сосудов с большей проницаемостью. Таким образом, экспрессия *ANGPT1* СКК и стромальными предшественниками при регенерации

индуцирует образование сосудов с меньшей проницаемостью, а также замедляет восстановление гемопоэза и ниши КМ [252].

SPP1, или остеопонтин (OPN), – белок, кодируемый геном *SPP1*. SPP1 секретируется в неактивной форме клетками, локализующимися преимущественно в районе эндоста (остеобластами, остеокластами, остеоцитами), а также мезенхимными предшественниками [129; 132; 166]. Под воздействием тромбина, продуцируемого мегакариоцитами, SPP1 расщепляется и приобретает способность связываться с интегринами $\alpha_4\beta_1$ и $\alpha_9\beta_1$ на поверхности СКК, удерживая их в остеобластной нише [53]. SPP1 поддерживает СКК в состоянии покоя, способствуя сохранению популяции этих клеток в КМ [198; 199].

VCAM1, или молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа, – трансмембранный белок, входящий в суперсемейство иммуноглобулинов и кодируемый геном *VCAM1*. В КМ VCAM1 экспрессируется мезенхимными предшественниками и эндотелиальными клетками [166; 187]. Взаимодействие VCAM1 с интегрином $\alpha_4\beta_1$ на поверхности СКК обеспечивает локализацию этих клеток в нише КМ [237; 243]. Показано, что нарушение приживления гемопоэтических клеток после алло-ТГСК у больных миелофиброзом может быть связано со снижением продукции мембраносвязанного VCAM1 в КМ, наблюдаемом при данном заболевании [226]. Очевидно, что наличие трансмембранной формы VCAM1 на поверхности мезенхимных и эндотелиальных клеток необходимо для локализации СКК в составе ниши и регуляции их функций.

TGF- β – суперсемейство трансформирующих факторов роста бета, включающее три фактора (TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3), кодируемые тремя генами (*TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*). Факторы суперсемейства TGF- β секретируются различными типами клеток КМ, преимущественно немиелинизированными шванновскими клетками и мегакариоцитами [41]. Известно, что взаимодействие TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3 с рецепторным комплексом на поверхности клеток-мишеней приводит к общему событию (фосфорилированию белков SMAD2 и SMAD3), однако до сих пор неясно, существуют ли различия в физиологических эффектах, вызываемых разными изоформами [231]. Кроме того, не все исследователи выделяют отдельные факторы, используя название суперсемейства TGF- β для обозначения всех изоформ. В КМ TGF- β депонируется в латентной форме в составе комплекса, ковалентно связанного с молекулами внеклеточного матрикса [29]. Активация данного фактора происходит в результате протеолитического расщепления металлопротеазами при связывании комплекса с интегрином β_8 на поверхности немиелинизированных шванновских клеток, которые локализуются в непосредственной близости к СКК [41]. Показано, что TGF- β способствует поддержанию СКК в состоянии покоя, а нарушение его активации индуцирует пролиферацию СКК и приводит к снижению их количества в КМ [162; 193].

Итак, действие сигнальных молекул кроветворного микроокружения в КМ направлено на поддержание СКК в нише в покоящемся состоянии, что способствует сохранению пула этих клеток на протяжении всей жизни организма. МСК способны секретировать все перечисленные факторы и служат основным источником большинства из них, чем обусловлено особое значение данных клеток в регуляции гемопоэза.

1.3. Мезенхимные стволовые клетки и их потомки

Понятие МСК впервые было введено А. Капланом, который назвал так прилипающие к пластику веретенovidные стромальные клетки КМ, способные к пролиферации в культуре в течение длительного времени, а также к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении [59]. Современная концепция подразумевает наличие у любой стволовой клетки двух свойств: мультипотентности, то есть способности к дифференцировке в несколько типов клеток, и самоподдержания, то есть способности образовывать в результате ассиметричного деления дочернюю клетку, полностью идентичную материнской [118; 139]. В экспериментах *in vivo* было показано наличие в КМ таких клеток, которые удовлетворяют данным требованиям. Эти клетки были названы кроветворное микроокружение переносящими единицами, поскольку обладали способностью формировать очаги эктопического кроветворения в серии последовательных ретрансплантаций под капсулу почки сингенным мышам [13]. Выделение таких клеток *in vitro* не представляется возможным, поскольку до сих пор неизвестно, какие поверхностные маркеры характерны для данной популяции. Поэтому получаемые в культуре мезенхимные клетки КМ нельзя отнести к стволовым в строгом смысле этого слова: они представляют собой более дифференцированные мультипотентные стромальные предшественники, происходящие от МСК. Выделяют два типа таких предшественников: КОЕф и ММСК.

Колониеобразующие единицы фибробластов

Первые доказательства присутствия негемопоэтических, мезенхимных предшественников в КМ были получены А.Я. Фриденштейном с соавторами [105]. Они обнаружили, что при инкубации суспензии КМ *in vitro* образуются прикрепленные к пластику гетерогенные кластеры из 2-4 фибробластоподобных клеток, которые через несколько дней начинают активно пролиферировать и образуют колонии. Каждая из таких колоний формируется в результате деления одной клетки, получившей название КОЕф. Клетки колоний обладают способностью дифференцироваться в адипоциты, остеобласты, хондроциты и миообласты, а также синтезируют белки межклеточного матрикса (коллаген I и IV типа, ламинин, фибронектин) и цитокины (ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-11, KITLG) [213]. Показано, что некоторые КОЕф способны претерпевать до 20-30

делений в культуре и сохранять при этом полипотентность [104]. Колонии, образованные разными КОЕф, различаются по размеру, дифференцировочному потенциалу, а также по способности формировать кроветворное микроокружение, что отражает гетерогенность данной популяции мезенхимных предшественников [65; 103; 104; 169]. Стоит отметить, что количество колоний *in vitro* зависит от условий инкубирования моноклеаров КМ, при этом оптимальной для культивирования КОЕф служит среда α MEM, содержащая 20% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) [65].

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

Другой тип стромальных предшественников, выделяемых из КМ *in vitro*, – ММСК. ММСК присутствуют в различных тканях организма, однако наиболее часто их получают из КМ, жировой ткани, периферической и пуповинной крови [58; 99; 103; 150]. Поскольку свойства ММСК различаются в зависимости от источника этих клеток и метода их культивирования, для сопоставления результатов разных научных групп был разработан минимальный критерий, позволяющий идентифицировать данную популяцию стромальных предшественников [181]. Во-первых, ММСК обладают способностью прилипать к пластику в стандартных культуральных условиях. Во-вторых, они характеризуются наличием поверхностных маркеров CD105, CD73, CD90 (не менее 95% положительных клеток в популяции) и отсутствием маркеров CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79 α или CD19, а также HLA-DR (не более 2% положительных клеток) по результатам иммунофенотипического анализа. В-третьих, полипотентность, или способность ММСК к дифференцировке в адипоциты, остеобласты и хондробласты под воздействием среды с соответствующим индуктором, должна быть подтверждена гистохимическим окрашиванием Oil Red O, ализариновым красным и альциановым синим, соответственно [181].

При сравнении двух типов стромальных предшественников (КОЕф и ММСК) было показано, что экспрессия генов, ассоциированных с дифференцировкой, в КОЕф выше, чем в ММСК. Это позволило сделать вывод о том, что КОЕф являются более поздними стромальными предшественниками, а ММСК – более ранними [116]. В целом ММСК охарактеризованы значительно лучше, чем КОЕф. Показано, что ММСК обладают рядом свойств, которые делают их привлекательным объектом для исследований и применения в области регенеративной медицины, иммунотерапии и клеточной терапии. Среди таких свойств можно выделить высокий пролиферативный и дифференцировочный потенциал, способность к поддержанию кроветворения, иммуномодуляции и к секреции трофических факторов.

Пролиферативные свойства мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

ММСК обладают высоким пролиферативным потенциалом. Известно, что данные клетки способны претерпевать в среднем около 20 делений *in vitro* [184]. Для пролиферации ММСК необходима активация трех сигнальных путей, опосредуемых FGF, PDGF, и TGF- β .

Ингибирование каждого из этих каскадов приводит к увеличению времени удвоения популяции ММСК, а активация данных каскадов при культивировании ММСК в бессывороточной среде с добавлением соответствующих факторов позволяет сохранять пролиферативный и дифференцировочный потенциал этих клеток [201].

FGF-2, или фактор роста фибробластов 2, – ключевой фактор, участвующий в поддержании пролиферативного и дифференцировочного потенциала ММСК. Повышение концентрации FGF-2 в среде инкубирования ММСК приводит к ускорению пролиферации данных предшественников, а также увеличивает продолжительность их жизни в культуре [216]. Существует четыре классических рецептора FGF-2 (FGFR1-4), активация которых запускает каскад реакций, ассоциированных с пролиферацией, а также неклассический рецептор (FGFRL1, или FGFR5) с укороченным цитоплазматическим доменом, не способный вызывать индукцию внутриклеточных сигнальных путей. FGF-2 связывается со всеми типами рецепторов. При взаимодействии данного фактора с FGFR1 и FGFR2 происходит снижение экспрессии этих рецепторов и, как следствие, подавление адипогенной и остеогенной дифференцировки, соответственно, что ассоциировано с поддержанием МСК в недифференцированном состоянии [219].

PDGF, или фактор роста, выделенный из тромбоцитов, – семейство лигандов, стимулирующих пролиферацию ММСК и ангиогенез [113]. Семейство включает четыре белка PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C и PDGF-D, которые посредством дисульфидной связи образуют гомо- и гетеродимеры и реализуют свое действие при взаимодействии с рецепторами на поверхности клетки-мишени. Существует две рецепторные тирозинкиназы PDGFRA и PDGFRB, которые собираются в гомо- и гетеродимерные рецепторные комплексы, при этом PDGFRAA активируется PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB и PDGF-CC, PDGFRAB - PDGF-AB, PDGF-BB и PDGF-CC, PDGFRBB – PDGF-BB и PDGF-DD [202]. Показано, что ММСК экспрессируют оба типа рецепторов, участвующих в передаче схожих, однако не идентичных сигналов. Хотя оба рецептора (PDGFRA и PDGFRB) при активации поддерживают пролиферацию и выживание, только PDGFRB участвует в регуляции миграции ММСК [77].

TGF- β - трансформирующий фактор роста бета. TGF- β участвует в регуляции не только кроветворных, но и стромальных предшественников. Показано, что влияние TGF- β на пролиферацию мезенхимных клеток зависит от содержания данного фактора в среде: при концентрации меньше 0,01 нг/мл TGF- β индуцирует продукцию PDGF-BB и стимулирует деление стромальных клеток некоторых тканей, а при концентрации больше 1 нг/мл приводит к повышению экспрессии ингибитора циклин-зависимой киназы p15^{INK4b} и вызывает арест клеточного цикла [85].

MYC. Связывание факторов роста с соответствующими рецепторами приводит к активации сигнальных каскадов, которые контролируют работу транскрипционных факторов. Один из таких транскрипционных факторов – протоонкоген MYC. Нарушение регуляции MYC ассоциировано с прогрессией различных типов злокачественных опухолей человека [20]. Показано, что данный транскрипционный фактор необходим для пролиферации и дифференцировки ММСК, выделенных из пуповинной крови [236].

ИЛ-1 β . Высокий пролиферативный потенциал ММСК имеет важное значение для кроветворения, поскольку известно, что стромальные предшественники в КМ участвуют в построении кроветворной территории и регуляции ее размера. Показано, что повышение концентрации ИЛ-1 β в крови приводит к увеличению размера эктопических очагов кроветворения под капсулой почки мышей, что происходит в результате индукции пролиферации стромальных предшественников. Добавление ИЛ-1 β в среду культивирования вызывает активацию пролиферации ММСК и позволяет им лучше поддерживать кроветворные предшественники *in vitro* [147; 148]. Полученные данные свидетельствуют о том, что стромальные предшественники регулируют размер кроветворной территории в ответ на внешние стимулы. Хотя механизм данного явления до конца не изучен, передача сигнала от ИЛ-1 β может быть опосредована рецептором первого типа ИЛ-1R1 на поверхности ММСК.

Дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

ММСК – мультипотентные мезенхимные предшественники, способные к дифференцировке в остеобласты, хондроциты, адипоциты, миобласты и клетки сухожилий под воздействием соответствующих индукторов. На начальном этапе происходит выбор направления дифференцировки, когда ММСК становятся коммитированными предшественниками и начинают экспрессировать специфические транскрипционные факторы. Данные факторы активируют продукцию белков, необходимых для дифференцировки, и клетки проходят все этапы созревания [231]. Наиболее изучены процессы, происходящие при остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировках.

При остеогенной дифференцировке экспрессию генов ранней стадии вызывает активация транскрипционного фактора RUNX2, последующие этапы созревания остеобластов происходят под контролем фактора SP7. Остеогенная дифференцировка включает четыре этапа. На первом этапе происходит активация пролиферации остеогенных предшественников и индукция синтеза одного из компонентов межклеточного матрикса костной ткани – коллагена 1-го типа. На втором этапе – повышение экспрессии генов, ассоциированных с созреванием и минерализацией матрикса (в том числе гена щелочной фосфатазы *ALPL*). Третий этап связан с активацией транскрипции генов, участвующих в отложении гидроксилатапата (*SPPI*, *BGLAP*). Четвертый

характеризуется повышением экспрессии гена коллагеназы и коллагена I типа, индукцией апоптоза и компенсаторной пролиферации клеток [240].

Остеогенная дифференцировка контролируется паратиреоидным гормоном, который связывается с рецептором PTH1R на поверхности клеток-мишеней. Экспрессия *PTH1R* повышается на раннем этапе дифференцировки и нарастает по мере созревания остеобластов в остециты [81]. Показано, что только *ALPL* и *PTH1R* экспрессируются всеми клетками остеобластной линии от остеогенных предшественников до остецитов [35; 215], что позволяет использовать данные гены в качестве маркеров остеогенной дифференцировки.

Стандартная среда для индукции остеогенной дифференцировки содержит дексаметазон, который повышает экспрессию и активирует *RUNX2*, аскорбиновую кислоту, которая стимулирует продукцию коллагена I типа, а также дигидрофосфат натрия, необходимый для образования и отложения гидроксилапатита [152].

При индукции адипогенной дифференцировки повышение экспрессии транскрипционных факторов *CEBPB* и *CEBPD* в мультипотентных мезенхимных клетках приводит к образованию коммитированных предшественников – преадипоцитов. Последующая активация транскрипции фактора *CEBPA* и рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом, гамма (*PPARG*) в данных клетках вызывает экспрессию белков, необходимых для терминальной дифференцировки. К таким белкам относятся белок 4, связывающий жирные кислоты (*FABP4*, называемый также *AP2*), транспортер глюкозы 4, синтаза жирных кислот, липопротеин липаза, лептин и адипонектин [66; 73]. В результате адипогенной дифференцировки образуются зрелые адипоциты округлой формы, содержащие липидные капли и обладающие чувствительностью к инсулину [110]. Интересно, что ключевые транскрипционные факторы адипогенной (*PPARG*) и остеогенной (*RUNX2*) дифференцировки ингибируют экспрессию друг друга, при этом *PPARG* также подавляет транскрипцию генов хондрогенной дифференцировки [231].

Стандартная среда для индукции адипогенной дифференцировки включает дексаметазон, индометацин и инсулин. Дексаметазон – молекула стероидной природы, вызывающая индукцию как остеогенной, так и адипогенной дифференцировки. Показано, что при высоких концентрациях дексаметазон активирует адипогенную и ингибирует остеогенную дифференцировку [74]. Индометацин повышает экспрессию ключевых транскрипционных факторов *CEBPB* и *PPARG*, контролирующих адипогенную дифференцировку [141]. Инсулин воздействует на преадипоциты, стимулируя их пролиферацию и дифференцировку [74].

Индукция хондрогенной дифференцировки *in vitro* требует специальных условий. Она происходит при инкубации агрегатов ММСК, образующих трехмерную структуру, в среде, содержащей дексаметазон, 2-фосфат аскорбиновой кислоты, инсулин, селенистую кислоту, трансферрин, пируват натрия и TGF- β . Культивирование ММСК при данных условиях в течение

2-3 недели приводит к отложению большого количества внеклеточного матрикса, состоящего преимущественно из молекул, образующих структуру хряща (коллаген 2 типа, агрекан) [225]. Индукция хондрогенной дифференцировки происходит при активации транскрипционного фактора SOX9, созревание хондроцитов контролируется факторами SOX5, SOX6 и SOX9, последний из которых перестает экспрессироваться на поздних стадиях [231].

Дифференцировка ММСК тесно связана с процессом пролиферации и регулируются теми же факторами: TGF- β , FGF, PDGF.

Известно, что экспрессия генов сигнального пути PDGF происходит только в недифференцированных мезенхимных предшественниках, и активация данного каскада может нарушать способность стромальных клеток к ответу на индукторы остеогенной дифференцировки [201; 205].

Факторы суперсемейства TGF- β играют важную роль на начальных этапах остеогенной и хондрогенной дифференцировки ММСК, подавляя при этом способность данных клеток к ответу на адипогенные индукторы [109; 153; 217].

Факторы семейства FGF и их рецепторы также контролируют дифференцировку ММСК. FGF-2 усиливает ответ ММСК на индукторы хондрогенной дифференцировки [100]. Показано, что при адипогенной и остеогенной дифференцировке ММСК происходит повышение экспрессии *FGFR1* и *FGFR2*, соответственно, однако добавление в среду инкубации FGF-2 приводит к снижению транскрипции этих генов и подавлению соответствующей дифференцировки [219]. Следовательно, FGF-2 играет важную роль в поддержании ММСК в недифференцированном состоянии посредством ингибирования продукции *FGFR1* и *FGFR2*.

Способность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток к поддержанию кроветворения

Хотя высоким пролиферативным и дифференцировочным потенциалом обладают ММСК, полученные из различных тканей человека, способность к образованию кроветворного микроокружения характерна только для ММСК, выделенных из КМ [94].

Известно, что при культивировании *in vitro* СКК быстро утрачивают пролиферативный и дифференцировочный потенциал, однако ММСК обладают способностью к сохранению свойств СКК. После эксплантации КМ на подслой ММСК образуются колонии, напоминающие по внешнему виду уложенную камнем мостовую, из-за чего формирующие их предшественники получили название «клетки, образующие области бульжника» (КООБ). Колонии, обнаруживаемые в такой культуре на 7 и 28 день, позволяют оценить концентрацию КООБ7 и КООБ28, соответственно, которая соответствует концентрации поздних олигопотентных и ранних полипотентных кроветворных предшественников в КМ [241].

Способность ММСК к поддержанию СКК определяется продукцией регуляторных факторов ниши КМ, которые были описаны в разделе, посвященном микроокружению СКК.

Способность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток к регуляции иммунного ответа

Низкая иммуногенность, а также способность к регуляции иммунного ответа делают ММСК привлекательным объектом для иммунотерапии. Низкая иммуногенность ММСК обусловлена слабой экспрессией на поверхностной мембране белков главного комплекса гистосовместимости 1-го класса (HLA-ABC) и отсутствием главного комплекса гистосовместимости 2-го класса (HLA-DR). Однако активация ММСК, например, под воздействием интерферона гамма (ИФН- γ), приводит к активации продукции HLA-DR данными клетками [181].

Иммуномодуляторные свойства ММСК обусловлены их способностью взаимодействовать с различными типами клеток иммунной системы и регулировать их функции.

ММСК подавляют развитие иммунного ответа, ингибируя пролиферацию и активацию наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов в результате ареста клеточного цикла в фазе G0/G1 [49; 170].

Т-хелперы 1-го типа (Th1) играют ведущую роль в развитии провоспалительного клеточного ответа и занимают особое место в патогенезе различных аутоиммунных заболеваний [159]. Сокультивирование ММСК с Th1 лимфоцитами приводит к снижению продукции ИФН- γ последними [24; 194]. Кроме того, ММСК способны индуцировать образование субпопуляции Th1 лимфоцитов, обладающих иммуносупрессорными свойствами и подавляющих пролиферацию аутологичных CD4⁺ Т-лимфоцитов [72].

Развитие гуморального ответа происходит при участии Т-хелперов 2-го типа (Th2), которые подавляют функции Th1 лимфоцитов и дендритных клеток (ДК) посредством секреции ИЛ-10, а также стимулируют В-клетки посредством продукции ИЛ-4 [159]. Сокультивирование с ММСК приводит к повышению секреции ИЛ-4 Th2 клетками, однако при патологиях, ассоциированных с повышением количества Th2 лимфоцитов (например, аллергия, астма, болезнь Крона), ММСК облегчают течение заболевания и ингибируют продукцию ИЛ-4 и ИЛ-5 Th2 клетками [176].

Т-хелперы 17-го типа (Th17) обеспечивают защиту организма от внеклеточных бактериальных и вирусных агентов. Нарушение регуляции Th17 клеток ассоциировано с патогенезом различных воспалительных и аутоиммунных заболеваний (например, рассеянный склероз, псориаз, ревматоидный артрит, системная красная волчанка и др.) [232]. Во многих работах было показано, что ММСК способны подавлять пролиферацию и дифференцировку Th17 лимфоцитов, а также секрецию ими ИЛ-17 и ИФН- γ [61; 174; 178]. Однако в одном из исследований были получены противоположные результаты, согласно которым при культивировании с ММСК происходит повышение продукции ИЛ-17 Th17 лимфоцитами.

Авторы объясняют данное расхождение различиями в стадиях активации Th17 клеток, на которых происходило сокультивирование с ММСК [194].

Регуляторные Т-лимфоциты (Treg) ответственны за поддержание иммунологической толерантности и подавление аутоиммунной агрессии. Treg воздействуют на эффекторные Т-клетки и ДК, ингибируя их дифференцировку, созревание и функционирование [159]. Известно, что ММСК стимулируют экспансию Treg за счет секреции растворимых факторов а также посредством индукции макрофагов [52; 125; 186]. В нескольких экспериментальных моделях *in vivo* было показано, что введение ММСК вызывает экспансию Treg и, вследствие этого, облегчает течение аутоиммунных заболеваний, а также способствует приживлению трансплантата [168; 171; 210].

CD8+ Т-клетки, или цитотоксические лимфоциты, – эффекторные клетки, осуществляющие элиминацию инфицированных вирусом и опухолевых клеток, а также играющие важную роль в процессе отторжения трансплантата и в патогенезе аутоиммунных заболеваний [159]. Активация CD8+ Т-клеток инициируется при связывании Т-клеточного рецептора с чужеродным пептидом в составе HLA-ABC на поверхности клеток. Процесс активации цитотоксических Т-лимфоцитов происходит в несколько этапов, каждый из которых характеризуется соответствующим иммунофенотипом. Известно, что ММСК препятствуют активации CD8+ Т-клеток и подавляют иммунный ответ, опосредованный данным типом клеток [120; 170]. Кроме того, показано, что ММСК способны ингибировать экспрессию антигена CD8 и молекул активации CD28 и CD44 на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов, способствуя приобретению ими иммуносупрессорного фенотипа [128].

Моноциты – субпопуляция лейкоцитов, способных к дифференцировке в антигенпрезентирующие клетки (макрофаги и ДК), которые участвуют в инициации иммунного ответа и служат связующим звеном между врожденной и адаптивной иммунной системой. Известно, что ММСК регулируют дифференцировку моноцитов, подавляя ее в одних случаях [126; 177], либо стимулируя созревание макрофагов 2-го типа – в других [186]. Макрофаги 2-го типа обладают противовоспалительным фенотипом и секретируют ИЛ-10 и ССЛ18. ССЛ18 в свою очередь индуцирует образование Treg [186]. Кроме того, ММСК оказывают воздействие на макрофаги и дендритные клетки, способствуя утрате ими провоспалительных свойств и приобретению иммуносупрессорного фенотипа [52; 86; 121].

Натуральные киллеры (NK) – эффекторные лимфоциты врожденного иммунитета, играющие важную роль в противоопухолевой и антибактериальной защите организма [107]. Показано, что ММСК оказывают ингибиторное воздействие на пролиферацию, способность к цитолизу, а также секрецию цитокинов (в том числе ИФН- γ) NK-клетками. [125; 144; 173].

В-клетки играют ведущую роль в гуморальной защите организма от чужеродных агентов, осуществляя продукцию антиген-специфичных антител. Опубликованные в литературе исследования, посвященные изучению влияния ММСК на функционирование В-лимфоцитов, немногочисленны и содержат противоречивые данные. Хотя в некоторых работах показано подавление пролиферации, дифференцировки и хемотаксиса В-клеток при сокультивировании с ММСК [47; 127], в другом исследовании выявлено стимулирующее влияние ММСК на пролиферацию и дифференцировку В-клеток [43].

Хотя характер воздействия ММСК на различные звенья иммунной системы зависит от разных факторов (от типа и стадии активации клеток-мишеней, концентрации цитокинов в среде и т. д.), в подавляющем большинстве случаев ММСК оказывают иммуносупрессорное воздействие на развитие иммунного ответа, что позволяет использовать данный тип клеток в клинической практике при терапии аутоиммунных заболеваний, а также при профилактике и лечении трансплантационных осложнений [145; 188].

Среди факторов, опосредующих иммуносупрессорное влияние ММСК, стоит выделить TGF- β 1, ИЛ-10, простагландин E2, фактор роста гепатоцитов, а также человеческий лейкоцитарный антиген G5 [24; 124; 125; 174; 197]. Супрессорное влияние ММСК на развитие Т-клеточного ответа также реализуется за счет экспрессии фермента ИДО-1. ИДО-1 метаболизирует необходимую для активации Т-лимфоцитов аминокислоту триптофан с образованием кинуренина, что приводит к подавлению пролиферации и дифференцировки Т-клеток [123; 178].

Проявление иммуносупрессорных свойств ММСК при прямом контакте с клетками иммунной системы происходит при участии нескольких молекул. Белок В7-Н4 экспрессируется на поверхности ММСК и подавляет активацию и пролиферацию Т-клеток при костимуляции [36; 234]. Взаимодействие рецептора программируемой смерти (PD-1) и FAS на поверхности Т-лимфоцитов с лигандами PD-L1 и FASL на поверхности ММСК, соответственно, приводит к подавлению пролиферации и/или апоптозу Т-клеток [47; 165; 175].

Важную роль в реализации иммунорегуляторных свойств ММСК играет экспрессия молекулы межклеточной адгезии 1-го типа и VCAM1. Увеличение продукции данных белков под воздействием провоспалительных цитокинов приводит к усилению иммуносупрессорных свойств ММСК за счет повышения адгезии к Т-лимфоцитам [142].

Стоит также отметить модулирующее воздействие ММСК на функционирование системы комплемента. Показано, что ММСК подавляют активацию системы комплемента посредством продукции СФН, которая усиливается под воздействием фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α) и ИФН- γ [172].

Способность ММСК к подавлению иммунного ответа реализуется посредством различных механизмов, а также при воздействии на разные субпопуляции клеток, что отражает важную роль стромальных предшественников в иммуномодуляции и поддержании толерантности в тех органах и тканях, из которых их получают. КМ служит одним из основных источников ММСК, что свидетельствует об особом значении локальной иммунорегуляции для его функционирования.

Способность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток к секреции трофических факторов

Трофическая функция ММСК связана со способностью данных предшественников к секреции факторов роста и хемокинов, стимулирующих пролиферацию клеток и ангиогенез [188]. ММСК продуцируют FGF-2, TGF- β , TGF- α , фактор роста гепатоцитов, эпидермальный фактор роста и инсулиноподобный фактор роста 1, которые индуцируют деление фибробластов, эпителиальных и эндотелиальных клеток [95; 212]. Секретируемые ММСК фактор роста эндотелия сосудов А (VEGFA), ANGPT1, эпидермальный фактор роста и инсулиноподобный фактор роста 1 активируют мобилизацию эндотелиальных клеток и инициируют васкуляризацию поврежденных тканей [200].

1.4. Апластическая анемия

Этиология апластической анемии

АА – это редкое заболевание системы крови, характеризующееся трехростковой цитопенией и аплазией КМ с замещением кроветворного КМ жировой тканью [247]. Частота возникновения АА варьирует в зависимости от географической области от 2 случаев на миллион человек в год в Европе и Северной Америке до 4-7 случаев на миллион в год в Восточной и Юго-Восточной Азии [250]. Для АА характерны два возрастных пика заболеваемости: от 10 до 25 лет, а также после 60 лет [180].

Диагностика апластической анемии

Диагноз АА устанавливают по совокупности следующих признаков:

1. Трехростковая цитопения: анемия (гемоглобин < 110 г/л), гранулоцитопения (гранулоциты < $2,0 \times 10^9$ /л), тромбоцитопения (тромбоциты < 100×10^9 /л);
2. Снижение клеточности КМ (< 30%) и отсутствие мегакариоцитов по данным пункта КМ (стерильная пункция);
3. Аплазия КМ с преобладанием жировой ткани в биоптате подвздошной кости (билатеральная трепанобиопсия) [6].

Диагноз идиопатическая АА устанавливают на основании исключения других состояний со схожей клинической картиной, например, гипопластического варианта МДС, врожденных синдромов костномозговой недостаточности (анемия Фанкони, врожденный дискератоз, синдром Швахмана-Даймонда, синдром Даймонда-Блэкфана и др.), аплазии, вызванной влиянием радиации и/или химических веществ, а также вторичной аплазии, связанной с течением сопутствующего заболевания [180].

В зависимости от степени выраженности цитопении выделяют три формы АА:

1. НАА: гранулоцитопения $> 0,5 \times 10^9/\text{л}$;
2. ТАА: гранулоцитопения $< 0,5 \times 10^9/\text{л}$, тромбоцитопения $< 20 \times 10^9/\text{л}$;
3. СТАА: гранулоцитопения $< 0,2 \times 10^9/\text{л}$ [6].

Нередко при АА в крови выявляют клон клеток, характерный для пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ). Этот клон возникает в результате пролиферации СКК с инактивирующей мутацией в гене *PIGA*, которая приводит к нарушению синтеза гликозилфосфатидилинозитола, осуществляющего прикрепление к поверхностной мембране белков CD55 и CD59. Клетки, лишенные данных белков, становятся мишенью системы комплемента и подвергаются лизису. Клинические проявления ПНГ – гемолиз эритроцитов, тромбоз и повышение уровня лактатдегидрогеназы в крови – как правило, отсутствуют у больных АА с размером ПНГ-клона меньше 10% [67].

Течение АА характеризуется повышенным риском развития поздних клональных осложнений с трансформацией в МДС и ОМЛ, которые выявляют у 15-26% больных АА на 10-летнем горизонте наблюдения [37].

Терапия апластической анемии

К основным подходам, применяемым при лечении АА, относятся алло-ТГСК и ИСТ. Алло-ТГСК рассматривают в качестве терапии выбора (терапии 1-й линии) для больных моложе 45 лет при наличии родственного донора, совместимого по аллелям HLA. В остальных случаях назначают ИСТ, включающую лошадиный антиtimoцитарный иммуноглобулин (АТГ) и циклоспорин А. Совершенствование ИСТ за последние десятилетия привело к повышению эффективности лечения АА: положительный ответ на терапию удается получить у 68-87% больных, а общая 10-летняя выживаемость достигает 90% [4; 117]. Однако доля полного ответа составляет 18-46% от всех больных, получавших ИСТ [4; 211]. При отсутствии ответа на ИСТ через 3-6 месяцев от момента ее начала больному диагностируют рефрактерную форму заболевания и назначают повторный курс ИСТ и/или элтромбопаг. Элтромбопаг – это агонист тромбопоэтинового рецептора, который вызывает моно-, би- или трилинейное восстановление кроветворения у некоторых больных с рефрактерной формой АА, достоверно повышая их выживаемость [88; 89].

Примерно у трети больных АА, первоначально ответивших на ИСТ, происходит развитие рецидива [117; 204]. В таких случаях назначают дополнительный курс ИСТ и/или элтромбопаг [4].

Патогенез апластической анемии

К настоящему моменту достигнут значительный прогресс в понимании патогенеза АА. Показана ведущая роль аутоиммунного механизма в развитии аплазии при АА для большинства больных, что объясняет эффективность применения ИСТ при данном заболевании. Однако отсутствие полного ответа на ИСТ и рефрактерное течение АА у некоторых больных свидетельствуют о вовлечении в патогенез заболевания других, пока неизвестных факторов. Выявление данных факторов необходимо для разработки новых терапевтических подходов, направленных на увеличение частоты достижения более выраженного и стойкого ответа у больных АА.

Снижение количества и нарушение свойств стволовой кроветворной клетки при апластической анемии

Известно, что аплазия при АА развивается в результате снижения количества и нарушения функционирования СКК в КМ [18]. Было показано, что сокращение пула СКК в КМ больных происходит в результате апоптоза кроветворных предшественников. В КМ больных происходит увеличение доли СКК, несущих на поверхности рецептор FAS, связывание которого с лигандом на мембране Т-лимфоцитов приводит к гибели клеток-мишеней. Активация экспрессии рецептора FAS в кроветворных предшественниках вызвана повышением концентрации провоспалительных цитокинов ИФН- γ и ФНО- α в сыворотке крови и КМ больных в результате активации аутоиммунного процесса [140].

Нарушение иммунорегуляции при апластической анемии

Предположение об участии иммунного механизма в развитии аплазии КМ при АА впервые возникло после того, как оказалось, что у некоторых больных несмотря на отторжение трансплантата после алло-ТГСК происходило аутологичное восстановление полноценного кроветворения. Данное явление было обусловлено иммуносупрессорным влиянием условий кондиционирования и в дальнейшем привело к внедрению ИСТ в качестве отдельного вида терапии АА [156]. Впоследствии были накоплены данные, подтверждающие ведущую роль аутоиммунных процессов в патогенезе АА по крайней мере для тех больных, у которых удается достичь ответа на ИСТ.

В настоящее время показано, что гибель СКК при АА происходит в результате атаки цитотоксических Т-лимфоцитов [249]. Изучение репертуара Т-клеточного рецептора лимфоцитов больных АА позволило выявить олигоклональную экспансию CD8⁺ клеток, вызванную специфическим ответом на антиген и характерную для ряда других аутоиммунных

заболеваний [135]. Хотя в сыворотке крови больных были выявлены антитела к различным аутоантигенам (кинектину, миезину и др.), их цитотоксические свойства установить не удалось, и попытки определить природу антигена до сих пор не увенчались успехом [156].

Активация иммунного ответа при АА также сопровождается изменением субпопуляционного состава CD4⁺ Т-лимфоцитов. Показано, что в крови больных АА в дебюте заболевания происходит увеличение Th1, Th2 и Th17 популяций Т-лимфоцитов, участвующих в развитии аутоиммунных реакций. При анализе субпопуляционного состава Treg было выявлено снижение доли клеток, обладающих иммуносупрессорными свойствами и участвующих в поддержании иммунологической толерантности. Функциональные свойства Treg больных АА также оказались нарушенными: в отличие от донорских клеток Treg больных АА оказались не способны к подавлению секреции ИФН- γ и ИЛ-2 эффекторными Т-лимфоцитами [106].

Индукция иммунного ответа при АА сопровождается секрецией провоспалительных цитокинов активированными Т-клетками. Известно, что в крови и КМ больных АА увеличена концентрация ИФН- γ и ФНО- α , которые подавляют рост гемопоэтических предшественников *in vitro* и нарушают их способность к репопуляции *in vivo* [221; 253]. Регуляция секреции ИФН- γ происходит при участии ФНО- α , выделяемого макрофагами КМ. Показано увеличение доли ФНО- α -секретирующих макрофагов в КМ больных АА, что подтверждает роль данного цитокина в патогенезе данного заболевания [157].

Хотя в настоящее время известно, что гибель СКК при АА происходит в результате аутоиммунной атаки Т-лимфоцитов, до сих пор остается неясно, какие события вызывают активацию иммунного ответа при данном заболевании и почему не у всех больных удается достичь ответа на ИСТ. Возможно, это связано с вовлечением в патогенез АА других факторов, среди которых рассматривают генетическую предрасположенность, укорочение теломер, соматические мутации в СКК, а также нарушение функционирования стромального микроокружения.

Генетическая предрасположенность к развитию апластической анемии

В различных исследованиях было показана ассоциация АА с определенными аллелями HLA. В частности, было выявлено увеличение представленности аллелей DRB1*15 и DQB1*06 у больных АА [93; 228].

Примерно у 13% больных АА в кроветворных клетках выявляют копий-нейтральную потерю гетерозиготности в коротком плече хромосомы 6 (6pLOH) [130]. При данной мутации в СКК происходит утрата одного из двух аллелей HLA-ABC, участвующего в представлении аутоантигенов цитотоксическим Т-лимфоцитам. Показано, что при АА наиболее часто встречается утрата четырех аллелей (A*02:01, A*02:06, A*31:01 и B*40:02), что указывает на

участие HLA в патогенезе АА и существование генетических факторов, определяющих предрасположенность к данному заболеванию [102].

Считается, что наличие клона с брLОН у больных АА позволяет клеткам избегать цитотоксического воздействия Т-лимфоцитов в условиях аутоиммунной атаки [156]. Было показано, что у всех больных с брLОН удается достичь ответа на ИСТ в отличие от больных АА, не имеющих данной мутации, которые достигают ответа только в 52,2% случаев [68]. Результаты данного исследования подтверждают аутоиммунную природу АА у больных с брLОН.

Укорочение теломер стволовых кроветворных клеток при апластической анемии

Теломеры – это концевые структуры хромосом, состоящие из тандемных шестинуклеотидных последовательностей ДНК и связанного с ними комплекса белков под названием «шелтерин» [151]. Теломеры защищают концевые участки хромосом от ломкости и слияния друг с другом. В результате недорепликации хромосом при каждом делении длина теломер сокращается. Фермент теломеразы способна достраивать концевые тандемные последовательности ДНК хромосом, однако ее активности недостаточно, чтобы предотвратить постепенное укорочение длины теломер по мере жизни организма. Уменьшение длины теломер до критического уровня приводит к геномной нестабильности, накоплению мутаций, старению и гибели клеток. По мере сокращения теломер стволовые клетки, в том числе СКК, утрачивают регенеративный потенциал. Было показано уменьшение длины теломер в СКК больных АА по сравнению с соответствующими по возрасту здоровыми донорами [230]. Анализ экспрессии генов в СКК больных АА выявил активацию транскрипции проапоптотических генов, а также генов, подавляющих пролиферацию и препятствующих вхождению в клеточный цикл [108]. Результаты данных исследований позволяют предположить, что снижение пролиферативной активности СКК при АА происходит в результате укорочения теломер и приводит к неспособности оставшихся СКК восстановить нарушенное в результате аутоиммунной атаки кроветворение [251]. Кроме того, было показано, что сокращение длины теломер при АА ассоциировано с хромосомной нестабильностью и повышенной вероятностью трансформации в МДС и ОМЛ [222].

Соматические мутации и клональный гемопоэз при апластической анемии

В норме кроветворение поликлонально, то есть происходит в результате одновременной пролиферации и дифференцировки большого количества кроветворных предшественников [206]. Ситуацию, при которой доля потомков одной гемопоэтической клетки начинает преобладать, называют клональным гемопоэзом. Хотя у больных АА обнаружены мутации примерно в 30 различных генах, наиболее часто клональный гемопоэз при данном заболевании ассоциирован преимущественно с 5 генами: *PIGA*, *HLA*, *BCOR*, *ASXL1*, *DNMT3A* [156].

Примерно у половины больных АА выявляют мутацию в гене *PIGA*, в результате которой нарушается синтез гликозилфосфатидилинозитола, осуществляющего прикрепление белков CD55 и CD59 к поверхностной мембране. Эта мутация характерна для ПНГ, поэтому клетки мутантного клона называют ПНГ-клон. Клетки ПНГ-клона, лишённые данных белков, подвержены атаке системой комплемента. Несмотря на это, ПНГ-клон способен полностью восстанавливать нормальное кроветворение, а клинические симптомы ПНГ, как правило, не наблюдаются у больных АА с размером клона меньше 10% [67]. Предполагают, что экспансия ПНГ-клона связана со способностью клеток с мутацией в гене *PIGA* избегать атаки тех цитотоксических Т-лимфоцитов, мишенью которых является гликозилфосфатидилинозитол [156]. Известно, что больные АА с ПНГ-клоном достоверно чаще отвечают на ИСТ [214], что подтверждает аутоиммунную природу АА у таких больных.

Мутации *brLOH*, ассоциированные с утратой локусов, кодирующих *HLA*, были рассмотрены в разделе, посвященном генетической предрасположенности к развитию АА.

Гены *BCOR*, *ASXL1*, *DNMT3A* кодируют белки, участвующие в регуляции структуры хроматина и/или транскрипции генов. *BCOR* – корепрессор транскрипционного фактора *BCL6*, нарушение экспрессии которого ассоциировано с лимфомагenezом. У больных МДС и ОМЛ описаны мутации, приводящие к утрате функции *BCOR* с последующей активацией *BCL6*, усилением пролиферации и миелоидной дифференцировки [40]. *ASXL1* – это белок, участвующий в эпигенетической регуляции экспрессии генов. Мутации в гене *ASXL1* обнаруживают примерно у 15-25% больных МДС и у 10-15% больных ОМЛ. Продукция укороченной формы мутированного *ASXL1* приводит к активации транскрипции генов, ассоциированных с миелоидной дифференцировкой и онкогенной трансформацией [34; 57]. *DNMT3A* кодирует фермент, осуществляющий метилирование дочерней цепи ДНК при репликации. Соматические мутации *DNMT3A* обнаруживают примерно у 30% больных ОМЛ с нормальным кариотипом, а также у некоторых больных МДС. Мутации *DNMT3A* при данных заболеваниях приводят к снижению метилтрансферазной активности фермента, гипометилированию генома и повышают вероятность онкогенной трансформации гемопоэтических клеток [112; 235]. Сами по себе мутации в генах *BCOR*, *ASXL1*, *DNMT3A* не вызывают ОМЛ или МДС, так как их обнаруживают и у здоровых людей, у которых эти заболевания не развиваются в течение жизни. Однако наличие данных мутаций отражает предрасположенность больных к миелопролиферативным заболеваниям [23].

При рассмотрении роли клонального гемопоэза в патогенезе АА стоит сказать, что он не приводит к развитию аплазии, а возникает как ее следствие. Клональность при АА возникает в результате сокращения количества нормальных СКК и экспансии клонов с соматическими

мутациями, позволяющими им избегать аутоиммунной атаки (*PIGA, HLA*) либо выживать в условиях этой атаки (*BCOR, ASXL1, DNMT3A*) [156].

Нарушение функционирования стромального микроокружения при апластической анемии

Значение кроветворного микроокружения в развитии аплазии при АА до конца не изучено. В норме клетки ниши КМ функционируют при тесном взаимодействии друг с другом, а также с кроветворными клетками. С одной стороны, при АА происходит нарушение данного взаимодействия в результате снижения количества гемопоэтических предшественников, что может приводить к функциональным изменениям микроокружения и вносить вклад в патогенез заболевания. Степень выраженности цитопении, и, соответственно, аплазии КМ, у больных АА различается от умеренной при НАА до тяжелой и сверхтяжелой при ТАА и СТАА, соответственно, что определяет физиологические различия условий функционирования клеток стромы у больных с разными формами заболевания. С другой стороны, мезенхимные предшественники КМ в норме обладают способностью к поддержанию кроветворения и подавлению иммунного ответа, возможно, при НАА происходит компенсаторная активация данных свойств, которая препятствует развитию более выраженной аплазии, наблюдаемой при ТАА и СТАА. Частота прогрессии НАА в ТАА невысока и составляет 16% [84], что указывает на различия в механизмах патогенеза данных форм заболевания.

Выявление изменений кроветворного микроокружения у больных АА необходимо для понимания его роли в патогенезе заболевания, при этом особое значение приобретает анализ особенностей стромальных предшественников при разных формах АА. Результаты данного исследования позволят понять, происходит ли нарушение функционирования клеток ниши при АА разной степени тяжести и могут ли быть в дальнейшем использованы дополнительные дифференциальные терапевтические подходы для повышения эффективности ИСТ у больных НАА, ТАА и СТАА.

Как было сказано выше, поддержание СКК в КМ осуществляется преимущественно в сосудистой нише. Клетки сосудов не только служат источником факторов, необходимых для регуляции функций СКК, но и определяют локализацию других компонентов ниши, в том числе МСК. Известно, что при АА происходит уменьшение плотности сосудистой сети в КМ, что ассоциировано со снижением ключевого ангиогенного фактора VEGFA в сыворотке крови [96; 97]. При этом в ТАА и СТАА плотность сосудов в КМ достоверно ниже, чем при НАА [97]. Достижение ответа на ИСТ и успешная алло-ТГСК сопровождаются восстановлением ангиогенеза в КМ и концентрации VEGFA в сыворотке крови у больных различными формами заболевания [96].

Характерным диагностическим критерием АА служит отсутствие мегакариоцитов в пунктате КМ, выявляемое у большинства больных [6; 233]. С одной стороны, мегакариоциты –

один из компонентов сосудистой ниши, истощение которого в КМ приводит к активации пролиферации СКК [162]. С другой стороны, у больных АА выявлено нарушение способности ранних кроветворных предшественников к дифференцировке в мегакариоциты [16; 138].

Макрофаги – клетки кроветворного происхождения, также представляющие собой компонент микроокружения КМ [46]. В одной из работ было выявлено нарушение процесса созревания макрофагов из моноцитов у больных АА *in vitro* [76], однако в других исследованиях показано увеличение общего количества макрофагов в КМ больных АА по сравнению с донорами *in situ* [45; 157]. При этом в экспериментах с использованием мышинной модели ТАА оказалось, что элиминация макрофагов в КМ препятствует развитию иммуноопосредованной аплазии, что может отражать вовлечение данных клеток в патогенез заболевания, а также нарушение их функций при ТАА [115; 157].

Первые свидетельства нарушения функционирования стромальных предшественников КМ у больных АА получены в работах, посвященных изучению длительной культуры КМ. Тогда оказалось, что в отличие от образцов КМ доноров, не все образцы КМ больных АА способны образовывать конфлуэнтный подслон, содержащий три основных типа клеток: фибробласты, адипоциты и макрофаги. Кроме того, из 6 больных, у которых не удалось получить фибробластоподобные клетки *in vitro*, у 5 впоследствии произошло отторжение трансплантата после алло-ТГСК, а у 1 не удалось достичь ответа на ИСТ, что указывает на нарушение способности стромального микроокружения к поддержанию кроветворения [30]. Более того, оказалось, что в подслоях из КМ больных АА, не отличавшихся от донорских по составу и морфологии клеток, изменен уровень экспрессии белков, ассоциированных с иммунным ответом и регуляцией кроветворения, в том числе ANGPT1, VCAM1, VEGFA и антагониста ИЛ-1P1 [25; 30].

Эффективность получения культуры ММСК из КМ больных АА ниже, чем у доноров, и составляет от 50 до 80% [64; 80], однако в одном из исследований, выполненном на когорте педиатрических больных, удалось получить ММСК из всех образцов КМ [119]. Экспрессия поверхностных маркеров ММСК из КМ больных АА не изменена по сравнению с таковой у доноров [64; 119; 183; 229]. При этом в отношении ряда других свойств ММСК больных АА в литературе нет единого мнения. В одних исследованиях показано изменение морфологии ММСК больных АА по сравнению с ММСК здоровых доноров [80; 183], в других – таких отличий выявлено не было [64; 119]. В ряде работ отмечено нарушение пролиферативных свойств ММСК больных АА [64; 80; 183; 208], однако в других не было выявлено отличий по сравнению с ММСК доноров [25; 119]. Снижение клоногенного потенциала ММСК больных АА констатируют все исследователи, изучавшие данное свойство [64; 80; 119], как и повышение доли апоптотических клеток в культуре ММСК больных АА по сравнению с донорами [80; 183]. При оценке

дифференцировочного потенциала ММСК больных АА разные авторы описывают либо отсутствие изменений по сравнению с донорами [48; 119], либо нарушение способности к остеогенной и адипогенной дифференцировке [25; 208], либо снижение способности к остеогенной дифференцировке, сопровождающееся усилением адипогенной дифференцировки [80; 183]. Хотя при изучении ниши КМ больных АА *in situ* показано снижение количества остеогенных клеток, экспрессирующих *SPP1* [242], в другом исследовании выявлено увеличение образования губчатой кости при ТАА [207]. Клинические данные, подтверждающие нарушение формирования костной ткани у больных АА, в литературе отсутствуют. При изучении свойств адипоцитов, полученных из КМ больных АА, также оказалось, что ни количество жировых клеток, ни их размер не имеют прогностической значимости при данном заболевании [15].

В отношении способности ММСК больных АА к поддержанию кроветворения и иммунорегуляции также существуют разногласия. Хотя в большинстве работ показано, что ММСК больных АА способны к поддержанию кроветворных предшественников *in vitro* [48; 229] а также к формированию полноценного кроветворного микроокружения *in vivo* [119], в одном из исследований показано нарушение данного свойства ММСК при АА [64]. Снижение иммуносупрессорного воздействия ММСК больных АА на развитие иммунного ответа отмечено в одном из источников [229], при этом в другом отличий по сравнению с донорами выявлено не было [48]. При анализе транскрипции генов показано изменение профиля экспрессии молекул, ассоциированных с пролиферацией, дифференцировкой, апоптозом, хемотаксисом, поддержанием кроветворения, а также иммунорегуляцией, однако результаты получены на нескольких образцах, что не позволяет сделать заключение о статистической значимости выявленных отличий [80; 183].

КОЕф больных АА изучены гораздо менее подробно, чем ММСК. При анализе концентрации КОЕф в КМ больных АА в одной из работ не было выявлено отличий по сравнению с донорами [229], в другой показано снижение [64], а в третьей – повышение [25].

В Таблице 1 перечислены основные исследования, посвященные определению особенностей костномозговых стромальных предшественников при АА. Для каждого из них указан размер группы больных, количество больных НАА, ТАА и СТАА при наличии данных в источнике, а также описан подход к формированию группы.

Таблица 1 – Исследования, посвященные изучению стромальных предшественников из КМ больных АА

Исследование	Число больных АА (НАА/ТАА/СТАА)	Подход к формированию группы больных
Holmberg, 1994	89 (5/84/0)	В дебюте заболевания.
Vasigalupo, 2005	23 (0/23/0)	3 больных в дебюте, 16 после ИСТ (13 ответивших на терапию, 2 с рецидивом, 1 с рефрактерным течением заболевания), 4 после алло-ТГСК.
Shipounova, 2009	26 (10/16/0)	9 больных АА в дебюте, 12 - в ремиссии, 5 - в рецидиве.
Chao, 2010	5 (0/5/0)	Педиатрические больные (моложе 18 лет). В дебюте заболевания.
Li, 2012	21 (- ¹)	Только для 11 больных указан диагноз ТАА. В дебюте заболевания.
Bueno, 2014	9 (-)	НАА и ТАА. В дебюте заболевания.
Hamzic, 2015	22 (9/10/3)	13 больных в дебюте заболевания и 9 больных, получавших ИСТ.
Michelozzi, 2016	8 (2/4/2)	Педиатрические больные (моложе 18 лет).
Wu, 2017	52 (0/44/8)	Больные АА в дебюте, у которых впоследствии была успешно проведена алло-ТГСК.
Huo, 2020	15 (6/9/0)	В дебюте заболевания.

Несмотря на то, что существует несколько работ, посвященных изучению свойств стромальных предшественников из КМ больных АА, различия в результатах исследований не позволяют сделать вывод о роли клеточного микроокружения в патогенезе заболевания. Противоречия могут быть связаны с использованием разных функциональных методов, а также различающихся подходов к формированию группы больных АА. В одних исследованиях анализируют предшественники из КМ больных с одной формой заболевания, в других – в общую

¹ Нет данных.

группу включают больных с разными формами заболевания, в третьих – наряду с больными в дебюте включают больных, получавших ИСТ. При этом в настоящий момент нет ни одной работы, посвященной изучению свойств стромальных предшественников из КМ больных АА с разными формами заболевания и позволяющей сделать вывод о правомерности объединения таких больных в общую группу. Интерпретация данных затруднена также тем, что результаты нередко бывают получены на небольших выборках, что делает невозможным определение значимости отличий. Все это диктует необходимость изучения особенностей стромальных предшественников из КМ больных АА в дебюте при разных формах заболевания с формированием выборок, достаточных для выявления значимых отличий.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Доноры костного мозга и больные апластической анемией

Клетки КМ из верхних задних остей подвздошных костей здоровых доноров для алло-ТГСК и из грудины больных АА с установленным диагнозом до начала ИСТ получали при эксфузии после подписания добровольного информированного согласия. Аликвоты КМ 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.) в период с 2018 по 2023 год.

При диагностической пункции были получены образцы КМ 43 больных приобретенной АА с впервые установленным диагнозом, из них 22 больных с НАА, 16 больных ТАА, 5 больных СТАА (Таблица 2). Диагностика АА проведена в соответствии с критериями, используемыми в ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России [6]. Клинические характеристики включенных в исследование больных приведены в Приложении А (Таблица А.1).

Аликвоты КМ 31 здорового донора были отобраны при плановой эксфузии КМ для алло-ТГСК и использованы в качестве контроля. Характеристики доноров представлены в Таблице 2 и в Приложении А (Таблица А.2). Группы больных НАА, ТАА и здоровых доноров соответствовали по полу и возрасту. Группа больных СТАА оказалась слишком маленькой и состояла только из мужчин, поэтому при статистической обработке данных была объединена с группой больных ТАА (ТАА+СТАА). Значимых различий по представленности клона ПНГ у больных с разными формами АА выявлено не было.

Таблица 2 – Общая характеристика групп больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров, включенных в исследование

Группа	Доноры	НАА	ТАА	СТАА
Число - n	31	22	16	5
Пол – n (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)
Клон ПНГ – n (выявлен/не выявлен)	-	18/4	13/3	3/2
Размер ПНГ-клона среди гранулоцитов, % Медиана (диапазон)	-	2,2 (0,03-65,1)	0,62 (0,03-25,6)	0,26 (0,15-0,27)

2.2. Методы выделения стромальных предшественников из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Получение фракции мононуклеаров костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Для последующих экспериментов из каждого образца КМ больных АА и здоровых доноров в стерильных условиях выделяли фракцию мононуклеаров. К аликвоте КМ добавляли равный объем культуральной среды α MEM (ICN), содержащей 0,2 % метилцеллюлозы (плотность 1500 сП, Sigma), и инкубировали в течение 40 минут при комнатной температуре для осаждения эритроцитов и гранулоцитов. Надосадочную жидкость отбирали, определяли в ней концентрацию клеток, остаток центрифугировали с ускорением 450 g в течение 10 минут. Супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в стандартной питательной среде α MEM, содержащей 10% ЭТС (HyClone), 2 мМ глутамин (ICN), 100 ед./мл пенициллина (Ферейн) и 50 мкг/мл стрептомицина (Ферейн), в концентрации 10^7 клеток в мл. Полученную суспензию мононуклеаров использовали для дальнейших исследований.

Определение концентрации клеток в суспензии

Концентрацию мононуклеаров в суспензии определяли при подсчете ядросодержащих клеток в камере Горяева. Для этого аликвоту анализируемого образца разводили в 20 раз в 1%-ом растворе генцианвиолета, приготовленном на 3%-й уксусной кислоте. После подсчета ядросодержащих клеток концентрацию мононуклеаров (C [клеток/мл]) определяли по формуле 1:

$$C = 2,5 * 10^3 * N * D, \quad (1)$$

где N — количество клеток в полной камере,

D — кратность разведения суспензии.

Определение концентрации ММСК в суспензии проводили с помощью автоматического счетчика клеток Countess II FL (Life Technologies) после добавления к аликвоте анализируемого образца равного объема 0,1 % раствора трипанового синего (ICN) для выявления живых клеток.

Культура мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

Для получения культуры ММСК $3,0 \times 10^6$ мононуклеаров КМ высаживали во флакон с площадью дна 25 см^2 в стандартной культуральной среде α MEM, содержащей 10% ЭТС, 2 мМ глутамина, 100 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO_2 в CO_2 -инкубаторе, производя полную смену среды через каждые 3-4 дня. После образования конфлуентного монослоя клетки пассировали, дважды промывая раствором Версена (0,02 % ЭДТА тетразамещенная соль (ICN) в 0,85 % NaCl (ICN)) и инкубируя в 0,25 % растворе трипсина, приготовленном на растворе Версена, при комнатной температуре. После открепления клеток от поверхности флакона трипсин инактивировали добавлением 3-кратного объема стандартной культуральной среды, определяли концентрацию клеток в суспензии и рассаживали по $1,0 \times 10^5$ клеток на флакон с площадью дна 25 см^2 . Первый пассаж после образования клетками конфлуентного монослоя от момента высаживания мононуклеаров КМ во флакон обозначен как П0, время до первого пассирования – время до П0. При каждом дальнейшем пассировании номер пассажа увеличивался соответственно.

Выделенные по данному протоколу ММСК соответствовали требованиям, предъявляемым к данному типу клеток [181], и характеризовались иммунофенотипом $\text{CD73}^+\text{CD90}^+\text{CD105}^+\text{CD34}^-\text{CD45}^-\text{CD14}^-\text{HLA-DR}^-$, а также способностью к дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлении, что было показано ранее [5; 9].

Колониеобразующие единицы фибробластов

Для получения колоний КОЕф $1,0 \times 10^6$ мононуклеаров КМ высаживали во флакон с площадью дна 25 см^2 в среде α MEM, содержащей 20% ЭТС, 2 мМ глутамина, 100 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в течение 14 дней без смены среды. После окончания времени инкубации часть флаконов была использована для выделения тотальной РНК с последующим анализом ОУЭ генов. В других флаконах колонии КОЕф после двукратной промывки 0,85% раствором NaCl были окрашены 0,1 % кристаллвиолетом, приготовленном на 20 % метаноле (Реахим), и подсчитаны с помощью бинокулярного микроскопа (STEMI SR, Zeiss).

2.3. Методы анализа стромальных предшественников из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Определение доли стромальных клеток в костном мозге больных апластической анемией и здоровых доноров

Уменьшение количества гемопоэтических клеток в КМ у больных АА может приводить к изменению соотношения кроветворных и стромальных предшественников. Определение доли стромальных клеток в КМ больных АА и здоровых доноров проводили методом проточной цитофлуориметрии. Для этого отбирали аликвоту суспензии мононуклеаров КМ, содержащую $0,5-1,0 \times 10^6$ клеток, проводили лизис эритроцитов раствором PharmLyse (BD Biosciences) согласно инструкции производителя, центрифугировали с ускорением 400 g в течение 4 минут. Супернатант отбрасывали, а к осадку добавляли 2 мл раствора CellWash (BD Biosciences), тщательно перемешивали на вортексе и центрифугировали с ускорением 400 g в течение 4 минут. Супернатант удаляли, а к осадку добавляли 50 мкл CellWash и 30 мкл Brilliant Staining Buffer (BD Biosciences), после чего тщательно перемешивали содержимое пробирки на вортексе. Затем в пробирку вносили моноклональные антитела (Таблица 3), а также краситель Syto16 (5 мкл разведенного в 100 раз красителя, Invitrogen, S7578), окрашивающий только ядросодержащие клетки в образце.

Таблица 3 – Характеристика моноклональных антител, а также объем, использованный для определения доли стромальных клеток в КМ больных АА и здоровых доноров

Антигенная специфичность	Флуорохром	Объем, мкл	Производитель, каталожный номер
CD90	PE	1	BD Biosciences, 555596
CD235ab	PE/Cyanine5	0,2	Biolegend, 306605
CD45	PE/Cyanine7	0,5	Biolegend, 304016
CD34	APC	0,5	BD Biosciences, 345804
CD71a	APC/Cyanine7	0,5	Biolegend, 334109
CD105	BV421	1	Biolegend, 800509
CD73	BV605	1	Biolegend, 344023

Иммунофенотипическое исследование проводили на проточном цитофлуориметре BC CytoFLEX, анализ данных – с помощью программного обеспечения Kaluza Analysis. Для выявления популяции мезенхимных клеток в образцах КМ больных АА и здоровых доноров использовали алгоритм гейтирования, представленный на Рисунке 1.

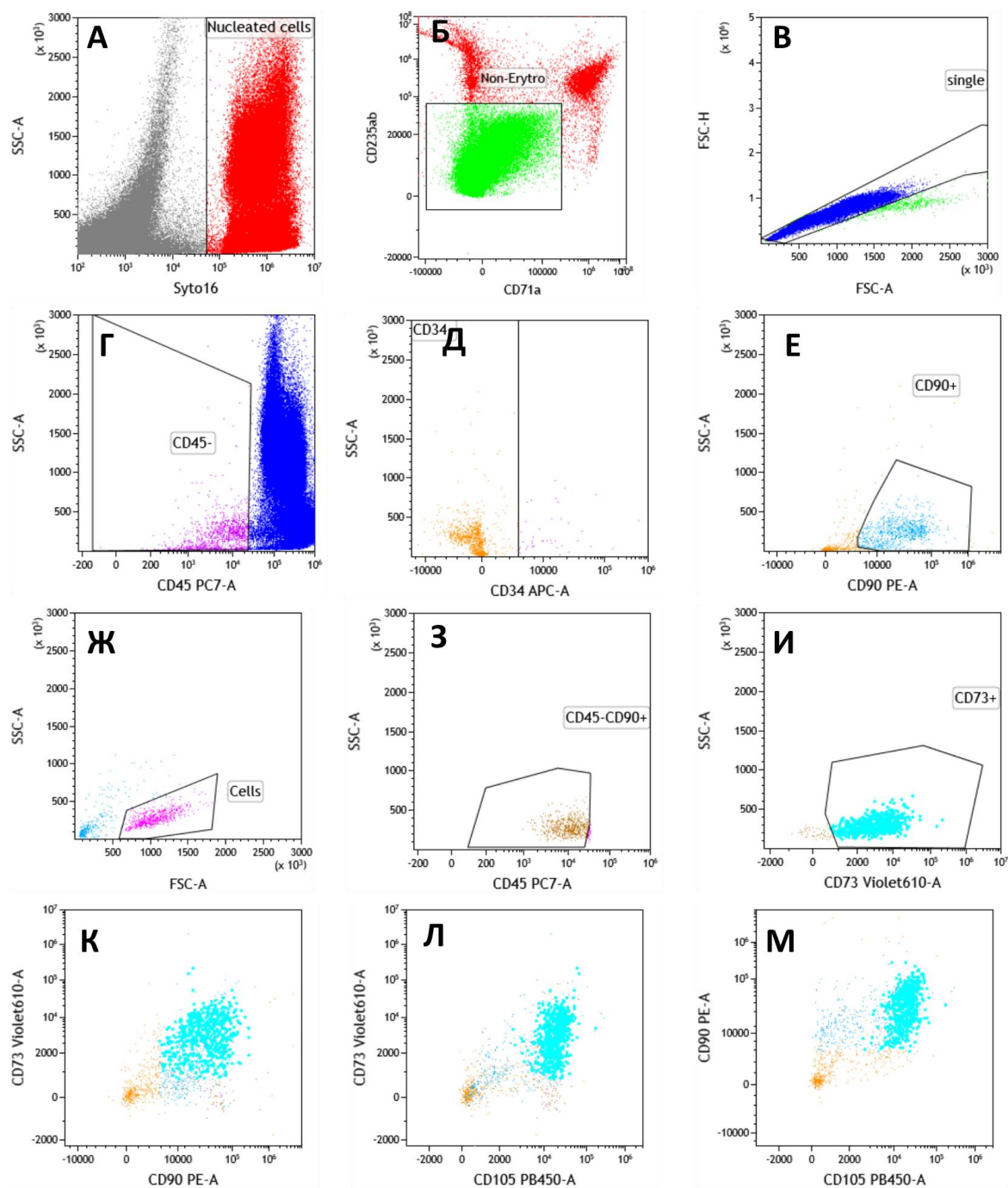


Рисунок 1 – Стратегия гейтирования при анализе доли стромальных клеток в КМ больных АА и здоровых доноров методом проточной цитофлуориметрии: выделение ядродержащих клеток (А), исключение клеток эритроидного ряда (Б), выделение единичных событий (В), исключение клеток лейкоцитарного роста (Г), а также ЭК и гемопоэтических предшественников (Д), выявление популяции клеток, несущих маркер мезенхимных клеток CD90 (Е) и сопоставимых по размеру с лейкоцитами (Ж), дополнительное выделение клеток, не несущих панлейкоцитарный маркер CD45 (З) и экспрессирующих маркер стромальных клеток CD73 (И), подтверждение экспрессии мезенхимных маркеров CD73, CD90 и CD105 клетками выделенной популяции (К, Л, М)

Сначала выделяли популяцию ядродержащих клеток (диаграмма SSC-A против Syto16, гейт Nucleated cells, Рисунок 1А) и исключали клетки эритроидного ряда, экспрессирующие антигены CD235ab и CD71a (диаграмма CD235ab против CD71a, гейт Non-Erythro, Рисунок 1Б). Затем гейтировали единичные события (диаграмма FSC-H против FSC-A, гейт single, Рисунок 1В), исключали лейкоциты, несущие маркер CD45 (диаграмма SSC-A против CD45, гейт CD45-, Рисунок 1Г), а также ЭК и гемопоэтические предшественники, характеризующиеся экспрессией молекулы CD34 (диаграмма SSC-A против CD34, гейт CD34-, Рисунок 1Д). После этого выделяли популяцию клеток, экспрессирующих CD90 (диаграмма SSC-A против CD90, гейт CD90+, Рисунок 1Е) и сопоставимых по размеру с лейкоцитами (диаграмма SSC-A против FSC-A, гейт Cells, Рисунок 1Ж). Затем проводили дополнительное выделение клеток, не несущих на поверхности панлейкоцитарный маркер CD45 (диаграмма SSC-A против CD45, гейт CD45-CD90+, Рисунок 1З) и экспрессирующих CD73 (диаграмма SSC-A против CD73, гейт CD73+, Рисунок 1И). Далее убеждались, что выделенная популяция клеток экспрессирует поверхностные маркеры мезенхимных клеток CD73, CD90 и CD105 (диаграммы CD73 против CD90, CD73 против CD105, CD90 против CD105, Рисунок 1К, 1Л, 1М, соответственно). При необходимости корректировали гейтирование с целью получения популяции клеток с иммунофенотипом $CD71^-CD235^-CD45^-CD34^-CD90^+CD73^+CD105^+$ и определяли долю таких клеток среди мононуклеаров КМ.

Результаты, полученные с помощью данного подхода для разных больных АА и доноров, могли отличаться на 1-2 порядка. На Рисунке 2 в качестве примера показан размер популяции клеток с иммунофенотипом $CD71^-CD235^-CD45^-CD34^-CD90^+CD73^+CD105^+$ среди мононуклеаров КМ для двух больных АА, у которых выявлены существенные различия при определении доли мезенхимных клеток в КМ.

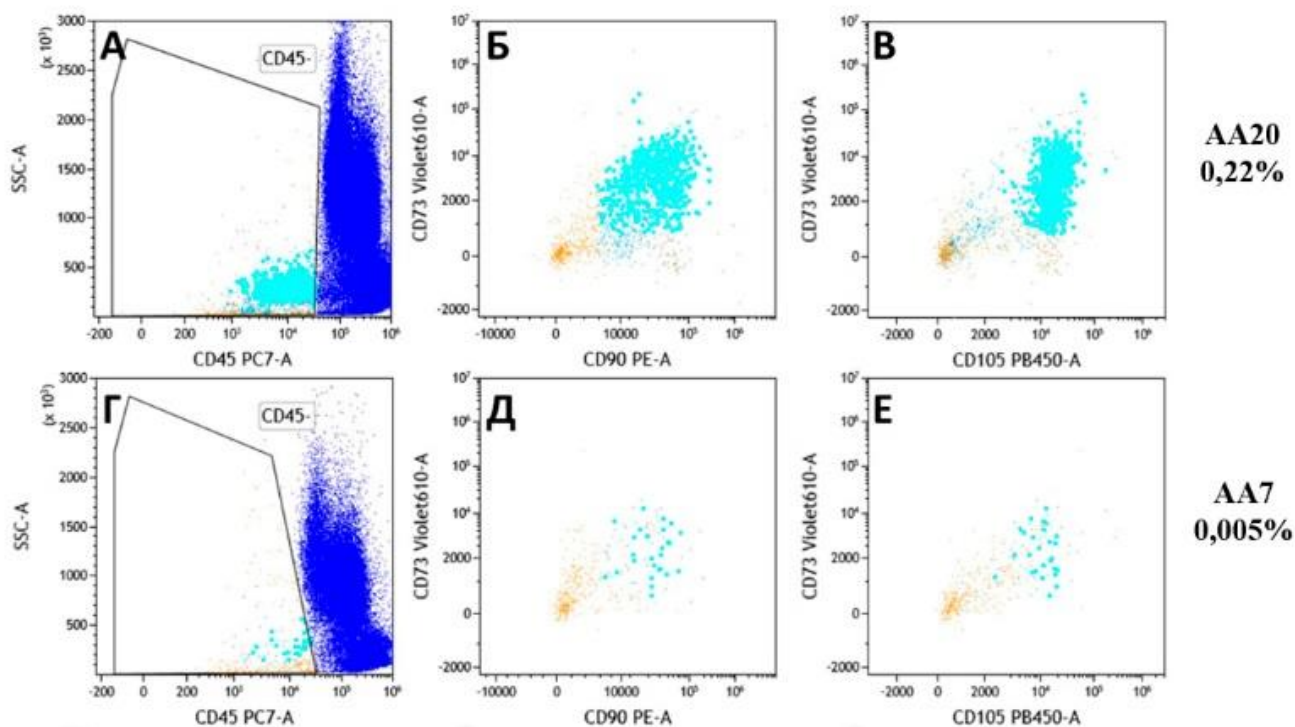


Рисунок 2 – Размер популяции стромальных клеток среди мононуклеаров КМ двух больных: AA20 (А, Б, В) и AA7 (Г, Д, Е). Популяция мезенхимных клеток представлена голубым цветом на диаграмме, соответствующей этапу исключения клеток лейкоцитарного ростка (А, Г), и подтверждению экспрессии поверхностных маркеров мезенхимных клеток (Б, В, Д, Е). Цифры отражают долю стромальных клеток среди мононуклеаров соответствующего образца КМ

Определение доли клоногенных предшественников среди стромальных клеток костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Подсчет колоний КОЕф позволяет определить концентрацию клоногенных стромальных предшественников среди всех мононуклеаров КМ больных АА и здоровых доноров, однако известно, что большинство клеток КМ кроветворные. При аплазии, наблюдаемой при АА, количество кроветворных клеток резко снижено, поэтому стандартный метод анализа концентрации КОЕф может давать ложные результаты. Необходимо оценивать долю мезенхимных клеток, способных к образованию колоний, именно среди стромальных клеток КМ. Долю клоногенных предшественников среди стромальных клеток КМ определяли по соотношению доли КОЕф в КМ и доли стромальных клеток в КМ по формуле 2:

доля клоногенных среди стромальных клеток КМ = доля КОЕф в КМ / доля стромальных клеток в КМ.

(2)

Методы анализа функциональных свойств мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Анализ пролиферативных характеристик мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

При анализе пролиферативных свойств ММСК, выделенных из КМ больных АА и здоровых доноров, определяли время от инициации до первого пассирования культуры ММСК (время до П0), суммарную клеточную продукцию и среднее время удвоения популяции (ВУП) за 3 пассажа.

Суммарную клеточную продукцию за 3 пассажа ($N_{\text{сум}}$) определяли по формуле 3:

$$N_{\text{сум}} = N_0 + N_0 * N_1 / (m_1 * 100000) + N_1 * N_2 / (m_2 * 100000) + N_2 * N_3 / (m_3 * 100000), \quad (3)$$

где N_0 , N_1 , N_2 и N_3 — количество клеток, полученных с 2 культуральных флаконов на 0-м, 1-м, 2-м и 3-м пассажах, соответственно,

m_1 , m_2 и m_3 — число культуральных флаконов, с которых были получены клетки на 1-м, 2-м и 3-м пассажах, соответственно.

Для расчета среднего ВУП за 3 пассажа ($\text{ВУП}_{\text{сред}}$) применяли формулу 4:

$$\text{ВУП}_{\text{сред}} = t_{p0-p3} * \lg(2) / (\lg(N_{\text{сум}}) - \lg(N_0)), \quad (4)$$

где t_{p0-p3} — время роста культуры ММСК от 0-го до 3-го пассажа,

$N_{\text{сум}}$ — суммарная клеточная продукция ММСК за 3 пассажа,

N_0 — общее количество клеток, полученных на 0-м пассаже.

Анализ дифференцировочного потенциала мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Анализ дифференцировочного потенциала ММСК больных АА и здоровых доноров проводили на 2-м пассаже. Клетки высаживали в ячейки 6-ячеечной платы в стандартной культуральной среде, содержащей 10% ЭТС, 2 мМ глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Для анализа способности ММСК к остеогенной и адипогенной дифференцировке по $8,0 \times 10^4$ клеток высаживали на две ячейки 6-луночной платы. Через 3-4 дня дифференцировку индуцировали сменой среды, содержащей соответствующие индукторы. Среда для индукции остеогенной дифференцировки содержала 0,1 мкМ дексаметазона (Sigma), 0,15 мМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты тринатриевой соли (Sigma) и 3 мМ NaH_2PO_4 (Sigma), среда для индукции адипогенной дифференцировки — 1 мкМ дексаметазона (Sigma), 60 мкМ индометацина (Sigma) и 5 мкг/мл инсулина (Sigma). В контрольную ячейку 6-луночной платы одновременно высаживали $2,0 \times 10^4$ клеток, которые культивировали в стандартной среде без индукторов дифференцировки. Смену соответствующей среды проводили через каждые 3-4 дня. Клетки инкубировали в течение 14 дней в CO_2 -инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 . По истечении времени инкубации из клеток выделяли тотальную РНК, которую использовали для анализа

экспрессии маркерных генов остеогенной (*ALPL*, *PTH1R*) и адипогенной дифференцировки (*FABP4*, *PPARG*).

Анализ способности мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров к поддержанию кроветворных предшественников

Способность ММСК больных АА и здоровых доноров к поддержанию кроветворных предшественников определяли с помощью метода, предложенного Р. Е. Пломахером [241]. Для этого в каждую из 60 не краевых ячеек 96-луночной платы, предварительно обработанных 0,1 % желатином (Sigma) в течение 1 часа, высаживали по $1,0 \times 10^3$ тестируемых ММСК на 1-4 пассаже в стандартной культуральной среде, содержащей 10% ЭТС, 2 мМ глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. На следующий день среду отбирали, а в ячейки с ММСК высевали мононуклеары КМ здорового донора в 4х последовательных разведениях (60; 30; 15; $7,5 \times 10^3$ клеток на лунку, по 15 ячеек на каждое разведение) в среде α 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). Для предотвращения испарения среды в краевые ячейки платы наливали 0,1 М раствор гидроксида натрия (ICN). Клетки инкубировали при 33°C и 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе, еженедельно осуществляя смену половины объема питательной среды. Через 7 и 28 дней ячейки плат анализировали под инвертированным микроскопом Nikon на наличие характерных скоплений клеток кроветворного происхождения, напоминающих бульжную мостовую и образованных КООБ7 и КООБ28, соответственно. Частоту КООБ7 и КООБ28 определяли по количеству лунок, в которых такие колонии отсутствовали, в соответствии с методикой, описанной ранее [7].

Анализ относительного уровня экспрессии генов в стромальных предшественниках из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Для определения ОУЭ генов из клеток выделяли тотальную РНК, которую использовали в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи ДНК (кДНК) в реакции обратной транскрипции (ОТ) с последующим анализом продукта методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Исследование ОУЭ генов проводили в суммарной культуре КОЕф и в ММСК, полученных на 1 пассаже.

Выделение РНК

Все процедуры по выделению РНК проводили на льду, в перчатках, после обработки поверхностей лабораторного оборудования реагентом RNase-ExitusPlus (AppliChem). Все растворы использовали охлажденными и готовили на деионизированной воде, предварительно проинкубированной с диэтилпирикарбонатом (ДЭПК, Sigma) и затем проавтоклавированной.

При выделении РНК из прикрепленной культуры флакон с клетками дважды промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ, MP Biomedicals), удаляли остатки жидкости, добавляли 0,4 мл TRIzol (Thermo Scientific) и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Как правило, из каждого образца КМ получали по два флакона с клетками, содержимое которых объединяли в одной микроцентрифужной пробирке и хранили при температуре -70°C . Для проведения последующих этапов пробы размораживали, добавляли по 160 мкл хлороформа (Sigma), тщательно перемешивали в течение 15 секунд и оставляли при комнатной температуре на 2-3 минуты. Затем образцы центрифугировали с ускорением 13500 g в течение 15 минут при 4°C . После этого аккуратно отбирали верхнюю бесцветную фазу в новую микроцентрифужную пробирку, добавляли 400 мкл изопропанола (ЗАС «Экос-1») и тщательно перемешивали. Пробирки инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут и центрифугировали с ускорением 13500 g в течение 10 минут при 4°C . Супернатант отбрасывали, а осадок промывали, добавляя в пробирку 1 мл 75% этанола и тщательно перемешивая на вортексе. Затем пробирки центрифугировали с ускорением 13500 g в течение 5 минут при 4°C , после чего надосадочную жидкость удаляли, а осадок высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 10-15 минут и растворяли в 100 мкл воды, обработанной ДЭПК. Отбирали 10 мкл полученного раствора для определения концентрации и проведения контроля качества РНК, а к оставшемуся объему добавляли 9 мкл 3М ацетата натрия (pH 5,2, Sigma) и 225 мкл 96 % этанола. Пробирки с выделенной и осажденной таким образом РНК хранили при температуре -20°C . Определение концентрации и степени чистоты РНК проводили на спектрофотометре (Ultrospec 300, Pharmacia Biotech). Соотношение величин поглощения A_{260}/A_{280} в диапазоне от 1,8 до 2,0, полученное для большинства образцов, свидетельствует о высокой степени очистки РНК от белков, фенола и других веществ, которые могут оказывать негативное влияние на результаты последующих экспериментов.

Синтез комплементарной цепи ДНК на матрице РНК

Для анализа представленности транскриптов различных генов в образцах тотальной РНК проводили реакцию ОТ с построением кДНК на матрице РНК. Сначала готовили водный раствор РНК. Для этого пробирки, содержащие осажденную с помощью этанола и ацетата натрия РНК, центрифугировали с ускорением 9500 g в течение 20 минут при 4°C , супернатант отбрасывали, а к осадку добавляли 1 мл 75% этанола и встряхивали на вортексе. После повторного центрифугирования образцов с ускорением 13500 g в течение 10 минут при 4°C надосадочную жидкость удаляли, а осадок РНК высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 10-15 минут. Затем РНК растворяли в воде, обработанной ДЭПК, до концентрации 1 мкг/мкл. 2 мкл раствора отбирали в чистые пробирки для проведения реакции ОТ, а объем оставшегося

образца доводили до 50 мкл водой, обработанной ДЭПК, и осаждали добавлением 5 мкл 3М ацетата натрия (рН 5,2) и 125 мкл 96 % этанола. Образцы РНК после осаждения хранили при температуре -20°C.

При проведении ОТ сначала осуществляли гибридизацию праймеров с последовательностью РНК транскриптов анализируемых образцов. Для этого к 2 мкл раствора РНК (1 мкг/мкл) добавляли 5,5 мкл деионизированной воды, а также 2,5 мкл смеси, содержащей 20 мкМ случайных гексамеров (NNNNNN, Синтол) и 20 мкМ поли-Т олигонуклеотидов (GGGAGGCCCTTTTTTTTTTTTVN, Синтол) в качестве затравки. Образцы инкубировали в течение 10 минут при 70°C, а затем 10 минут при 4°C в амплификаторе (Терцик, ДНК-Технология). После осаждения конденсата кратким центрифугированием в пробирки добавляли по 5 мкл буфера для обратной транскриптазы (x5, Promega), 2,5 мкл смеси 4 дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ, по 10 мМ каждого, Медиген), 1 мкл ингибитора рибонуклеаз РНАзина (40 Ед, Promega), 1 мкл обратной транскриптазы М-MLV (200 Ед, Promega) и 5,5 мкл воды. Пробы перемешивали, инкубировали в течение 1 часа при температуре 42°C в амплификаторе, охлаждали и добавляли в каждую пробирку по 75 мкл воды. Полученные образцы кДНК после встряхивания использовали для проведения ПЦР или хранили при температуре -20°C.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

ПЦР в реальном времени – наиболее распространённый подход, используемый для количественной оценки представленности заданной нуклеотидной последовательности в образце. Существует несколько вариаций этого метода. В настоящей работе анализ ОУЭ генов в стромальных предшественниках был выполнен с помощью ПЦР в реальном времени в модификации Taqman. При данной технологии в процессе ПЦР происходит расщепление олигонуклеотидной последовательности зонда, комплементарного последовательности интересующего нас транскрипта. Этот процесс сопровождается диссоциацией флуоресцентного красителя и гасителя флуоресценции, вследствие чего появляется флуоресцентный сигнал. Увеличение интенсивности этого сигнала отражает накопление продукта в процессе реакции и детектируется анализатором в режиме реального времени, позволяя определять относительное количество копий исследуемого гена в образцах. В настоящей работе зонды, комплементарные последовательностям референсных генов глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) и β -актина (*ACTB*), сконструированы с использованием 6-карбоксих-родамина (ROX) в качестве флуорофора и ВНQ2 – в качестве гасителя. Для детекции генов интереса при создании зонда выбран краситель 5'-карбоксихлуоресцеин (FAM) и гаситель RTQ1. Последовательности праймеров и зондов, использованных в настоящей работе, приведены в Приложении Б (Таблица

Б.1). Часть из них сконструирована автором работы, другие – Шипуновой И. Н., Бигильдеевым А. Е., Петровой Т. В. Синтез олигонуклеотидов выполнен в компании Синтол.

Общий объем смеси ПЦР составлял 25 мкл и содержал следующие компоненты: 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8; MP Biomedicals); 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄ (Sigma); 0,01 % Tween-20 (Sigma); 3,5 мМ MgCl₂ (Sigma); 0,25 мМ дНТФ; 0,4 мкМ праймеров; 0,2 мкМ флуоресцентного зонда; 0,04 Ед SmarTaq полимеразы (Dialat Ltd.), и 1 мкл образца кДНК, полученного в результате ОТ.

Температурный режим реакции состоял из следующих этапов: денатурация кДНК и активация SmarTaq полимеразы в течение 10 минут при 95°C, 45 последовательных циклов полимеризации, включающих денатурацию цепей ДНК в течение 20 секунд при 95°C, отжиг праймеров и элонгацию полинуклеотидных цепей в течение 40 секунд при 60°C. Поддержание условий ПЦР, а также детекцию флуоресцентного сигнала проводили на амплификаторе ABI Prism 7500 (ThermoFischer Scientific). Каждый образец кДНК анализировали в 3х технических повторях. Для сопоставления результатов различных экспериментов и нормирования данных использовали референсный образец, содержащий смесь кДНК от нескольких доноров. Отсутствие контаминации реагентов подтверждали при помощи отрицательного контроля – пробы, содержащей все компоненты реакции за исключением кДНК.

Обработку данных проводили с помощью программы 7500 Software v2.3 согласно методу, предложенному Т. Шмитгеном и К. Ливаком [220]. Для каждого гена выбирали значение порогового уровня флуоресценции на начальном этапе экспоненциального увеличения количества продукта ПЦР. Это значение было использовано программой при автоматическом расчете величины порогового цикла *Ct* во всех экспериментах для данного гена. После вычисления разницы между средним арифметическим значением *Ct* трех технических повторов исследуемой и референсной пробы ОУЭ гена до нормализации (*D*) в образце определяли по формуле 5:

$$D = 2^{-\Delta Ct}, \quad (5)$$

где ΔCt — разницa среднего арифметического значения порогового цикла исследуемой и референсной пробы.

Для нормализации значений был рассчитан ОУЭ референсных генов *GAPDH* и *ACTB*, конститутивно экспрессирующихся в большинстве типов клеток и в связи с этим позволяющих сделать поправку на количество тотальной РНК в исходном образце. Нормализованное значение ОУЭ генов интереса (*D_n*) получали, применяя формулу 6:

$$D_n = \frac{D}{NF}, \quad (6)$$

где *D* — ОУЭ гена интереса до нормализации,

NF — среднее геометрическое значение ОУЭ референсных генов *GAPDH* и *ACTB*.

Анализ ОУЭ каждого гена интереса в стромальных предшественниках из КМ больных АА и доноров был выполнен на основании значений D_n , полученных после стандартной обработки данных.

Статистическая обработка данных

Однофакторный статистический анализ полученных результатов был выполнен с помощью программного обеспечения Excel 2013 и GraphPad Prism 8. При обработке данных независимых выборок характер распределения выявляли, применяя критерий Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения значимость отличий определяли с помощью t-критерия Стьюдента с поправкой Уэлча, при распределении, отличном от нормального, использовали U-критерий Манна-Уитни. При анализе способности ММСК к ответу на индукторы дифференцировки для сравнения парных значений в случае нормального распределения использовали парный t-критерий Стьюдента, при распределении, отличном от нормального, применяли тест Уилкоксона. Статистически достоверными считали отличия при $p < 0,05$. В случае множественных сравнений применяли поправку Бонферрони. Результаты представляли как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

Для реализации задач классификации и регрессии был проведен многофакторный анализ на языке Python с помощью библиотеки Sklearn (в случае логистической регрессии) и XGBoost (для осуществления алгоритма бустинга XGBoost).

Глава 3. Результаты и обсуждение

АА – это редкое заболевание. В настоящее время в литературе отсутствуют публикации, посвященные сравнению особенностей стромальных предшественников у больных АА разными формами заболевания, поскольку получение необходимого количества образцов в каждой группе представляется непростой задачей. В данной работе было получено достаточно большое количество образцов КМ больных НАА и ТАА для выявления статистически значимых отличий по сравнению с донорами. Группа больных СТАА оказалась очень маленькой, поэтому не была включена в статистический анализ. Стоит отметить, что не все исследователи выделяют больных СТАА в отдельную группу. Сходство клинического течения заболевания позволяет объединять больных СТАА в общую группу с больными ТАА. В настоящей работе представлены данные как отдельно для групп ТАА и СТАА, так и для группы, включающей обе формы заболевания, (ТАА+СТАА). При изучении роли стромального микроокружения в патогенезе АА объединение двух форм АА позволит увеличить размер выборки больных с ТАА и СТАА. С другой стороны, рассмотрение каждой из форм в отдельности очень важно для определения влияния аплазии различной степени тяжести на функционирование стромальных предшественников КМ, что представляет интерес для фундаментальной науки.

3.1. Эффективность получения культуры клеток стромальных предшественников из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Эффективность получения культуры мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Для определения свойств стромальных предшественников получали культуры ММСК здоровых доноров и больных НАА, ТАА и СТАА. Эффективность выделения ММСК представлена в Таблице 4.

Таблица 4 – Эффективность выделения культуры ММСК из КМ здоровых доноров, больных НАА, ТАА и СТАА

Группа	Доноры	НАА	ТАА	СТАА
Посажено культур (м/ж)	30 (17/13)	22 (11/11)	16 (8/8)	5 (5/0)
Получено культур на П0 (м/ж)	30 (17/13)	20 (11/9)	13 (8/5)	3 (3/0)
Эффективность получения культуры на П0	100%	91%	81%	60%
Получено культур на П3 (м/ж)	29 (16/13)	16 (9/7)	8 (7/1)	3 (3/0)
Эффективность получения культуры на П3	97%	73%	50%	60%

В отличие от здоровых доноров, у которых из каждого образца КМ удалось получить культуры ММСК на П0, эффективность получения культур ММСК больных АА снижена, причем данное снижение ассоциировано с увеличением тяжести АА. Процент культур ММСК больных АА, достигших П3, также был ниже, чем у доноров. При этом уменьшение доли культур ММСК на П0 и П3 характерно в большей степени для женщин, чем для мужчин, что наиболее выражено у больных с тяжелой формой заболевания.

Суммарно у больных АА удалось получить 36 культур ММСК из 43 образцов КМ на П0 (84%), и 27 культур на П3 (63%). Хотя в одном из исследований эффективность выделения культуры ММСК педиатрической когорты больных АА составила 100% [119], в других работах она оказалась сниженной (50-80%), кроме того, в некоторых случаях ММСК были не способны претерпевать такое же количество пассажей, как ММСК доноров, что согласуется с результатами настоящего исследования [64; 80; 208]. Однако, разницы в эффективности получения культур в

зависимости от пола больного ранее выявлено не было. Возможно, это связано с небольшими выборками больных в других исследованиях.

Эффективность получения культуры колониобразующих единиц фибробластов из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Для последующего анализа были получены культуры КОЕф, эффективность выделения которых представлена в Таблице 5.

Таблица 5 - Эффективность получения культуры КОЕф из КМ здоровых доноров, больных НАА, ТАА и СТАА

Группа	Доноры	НАА	ТАА	СТАА
Посажено культур (м/ж)	18 (9/9)	19 (9/10)	12 (7/5)	3 (3/0)
Получено культур (м/ж)	17 (9/8)	18 (9/9)	9 (7/2)	2 (2/0)
Эффективность получения культуры КОЕф	94%	95%	75%	67%

Как и в случае с ММСК, при получении КОЕф прослеживается тенденция к уменьшению процента выделенных культур с увеличением тяжести АА, что может отражать более выраженные изменения стромальных предшественников при ТАА и СТАА, чем при НАА. При тяжелой форме заболевания способность к образованию культур КОЕф у женщин была также ниже, чем у мужчин. Этот феномен не был описан ранее в мировой литературе и требует дальнейшего исследования.

3.2. Концентрация колониобразующих единиц фибробластов и доля стромальных клеток в костном мозге больных апластической анемией и здоровых доноров

Размер кроветворной территории в норме определяется концентрацией клоногенных мезенхимных клеток в КМ. КОЕф – это стромальные предшественники, способные к образованию колоний *in vitro*. Концентрацию КОЕф в КМ здоровых доноров и больных АА определяли по количеству колоний, образованных в культуральном флаконе после высадки в него 1 млн мононуклеаров КМ. В результате анализа не было выявлено отличий в концентрации КОЕф в КМ больных НАА, ТАА, ТАА+СТАА и здоровых доноров (Рисунок 3, Приложение В (Таблица В.1)).

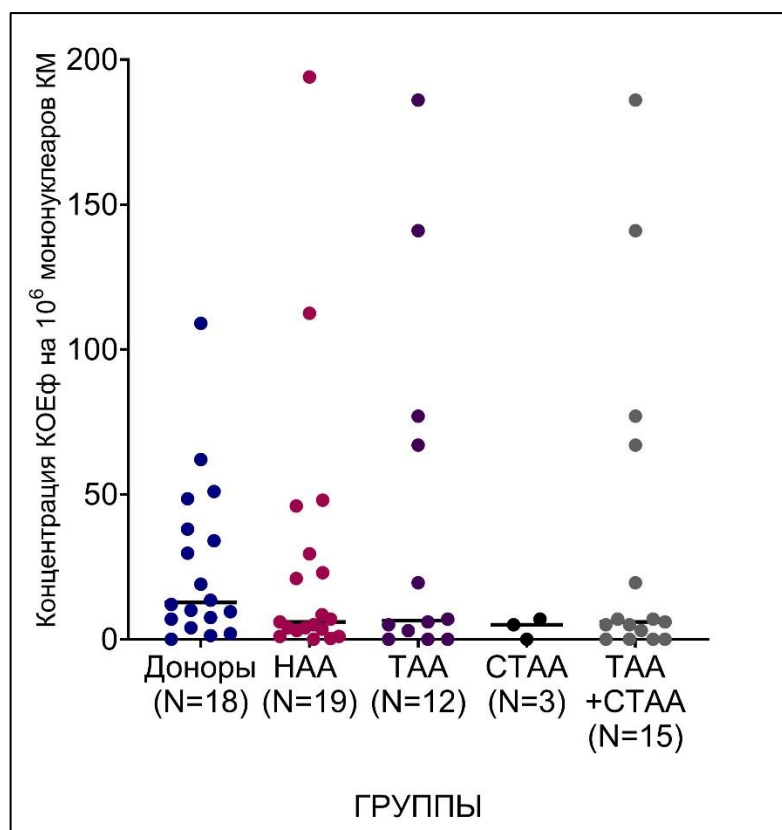


Рисунок 3 – Концентрация КОЕф на 10^6 мононуклеаров, выделенных из КМ больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров. Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального больного или донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе

Значения концентрации КОЕф в КМ трех индивидуальных больных СТАА существенно не отличались от данных, полученных для доноров, НАА и ТАА, что указывает на отсутствие выраженных изменений в количестве клоногенных предшественников в КМ при СТАА.

Ранее в различных исследованиях было показано, что концентрация КОЕф в КМ больных АА снижена [64], повышена [25], либо не изменена по сравнению со значениями у доноров [229]. В нашей работе не было выявлено различий в концентрации КОЕф у больных НАА, ТАА и здоровых доноров, что отражает отсутствие изменений клоногенного потенциала стромальных предшественников из КМ больных АА. Однако обращает на себя внимание значительная вариабельность значений в каждой из групп. При анализе небольших выборок индивидуальные особенности больных и доноров могут вносить существенный вклад в итоговый результат и приводить к несоответствию данных различных исследований.

Утрата гемопоэтических клеток в КМ больных АА может приводить к снижению соотношения гемопоэтических и мезенхимных клеток и переоценке концентрации клоногенных предшественников в КМ больных. Определение доли клоногенных клеток среди стромальных позволяет избежать этого. Для расчета данного показателя используют концентрацию КОЕф и

долю стромальных клеток среди мононуклеаров КМ, полученную с помощью анализа образцов методом проточной цитофлуориметрии. Результаты определения доли стромальных клеток в КМ, а также доли клоногенных клеток среди стромальных у больных НАА, ТАА и здоровых доноров представлены в Рисунке 4 и в Приложении В (Таблица 1В). Образцы КМ больных СТАА не были включены в данное исследование, поскольку были получены после его завершения.

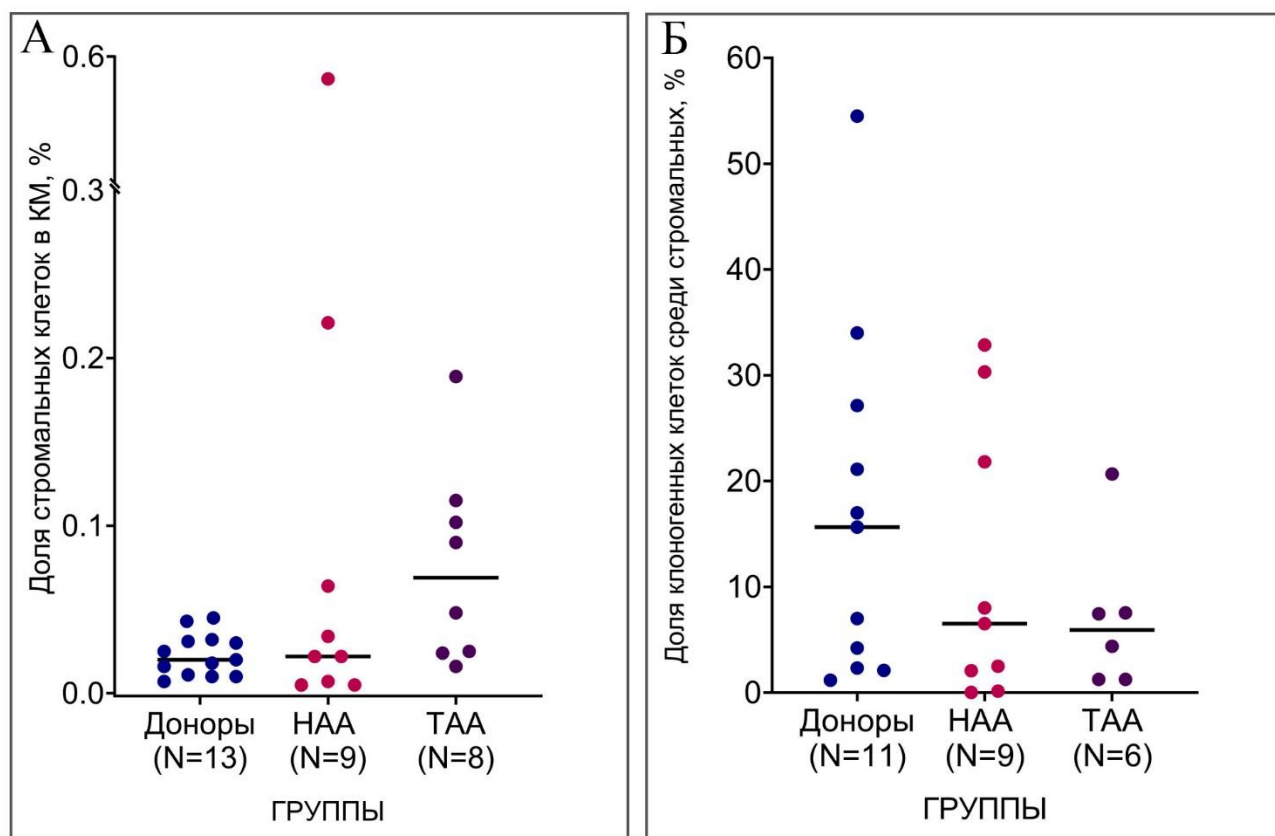


Рисунок 4 – Доля стромальных клеток в КМ (А) и доля клоногенных клеток среди стромальных (Б) у больных НАА, ТАА и здоровых доноров. Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального больного или донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе

Хотя достоверных различий между группами выявлено не было, доля стромальных клеток в КМ больных ТАА оказалась выше, чем у доноров и больных НАА, что может быть связано с утратой гемопоэтических клеток при ТАА. Процент клоногенных среди стромальных клеток КМ был ниже при НАА и ТАА по сравнению с донорами, однако различие статистически недостоверно.

3.3. Проллиферативные свойства мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Способность стромальных предшественников к образованию всех клеточных элементов мезенхимного происхождения в КМ связана с их высоким пролиферативным потенциалом. Особое значение также имеет скорость пролиферации, поскольку увеличение времени удвоения данных клеток может приводить к замедлению регенерации старых и поврежденных клеток. Для определения пролиферативных свойств ММСК больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров анализировали время до П0, среднее ВУП, а также суммарную клеточную продукцию за 3 пассажа. Результаты исследования представлены на Рисунке 5 и в Приложении В (Таблица В.2).

Суммарная клеточная продукция отражает общее количество клеток, способных образоваться в результате пролиферации предшественников в культуре. Суммарная клеточная продукция ММСК больных НАА и ТАА не отличается от значений у доноров, что свидетельствует о сохранении пролиферативного потенциала ММСК больных НАА и ТАА по сравнению с донорами. Достоверное увеличение времени до П0 для ММСК больных НАА и ТАА выявляет необходимость более длительного культивирования данного типа стромальных предшественников *in vitro* для формирования конфлуентного монослоя по сравнению с донорами. ВУП ММСК больных НАА оказалось достоверно выше, чем у доноров. Это означает замедление пролиферации данных клеток, что может приводить к снижению скорости обновления старых и поврежденных клеток стромального микроокружения КМ при НАА. Вероятно, это объясняет удлинение времени до П0 в культурах ММСК больных НАА. Очевидно, в культурах больных ТАА этот феномен имеет другое объяснение и требует дальнейшего изучения.

Время до П0 в культурах ММСК больных СТАА не отличалось от значений, полученных для НАА и ТАА, и было увеличено по сравнению с донорами. ВУП ММСК больных СТАА оказалось повышенным, а суммарная клеточная продукция – снижена по сравнению со значениями у больных НАА, ТАА и здоровых доноров. Изменение характеристик ММСК больных СТАА указывает на снижение скорости пролиферации данных предшественников и нарушение их пролиферативного потенциала. Хотя размер выборки не позволяет сделать вывод о достоверности полученных отличий, результаты исследования свидетельствуют о более выраженных нарушениях пролиферативных свойств ММСК при СТАА, чем при НАА и ТАА. Все значения ВУП ММСК больных СТАА были выше, а суммарная клеточная продукция – ниже соответствующих диапазонов данных, полученных для больных ТАА, что указывает на различия в пролиферативных характеристиках ММСК при ТАА и СТАА и необходимости рассмотрения каждой из групп больных в отдельности.

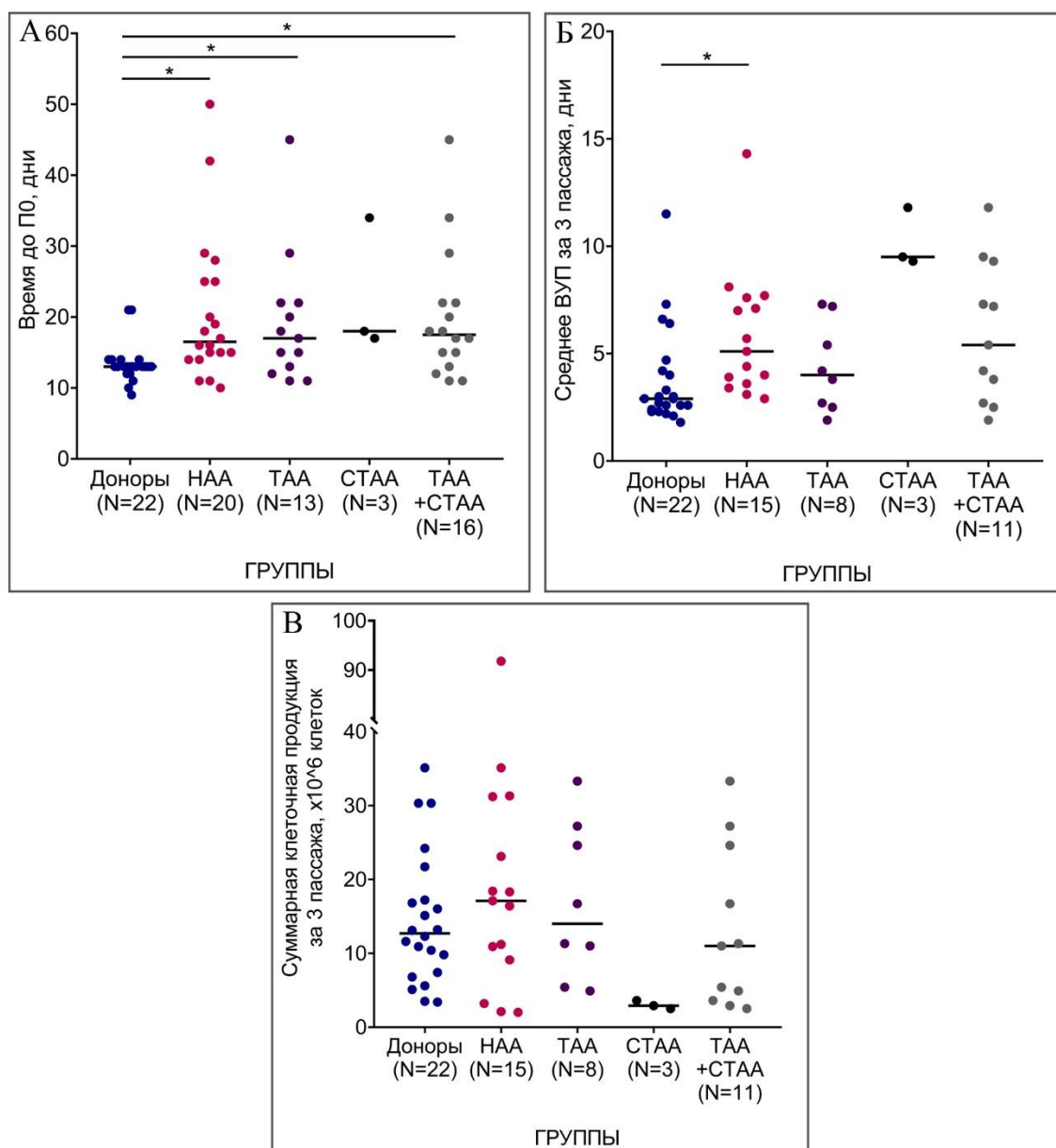


Рисунок 5 – Проллиферативные характеристики ММСК больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров: время до П0 (А), среднее ВУП за 3 пассажа (Б), суммарная клеточная продукция за 3 пассажа (В). Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального больного или донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе. * – достоверные отличия ($p < 0,05$)

Ранее в различных исследованиях было показано отсутствие изменений пролиферативных свойств ММСК больных АА по сравнению с донорами [25; 119], снижение скорости пролиферации [80; 183; 208] или нарушение пролиферативного потенциала данных предшественников [64]. Разногласия по данному вопросу могут быть связаны с различиями в соотношении больных НАА, ТАА и СТАА в составе выборки, поскольку в настоящей работе показано, что при НАА происходит снижение скорости пролиферации ММСК, при ТАА

пролиферативные свойства ММСК не изменены, а для СТАА, возможно, характерно выраженное нарушение пролиферативного потенциала и скорости пролиферации ММСК.

3.4. Дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

ММСК – полипотентные клетки взрослого организма, способные к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении [181]. Высокий дифференцировочный потенциал ММСК определяет способность данных клеток к образованию всех элементов стромального кроветворного микроокружения КМ. В контексте кроветворения особенно важную роль играет способность данных предшественников к дифференцировке в остеобласты и адипоциты. Остеобласты участвуют в образовании остеобластной ниши и поддержании пула СКК в КМ [78; 192; 199], а адипоциты в определенных условиях могут подавлять гемопоэз [42; 114].

Развитие АА сопровождается замещением кроветворной ткани на жировую [167], однако до сих пор неясно, приводит ли активация адипогенеза к нарушению функций гемопоэтических предшественников при данном заболевании, или она является следствием утраты кроветворных клеток в КМ. Также неизвестно, связано ли накопление жировой ткани в КМ больных АА с повышением способности стромальных предшественников КМ к адипогенной дифференцировке.

Ранее было показано, что активация ключевого транскрипционного фактора жировой дифференцировки PPAR γ в ММСК приводит к подавлению остеогенной дифференцировки за счет ингибирования транскрипционного фактора RUNX2 [231]. Снижение способности стромальных предшественников КМ к остеогенной дифференцировке в результате активации адипогенеза может приводить к нарушению функционирования остеобластной ниши и, как следствие, может быть ассоциировано с развитием аплазии при АА.

Дифференцировочный потенциал ММСК определяют по ответу данных клеток на индукцию соответствующей дифференцировки, при этом в качестве контроля используют ММСК, культивировавшиеся без индуктора. Стандартным методом анализа адипогенной и остеогенной дифференцировки ММСК служит гистохимическое окрашивание внутриклеточных капель жира или внеклеточных отложений кальция, соответственно [181]. Однако данный подход не всегда позволяет провести количественную оценку способности стромальных предшественников к дифференцировке. В качестве альтернативного метода нередко используют определение ОУЭ маркерных генов соответствующей дифференцировки. Показано, что среди генов, ассоциированных с остеогенной дифференцировкой ММСК, только *ALPL* и *PTHRI*

экспрессируются во всех типах клеток остеобластной линии [35; 215], что позволяет использовать эти гены в качестве маркеров. Для анализа жировой дифференцировки часто используют ОУЭ *PPARG* и *FABP4*. Повышение ОУЭ этих генов происходит на протяжении всего процесса дифференцировки ММСК в адипоциты, поэтому их ОУЭ достаточно точно отражает степень зрелости данных клеток [22; 33].

Анализ экспрессии маркерных генов остеогенной и адипогенной дифференцировки показал, что инкубация ММСК доноров и больных НАА в среде с соответствующим индуктором приводит к статистически значимому повышению ОУЭ каждого из соответствующих маркерных генов по сравнению с контролем (Рисунок 6, 7, Приложение В (Таблица В.3)). У больных ТАА выявлено достоверное увеличение ОУЭ всех генов, кроме *ALPL*, который также повышен, однако недостоверно. Возможно, это связано с небольшим числом образцов в группе, поскольку при объединении больных ТАА с СТАА различия становятся достоверными. Показано повышение ОУЭ всех маркерных генов дифференцировки в ММСК больных СТАА в результате инкубации в среде с соответствующими индукторами по сравнению с контролем, однако размер выборки не позволяет определить значимость выявленных отличий. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что ММСК больных НАА и ТАА способны к ответу на индукцию остеогенной и адипогенной дифференцировки.

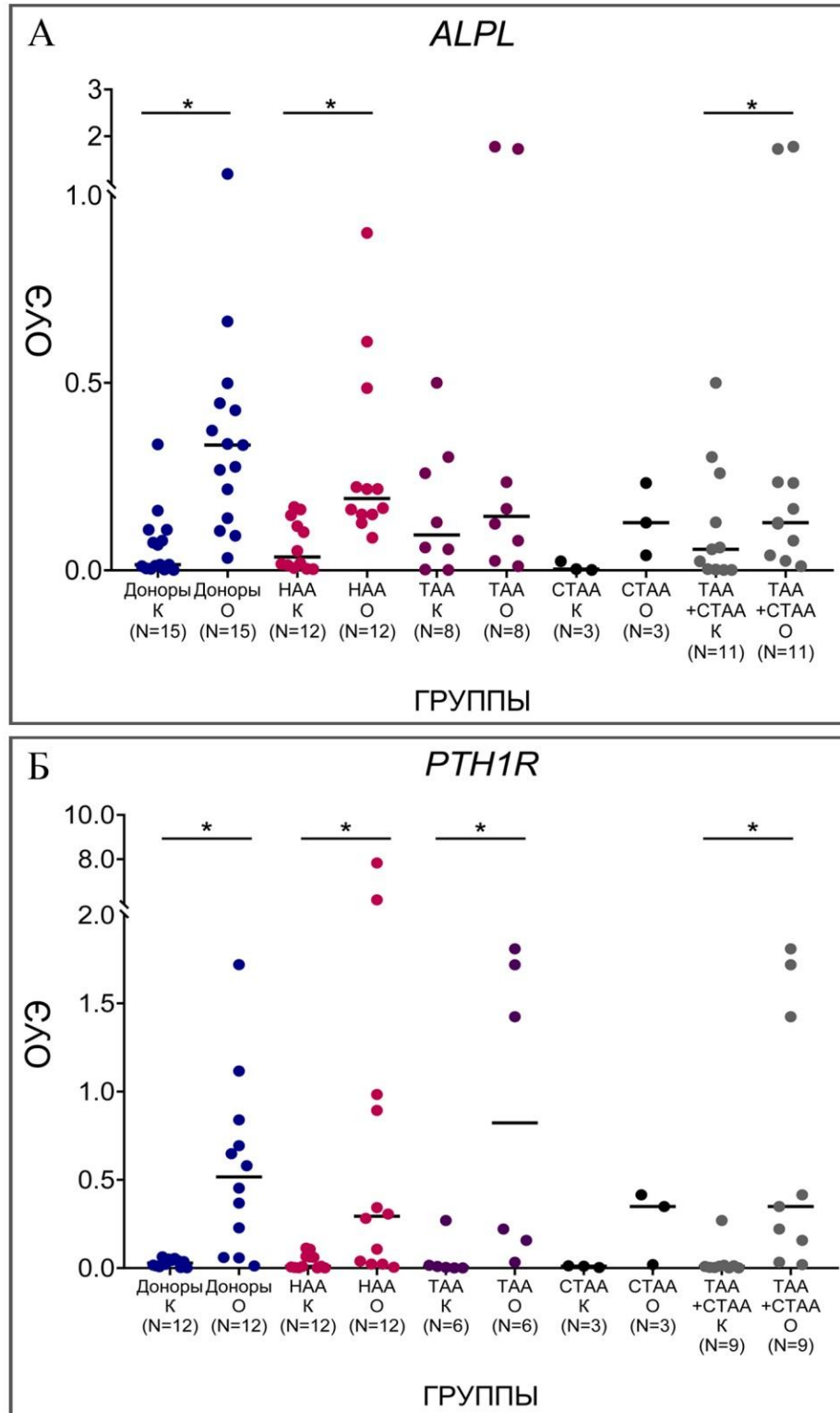


Рисунок 6 – Экспрессия генов-маркеров остеогенной дифференцировки *ALPL* (А) и *PTH1R* (Б) в ММСК больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров при инкубации в среде без индукторов (К) и с индукторами остеогенной дифференцировки (О). Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального больного или донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе. * – достоверные отличия ($p < 0,05$)

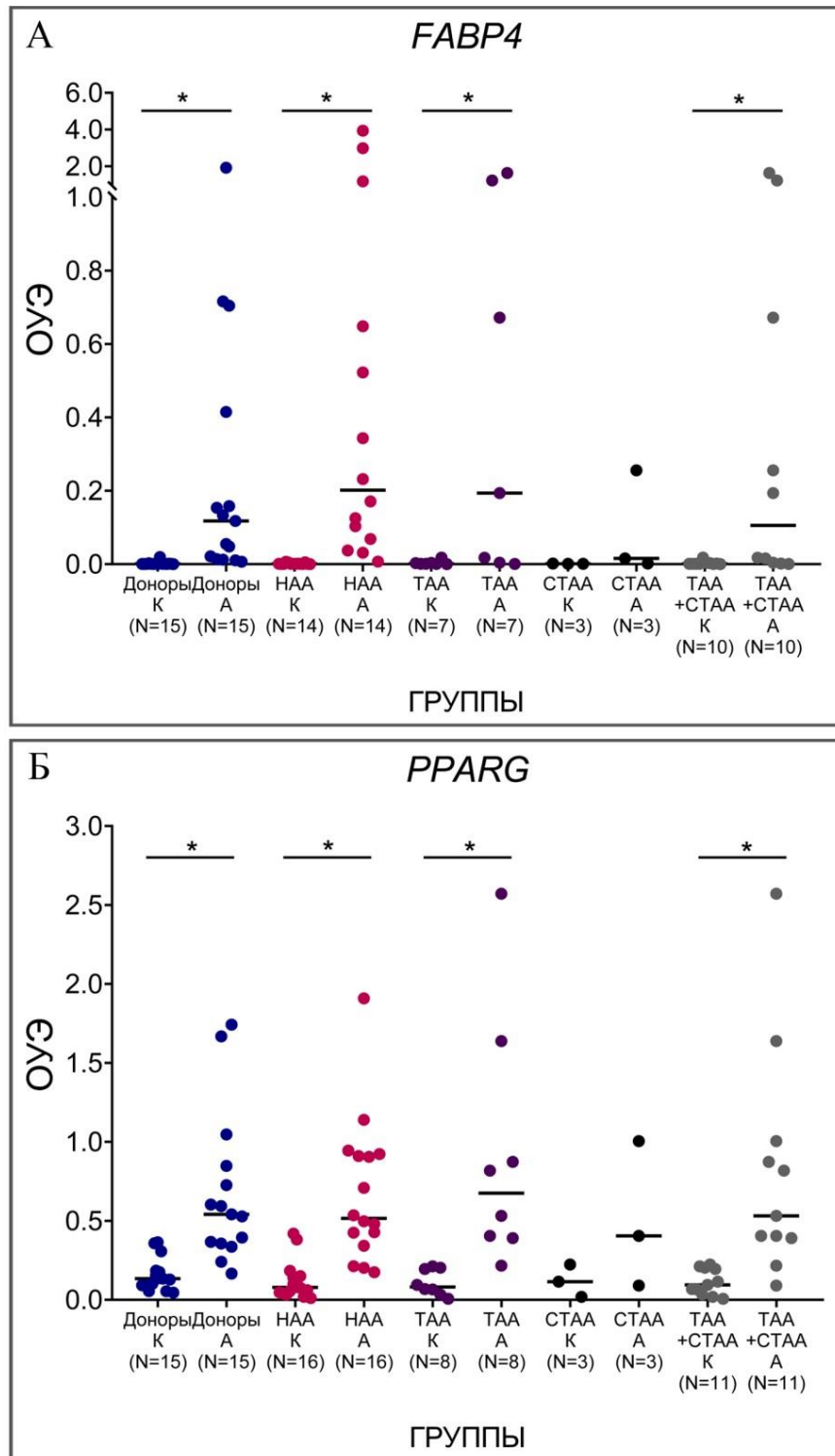


Рисунок 7 – Экспрессия генов-маркеров адипогенной дифференцировки *FABP4* (А) и *PPARG* (Б) в ММСК больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров при инкубации в среде без индукторов (К) и с индукторами адипогенной дифференцировки (А). Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального больного или донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе. * – достоверные отличия ($p < 0,05$)

При сравнении ОУЭ маркерных генов в контрольных образцах ММСК, инкубированных без индуктора, не было выявлено различий между группами больных и доноров. ОУЭ этих генов в ММСК, культивированных в среде с индукторами дифференцировки, также не отличается в группах больных и доноров. Результаты данного исследования свидетельствуют об отсутствии различий дифференцировочного потенциала ММСК больных НАА и ТАА по сравнению с донорами. Однако следует отметить существенную вариабельность значений ОУЭ маркерных генов дифференцировки как среди доноров, так среди больных, что указывает на наличие выраженных индивидуальных отличий в группах больных и доноров.

Результаты настоящей работы согласуются с некоторыми описанными в литературе исследованиями, в которых также не было выявлено различий в дифференцировочном потенциале ММСК больных АА и здоровых доноров [48; 119]. В обеих процитированных работах изучение способности ММСК к ответу на индукторы дифференцировки проводилось с использованием как гистохимического окрашивания, так и определения ОУЭ маркерных генов. Отличий в ОУЭ генов *ALPL*, *FABP4* и *PPARG* в ММСК больных АА и здоровых доноров, как и в настоящей работе, обнаружено не было. Однако, в других исследованиях выявлено нарушение остеогенной и адипогенной дифференцировки [25; 208] либо усиление адипогенной при подавлении остеогенной дифференцировки [80; 183] в ММСК больных АА по сравнению с донорами. Во всех случаях дифференцировочный потенциал ММСК определяли с помощью гистохимического окрашивания и только в одном из них также использовали анализ ОУЭ маркерных генов [183]. Все исследования выполнены на небольших выборках, как правило, включающих не более 5 образцов. В настоящей работе была показана вариабельность значений ОУЭ маркерных генов *ALPL*, *PTH1R*, *FABP4* и *PPARG*, которая связана с индивидуальными различиями ММСК больных и доноров. Проведенные ранее исследования показали высокую корреляцию ОУЭ данных генов со степенью зрелости клеток [22; 33; 35; 215], что позволяет предполагать наличие индивидуальных отличий ММСК больных и доноров также на гистологическом уровне. В этом случае использование качественных методов при анализе выборок с небольшим числом образцов может приводить к получению противоречивых данных. В одной из работ показано повышение экспрессии *PPARG* в ММСК больных АА по сравнению с донорами, при этом каждая из выборок включала по 4 образца. Результаты этой работы не согласуются с опубликованными ранее исследованиями, посвященными определению ОУЭ *PPARG* в ММСК больных АА [48; 119], а также результатами настоящей работы, что также может быть связано с небольшим количеством анализируемых образцов в каждой выборке.

3.5. Способность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров к поддержанию кроветворных предшественников

Кроветворение во взрослом организме происходит в нише КМ и регулируется образующими ее клетками. Ключевую роль в поддержании функциональных свойств гемопоэтических клеток играют МСК – наиболее ранние мезенхимные предшественники, обнаруженные *in vivo*, характеризующиеся экспрессией гена промежуточного филамента *NES* и обладающие способностью к самоподдержанию [166]. МСК локализируются в непосредственной близости к СКК и продуцируют растворимые факторы и молекулы клеточной адгезии, необходимые для регуляции пролиферации, дифференцировки и миграции СКК. При некоторых гематологических заболеваниях (например, хронический миелолейкоз, ОМЛ и др.) происходит нарушение способности МСК к регуляции функций СКК, что приводит к подавлению нормального гемопоэза [19; 190; 191].

Известно, что развитие аплазии при АА ассоциировано со снижением количества СКК и изменением их свойств [18]. Показано, что истощение пула СКК при АА происходит в результате аутоиммунной атаки Т-лимфоцитов, однако роль МСК в регуляции кроветворения при АА до конца не изучена. До сих пор неизвестно, сохраняют ли стромальные предшественники из КМ больных АА способность к поддержанию гемопоэтических клеток и различаются ли эта способность у больных с разной степенью выраженности аплазии.

Известно, что гемопоэтические предшественники в условиях *in vitro* утрачивают свои свойства и дифференцируются с образованием более зрелых кроветворных клеток [137]. ММСК способны к поддержанию функциональных особенностей гемопоэтических предшественников при сокультивировании. Наиболее часто для оценки такой способности определяют концентрацию колониеобразующих единиц в суспензии неприкрепленных кроветворных клеток, полученной после сокультивирования ММСК с мононуклеарами КМ или субпопуляцией CD34+ клеток, соответствующих ранним гемопоэтическим предшественникам. Однако такой способ не позволяет охарактеризовать способность ММСК к поддержанию более ранних полипотентных и более поздних олигопотентных кроветворных предшественников. Для определения такой способности можно использовать метод, описанный в работе Р. Е. Пломакера с соавторами [241]. В данном исследовании было показано, что при культивировании мононуклеаров КМ на подслоях стромальных клеток через 7 и 28 дней формируются колонии гемопоэтических клеток, образованные КООб7 и КООб28, частота встречаемости которых отражает концентрацию в КМ более поздних олигопотентных и более ранних полипотентных кроветворных предшественников, соответственно. Таким образом, определение концентрации КООб7 и

КООБ28 при культивировании мононуклеаров КМ здоровых доноров на подслоях ММСК больных АА и здоровых доноров позволяет оценить способность ММСК к поддержанию кроветворных предшественников разной степени зрелости.

При анализе концентрации КООБ7 на подслоях ММСК больных НАА, ТАА и здоровых доноров не было выявлено достоверных различий между группами, что свидетельствует о сохранении способности ММСК больных АА к поддержанию поздних олигопотентных кроветворных предшественников (Рисунок 8, Приложение В (Таблица В.4)). Концентрация КООБ28 на подслоях ММСК больных НАА оказалась выше по сравнению с КООБ28 на подслоях ММСК доноров, а концентрация КООБ28 на подслоях ММСК больных ТАА не отличалась от значений у доноров и больных НАА. При объединении больных ТАА и СТАА в общую выборку не было выявлено различий в концентрации КООБ7 и КООБ28 по сравнению с группой доноров и больных НАА. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что способность ММСК больных ТАА к поддержанию ранних полипотентных предшественников сохранена, а аналогичная способность ММСК больных НАА – повышена по сравнению с донорами.

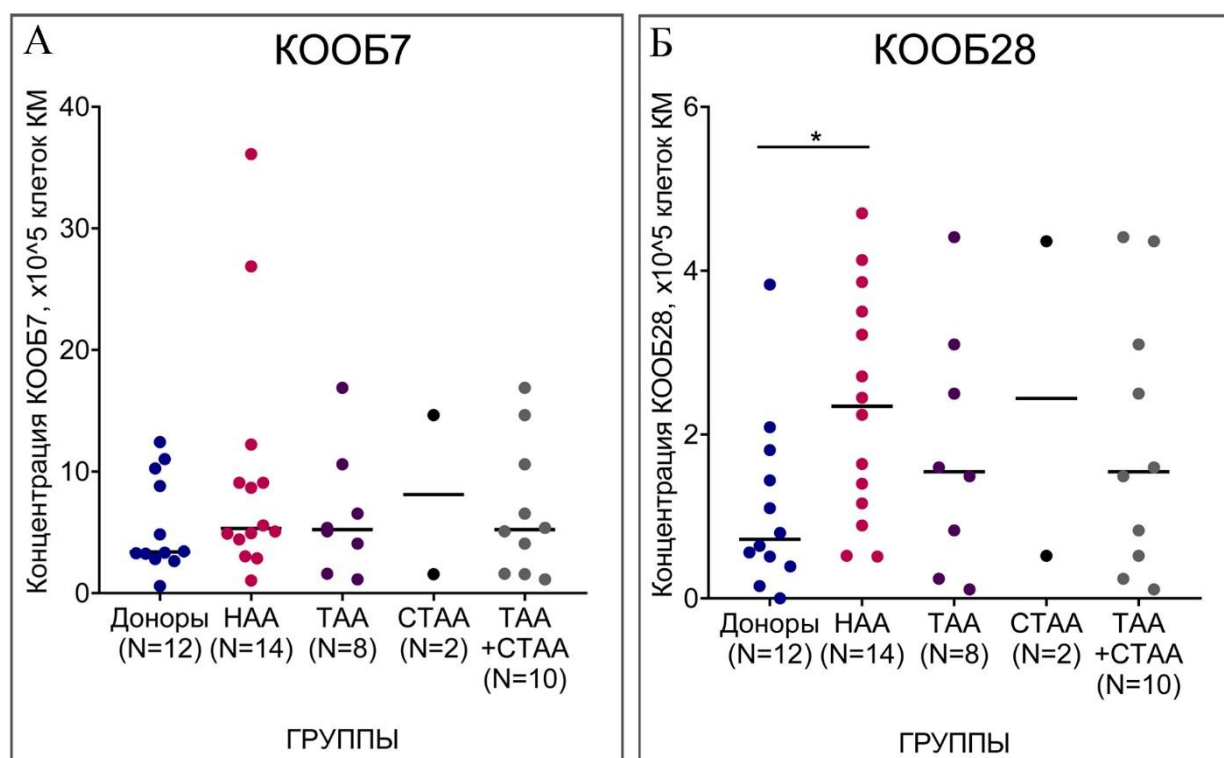


Рисунок 8 – Концентрация КООБ7 (А) и КООБ28 (Б) на подслоях ММСК больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров. Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального больного или донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе. * – достоверные отличия ($p < 0,05$)

СКК – наиболее ранние полипотентные кроветворные предшественники, количество которых снижено в КМ больных АА. Результаты настоящей работы свидетельствуют о компенсаторной активации стромальных предшественников больных НАА, направленной на поддержание функциональных свойств СКК и сохранение пула этих клеток в КМ в условиях аплазии. Активация ММСК при НАА способствует удержанию в нише большего числа СКК, и возможно, вследствие этого препятствует развитию более выраженной аплазии, наблюдаемой при ТАА.

Ранее в нескольких исследованиях была проанализирована способность ММСК больных АА к поддержанию кроветворных предшественников. В двух работах не было выявлено различий между группой больных АА и здоровых доноров [48; 229], а в одной – было показано нарушение способности ММСК больных АА к поддержанию кроветворных предшественников здоровых доноров [64]. Кроме того, в одном исследовании на когорте педиатрических больных была продемонстрирована способность ММСК больных АА к формированию полноценного кроветворного микроокружения *in vivo* [119]. Во всех случаях результаты были получены на 3-6 образцах когорты, включавшей больных НАА и ТАА [48; 64; 119] либо только ТАА [229]. В двух исследованиях были включены также больные, принимавшие ИСТ [64; 229]. Возможно, различия в полученных результатах связаны с исследованием групп, отличающихся по соотношению больных с различными формами и стадиями заболевания.

Результаты настоящего исследования согласуются с данными большинства работ и подтверждают сохранение способности ММСК к поддержанию олигопотентных кроветворных предшественников при НАА и ТАА, а также способности ММСК к поддержанию полипотентных предшественников при ТАА по сравнению с донорами. При этом ММСК больных НАА оказались способны к поддержанию большего числа полипотентных гемопоэтических предшественников по сравнению с донорами, что может объяснять развитие менее выраженной аплазии при данной форме заболевания, чем при ТАА и СТАА.

3.6. Сравнение относительного уровня экспрессии генов в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках и колониеобразующих единицах фибробластов из костного мозга здоровых доноров

В задачи настоящего исследования входит изучение экспрессии генов в двух типах стромальных предшественниках из КМ больных АА: ММСК и КОЕф. В ранее было показано, что КОЕф представляют собой более зрелые мезенхимные предшественники по сравнению с ММСК, однако различия между данными популяциями клеток на молекулярном уровне изучены недостаточно. Сравнительный анализ ОУЭ генов, ассоциированных с пролиферацией,

дифференцировкой, регуляцией кроветворения и иммуномодуляцией, в ММСК и КОЕф из КМ здоровых доноров позволит выявить особенности каждого типа стромальных предшественников, а также понять значение изменений в соответствующих предшественниках из КМ больных АА.

Для удобства изложения материала панель проанализированных генов была разбита на две части: гены, ассоциированные с пролиферацией и дифференцировкой, а также гены, участвующие в регуляции кроветворения и иммуномодуляции.

Сравнение относительного уровня экспрессии генов, ассоциированных с пролиферацией и дифференцировкой, в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках и колониобразующих единицах фибробластов, выделенных из костного мозга здоровых доноров

Результаты анализа ОУЭ генов, ассоциированных с пролиферацией и дифференцировкой, в ММСК и КОЕф из КМ здоровых доноров представлены на Рисунке 9 и в Приложении Г (Таблица Г.1).

Согласно данным литературы, экспрессия гена промежуточного филамента *NES* характерна для МСК – наиболее ранних стромальных предшественников, которые участвуют в образовании ниши СКК [166]. Показано, что популяция *NES*-экспрессирующих мезенхимных предшественников содержит все КОЕф КМ. Поскольку КОЕф – более поздние предшественники, следовательно, культура ММСК также образуется из *NES*-экспрессирующих стромальных клеток. Показано, что в результате пролиферации *in vitro* *NES*-экспрессирующие мезенхимные клетки утрачивают экспрессию *NES* [166].

При анализе ОУЭ *NES* в ММСК и КОЕф из КМ здоровых доноров оказалось, что *NES* экспрессируется в обоих типах стромальных предшественников. При этом ОУЭ *NES* в КОЕф ниже, чем в ММСК, однако недостоверно. КОЕф – более поздние стромальные предшественники, и данное различие может быть связано со снижением экспрессии *NES* в результате созревания мезенхимных клеток.

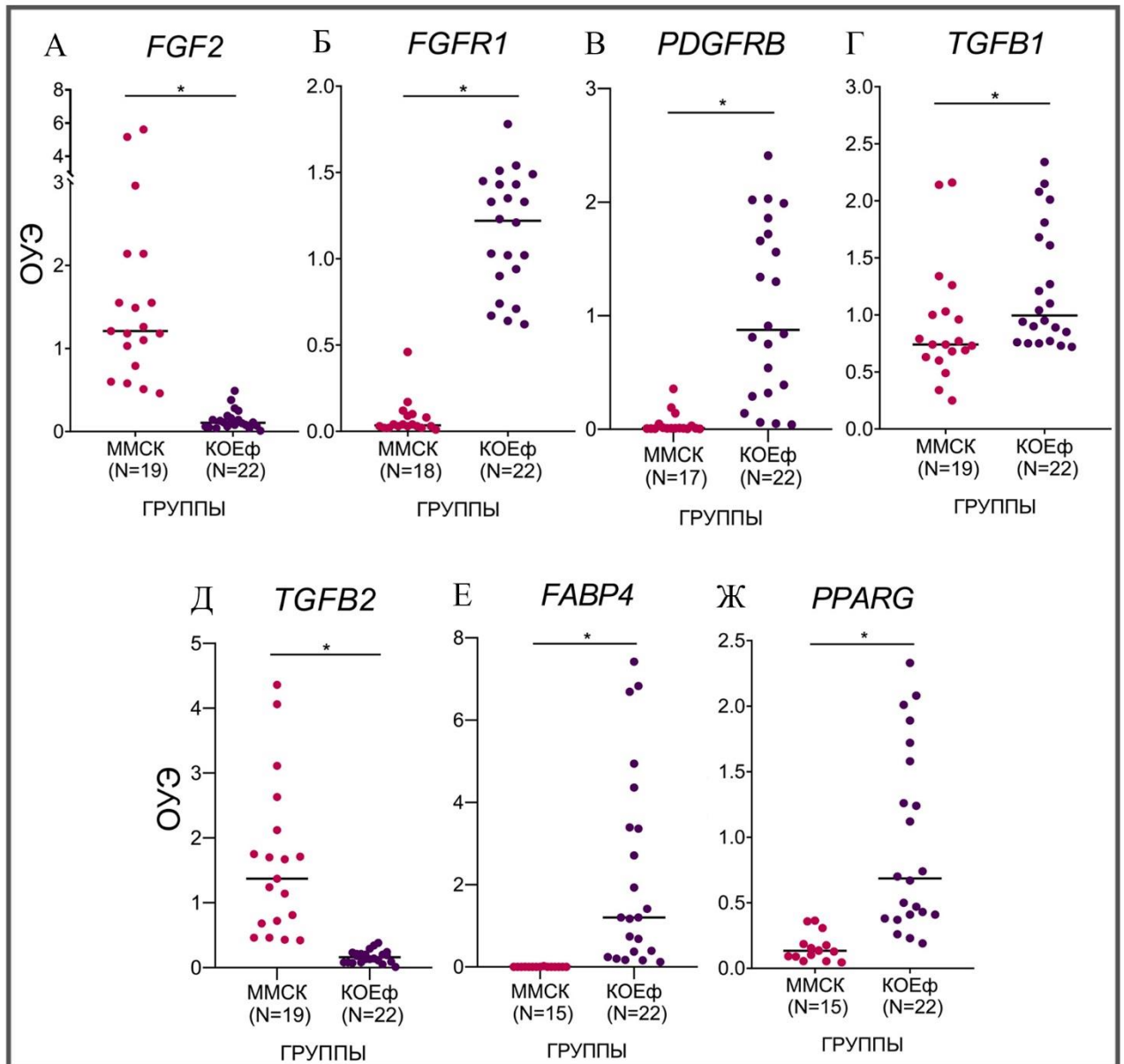


Рисунок 9 – ОУЭ генов, ассоциированных с пролиферацией (*FGF2*, *FGFR1*, *PDGFRB*, *TGFB1*, *TGFB2* – А, Б, В, Г, Д, соответственно) и дифференцировкой (*FABP4*, *PPARG* – Е, Ж, соответственно) в ММСК и КОЕф из КМ здоровых доноров. Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе. * – достоверные отличия ($p < 0,05$)

При определении ОУЭ генов факторов роста и их рецепторов были выявлены различия между ММСК и КОЕф. ОУЭ *FGF2* повышен, а ОУЭ *FGFR1* – снижен в ММСК по сравнению с КОЕф. Известно, что увеличение ОУЭ *FGFR1* и *FGFR2* в мезенхимных клетках ассоциировано с адипогенной и остеогенной дифференцировкой, соответственно. *FGF2* способен подавлять экспрессию обоих рецепторов, препятствуя созреванию клеток и поддерживая их в недифференцированном состоянии [219]. Повышенный ОУЭ *FGF2* и сниженный ОУЭ *FGFR1*

характеризует ММСК как более ранние предшественники по сравнению с КОЕф, что согласуется с данными литературы [116]. Достоверное увеличение только ОУЭ *FGFR1*, но не *FGFR2*, в КОЕф отражает повышение способности данных предшественников к дифференцировке в адипогенном, но не в остеогенном направлении по сравнению с ММСК.

Изучение экспрессии генов факторов роста и их рецепторов выявило повышение ОУЭ *PDGFRB* в КОЕф по сравнению с ММСК, что может быть связано с различиями в степени зрелости двух типов стромальных предшественников. *TGFB1* оказался достоверно повышен, а *TGFB2* – достоверно снижен в КОЕф по сравнению с ММСК, что позволяет сделать вывод о различиях в соотношении экспрессируемых изоформ TGF- β в стромальных предшественниках разной степени зрелости. В настоящее время неясно, различается ли спектр действий TGF- β 1 и TGF- β 2, однако известно, что связывание каждой из изоформ с рецепторным комплексом на поверхности клетки приводит к общему событию – фосфорилированию белков Smad2 и Smad3 [231]. Кроме того, показано, что изоформы TGF- β секретируются в виде латентного комплекса и депонируются во внеклеточном пространстве при связывании с компонентами матрикса, поэтому ключевую роль в реализации функций данного фактора играет его активация [29]. Все это не позволяет определить значение различий в соотношении экспрессируемых изоформ TGF- β в ММСК и КОЕф.

Сравнение ОУЭ генов, ассоциированных с адипогенной дифференцировкой, показало увеличение экспрессии *FABP4* и *PPARG* в КОЕф, что отражает повышенный адипогенный потенциал данных предшественников по сравнению с ММСК.

Отсутствие различий в экспрессии генов, ассоциированных с ранними этапами остеогенной дифференцировки, *ALPL* и *PTH1R* свидетельствует о сходстве остеогенного потенциала ММСК и КОЕф.

Сравнение относительного уровня экспрессии генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения и иммуномодуляцией, в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках и колониеобразующих единицах фибробластов, выделенных из костного мозга здоровых доноров

Результаты анализа ОУЭ генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения и иммуномодуляцией, в ММСК и КОЕф из КМ здоровых доноров представлены на Рисунке 10 и в Приложении Г (Таблица Г.1).

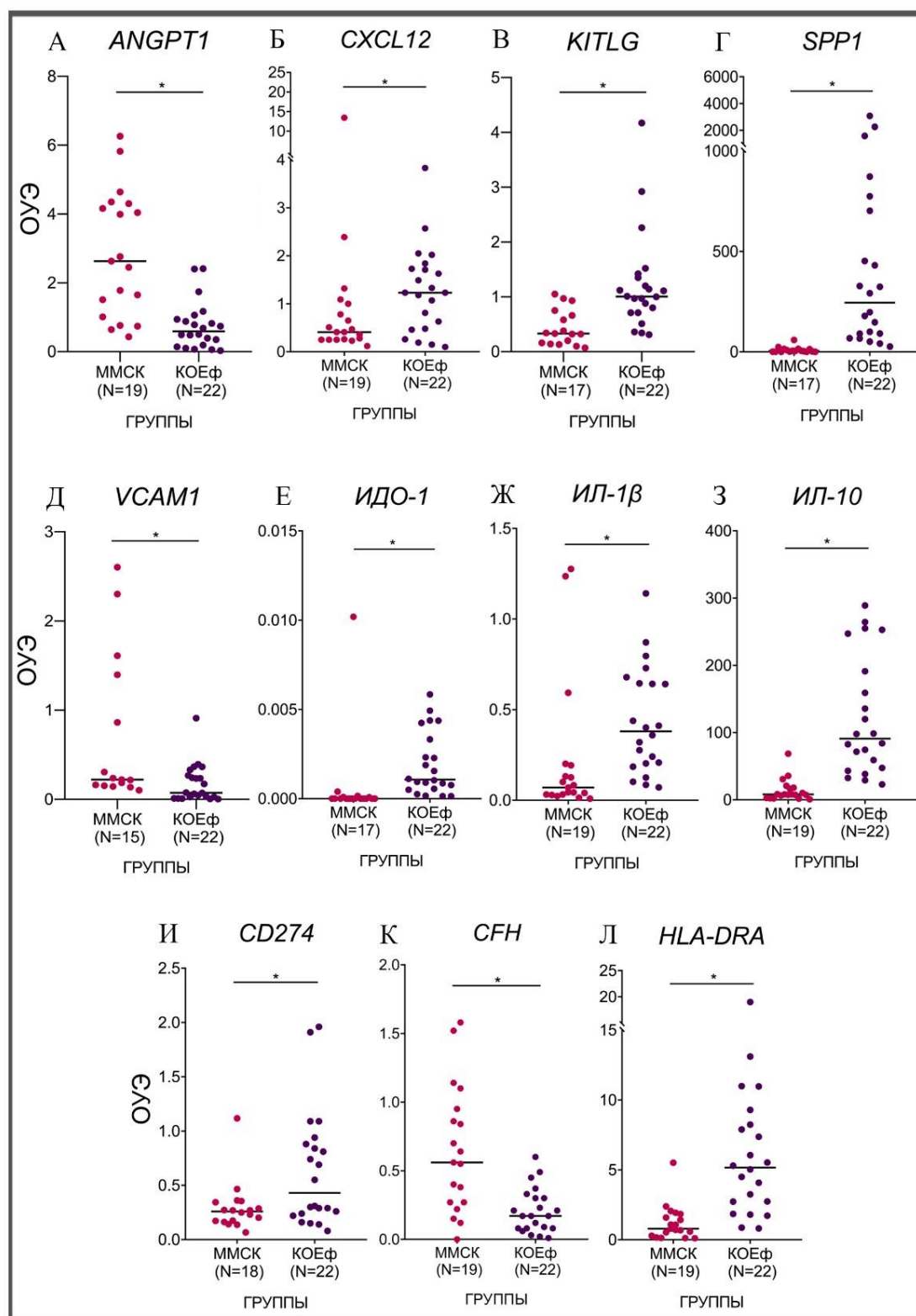


Рисунок 10 – ОУЭ генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения (*ANGPT1*, *CXCL12*, *KITLG*, *SPP1*, *VCAM1* – А, Б, В, Г, Д, соответственно) и иммуномодуляцией (*ИДО-1*, *ИЛ-1β*, *ИЛ-10*, *CD274*, *CFH*, *HLA-DRA* – Е, Ж, З, И, К, Л, соответственно) в ММСК и КОЕф из КМ здоровых доноров. Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе. * – достоверные отличия ($p < 0,05$)

Стромальные предшественники ниши КМ регулируют функции СКК за счет продукции растворимых факторов, а также молекул межклеточной адгезии. При помощи различных экспериментальных мышинных моделей были выявлены популяции клеток, поддерживающих СКК в нише КМ: CAR клетки, секретирующие CXCL12, LepR⁺ клетки, продуцирующие CXCL12 и KITLG, а также NES-экспрессирующие клетки, характеризующиеся высоким уровнем транскрипции генов *CXCL12*, *KITLG*, *ANGPT1*, *VCAM1*, *SPP1* [82; 90; 158; 166]. Перечисленные популяции клеток в значительной степени пересекаются между собой и включают клетки, обладающие свойствами МСК [32; 79; 166].

Ранее изучение свойств стромальных клеток человека, выделенных *in vitro*, показало, что ММСК соответствуют более ранним предшественникам, чем КОЕф, а также обладают способностью к поддержанию полипотентных и олигопотентных кроветворных предшественников, что позволяет рассматривать их в качестве ближайших потомков МСК [116; 241]. Однако сравнительный анализ ОУЭ генов, необходимых для поддержания кроветворения, в ММСК и КОЕф проведен не был.

Определение ОУЭ генов, ассоциированных с регуляцией гемопоэза, показало, что экспрессия *CXCL12*, *KITLG* и *SPP1* снижена, а *ANGPT1*, *VCAM1* – повышена в ММСК по сравнению с КОЕф. *CXCL12* и *KITLG* играют ключевую роль в поддержании СКК в нише. Показано, что подавление экспрессии данных генов в стромальных предшественниках приводит к утрате СКК [90; 154; 158]. Продукт экспрессии гена *SPP1* подавляет пролиферацию СКК, препятствуя истощению их пула в КМ [198; 199]. Повышенный уровень экспрессии *CXCL12*, *KITLG* и *SPP1* в КОЕф из КМ здоровых доноров может свидетельствовать о более выраженной способности данных стромальных предшественников к поддержанию СКК в нише КМ по сравнению с ММСК. Хотя ранее считалось, что экспрессия *ANGPT1* также ассоциирована с удержанием СКК в нише, недавнее исследование показало, что при гомеостазе подавление данного гена в стромальных предшественниках не влияет на функционирование СКК [238; 252]. *VCAM1* – молекула клеточной адгезии, способствующая удержанию СКК в нише и контролирующая процессы мобилизации данных клеток [237; 243]. Повышенный ОУЭ *ANGPT1* и *VCAM1* в ММСК по сравнению с КОЕф указывает на более выраженную способность данных предшественников к регуляции миграции СКК.

Различия ОУЭ генов, необходимых для поддержания СКК в нише КМ, в ММСК и КОЕф могут отражать различия функциональных свойств данных предшественников в отношении регуляции гемопоэза.

При анализе ОУЭ генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, было выявлено повышение экспрессии *ИДО-1*, *ИЛ-1 β* , *ИЛ-10*, *CD274*, *HLA-DRA* и снижение экспрессии *CFH* в КОЕф по сравнению с ММСК. Иммуносупрессорные свойства мезенхимных клеток реализуются

в результате продукции ИДО-1, ИЛ-10, CD274. Данные молекулы ингибируют пролиферацию и активацию и Th1 и Th17 лимфоцитов, подавляя иммунный ответ. Повышенный ОУЭ данных генов в КОЕф свидетельствует о том, что эти клетки обладают более выраженными иммуносупрессорными свойствами по сравнению с ММСК [159]. Хотя ОУЭ провоспалительного цитокина ИЛ-1 β в КОЕф оказался выше, чем в ММСК, показано, что его воздействие на стромальные предшественники приводит к приобретению ими иммуносупрессорного фенотипа [149]. По сравнению с ММСК КОЕф обладают повышенным ОУЭ *HLA-DRA*. Продукция данной молекулы стромальными предшественниками усиливается под воздействием различных факторов, в том числе ИФН- γ , и свидетельствует об активации данных клеток [181]. Среди молекул, ассоциированных с иммуномодуляцией, только ОУЭ *CFH* оказался увеличенным в ММСК, что отражает повышенную способность данных клеток к подавлению активности комплемента, по сравнению с КОЕф [172].

В целом повышение ОУЭ генов, участвующих в подавлении иммунного ответа, в КОЕф свидетельствует о более выраженных иммуносупрессорных свойствах данных предшественников по сравнению с ММСК.

Итак, сравнение ОУЭ генов в ММСК и КОЕф из КМ здоровых доноров выявило отличия между данными типами стромальных предшественников: по сравнению с ММСК в КОЕф повышена экспрессия генов, ассоциированных с адипогенной дифференцировкой, некоторых генов, связанных с регуляцией кроветворения и большинства генов, участвующих в иммуномодуляции. Выявленные различия могут отражать различия функциональных свойств ММСК и КОЕф в КМ здорового человека.

3.7. Экспрессия генов, ассоциированных с пролиферацией, в стромальных предшественниках из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Экспрессия генов, ассоциированных с пролиферацией, в мультипотентных мезенхимных клетках из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Деление клетки происходит под контролем ростовых факторов, которые связываются с рецепторами на поверхностной мембране и запускают каскад событий, приводящий к изменению функции транскрипционных факторов, регулирующих клеточный цикл. Известно, что пролиферация стромальных предшественников происходит при активации трех сигнальных путей: FGF, PDGF и TGF- β [201] и контролируется транскрипционным фактором MYC [236]. Кроме того, показано, что регуляция пролиферации ММСК *in vitro*, а также размера кроветворной территории *in vivo* происходит под влиянием ИЛ-1 β [147; 148]. Данный фактор

может реализовывать свое действие при связывании с рецептором ИЛ-1Р1 на поверхностной мембране клетки.

При изучении особенностей стромальных предшественников из КМ больных АА была проанализирована экспрессия некоторых генов, ассоциированных с пролиферацией. Результаты определения ОУЭ этих генов в ММСК из КМ больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров представлены на Рисунке 11 и в Приложении Г (Таблица Г.2).

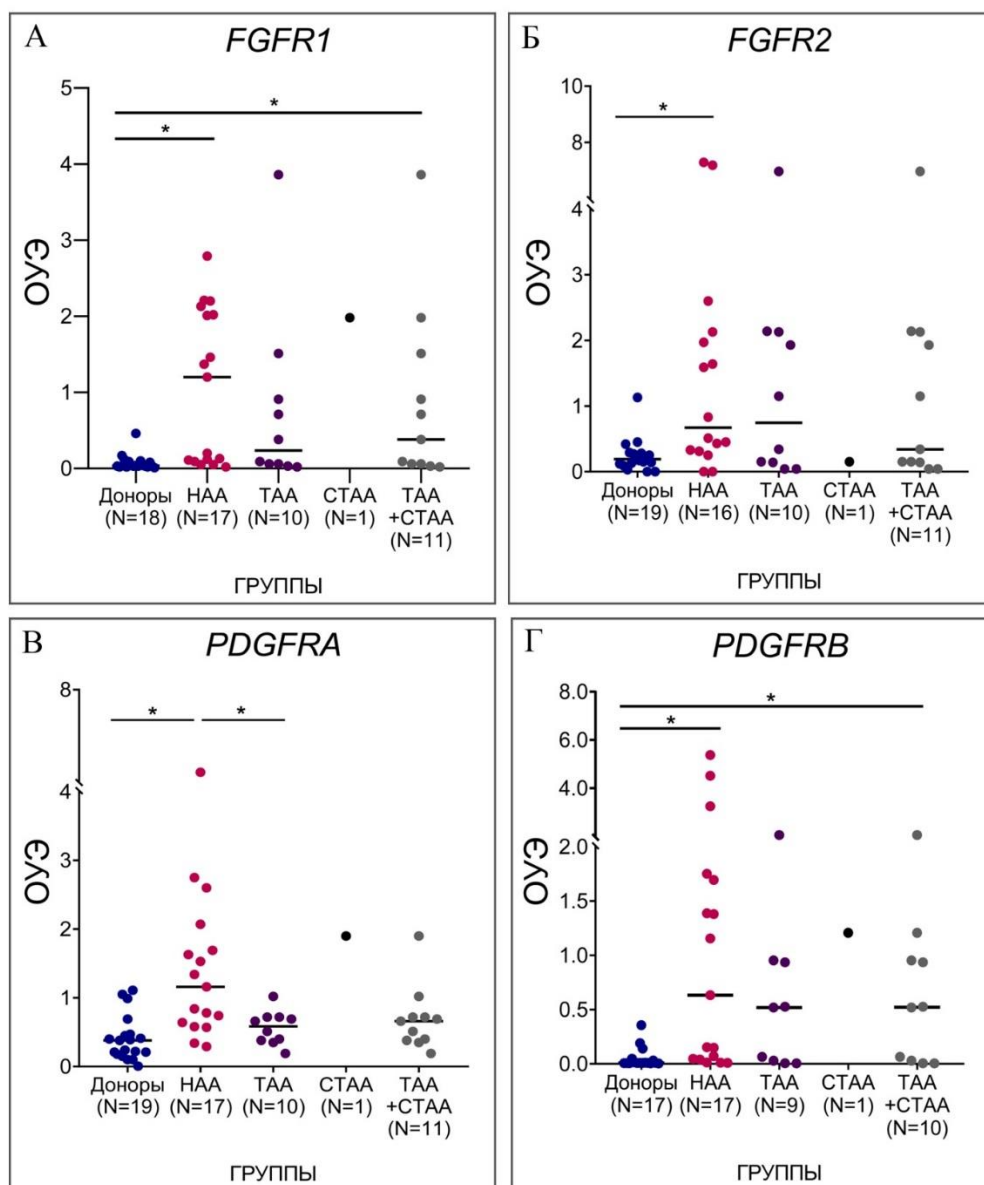


Рисунок 11 – Экспрессия генов, ассоциированных с пролиферацией, в ММСК больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров: *FGFR1* (А), *FGFR2* (Б), *PDGFRA* (В), *PDGFRB* (Г). Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального больного или донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе. * – достоверные отличия ($p < 0,05$)

В ММСК больных НАА выявлено повышение ОУЭ генов всех исследованных рецепторов ростовых факторов (*FGFR1*, *FGFR2*, *PDGFRA*, *PDGFRB*) по сравнению с донорами, что свидетельствует о нарушении путей передачи сигнала от факторов роста FGF и PDGF в данных предшественниках. Выявленное в настоящей работе увеличение времени до ПО и ВУП в ММСК больных НАА может быть следствием данных изменений.

В ММСК больных ТАА также наблюдается повышение ОУЭ всех генов рецепторов ростовых факторов, однако различие недостоверно, что в некоторых случаях может быть связано с небольшим количеством образцов в группе. ММСК группы ТАА+СТАА характеризуются повышенным ОУЭ генов *FGFR1* и *PDGFRB* по сравнению с ММСК доноров. Результаты анализа экспрессии генов свидетельствуют о том, что нарушение путей передачи сигнала от ростовых факторов FGF и PDGF в ММСК больных ТАА и СТАА носит менее выраженный характер, чем при НАА. Возможно, это способствует сохранению ВУП ММСК больных ТАА и ТАА+СТАА на уровне значений доноров, что было показано выше.

При сравнении ММСК больных НАА и ТАА оказалось, что ОУЭ *PDGFRA* достоверно выше у больных НАА, чем у больных ТАА, что отражает различия ММСК больных НАА и ТАА на молекулярном уровне.

ОУЭ факторов роста *FGF2*, *TGFB1*, *TGFB2*, *VEGFA*, рецептора цитокина *ИЛ-1P1* и транскрипционного фактора *MYC* в ММСК больных НАА и ТАА не отличается от значений у доноров, значит, изменение пролиферативных характеристик ММСК больных НАА и ТАА не связано с нарушением экспрессии данных генов. *VEGFA* – ангиогенный фактор, секретируемый ММСК и стимулирующий образование сосудов [185]. Развитие аплазии при АА сопровождается уменьшением плотности сосудов в КМ и снижением концентрации *VEGFA* в сыворотке крови [96; 97]. В литературе отсутствуют данные о необходимости *VEGFA* для роста ММСК. Однако в одной из работ показано, что нарушение пролиферативных свойств ММСК больных АА ассоциировано с подавлением экспрессии компонентов VEGF-Notch сигнального пути, и добавление VEGF в среду инкубирования ММСК больных приводит к восстановлению характеристик данных клеток [17]. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что наблюдаемые изменения в строении КМ, а также в ростовых характеристиках ММСК не связаны с нарушением экспрессии *VEGFA* в ММСК при АА.

Проведенное ранее изучение экспрессии широкой панели генов показало снижение ОУЭ большинства факторов, контролирующих клеточный цикл и деление, в ММСК больных АА по сравнению с донорами [80]. Однако значимость отличий в данной работе невозможно оценить, поскольку она была выполнена на образцах, объединенных в пулы.

В другом исследовании, выполненном на когорте педиатрических больных, включавшей НАА и ТАА, показано, что снижение скорости пролиферации ММСК больных АА по сравнению

с донорами ассоциировано с подавлением экспрессии *FGF2* в данных клетках [155]. В настоящей работе не было выявлено отличий ОУЭ *FGF2* в ММСК больных НАА, ТАА и здоровых доноров, что может быть связано с изучением стромальных предшественников более старшей возрастной группы.

Итак, анализ экспрессии генов, ассоциированных с пролиферацией, показал повышение ОУЭ генов рецепторов ростовых факторов в ММСК больных НАА по сравнению с донорами, которое отражает нарушение механизмов передачи сигнала от факторов роста и может быть связано с изменением пролиферативных свойств данных клеток.

Экспрессия генов, ассоциированных с пролиферацией, в колониеобразующих единицах фибробластов из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

По сравнению с ММСК КОЕф представляют собой более поздние стромальные предшественники, что было показано ранее [116] и в настоящей работе. Хотя образованные КОЕф колонии гетерогенны и различаются по пролиферативному потенциалу, показано, что некоторые из этих предшественников способны претерпевать до 20-30 делений *in vitro*, сохраняя при этом полипотентность [104]. Пролиферация клеток регулируется различными молекулами, в том числе ростовыми факторами и цитокинами. В данной работе определяли ОУЭ генов, кодирующих некоторые из этих молекул, а также их рецепторов, в суммарной культуре колоний КОЕф, полученных из КМ больных НАА, ТАА и СТАА, а также здоровых доноров (Рисунок 12, Приложение Г (Таблица Г.3)).

При анализе экспрессии генов, ассоциированных с пролиферацией, ОУЭ *TGFβ1* оказался снижен в КОЕф больных НАА, а *TGFβ2* – повышен в КОЕф больных ТАА, а также в КОЕф больных ТАА+СТАА по сравнению с донорами. Активация TGF-β/SMAD сигнального каскада под воздействием изоформ TGF-β необходима для пролиферации стромальных предшественников. Снижение продукции TGF-β в КОЕф больных НАА может приводить к замедлению пролиферации, а повышение продукции данного фактора в КОЕф больных ТАА – к ускорению пролиферации этих клеток [201]. Однако поскольку ведущая роль в продукции и активации TGF-β в КМ принадлежит немиелинизированным шванновским клеткам и макрофагам [41], неизвестно, приводит ли изменение экспрессии TGF-β в стромальных клетках КМ больных АА к физиологическому эффекту.

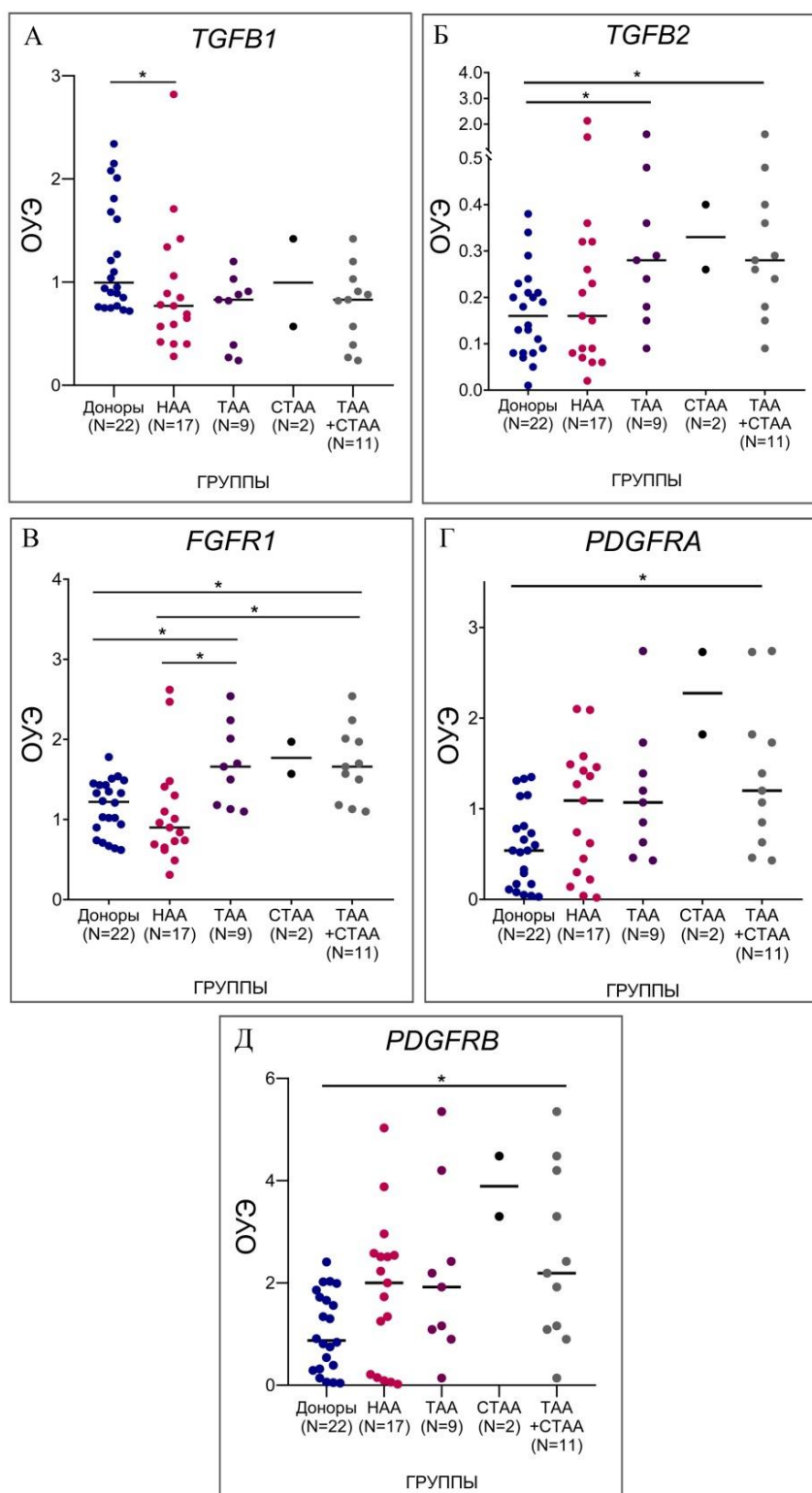


Рисунок 12 – Экспрессия генов, ассоциированных с пролиферацией, в КОЕф больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров: *TGFB1* (А), *TGFB2* (Б), *FGFR1* (В), *PDGFRA* (Г), *PDGFRB* (Д). Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального больного или донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе. * – достоверные отличия ($p < 0,05$)

Известно, что TGF- β 1 обладает также иммуносупрессорными свойствами. Показано, что ММСК из КМ способны подавлять пролиферацию CD4+ и CD8+ активированных Т-лимфоцитов, а также индуцировать образование Treg за счет секреции TGF- β 1 [62; 124]. Снижение ОУЭ *TGFB1* в КОЕф больных НАА может отражать нарушение способности данных клеток к иммуномодуляции. TGF- β 2 также обладает иммуносупрессорными свойствами, однако влияние данной изоформы на развитие Т-клеточного иммунного ответа не так хорошо изучено [134]. ОУЭ *TGFB2* в КОЕф больных ТАА увеличен, что свидетельствует об усилении способности данных клеток к иммуномодуляции.

КОЕф больных НАА не отличались от донорских по ОУЭ генов рецепторов факторов роста. В КОЕф больных ТАА выявлено повышение ОУЭ *FGFR1* по сравнению со значениями у доноров, а также у больных НАА, что отражает различие между КОЕф больных НАА и ТАА на молекулярном уровне. Повышение ОУЭ *FGFR1*, *PDGFRA*, *PDGFRB* в КОЕф больных с ТАА+СТАА по сравнению с донорами отражает нарушение процесса передачи сигнала от соответствующих факторов роста и указывает на изменение пролиферативных свойств данных предшественников.

Отличий ОУЭ факторов роста *FGF2*, *VEGFA* и рецептора к ростовому фактору *FGFR2* между группами больных НАА, ТАА, ТАА+СТАА и здоровых доноров выявлено не было.

Таким образом, наиболее выраженные изменения экспрессии генов рецепторов ростовых факторов выявлены в КОЕф при ТАА+СТАА, что может быть связано с нарушением пролиферации этого типа стромальных предшественников при данных формах заболевания.

3.8. Экспрессия генов, ассоциированных с дифференцировкой, в колониеобразующих единицах фибробластов из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Ранее в настоящей работе был проанализирован дифференцировочный потенциал ММСК больных АА и здоровых доноров. Показано, что ММСК больных АА не отличаются от ММСК здоровых доноров по способности к ответу на индукторы остеогенной и адипогенной дифференцировки, а также по экспрессии маркерных генов в контрольных образцах и в образцах, культивированных с индукторами.

В КОЕф больных АА и здоровых доноров, культивированных в стандартной среде, не содержащей индукторов дифференцировки, был также проанализирован ОУЭ маркерных генов дифференцировки, отражающих степень зрелости данных предшественников (Таблица 6, Приложение Г (Таблица Г.3)). При этом не было выявлено достоверных отличий ОУЭ *ALPL*, *PTHRI*, *FABP4* и *PPARG* в КОЕф больных НАА, ТАА, ТАА+СТАА и здоровых доноров, что

указывает на отсутствие изменений степени дифференцированности КОЕф больных АА по сравнению с КОЕф доноров. КОЕф как более поздние мезенхимные предшественники участвуют в образовании всех зрелых клеток стромы КМ, поэтому их дифференцировочный потенциал играет важную роль в функционировании кроветворного микроокружения. Отсутствие изменений ОУЭ маркерных генов дифференцировки в КОЕф больных АА по сравнению с донорами свидетельствует о сохранении способности к дифференцировке данных предшественников при АА.

Таблица 6 – Экспрессия генов, ассоциированных с дифференцировкой, в КОЕф больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров

Функциональная группа	Ген	Доноры (N=22)	НАА (N=17)	ТАА (N=9)	СТАА (N=2)	ТАА+СТАА (N=11)
Остеогенная дифференцировка	<i>ALPL</i>	0,11±0,03	0,20±0,05	0,3±0,1	0,07±0,05	0,2±0,1
	<i>PTH1R</i>	0,07±0,02	0,05±0,01	0,07±0,01	0,02±0,01	0,06±0,01
Адипогенная дифференцировка	<i>FABP4</i>	2,3±0,5	4,1±2,0	2,0±1,4	0,2±0,1	1,6±1,2
	<i>PPARG</i>	1,0±0,1	1,0±0,2	0,5±0,1	0,4±0,1	0,5±0,1

3.9. Экспрессия маркера наиболее ранних мезенхимных клеток нестина в стромальных предшественниках из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Хотя анализ ОУЭ маркерных генов дифференцировки не выявил отличий в степени дифференцированности ММСК и КОЕф из КМ больных по сравнению с донорами, при АА может происходить нарушение соотношения наиболее ранних мезенхимных клеток, образующих нишу КМ. Маркером ранних стромальных предшественников КМ служит экспрессия *NES* [166]. ОУЭ данного гена был проанализирован в ММСК и КОЕф из КМ больных АА и здоровых доноров.

Экспрессия нестина в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Популяция ММСК гетерогенна [71] и состоит из клеток, различающихся по степени зрелости [69; 70]. Анализ экспрессии *NES* может отражать относительную представленность в ней наиболее ранних стромальных предшественников. Результаты определения ОУЭ данного гена в ММСК больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров представлены на Рисунке 13 и в Приложении Г (Таблица Г.2).

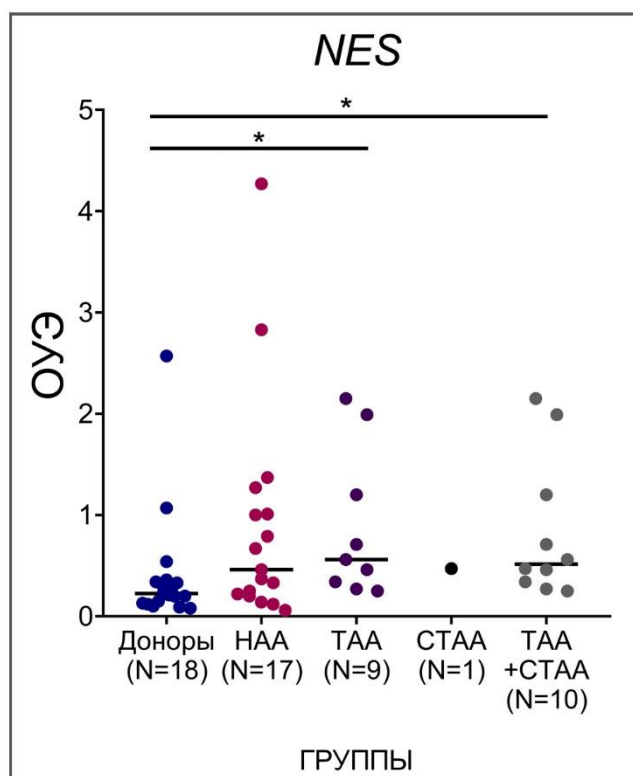


Рисунок 13 – Экспрессия гена промежуточного филамента *NES* в ММСК больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров. Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального больного или донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе. * – достоверные отличия ($p < 0,05$)

ОУЭ *NES* в ММСК больных НАА был повышен, но достоверно не отличался от значений доноров. ОУЭ *NES* в ММСК больных ТАА и ТАА+СТАА оказался достоверно выше, чем в ММСК здоровых доноров. Увеличение экспрессии *NES* в ММСК больных может быть связано с усилением транскрипции этого гена в популяции наиболее ранних стромальных предшественников и изменении их свойств, либо с увеличением доли этих клеток в культуре ММСК, а также в КМ таких больных. *NES*-экспрессирующие клетки образуют нишу СКК, повышение их доли в КМ при ТАА и СТАА, возможно, носит компенсаторный характер и направлено на поддержание размера кроветворной территории в условиях аплазии.

Экспрессия нестина в колониеобразующих единицах фибробластов из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Хотя экспрессия *NES* характерна для наиболее ранних мезенхимных клеток КМ, оказалось, что транскрипция этого гена происходит и в более поздних предшественниках (колониях, образованных КОЕф) как у здоровых доноров, так и у больных АА (Рисунок 14, Приложении Г (Таблица Г.3). При этом ОУЭ *NES* оказался повышен в КОЕф больных НАА, ТАА и ТАА+СТАА по сравнению с значениями у доноров, что указывает на изменение свойств и/или

представленности ранних мезенхимных клеток в колониях КОЕф, а также в КМ больных. Выявлена тенденция к повышению ОУЭ *NES* в КОЕф при увеличении степени тяжести АА, что может отражать компенсаторное увеличение доли более ранних предшественников в КМ больных АА, связанное с необходимостью увеличения размера кроветворной территории в условиях аплазии.

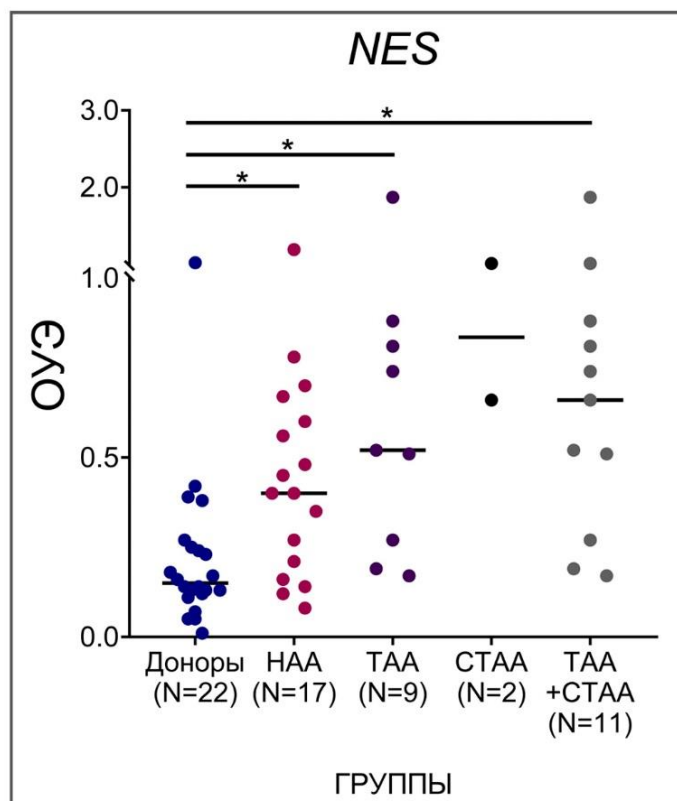


Рисунок 14 – Экспрессия гена промежуточного филамента *NES* в КОЕф больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров. Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального больного или донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе. * – достоверные отличия ($p < 0,05$)

3.10. Экспрессия генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения, в стромальных предшественниках из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Способность стромальных предшественников КМ к регуляции кроветворения реализуется за счет продукции факторов, необходимых для поддержания СКК в нише. К таким факторам относятся CXCL12, KITLG, ANGPT1, SPP1, VCAM1 [166]. Данные молекулы определяют локализацию СКК в нише, сохранение их функциональных свойств, а также размер пула этих клеток в КМ.

Экспрессия генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения, в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Анализ ОУЭ генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения, в ММСК не выявил изменений у больных НАА по сравнению с донорами, что отражает сохранение экспрессии факторов, необходимых для поддержания ССК в нише, в данных клетках (Приложение Г (Таблица Г.2)). Полученные данные согласуются с результатами анализа концентрации КООБ7 и КООБ28 на подслоях ММСК, в котором не было обнаружено нарушений в способности ММСК больных НАА к поддержанию ранних и поздних кроветворных предшественников.

ОУЭ генов *CXCL12*, *KITLG*, *SPPI*, *VCAM1* в ММСК больных ТАА и ТАА+СТАА не отличался от значений у доноров, однако ОУЭ *ANGPT1* был снижен (Рисунок 15). Долгое время считалось, что продукция *ANGPT1* необходима для удержания ССК в остеобластной нише в состоянии покоя [238]. Однако в недавнем исследовании было показано, что *ANGPT1* не экспрессируется в остеобластах, и подавление его транскрипции не влияет на функционирование ССК при гомеостазе, но стимулирует ангиогенез и восстановление гемопоэза после облучения [252]. При анализе концентрации КООБ7 и КООБ28 в настоящем исследовании оказалось, что ММСК больных ТАА и ТАА+СТАА сохраняют способность к поддержанию ранних и поздних кроветворных предшественников, несмотря на снижение экспрессии *ANGPT1*, что подтверждает результаты данной работы. Известно, что при АА происходит уменьшение плотности сосудов в КМ [96; 97]. Возможно, подавление экспрессии *ANGPT1* в ММСК носит компенсаторный характер и направлено на стимуляцию ангиогенеза, а также восстановление гемопоэза в условиях выраженной аплазии.

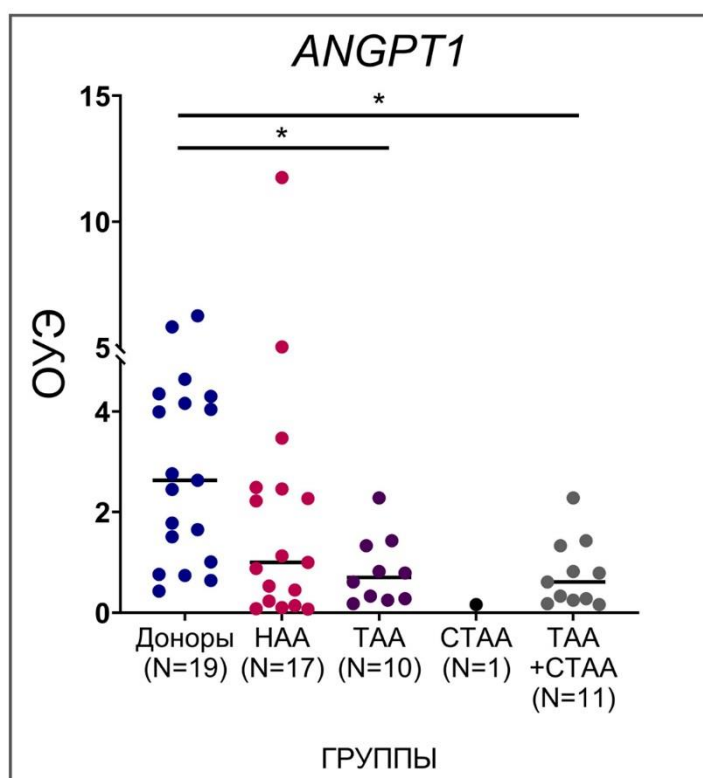


Рисунок 15 – Экспрессия *ANGPT1* в ММСК больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров. Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального больного или донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе. * – достоверные отличия ($p < 0,05$)

Ранее на когорте, включающей 24 больных НАА и 4 больных ТАА, было показано снижение OУЭ гена *VCAM1* в ММСК больных АА по сравнению с донорами, что сопровождалось нарушением способности данных клеток к поддержанию ранних кроветворных предшественников, а также к индукции ангиогенеза [60]. Хотя в настоящем исследовании выявлено уменьшение экспрессии *VCAM1* в ММСК больных НАА и ТАА, однако отличия от доноров недостоверны. Кроме того, показано сохранение способности ММСК больных АА к поддержанию кроветворных предшественников, что не согласуется с данными проведенного ранее исследования. Возможно, несоответствие результатов связано с различиями в методологических подходах при выделении и изучении ММСК из КМ больных АА и здоровых доноров.

В другом исследовании было показано снижение OУЭ *KITLG* в ММСК больных ТАА по сравнению с донорами, однако значимость отличий не была оценена в связи с выполнением анализа на образцах, объединенных в пулы [80]. В настоящем исследовании не было выявлено достоверных различий экспрессии *KITLG* в ММСК больных ТАА и здоровых доноров.

Экспрессия генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения, в колониобразующих единицах фибробластов из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Несмотря на то, что КОЕф обладают характеристиками более поздних потомков МСК, в некоторых работах была показана способность данных предшественников к формированию кроветворного микроокружения в модельной системе образования очага эктопического кроветворения под капсулой почки сингенных животных [103; 209]. В настоящей работе при сравнении ММСК и КОЕф доноров, оказалось, что ОУЭ некоторых молекул, определяющих поддержание СКК в нише (*CXCL12*, *KITLG* и *SPP1*) повышен в КОЕф, по сравнению с ММСК, что указывает на важную роль данных предшественников в регуляции кроветворения.

При анализе экспрессии генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения, в КОЕф не было выявлено отличий ОУЭ генов *CXCL12*, *SPP1*, *VCAM1*, *ANGPT1* между группами больных НАА и здоровых доноров (Рисунок 16, Приложение Г (Таблица Г.3)). ОУЭ *KITLG* в КОЕф данной группы больных оказался повышен по сравнению со значениями у доноров. *KITLG* синтезируется стромальными предшественниками как в растворимой, так и мембраносвязанной форме. Взаимодействие мембраносвязанного *KITLG* с рецептором С-КИТ на поверхности СКК необходимо для поддержания этих клеток в нише [38; 39; 90]. Усиление экспрессии *KITLG* стромальными предшественниками приводит к увеличению количества молекул данного фактора на поверхности мезенхимных клеток и, как следствие, к удержанию большего числа СКК в нише КМ. Достоверное повышение ОУЭ *KITLG* характерно для КОЕф только больных НАА, но не ТАА и ТАА+СТАА, что свидетельствует о компенсаторном характере изменений при НАА, препятствующих развитию более выраженной аплазии.

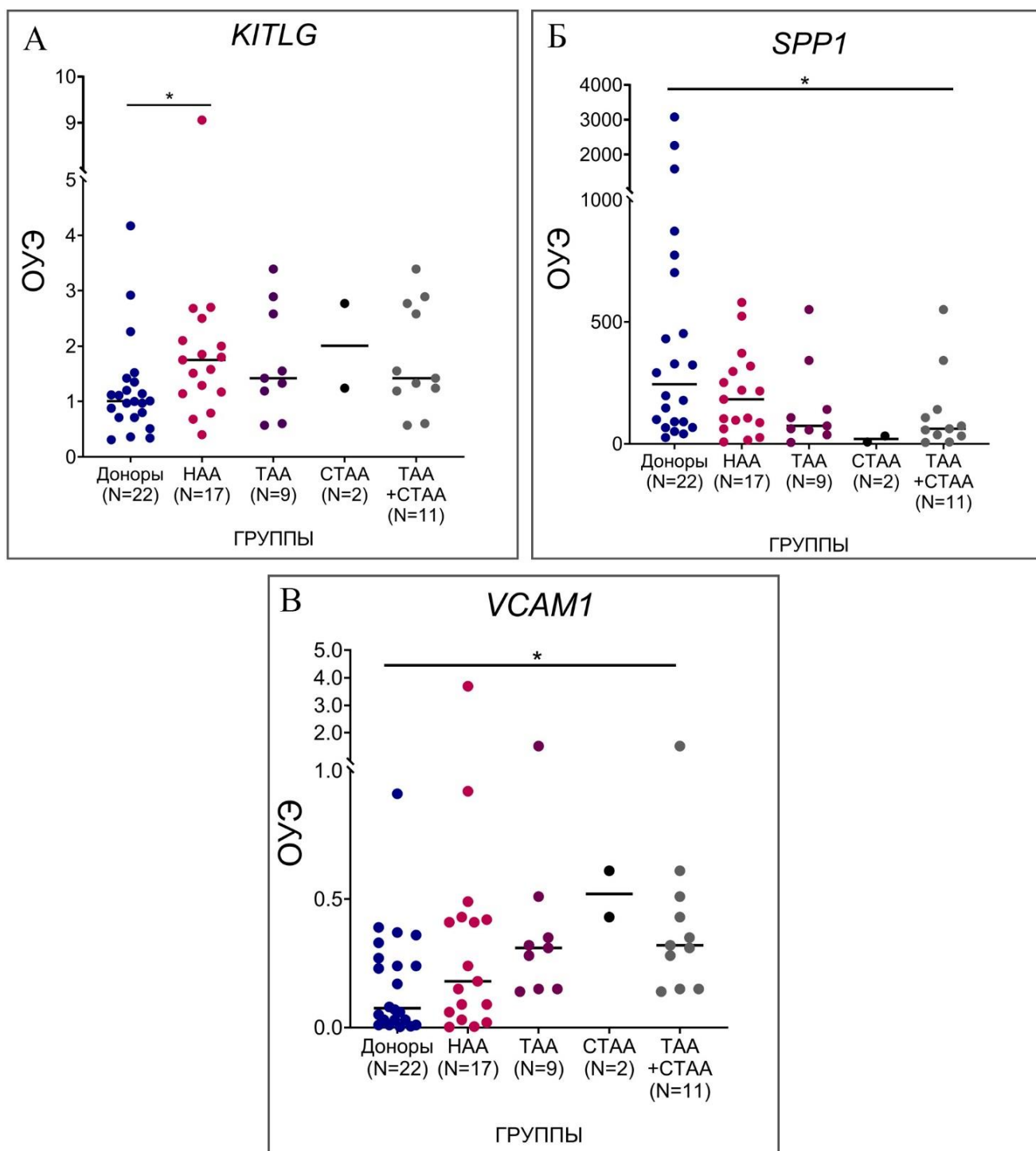


Рисунок 16 – Экспрессия генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения, в КОЕф из КМ больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров: *KITLG* (А), *SPP1* (Б), *VCAM1* (В). Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального больного или донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе. * – достоверные отличия ($p < 0,05$)

Интересно, что при анализе концентрации КООБ28 здоровых доноров на подслоях ММСК, оказалось, что ММСК больных НАА, но не ТАА и ТАА+СТАА, способны к поддержанию

большого числа ранних кроветворных предшественников по сравнению с ММСК доноров. Хотя достоверных отличий ОУЭ *KITLG* в ММСК больных АА и здоровых доноров выявлено не было, экспрессия данного гена также оказалась повышенной только у больных НАА, но не у больных ТАА и ТАА+СТАА. Возможно, сокультивирование с гемопоэтическими предшественниками приводит к более выраженному увеличению ОУЭ *KITLG* в ММСК больных НАА, проявляющемуся в достоверном усилении способности к поддержанию кроветворных клеток. Стоит отметить, что колонии КОЕф получают в результате инкубации мононуклеаров КМ в стандартных условиях в течение 14 дней без смены среды. При этом в культуральном флаконе наряду со стромальными некоторое время могут присутствовать и кроветворные клетки. Возможно, при НАА воздействие гемопоэтических клеток способствует повышению ОУЭ *KITLG* в костномозговых стромальных предшественниках. Проверка данной гипотезы требует дополнительных исследований.

Анализ ОУЭ генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения, в КОЕф больных ТАА не выявил достоверных отличий от КОЕф больных НАА и здоровых доноров, возможно, в связи с небольшим числом образцов в группе. Однако ОУЭ *SPP1* оказался снижен, а *VCAM1* – повышен в КОЕф группы больных ТАА+СТАА. Возможно, эти изменения связаны с увеличением степени тяжести заболевания. Известно, что СКК большую часть времени пребывают в покое и способны входить в клеточный цикл всего несколько раз за время жизни организма [26]. *SPP1* ингибирует пролиферацию СКК, препятствуя истощению пула данных клеток в КМ, однако с возрастом их количество сокращается. Показано, что подавление экспрессии *SPP1* в клетках ниши КМ приводит к экспансии СКК [198; 199]. Снижение ОУЭ *SPP1* в КОЕф больных ТАА+СТАА свидетельствует об активации пролиферации СКК при данных формах заболевания. С одной стороны, это может быть связано с компенсаторной стимуляцией гемопоэза в условиях аплазии, с другой стороны, продолжительная индукция клеточных делений может приводить к истощению пула наиболее ранних кроветворных предшественников и к развитию более выраженной аплазии.

Одним из основных подходов при лечении рефрактерной АА служит назначение агониста тромбопоэтинового рецептора элтромбопага, который стимулирует пролиферацию СКК и мегакариоцитопоэз. Показано, что применение элтромбопага вызывает моно-, би- и трилинейное восстановление гемопоэза у 44% больных рефрактерной ТАА [88]. Обнаружено, что у больных, не отвечающих на терапию элтромбопагом, снижено количество ретикулоцитов, что указывает на истощение ранних гемопоэтических предшественников. Можно предположить, что у части больных в результате подавления экспрессии *SPP1* в стромальных предшественниках КМ происходит стимуляция делений СКК, которая и приводит к истощению пула клеток этого типа.

При анализе экспрессии генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения, было выявлено повышение ОУЭ *VCAM1* в КОЕф больных ТАА+СТАА, которое может также носить компенсаторный характер. *VCAM1* определяет локализацию в нише КМ как наиболее ранних, так и более поздних кроветворных предшественников [237; 243]. Усиление экспрессии данного гена в КОЕф больных ТАА+СТАА в условиях экспансии СКК, вызванной подавлением ОУЭ *SPP1*, способствует удержанию данных клеток в нише КМ и препятствует их мобилизации в кровоток, что повышает эффективность гемопоэза.

Итак, активация экспрессии *KITLG* в КОЕф больных НАА отражает усиление способности стромальных клеток КМ к удержанию в нише наиболее ранних кроветворных предшественников, что может препятствовать развитию более выраженной аплазии. Снижение ОУЭ *ANGPT1* в ММСК больных ТАА и СТАА, возможно, направлено на стимуляцию ангиогенеза и гемопоэза, а уменьшение ОУЭ *SPP1* и увеличение ОУЭ *VCAM1* в КОЕф свидетельствует о стимуляции пролиферации гемопоэтических предшественников и повышении их адгезии к стромальным клеткам ниши, что, однако может быть причиной истощения пула СКК при данных формах заболевания.

В целом, стромальные предшественники из КМ больных АА не теряют способности поддерживать кроветворение, напротив, они находятся в активированном состоянии и экспрессируют ряд генов, стимулирующих пролиферацию СКК и удержание их в нише, а также ангиогенез.

3.11. Экспрессия генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, в стромальных предшественниках из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Экспрессия генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Иммуносупрессорные свойства стромальных предшественников связаны с их способностью подавлять развитие иммунного ответа в результате секреции растворимых факторов и за счет непосредственного взаимодействия с клетками иммунной системы. К основным факторам, опосредующим иммуномодулирующее действие мезенхимных клеток, относят TGF- β , ИЛ-10, простагландин E2, фактор роста гепатоцитов, человеческий лейкоцитарный антиген G5, ИДО-1, PD-L1 (CD274) и FASL [159; 165]. Кроме того, стромальные предшественники ингибируют активацию системы комплемента за счет секреции CFH [172]. Экспрессия данных молекул возрастает в результате активации мезенхимных клеток под

воздействием провоспалительных цитокинов, например, ИФН- γ , а также при взаимодействии их с лимфоцитами [146; 218]. Этот процесс сопровождается усилением транскрипции *HLA-DR* в стромальных предшественниках [179]. Добавление в среду инкубации мезенхимных клеток ИЛ-1 β также приводит к приобретению ими иммуносупрессорного фенотипа [149].

При анализе экспрессии генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, не было выявлено различий ОУЭ *CFH*, *ИДО-1*, *CD274*, *ИЛ-1 β* , *TGFB1*, *TGFB2* в ММСК больных НАА, ТАА, ТАА+СТАА и здоровых доноров (Приложение Г (Таблица Г.2)). Однако ОУЭ *ИЛ-10* снижен, а ОУЭ рецептора ИЛ-4 (*ИЛ-4R*) – повышен в ММСК больных НАА по сравнению с ММСК здоровых доноров (Рисунок 17). ИЛ-10 – один из основных противовоспалительных цитокинов. Его супрессорная роль на развитие иммунного ответа связана со способностью подавлять пролиферацию Th1 лимфоцитов, ингибировать созревание ДК, а также стимулировать экспансию Трег [133]. Снижение экспрессии *ИЛ-10* в ММСК больных НАА свидетельствует о нарушении иммунорегуляторной функции этих клеток.

Секреция ИЛ-4 Th2 лимфоцитами необходима для индукции гуморального иммунного ответа. Показано, что количество Th2 лимфоцитов повышено в крови больных АА по сравнению с донорами [106], однако концентрация ИЛ-4 не изменена [51; 189]. Увеличение ОУЭ *ИЛ-4R* в ММСК больных НАА свидетельствует о нарушении передачи сигнала от ИЛ-4 в данных клетках и об изменении их иммунологических свойств.

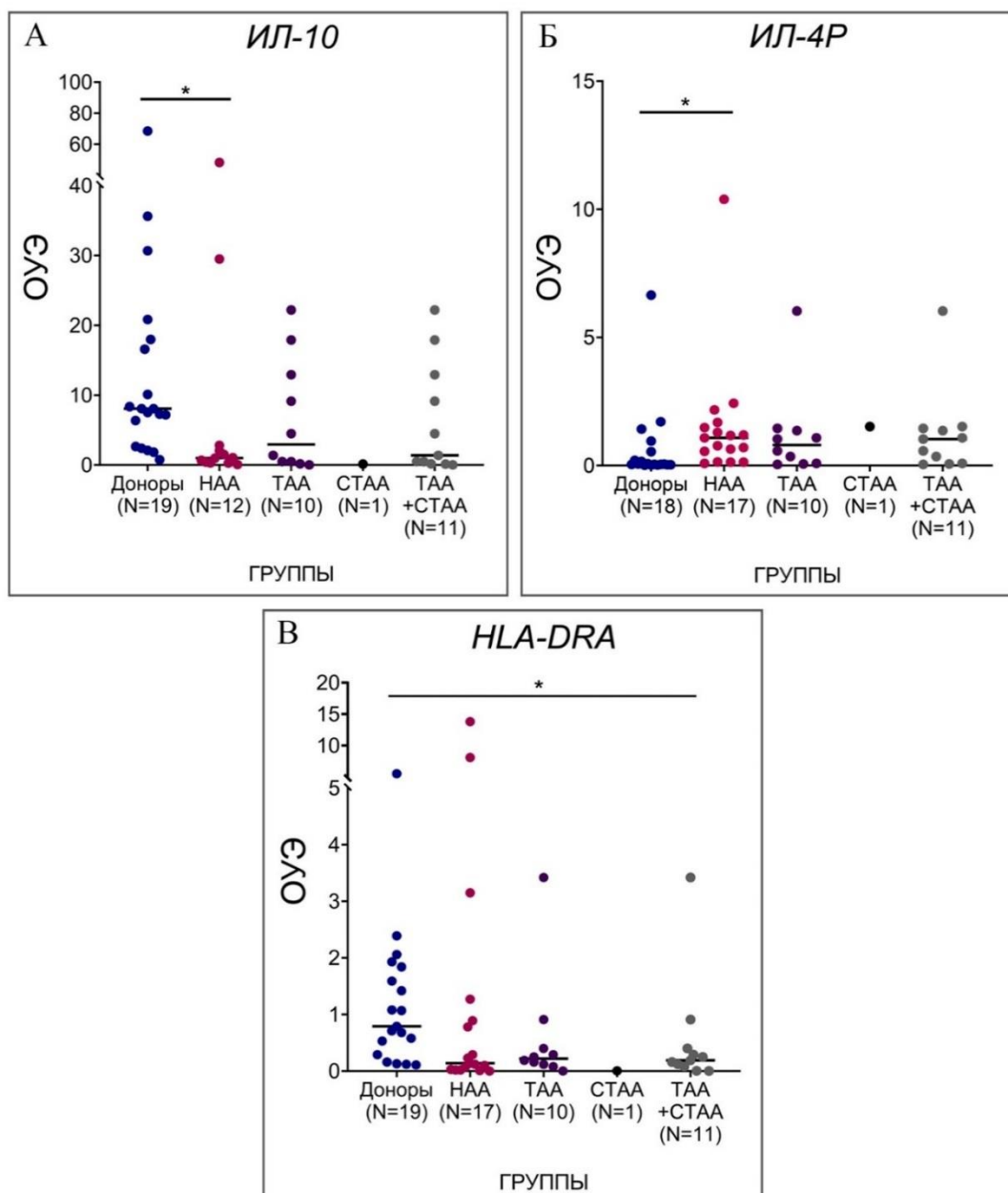


Рисунок 17 – Экспрессия генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, в ММСК больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров: *ИЛ-10* (А), *ИЛ-4Р* (Б), *HLA-DRA* (В). Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального больного или донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе. * – достоверные отличия ($p < 0,05$)

Хотя в ММСК больных ТАА не было выявлено изменений экспрессии генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, в ММСК больных ТАА+СТАА, оказался сниженным ОУЭ *HLA-DRA* по сравнению с донорами. *HLA-DRA* кодирует альфа субъединицу *HLA-DR*. Повышение экспрессии *HLA-DR* в ММСК в норме происходит в результате активации под воздействием провоспалительных цитокинов и ассоциировано с приобретением данными

клетками иммуносупрессорного фенотипа [179]. Хотя определение ОУЭ *HLA-DRA* в настоящем исследовании проводилось в неактивированных стромальных предшественниках, снижение экспрессии этого гена в ММСК больных ТАА и СТАА может быть связано с нарушением способности данных клеток к активации.

Итак, выявленные изменения ОУЭ *ИЛ-10* и *ИЛ-4Р* отражают нарушение иммуносупрессорной функции ММСК при НАА, а подавление транскрипции *HLA-DRA* в ММСК при ТАА, возможно, связано с дефектом активации данных клеток. В работах, посвященных изучению способности ММСК больных АА к регуляции иммунного ответа, были получены противоречивые данные. В одном исследовании показано, что ММСК больных ТАА в отличие от донорских не способны ингибировать пролиферацию и активацию Т-лимфоцитов, а также секрецию ими провоспалительных цитокинов [229]. Однако в другой работе выяснилось, что ММСК как больных НАА и ТАА, так и здоровых доноров подавляют Т-клеточный ответ в модельной системе *in vitro* [48]. Возможно, несоответствие результатов связано с различиями в методических подходах: в первом исследовании длительность сокультивирования лимфоцитов и ММСК была выше, что позволило выявить достоверные различия между группами больных и доноров.

Экспрессия генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, в колониеобразующих единицах фибробластов из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

В отличие от ММСК, свойства которых активно изучают на протяжении последних десятилетий, КОЕф охарактеризованы недостаточно в связи с ограниченными возможностями практического применения данных клеток. В литературе отсутствуют исследования, посвященные определению иммуносупрессорных свойств КОЕф. В настоящей работе при сравнении двух типов предшественников, выделенных из КМ здоровых доноров, оказалось, что экспрессия большинства генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, в КОЕф выше, чем в ММСК здоровых доноров, что свидетельствует о более выраженной способности данных стромальных клеток к регуляции иммунного ответа.

При изучении экспрессии генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, в КОЕф больных НАА, ТАА, ТАА+СТАА и здоровых доноров различий ОУЭ *CFH* обнаружено не было (Приложение Г (Таблица Г.3)), что позволяет сделать вывод о сохранении способности КОЕф больных АА к подавлению активации системы комплемента. Анализ ОУЭ *ИЛ-1β*, *ИДО-1*, *ИЛ-10*, *HLA-DRA*, *CD274* в КОЕф не выявил изменений экспрессии этих генов у больных НАА по сравнению со здоровыми донорами (Рисунок 18), что указывает на сохранение иммунорегуляторных свойств данных клеток, реализуемых за счет этих молекул.

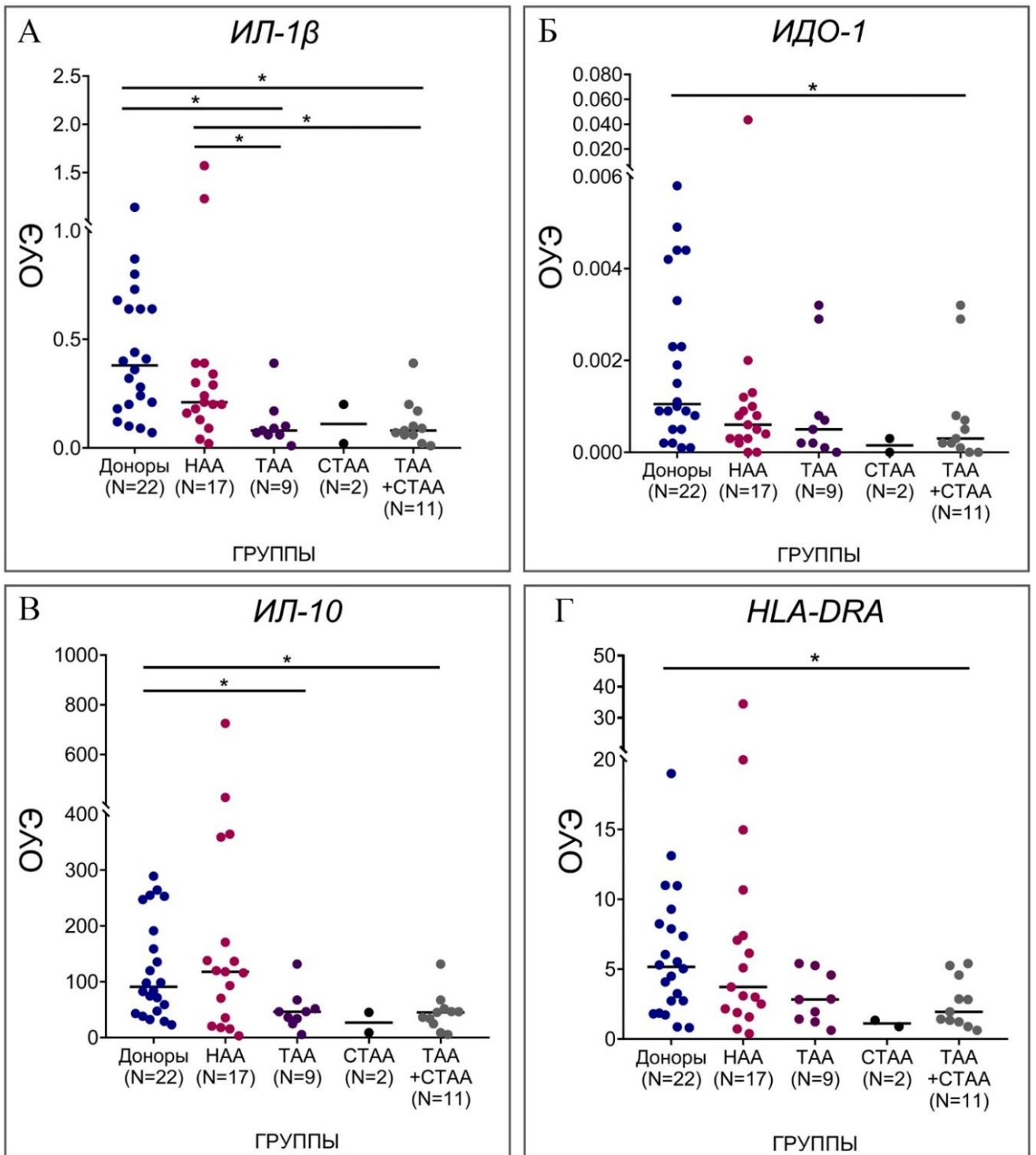


Рисунок 18 – Экспрессия генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, в КОЕф больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров: *ИЛ-1 β* (А), *ИДО-1* (Б), *ИЛ-10* (В), *HLA-DRA* (Г). Горизонтальная черта обозначает медиану. Каждый символ соответствует значению индивидуального больного или донора. В скобках указано количество проанализированных образцов в каждой группе. * – достоверные отличия ($p < 0,05$)

ОУЭ *ИЛ-1 β* , *ИДО-1*, *ИЛ-10*, *HLA-DRA*, в КОЕф больных ТАА+СТАА был снижен по сравнению с донорами. Для данной группы характерно также подавление транскрипции *CD274* по сравнению с донорами и больными НАА, однако различия недостоверны. *ИДО-1* и *ИЛ-10* ингибируют развитие иммунного ответа за счет супрессорного воздействия на пролиферацию, активацию Th1, Th17 лимфоцитов и НК-клеток, а также секрецию ими провоспалительных цитокинов [133]. Как уже было сказано выше, повышение экспрессии *HLA-DRA* в стромальных клетках ассоциировано с их активацией, а воздействие ИЛ-1 β способствует приобретению ими иммуносупрессорного фенотипа. Подавление экспрессии данных генов в КОЕф больных ТАА и СТАА свидетельствует о выраженном нарушении способности данных клеток к иммуномодуляции.

ОУЭ *ИЛ-1 β* в КОЕф больных ТАА и СТАА оказался достоверно ниже не только значений доноров, но и значений больных НАА, что отражает различия между двумя формами заболевания на уровне экспрессии генов, ассоциированных с регуляцией иммунного ответа, в стромальных предшественниках КМ.

В целом прослеживается тенденция к снижению ОУЭ *ИЛ-1 β* , *ИДО-1*, *ИЛ-10*, *HLA-DRA* в КОЕф больных НАА, ТАА и СТАА, которая отражает более выраженные нарушения иммуносупрессорных свойств мезенхимных клеток КМ при увеличении степени тяжести заболевания.

Известно, что в основе патогенеза АА лежит гибель СКК в результате атаки аутореактивных Т-лимфоцитов [249]. Хотя анализ периферической крови не выявил различий в количестве CD4⁺ лимфоцитов у больных АА по сравнению со здоровыми донорами, субпопуляционный состав данных клеток оказался изменен [8]. При этом обнаружено повышение Th1, Th2 и Th17 клеток, участвующих в развитии аутоиммунных реакций, и снижение Treg, ответственных за поддержание иммунологической толерантности, у больных АА. Увеличение Th2 и Th17 клеток и уменьшение Treg в крови больных ТАА и СТАА по сравнению с больными НАА указывает на более выраженное нарушение баланса субпопуляций CD4⁺ лимфоцитов при увеличении степени тяжести заболевания [106].

ММСК здоровых доноров способны регулировать дифференцировку CD4⁺, изменяя соотношение Th1/Th2 клеток, а также подавляя созревание Th17 лимфоцитов и индуцируя при этом экспансию Treg [92]. Однако способность ММСК больных ТАА к регуляции субпопуляционного состава лимфоцитов нарушена [136]. В настоящем исследовании выявлено снижение экспрессии большинства генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, в КОЕф больных ТАА+СТАА по сравнению с донорами, что свидетельствует о подавлении иммуносупрессорной функции этих клеток. С одной стороны, выявленные нарушения могут происходить вследствие активации иммунного ответа и повышения концентрации

провоспалительных цитокинов в КМ. С другой стороны, подавление способности стромальных предшественников к регуляции дифференцировки CD4⁺ лимфоцитов может служить одним из факторов, стимулирующим иммунный ответ и, как следствие, развитие более выраженной аплазии, наблюдаемой при ТАА и СТАА. Не исключено вовлечение обоих факторов в механизм патогенеза АА и их взаимное усиление: развитие аутоиммунной реакции может приводить к нарушению иммуносупрессорной функции мезенхимных клеток КМ, которое способствует последующей активации иммунного ответа. Тот факт, что единственным иммунологическим показателем, коррелирующим с длительностью заболевания, служит соотношение Th2/Treg [106], указывает на усиление аутоиммунной агрессии у больных АА с течением времени.

Стандартным методом лечения НАА, ТАА и СТАА является ИСТ, включающая АТГ и циклоспорин А. Терапевтическое воздействие АТГ направлено на элиминацию Т-лимфоцитов, а циклоспорина А – на подавление синтеза ИЛ-2 в процессе Т-клеточной активации [101; 182]. То есть ИСТ преимущественно воздействует на Т-клеточное звено иммунной системы. Показано, что больные ТАА и СТАА реже отвечают на ИСТ, чем больные НАА [11], что может быть связано с нарушением иммуносупрессорных свойств стромальных предшественников КМ при данных формах заболевания.

Таким образом, в КОЕф больных НАА не было выявлено изменения ОУЭ генов, ассоциированных с иммуномодуляцией. Анализ экспрессии генов в КОЕф больных ТАА+СТАА показал снижение ОУЭ *ИЛ-1 β* , *ИДО-1*, *ИЛ-10*, *HLA-DRA* по сравнению с значениями доноров, что указывает на выраженное нарушение иммуносупрессорных свойств данных стромальных предшественников. Хотя изменения транскрипции некоторых из этих генов затрагивают также ММСК больных АА, различия, выявленные в КОЕф, могут иметь большее значение, поскольку КОЕф характеризуются повышенной экспрессией большинства генов, ассоциированных с иммуномодуляцией.

3.12. Сравнение профиля экспрессии генов в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках и колониобразующих единицах фибробластов из костного мозга больных нетяжелой, тяжелой и сверхтяжелой апластической анемией

В настоящей работе проанализировано достаточное количество образцов ММСК и КОЕф в группе больных НАА и в группе, включающей больных ТАА и СТАА, для получения статистически значимых отличий по сравнению с донорами. Это позволило сравнить профили экспрессии генов в двух типах стромальных предшественников, выявить сходства и различия между группами больных, отличающихся по степени тяжести заболевания. (Таблица 7).

Таблица 7 – Сравнение ОУЭ генов, ассоциированных с пролиферацией, дифференцировкой, регуляцией кроветворения, иммуномодуляцией, в ММСК и КОЕф больных НАА, ТАА+СТАА, и здоровых доноров. Розовым выделено достоверное повышение ОУЭ, фиолетовым – достоверное снижение ОУЭ по сравнению с донорами. * – достоверные отличия от доноров ($p < 0,05$), ** – достоверные отличия от больных НАА ($p < 0,05$)

Функциональная группа	Ген	ММСК			КОЕф		
		Доноры (N=19)	НАА (N=17)	ТАА+СТАА (N=11)	Доноры (N=22)	НАА (N=17)	ТАА+СТАА (N=11)
Факторы роста	<i>FGF2</i>	1,7±0,3	2,7±0,9	2,5±1,6	0,14±0,03	0,6±0,3	0,3±0,1
	<i>TGFB1</i>	0,9±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	1,2±0,1	0,9±0,2 *	0,8±0,1
	<i>TGFB2</i>	1,6±0,3	2,8±0,7	4,8±2,0	0,16±0,02	0,36±0,14	0,39±0,13 *
	<i>VEGFA</i>	3,2±0,6	3,3±0,7	3,7±1,2	2,2±0,3	2,9±0,9	2,9±0,6
Рецепторы факторов роста	<i>FGFR1</i>	0,08±0,02	1,1±0,2 *	0,9±0,4 *	1,2±0,1	1,1±0,2	1,7±0,1 *, **
	<i>FGFR2</i>	0,24±0,06	1,7±0,6 *	1,4±0,6	1,2±0,3	1,5±0,3	1,3±0,2
	<i>PDGFRA</i>	0,4±0,1	1,5±0,3 *	0,7±0,1	0,6±0,1	1,0±0,2	1,4±0,2 *
	<i>PDGFRB</i>	0,05±0,02	1,3±0,4 *	0,6±0,2 *	1,0±0,2	1,8±0,4	2,5±0,5 *
Промежуточный филамент	<i>NES</i>	0,4±0,1	0,9±0,3	0,8±0,2 *	0,22±0,04	0,4±0,1 *	0,7±0,1 *
Иммуно-модуляция	<i>CFH</i>	0,6±0,1	1,3±0,3	0,8±0,1	0,21±0,03	0,4±0,1	0,33±0,04
	<i>IL1R1</i>	0,7±0,2	1,0±0,2	0,8±0,4	0,7±0,1	0,9±0,1	0,9±0,1
	<i>IL-1β</i>	0,2±0,1	0,5±0,2	1,1±0,5	0,4±0,1	0,4±0,1	0,11±0,03 *, **
	<i>ИДО-1</i>	0,0006±0,0006	0,002±0,001	0,007±0,007	0,0019±0,0004	0,003±0,003	0,0008±0,0003 *
	<i>CD274</i>	0,29±0,05	0,9±0,5	0,8±0,4	0,6±0,1	0,6±0,1	0,30±0,03
	<i>IL-10</i>	13,8±3,8	7,3±4,4 *	6,3±2,4	123±19	172±47	45±10 *
Регуляция кроветворения	<i>HLA-DRA</i>	1,2±0,3	1,7±0,9	0,5±0,3 *	6,1±1,0	7,3±2,1	2,6±0,5 *
	<i>ANGPT1</i>	2,8±0,4	2,0±0,7	0,8±0,2 *	0,7±0,1	1,4±0,4	1,3±0,2
	<i>CXCL12</i>	1,3±0,7	0,9±0,2	0,7±0,2	1,3±0,2	1,5±0,3	1,9±0,4
	<i>VCAM1</i>	0,7±0,2	0,4±0,1	0,4±0,1	0,18±0,05	0,4±0,2	0,4±0,1 *
	<i>SPP1</i>	9,3±3,5	9,3±3,8	16,2±8,4	553±168	204±41	129±51 *
	<i>KITLG</i>	0,4±0,1	0,6±0,2	0,3±0,1	1,2±0,2	2,1±0,5 *	1,8±0,3

Продолжение таблицы 7

Функциональная группа	Ген	ММСК			КОЕф		
		Доноры (N=16)	НАА (N=17)	ТАА+СТАА (N=14)	Доноры (N=22)	НАА (N=17)	ТАА+СТАА (N=11)
Адипогенная дифференцировка	<i>FABP4</i>	0,0019±0,0012	0,0015±0,0005	0,050±0,047	2,3±0,5	4,1±2,0	1,6±1,2
	<i>PPARG</i>	0,22±0,06	0,11±0,03	0,16±0,07	1,0±0,1	1,0±0,2	0,5±0,1
Остеогенная дифференцировка	<i>ALPL</i>	0,068±0,022	0,11±0,04	0,19±0,09	0,11±0,03	0,20±0,05	0,22±0,08
	<i>PTH1R</i>	0,29±0,25	0,027±0,009	0,056±0,029	0,07±0,02	0,05±0,01	0,06±0,01

При сравнении профиля экспрессии генов в ММСК больных НАА и ТАА+СТАА, общим изменением оказалось повышение ОУЭ генов рецепторов ростовых факторов *FGFR1* и *PDGFRB* по сравнению с донорами. При этом у больных НАА также повышен ОУЭ *FGFR2* и *PDGFRA* и снижен ОУЭ *ИЛ-10*, участвующий в иммуномодуляции. В ММСК ТАА+СТАА, выявлено повышение ОУЭ промежуточного филамента *NES*, снижение ОУЭ *HLA-DRA* и *ANGPT1*, ассоциированных с иммуномодуляцией и регуляцией кроветворения, соответственно. Хотя количество генов, для которых были получены достоверные отличия по сравнению с донорами, одинаково в обеих группах больных АА (5 из 25), общие изменения были выявлены только для 2 генов. Стоит также отметить, что в ММСК больных НАА достоверно повышен ОУЭ *PDGFRA* по сравнению с ММСК больных ТАА, что отражает различия между данными формами на молекулярном уровне. Таким образом, анализ ОУЭ генов в ММСК показал, что данные предшественники изменены как при НАА, так и при ТАА и СТАА, однако спектры дифференциально измененных генов при разных формах заболевания пересекаются лишь частично.

Анализ профиля экспрессии генов в КОЕф больных НАА и ТАА+СТАА, показал, что общим изменением для обеих форм является повышение ОУЭ промежуточного филамента *NES*. Для КОЕф больных НАА характерно снижение ОУЭ фактора роста *TGFB1* и повышение ОУЭ *KITLG*, участвующего в регуляции кроветворения. В КОЕф больных ТАА+СТАА изменения затрагивают гены факторов роста (*TGFB2*) и их рецепторов (*FGFR1*, *PDGFRA*, *PDGFRB*), а также гены, ассоциированные с иммуномодуляцией (*ИЛ-1β*, *ИДО-1*, *ИЛ-10*, *HLA-DRA*) и регуляцией кроветворения (*VCAM1*, *SPP1*). В КОЕф больных НАА достоверные отличия ОУЭ по сравнению с КОЕф доноров выявлены для 3 генов из 25, в КОЕф больных ТАА+СТАА – для 11 из 25, что отражает более выраженные изменения данного типа стромальных предшественников у больных ТАА и СТАА. Различия между формами АА на уровне КОЕф проявляются повышенным ОУЭ *FGFR1* и сниженным ОУЭ *ИЛ-1β* у больных ТАА и СТАА по сравнению с НАА.

Итак, при анализе функциональных групп дифференциально измененных генов, показано, что стромальные предшественники больных АА отличаются от донорских по ОУЭ генов факторов роста, их рецепторов, промежуточного филамента, генов, ассоциированных с иммуномодуляцией и регуляцией кроветворения, однако не отличаются по ОУЭ генов, ответственных за адипогенную и остеогенную дифференцировку.

Проведено сравнение изменений, происходящих в разных типах стромальных предшественников, при НАА и ТАА+СТАА. При НАА изменения ОУЭ затрагивают разные гены в ММСК и КОЕф: в ММСК наблюдается повышение ОУЭ всех генов рецепторов ростовых факторов (*FGFR1*, *FGFR1*, *PDGFRA*, *PDGFRB*) и снижение ОУЭ *ИЛ-10*, а в КОЕф – повышение ОУЭ *NES* и *KITLG*, а также снижение ОУЭ *TGFBI* по сравнению с соответствующими значениями доноров. При ТАА и СТАА выявлены изменения, характерные для обоих исследованных типов стромальных предшественников: увеличение ОУЭ *FGFR1*, *PDGFRB* и *NES* и подавление *HLA-DRA*. Кроме того, в ММСК больных ТАА+СТАА происходит подавление экспрессии *ANGPT1*, а в КОЕф – увеличение ОУЭ *TGF2*, *PDGFRA*, *VCAM1* и подавление экспрессии *ИЛ-1β*, *ИДО-1*, *ИЛ-10* и *SPP1*. Таким образом, экспрессия ни одного из исследуемых генов не была изменена одновременно в двух типах стромальных предшественников при НАА, в то же время при ТАА и СТАА происходят изменения, характерные для двух типов предшественников, что, возможно, обуславливает увеличение тяжести заболевания.

Интересно, что экспрессия двух генов была изменена как при НАА, так и при ТАА+СТАА, однако в разных типах стромальных предшественниках. Так ОУЭ *PDGFRA* оказался повышен, а *ИЛ-10* снижен у больных НАА в ММСК, а у больных ТАА+СТАА – в КОЕф. Возможно, нарушение транскрипции этих генов в стромальных предшественниках играет ключевую роль в развитии аплазии при АА. Ранее в настоящем исследовании было показано, что в КМ здорового человека ОУЭ *ИЛ-10* в КОЕф в 9 раз превышает ОУЭ этого гена в ММСК (Рисунок 10, Приложение (Таблица Г.1)), что указывает на большой вклад КОЕф в продукцию данного цитокина в КМ по сравнению с ММСК. Возможно, нарушение транскрипции *ИЛ-10* именно в КОЕф приводит к более выраженному дефициту данного фактора в КМ больных ТАА+СТАА, чем аналогичное изменение, происходящее в ММСК больных НАА.

Для выявления генов, в наибольшей степени отражающих различия между формами АА на уровне стромальных предшественников, был проведен многофакторный анализ (Таблица 8).

Таблица 8 – Математический вес и важность признака, полученные при анализе экспрессии генов в стромальных предшественниках из КМ больных НАА и ТАА+СТАА, с помощью логистической регрессии и при использовании алгоритма XGBoost, соответственно

ММСК				КОЕф			
Логистическая регрессия		XGBoost		Логистическая регрессия		XGBoost	
Ген	Вес признака	Ген	Важность признака	Ген	Вес признака	Ген	Важность признаков
<i>VEGFA</i>	0,90	<i>PDGFRA</i>	0,30	<i>FGFR1</i>	0,98	<i>FGFR1</i>	0,39
<i>SPP1</i>	0,41	<i>CXCL12</i>	0,27	<i>HLA-DRA</i>	0,50	<i>ИЛ-1β</i>	0,14
<i>ИЛ-10</i>	0,33	<i>PDGFRB</i>	0,11	<i>FABP4</i>	0,48	<i>CD274</i>	0,11
<i>VCAM1</i>	0,28	<i>CFH</i>	0,08	<i>NES</i>	0,39	<i>NES</i>	0,10
<i>TGFB1</i>	0,28	<i>ANGPT1</i>	0,08	<i>VEGFA</i>	0,33	<i>FGFR2</i>	0,08
<i>CXCL12</i>	0,27	<i>TGFB1</i>	0,07	<i>PDGFRA</i>	0,32	<i>TGFB2</i>	0,07
<i>MYC</i>	0,12	<i>VCAM1</i>	0,04	<i>TGFB2</i>	0,28	<i>FABP4</i>	0,07
<i>TGFB2</i>	0,11	<i>ИЛ-10</i>	0,03	<i>VCAM1</i>	0,27	<i>KITLG</i>	0,04
<i>ИЛ-1P1</i>	-0,04	<i>ИЛ-1P1</i>	0,02	<i>TGFB1</i>	0,24	<i>FGF2</i>	0
<i>ИДО-1</i>	-0,09	<i>FGFR2</i>	0,00	<i>FGF2</i>	0,21	<i>PDGFRA</i>	0
<i>ИЛ-1β</i>	-0,09	<i>FGF2</i>	0	<i>CXCL12</i>	0,15	<i>PDGFRB</i>	0
<i>ИЛ-4P</i>	-0,11	<i>FGFR1</i>	0	<i>PDGFRB</i>	0,13	<i>ИЛ-1P1</i>	0
<i>NES</i>	-0,28	<i>TGFB2</i>	0	<i>ИДО-1</i>	0,05	<i>ANGPT1</i>	0
<i>FGFR2</i>	-0,30	<i>ИЛ-1β</i>	0	<i>PPARG</i>	0,02	<i>CXCL12</i>	0
<i>CD274</i>	-0,31	<i>CD274</i>	0	<i>CFH</i>	0,02	<i>CFH</i>	0
<i>CFH</i>	-0,32	<i>MYC</i>	0	<i>PTHRI</i>	0,02	<i>ИЛ-10</i>	0
<i>KITLG</i>	-0,33	<i>ИЛ-4P</i>	0	<i>SPP1</i>	0,00	<i>HLA-DRA</i>	0
<i>ANGPT1</i>	-0,34	<i>HLA-DRA</i>	0	<i>CD274</i>	-0,01	<i>PPARG</i>	0
<i>PDGFRA</i>	-0,35	<i>NES</i>	0	<i>ALPL</i>	-0,05	<i>ALPL</i>	0
<i>FGFR1</i>	-0,39	<i>VEGFA</i>	0	<i>ИЛ-10</i>	-0,08	<i>PTHRI</i>	0
<i>HLA-DRA</i>	-0,53	<i>ИДО-1</i>	0	<i>ИЛ-1P1</i>	-0,14	<i>VEGFA</i>	0
<i>FGF2</i>	-0,56	<i>SPP1</i>	0	<i>ИЛ-1β</i>	-0,15	<i>VCAM1</i>	0
<i>PDGFRB</i>	-0,62	<i>KITLG</i>	0	<i>ANGPT1</i>	-0,17	<i>SPP1</i>	0
				<i>KITLG</i>	-0,20	<i>TGFB1</i>	0
				<i>FGFR2</i>	-1,08	<i>ИДО-1</i>	0

При использовании модели логистической регрессии оказалось, что наибольший вклад в различия между группами НАА и ТАА+СТАА вносит ОУЭ *VEGFA*, *PDGFRB*, *FGF2* и *HLA-DRA* в ММСК и *FGFR2*, *FGFR1*, в КОЕф. Анализ экспрессии генов в стромальных предшественниках с помощью алгоритма XGBoost показал, что различия между формами НАА и ТАА+СТАА определяются в наибольшей степени ОУЭ *PDGFRA*, *CXCL12*, *PDGFRB* в ММСК и *FGFR1*, *ИЛ-1 β* , *CD274* в КОЕф. Применение методов однофакторного статистического анализа в настоящей работе показало, что ММСК больных НАА отличаются от ММСК больных ТАА повышенным ОУЭ *PDGFRA*, а КОЕф больных ТАА+СТАА отличаются от КОЕф больных НАА повышенным ОУЭ *FGFR1* и сниженным ОУЭ *ИЛ-1 β* , что согласуется с результатами анализа экспрессии методом XGBoost.

Таким образом, профили экспрессии генов в ММСК и КОЕф отличаются у больных НАА и в группе, включающей больных ТАА и СТАА. Различия между формами заболевания на уровне ММСК определяются повышением ОУЭ *PDGFRA* при НАА, на уровне КОЕф – повышением *FGFR1* и снижением *ИЛ-1 β* при ТАА и СТАА, что свидетельствует о различиях в механизмах патогенеза данных форм АА. Полученные результаты позволяют сделать вывод о необходимости дифференциального анализа групп больных с нетяжелой и тяжелой формой АА при проведении исследований.

Заключение

За последние десятилетия была показана ведущая роль аутоиммунного механизма в развитии аплазии при АА, однако вклад кроветворного стромального микроокружения в патогенез данного заболевания до сих пор неизвестен. Работы, посвященные определению особенностей стромальных предшественников при АА, немногочисленны и нередко содержат противоречивые данные, что может быть связано с выполнением исследований на небольшом числе образцов, полученных от больных разными формами АА. Однако такой подход оправдан лишь в том случае, когда доказано отсутствие различий между формами заболевания. Известно, что частота ответа на ИСТ у больных НАА и ТАА различается [11], что указывает на различия в механизмах патогенеза данных форм заболевания и диктует необходимость проведения дифференциального анализа особенностей стромальных предшественников при разных формах АА.

В рамках настоящего исследования было получено достаточно большое количество культур двух типов стромальных предшественников (ММСК и КОЕф) из КМ больных НАА, ТАА и здоровых доноров, что позволило выявить значимые отличия функциональных свойств и экспрессии генов. Три культуры ММСК и две – КОЕф из КМ больных СТАА были рассмотрены как отдельно, так и в объединенной группе с больными ТАА, поскольку с точки зрения клинического течения заболевания различий между данными формами не выявлено [106].

Эффективность получения культур ММСК и КОЕф больных АА оказалась ниже, чем у доноров, при этом была выявлена тенденция к уменьшению процента полученных культур при увеличении степени тяжести заболевания. Результаты настоящей работы согласуются с данными других исследований, в которых также было показано снижение эффективности выделения культур ММСК из КМ больных АА по сравнению с донорами [64; 80].

Анализ концентрации КОЕф в КМ не выявил изменений при НАА, ТАА и в группе, включающей больных ТАА и СТАА, по сравнению со здоровыми донорами. Результаты исследования согласуются с полученными ранее данными [229], хотя в других работах было показано увеличение [25] и снижение [64] количества клоногенных стромальных предшественников в КМ при АА, что может быть связано с различиями в подходах к формированию выборки больных.

Выявлено изменение пролиферативных характеристик ММСК больных АА. Для образования конфлуэнтного монослоя ММСК после посадки мононуклеаров КМ больных НАА и ТАА требовалось больше времени, чем для образцов КМ доноров. Отсутствие изменений в суммарной клеточной продукции ММСК больных НАА и ТАА по сравнению с донорами свидетельствует о сохранении пролиферативного потенциала у данного типа стромальных

предшественников. Скорость пролиферации ММСК больных ТАА не отличалась от значений у доноров, а у больных НАА она была снижена в 1,6 раза, что может быть ассоциировано с замедлением регенерации клеток в КМ и восстановления размера кроветворной территории после ответа на ИСТ. Пролиферативные характеристики ММСК 3 больных СТАА указывают как на снижение скорости пролиферации, так и на нарушение пролиферативного потенциала этих клеток, однако полученные данные необходимо подтвердить на расширенной выборке больных СТАА. Представленные в литературе данные свидетельствуют об отсутствии изменений пролиферативных свойств ММСК больных АА [25; 119], о снижении скорости пролиферации [80; 183; 208] либо о нарушении пролиферативного потенциала этих клеток [64]. Разногласия по данному вопросу, возможно, обусловлены проведением исследований на когортах больных, различающихся по возрасту, степени тяжести и стадии заболевания.

Анализ дифференцировочного потенциала ММСК больных НАА, ТАА и группы, включающей ТАА и СТАА, показал, что данные клетки отвечают на индукторы дифференцировки, и не выявил различий по сравнению с донорами. То есть стромальные предшественники из КМ больных АА не отличаются от донорских по способности дифференцироваться в остеогенном направлении и образовывать клетки остеобластной ниши, регулирующей кроветворение. Кроме того, ММСК больных не обладают повышенной склонностью к адипогенной дифференцировке, несмотря на то, что КМ больных АА состоит преимущественно из жировой ткани. К таким же результатам пришли авторы и более ранних работ [48; 119]. При этом в других исследованиях было показано нарушение адипогенной и остеогенной дифференцировки [25; 208], возможно, в связи с включением в когорту больных, получавших ИСТ, влияние которой на дифференцировочный потенциал ММСК не изучено. Кроме того, в двух работах выявлено нарушение остеогенной дифференцировки и усиление способности к адипогенезу [80; 183], что может быть связано с проведением анализа на небольших выборках и значительным вкладом индивидуальных различий между больными в итоговый результат. Итак, сохранение пролиферативного и дифференцировочного потенциала ММСК из КМ больных АА позволяет предполагать, что даже в условиях глубокой аплазии эти клетки способны построить кроветворное микроокружение. Это предположение было подтверждено в культуре при анализе концентрации КООБ.

ММСК больных НАА, ТАА, а также группы больных ТАА и СТАА оказались способны к поддержанию ранних и поздних кроветворных предшественников здоровых доноров *in vitro*. При этом ММСК больных НАА обеспечивают жизнеспособность в 2,2 раза большего количества ранних гемопоэтических предшественников по сравнению с донорами, что, возможно, отражает компенсаторный характер изменений мезенхимных клеток при данной форме заболевания, препятствующий развитию более выраженной аплазии, наблюдаемой при ТАА и СТАА. Хотя

ранее способность ММСК больных АА к поддержанию кроветворных предшественников разной степени зрелости не была изучена, в большинстве работ было показано сохранение функциональных свойств клоногенных гемопоэтических клеток доноров при сокультивировании с ММСК из КМ больных АА *in vitro* [48; 229], а также способность ММСК больных АА к образованию полноценного кроветворного микроокружения *in vivo* [119]. Однако в одном исследовании выживаемость кроветворных предшественников здоровых доноров при сокультивировании с ММСК из КМ больных АА оказалась ниже, чем с ММСК из КМ доноров [64]. Поскольку в данное исследование были включены больные, принимавшие ИСТ, нельзя исключать влияние терапии на свойства стромальных предшественников.

В настоящей работе был выполнен анализ экспрессии генов, ассоциированных с пролиферацией, дифференцировкой, регуляцией кроветворения и иммуномодуляцией, в ММСК и КОЕф из КМ больных АА и здоровых доноров. Поскольку различия между данными типами стромальных предшественников на уровне экспрессии генов у здорового человека изучены недостаточно, было проведено сравнение ОУЭ генов в соответствующих культурах, полученных из КМ доноров. Анализ ОУЭ генов, ассоциированных с пролиферацией и дифференцировкой, подтвердил полученные ранее данные о том, что ММСК обладают свойствами более ранних стромальных предшественников по сравнению с КОЕф [116]. То есть ММСК – ближайшие потомки МСК, формирующих нишу СКК *in vivo* [166], а КОЕф находятся ниже в иерархии стромальных предшественников. При анализе экспрессии генов, ассоциированных с поддержанием функциональных свойств СКК, оказалось, что ММСК отличались от КОЕф только увеличенным ОУЭ *ANGPT1* и *VCAM1*, а выявленное в КОЕф повышение ОУЭ *SPP1*, *CXCL12*, *KITLG* свидетельствует о важной роли данного типа стромальных предшественников в регуляции кроветворения. Сравнение ОУЭ генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, в двух типах стромальных предшественников показало повышенный ОУЭ *ИДО-1*, *ИЛ-1 β* , *ИЛ-10*, *CD274* и *HLA-DRA* в КОЕф, что указывает на более выраженную способность этих клеток к иммуносупрессии по сравнению с ММСК. Ранее исследований, посвященных сравнению ММСК и КОЕф из КМ человека по ОУЭ генов, участвующих в регуляции кроветворения и иммунного ответа, не проводилось.

Экспрессия тех же групп генов была тщательно проанализирована в стромальных предшественниках больных АА. При анализе ОУЭ генов, ассоциированных с пролиферацией, были выявлены различия в стромальных предшественниках из КМ больных НАА и группы, включающей ТАА и СТАА, по сравнению с донорами. Повышение ОУЭ генов рецепторов ростовых факторов в ММСК показано для всех групп больных АА, однако при НАА оно охватывает большее число генов, что ассоциировано с более выраженными нарушениями пролиферативных свойств ММСК при данной форме заболевания. Увеличение ОУЭ генов

рецепторов ростовых факторов в КОЕф в группе, включающей больных ТАА и СТАА, свидетельствует о значимых изменениях пролиферативных характеристик КОЕф только при данных формах АА. В целом изменение ОУЭ рецепторов ростовых факторов отражает нарушение процесса передачи сигналов от факторов роста FGF и PDGF, которые играют ключевую роль в регуляции клеточных делений стромальных предшественников и, соответственно, в их способности к поддержанию размера кроветворной территории [201].

При изучении транскрипции маркерных генов остеогенной (*ALPL*, *PTHRI*) и адипогенной (*FABP4*, *PPARG*) дифференцировки в ММСК и КОЕф не было выявлено отличий между группами больных и доноров, что подтверждает отсутствие изменений дифференцировочного потенциала стромальных предшественников из КМ больных АА. Однако повышение ОУЭ *NES* в ММСК и КОЕф больных НАА и группы, включающей больных ТАА и СТАА, может отражать изменение соотношения наиболее ранних стромальных предшественников в КМ больных АА по сравнению с донорами.

Выявлены различия в ОУЭ генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения, в стромальных предшественниках из КМ больных НАА и группы, включающей больных ТАА и СТАА, по сравнению с донорами. Повышение ОУЭ *KITLG* в КОЕф больных НАА указывает на компенсаторный характер изменений мезенхимных клеток КМ при данной форме заболевания, направленный на удержание большего числа СКК в нише и препятствующий развитию более выраженной цитопении, наблюдаемой при ТАА и СТАА. Снижение ОУЭ *SPP1* в КОЕф больных ТАА и СТАА по сравнению с донорами свидетельствует об активации пролиферации СКК при данных формах заболевания и, с одной стороны, может способствовать активации гемопоэза, а с другой стороны, может приводить к истощению пула наиболее ранних кроветворных предшественников в КМ таких больных.

Снижение ОУЭ *ИЛ-1 β* , *ИДО-1*, *ИЛ-10* и *HLA-DRA* в КОЕф группы, включающей больных ТАА и СТАА, по сравнению с донорами, отражает нарушение иммуносупрессорной функции стромальных предшественников КМ при данных формах заболевания. С одной стороны, возможно, повреждение КОЕф является следствием активации иммунного ответа в КМ, с другой стороны, снижение способности мезенхимных клеток к иммуномодуляции может способствовать дальнейшему усилению аутоиммунной агрессии.

Выявлены различия в профиле экспрессии генов в ММСК и КОЕф больных НАА и группы, включающей ТАА и СТАА, по сравнению с донорами. Изменения в ММСК примерно в равной степени характерны для обеих групп АА, хотя и затрагивают различные гены. Изменения в КОЕф охватывают большее число генов и носят более выраженный характер при ТАА и СТАА, чем при НАА. Общим для обеих групп стало повышение ОУЭ рецепторов ростовых факторов *FGFR1* и *PDGFRB* в ММСК, а также повышение ОУЭ *NES* в КОЕф. Различия между формами заболевания

обусловлены повышением ОУЭ *PDGFRA* в ММСК больных НАА по сравнению с больными ТАА, а также повышением ОУЭ *FGFR1* и снижением ОУЭ *ИЛ-1β* в КОЕф группы, включающей ТАА и СТАА, по сравнению с больными НАА. Выявленные изменения указывают на принципиальные различия свойств стромальных предшественников из КМ больных АА разной степени тяжести.

Итак, выявленные в настоящем исследовании изменения функциональных свойств и ОУЭ генов в стромальных предшественниках из КМ больных АА могут указывать на различия в механизмах развития аплазии при разных формах АА. Хотя применение ИСТ при АА в настоящее время приводит к удовлетворительному результату в большинстве случаев, различия между формами АА свидетельствуют о том, что разработка дополнительных дифференциальных подходов может повысить эффективность существующих методов терапии у больных с НАА, ТАА и СТАА.

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 β* , *ИЛ-10*, *CD274* и *HLA-DRA* по сравнению с мультипотентными мезенхимными стромальными клетками, что указывает на важную роль колониеобразующих единиц фибробластов в регуляции кроветворения и иммуномодуляции.

4. В колониеобразующих 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 β* 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 колониеобразующих единицах фибробластов больных тяжелой и сверхтяжелой апластической анемией уровень экспрессии *FGFR1* выше в 1,5 раза, а *ИЛ-1 β* 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,
алло-ТГСК — трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток,
АТГ — антитимоцитарный иммуноглобулин,
ВУП — время удвоения популяции,
ДК — дендритные клетки,
дНТФ — дезоксирибонуклеозидтрифосфат,
ДЭПК — диэтилпирокарбонат,
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота,
ИДО-1 — индоламин 2,3-диоксигеназа 1,
ИЛ — интерлейкин,
ИЛ-1Р1 — рецептор первого типа ИЛ-1 β ,
ИЛ-4Р — рецептор ИЛ-4,
ИСТ — иммуносупрессивная терапия,
ИФН- γ — интерферон-гамма,
кДНК — комплементарная цепь ДНК,
КМ — костный мозг,
КОЕф — колониеобразующие единицы фибробластов,
КООБ — клетки, образующие области булыжника,
МДС — миелодиспластический синдром,
ММСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки,
МСК — мезенхимные стволовые клетки,
НАА — нетяжелая апластическая анемия,
ОМЛ — острый миелоидный лейкоз,
ОТ — обратная транскрипция,
ОУЭ — относительный уровень экспрессии,
ПНГ — пароксизмальная ночная гемоглобинурия,
ПЦР — полимеразная цепная реакция,
РНК — рибонуклеиновая кислота,
СКК — стволовые кроветворные клетки,
СТАА — сверхтяжелая апластическая анемия,
ТАА — тяжелая апластическая анемия,
ФНО- α — фактора некроза опухоли-альфа,
ФСБ — фосфатно-солевой буфер,

ЭДТА — этилендиаминтетраацетат натрия,

ЭК – эндотелиальные клетки,

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

брЛОН – loss of heterozygosity of the бp arms,

АСТВ – actin beta,

ALPL – alkaline phosphatase, biomineralization associated,

ANGPT1 – angiopoietin 1,

CAR – CXCL12-abundant reticular,

CD – cluster of differentiation, кластер дифференцировки,

CFH – complement factor H,

CXCL12 – C-X-C motif chemokine ligand 12, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1),

FABP4 – fatty acid binding protein 4, adipocyte protein 2 (AP2),

FGF – fibroblast growth factor,

FGFR – fibroblast growth factor receptor,

GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,

GFP – green fluorescent protein,

HLA-ABC – Human Leukocyte Antigens-A, B, C, молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса,

HLA-DR – Human Leukocyte Antigens-DR, молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса,

KITLG – KIT ligand, stem cell factor (SCF),

LepR – leptin receptor,

NES – nestin,

NK – natural killer,

NG2 – neuron glial 2,

PD-1 - programmed cell death 1 (1),

PD-L1 – programmed cell death ligand 1 (CD274),

PDGF – platelet-derived growth factor,

PDGFRA – platelet-derived growth factor receptor alpha,

PDGFRB – platelet-derived growth factor receptor beta,

PPARG – peroxisome proliferator activated receptor gamma,

PTH1R – parathyroid hormone 1 receptor,

SPP1 – secreted phosphoprotein 1, osteopontin (OPN),

TGF-β – transforming growth factor beta,

Th1 – T helper type 1,

Th2 – T helper type 2,

Th17 – T helper type 17,

Treg – regulatory T cells,

VCAM1 – vascular cell adhesion molecule 1,

VEGFA – vascular endothelial growth factor A.

Список литературы

1. Дризе, Н. И. Радиочувствительность стромальных предшественников и зрелых клеток кроветворной стромы в культуре / Н. И. Дризе, О. А. Гуревич, И. Л. Чертков // Радиобиология. – 1986. – Т. 26. – С. 345–350.
2. 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 [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2019. – Т. 64. – № 4. – С. 424-435. DOI: 10.35754/0234-5730-2019-64-4-424-435.
3. Изменения стромальных клеток-предшественниц костного мозга у больных гемобластозами в дебюте заболевания / Н. А. Петинати, И. Н. Шипунова, Е. А. Фастова [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2021. – № 2. – С. 130-135. DOI: 10.47056/1814-3490-2021-2-130-135.
4. Иммуносупрессивная терапия больных апластической анемией: успехи и неудачи (одноцентровое исследование 2007-2016 гг.) / Е. А. Михайлова, З. Т. Фидарова, А. В. Абрамова [и др.] // Терапевтический архив. – 2020. – Т. 92. – № 7. – С. 4-9. DOI: 10.26442/00403660.2020.07.000756.
5. Исследование параметров дифференцировки мезенхимных стромальных клеток у здоровых доноров и больных апластической анемией / Д. А. Свиная, Т. В. Петрова, И. Н. Шипунова [и др.] // Терапевтический архив. – 2009. – Т. 81. – № 7. – С. 66-70.
6. Клинические рекомендации по диагностике и лечению апластической анемии (редакция 2019 г.) / Е. А. Михайлова, З. Т. Фидарова, В. В. Троицкая [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65. – № 2. – С. 208-226. DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-2-208-226.
7. Нифонтова, И. Н. Динамика состава клеток-предшественников в культуре костного мозга мышей, дефицитных по фактору некроза опухоли / И. Н. Нифонтова, М. А. Эршлер, Н. И. Дризе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 135. – № 3. – С. 330-333. DOI: 10.1023/A:1024149401356.
8. Олигоклональность и субпопуляционный состав Т-клеток костного мозга у больных апластической анемией / А. В. Абрамова, И. В. Гальцева, Е. А. Михайлова [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65. – № 4. – С. 417-430. DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-4-417-430.
9. Основные свойства мезенхимных стромальных клеток из костного мозга доноров: поверхностные маркеры / Д. А. Свиная, И. Н. Шипунова, Ю. В. Ольшанская [и др.] // Терапевтический архив. – 2010. – Т. 82. – № 7. – С. 52-56.

10. Руководство По Гематологии: в 3 т. Т. 1 / ред. А. И. Воробьев. – 3-е изд. – Москва : Ньюдиамед, 2002. – 280 с.
11. Фидарова, З. Т. Наличие клона пароксизмальной ночной гемоглобинурии и другие факторы, влияющие на эффективность иммуносупрессивной терапии у больных идиопатической апластической анемией / З. Т. Фидарова, А. В. Абрамова, А. В. Лучкин // Гематология и трансфузиология. – 2019. – Т. 64. – № 3. – С. 342-352. DOI: 10.35754/0234-5730-2019-64-3-342-352.
12. Частота и прогностическое значение укорочения теломерных участков ДНК при апластической анемии / А. Д. Кулагин, В. И. Борисов, Н. В. Пронкина [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59. – № 1. – С. 20.
13. Чертков, И. Л. Стволовая кроветворная клетка и её микроокружение / И. Л. Чертков, О. А. Гуревич. – Москва : Медицина, 1984. – 238 с.
14. Эффективность комбинированной иммуносупрессивной терапии в лечении приобретенной апластической анемии у детей. / А. А. Масчан, Н. Ю. Богачева, М. М. Шнейдер [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 1998. – № 5. – С. 37-40.
15. [Acquired aplastic anemia: a stereological analysis of bone marrow fatty tissue and its clinical correlations]. / C. Rozman, E. Feliu, M. Rozman [et al.] // Medicina Clinica. – 1993. – Vol. 101. – № 12. – P. 441-445.
16. [Comparative study on bone marrow megakaryocytes in children with thrombocytopenic purpura, aplastic anemia and myelodysplastic syndrome]. / Т. Hu, X. dong Shi, Y. ling Feng [et al.] // Zhonghua er ke za zhi = Chinese Journal of Pediatrics. – 2005. – Vol. 43. – № 3. – P. 183-187.
17. [Effects of VEGF-Notch Signaling Pathway on Proliferation and Apoptosis of Bone Marrow MSC in Patients with Aplastic Anemia]. / S. Deng, J. J. Xiang, Y. Y. Shen [et al.] // Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi. – 2019. – Vol. 27. – № 6. – P. 1925-1932. DOI: 10.19746/J.CNKI.ISSN.1009-2137.2019.06.035.
18. A severe and consistent deficit in marrow and circulating primitive hematopoietic cells (long-term culture-initiating cells) in acquired aplastic anemia / J. P. Maciejewski, C. Selleri, T. Sato [et al.] // Blood. – 1996. – Vol. 88. – № 6. – P. 1983-1991. DOI: 10.1182/blood.v88.6.1983.bloodjournal8861983.
19. Acute myelogenous leukemia-induced sympathetic neuropathy promotes malignancy in an altered hematopoietic stem cell niche. / M. Hanoun, D. Zhang, T. Mizoguchi [et al.] // Cell stem cell. – 2014. – Vol. 15. – № 3. – P. 365-375. DOI: 10.1016/j.stem.2014.06.020.
20. Adhikary, S. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins / S. Adhikary, M. Eilers // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2005. – Vol. 6. – № 8. – P. 635-645. DOI: 10.1038/nrm1703.

21. Adipocytic Cells Augment the Support of Primitive Hematopoietic Cells In Vitro But Have No Effect in the Bone Marrow Niche Under Homeostatic Conditions / T. J. Spindler, A. W. Tseng, X. Zhou, G. B. Adams // *Stem Cells and Development*. – 2014. – Vol. 23. – № 4. – P. 434-441. DOI: 10.1089/SCD.2013.0227.
22. Adipogenic Differentiation of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma (MSCs) / I. Sekiya, B. L. Larson, J. T. Vuoristo [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2004. – Vol. 19. – № 2. – P. 256-264. DOI: 10.1359/JBMR.0301220.
23. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies / M. Xie, C. Lu, J. Wang [et al.] // *Nature Medicine*. – 2014. – Vol. 20. – № 12. – P. 1472-1478. DOI: 10.1038/nm.3733.
24. Aggarwal, S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S. Aggarwal, M. F. Pittenger // *Blood*. – 2005. – Vol. 105. – № 4. – P. 1815-22. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1559.
25. Alterations in hematopoietic microenvironment in patients with aplastic anemia. / I. N. Shipounova, T. V Petrova, D. A. Svinareva [et al.] // *Clinical and translational science*. – 2009. – Vol. 2. – № 1. – P. 67-74. DOI: 10.1111/j.1752-8062.2008.00074.x.
26. Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells / A. Foudi, K. Hochedlinger, D. Van Buren [et al.] // *Nature biotechnology*. – 2009. – Vol. 27. – № 1. – P. 84-90. DOI: 10.1038/NBT.1517.
27. Angiopoietin-1 guides directional angiogenesis through integrin $\alpha\beta 5$ signaling for recovery of ischemic retinopathy / J. Lee, K. E. Kim, D. K. Choi [et al.] // *Science translational medicine*. – 2013. – Vol. 5. – № 203. – P. 203ra127. DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3006666.
28. Angiopoietin-1 Suppresses Choroidal Neovascularization and Vascular Leakage / J. Lee, D. Y. Park, D. Y. Park [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2014. – Vol. 55. – № 4. – P. 2191-2199. DOI: 10.1167/IOVS.14-13897.
29. Annes, J. P. Making sense of latent TGF β activation / J. P. Annes, J. S. Munger, D. B. Rifkin // *Journal of Cell Science*. – 2003. – Vol. 116. – № 2. – P. 217-224. DOI: 10.1242/JCS.00229.
30. Aplastic Anemia: Analysis of Stromal Cell Function in Long-Term Marrow Cultures / L. A. Holmberg, K. Seidel, W. Leisenring, B. Torok-Storb // *Blood*. – 1994. – Vol. 84. – № 11. – P. 3685-3690. DOI: 10.1182/BLOOD.V84.11.3685.BLOODJOURNAL84113685.
31. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. / Y. Kunisaki, I. Bruns, C. Scheiermann [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 502. – № 7473. – P. 637-43. DOI: 10.1038/nature12612.
32. Asada, N. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche / N. Asada, S. Takeishi, P. S. Frenette // *International journal of hematology*. – 2017. – Vol. 106. – № 1. – P. 45-54. DOI: 10.1007/S12185-017-2262-9.

33. Assay validation for the assessment of adipogenesis of multipotential stromal cells—a direct comparison of four different methods / A. Aldridge, D. Kouroupis, S. Churchman [et al.] // *Cytherapy*. – 2013. – Vol. 15. – № 1. – P. 89-101. DOI: 10.1016/J.JCYT.2012.07.001.
34. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression / O. Abdel-Wahab, M. Adli, L. M. LaFave [et al.] // *Cancer cell*. – 2012. – Vol. 22. – № 2. – P. 180-193. DOI: 10.1016/J.CCR.2012.06.032.
35. Aubin, J. E. Bone Stem Cells / J. E. Aubin // *J. Cell. Biochem. Suppls.* – 1998. – Vol. 30. – P. 73-82. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4644(1998)72:30/31.
36. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. / G. L. Sica, I. H. Choi, G. Zhu [et al.] // *Immunity*. – 2003. – Vol. 18. – № 6. – P. 849-61. DOI: 10.1016/S1074-7613(03)00152-3.
37. Babushok, D. V. A brief, but comprehensive, guide to clonal evolution in aplastic anemia / D. V. Babushok // *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. – 2018. – Vol. 2018. – № 1. – P. 457-466. DOI: 10.1182/ASHEDUCATION-2018.1.457.
38. Barker, J. E. Early transplantation to a normal microenvironment prevents the development of Steel hematopoietic stem cell defects. / J. E. Barker // *Experimental Hematology*. – 1997. – Vol. 25. – № 6. – P. 542-547.
39. Barker, J. E. SI/SI(d) hematopoietic progenitors are deficient in situ / J. E. Barker // *Experimental Hematology*. – 1994. – Vol. 22. – № 2. – P. 174-177.
40. BCOR regulates myeloid cell proliferation and differentiation / Q. Cao, M. D. Gearhart, S. Gery [et al.] // *Leukemia*. – 2016. – Vol. 30. – № 5. – P. 1155-1165. DOI: 10.1038/leu.2016.2.
41. Blank, U. TGF- β signaling in the control of hematopoietic stem cells / U. Blank, S. Karlsson // *Blood*. – 2015. – Vol. 125. – № 23. – P. 3542-3550. DOI: 10.1182/BLOOD-2014-12-618090.
42. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment / O. Naveiras, V. Nardi, P. L. Wenzel [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 460. – № 7252. – P. 259-263. DOI: 10.1038/NATURE08099.
43. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce Both Polyclonal Expansion and Differentiation of B Cells Isolated from Healthy Donors and Systemic Lupus Erythematosus Patients / E. Traggiai, S. Volpi, F. Schena [et al.] // *Stem Cells*. – 2008. – Vol. 26. – № 2. – P. 562-569. DOI: 10.1634/STEMCELLS.2007-0528.
44. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche / A. Chow, D. Lucas, A. Hidalgo [et al.] // *The Journal of experimental medicine*. – 2011. – Vol. 208. – № 2. – P. 761-771. DOI: 10.1084/JEM.20101688.
45. Bone marrow expression of CD68/CD163 macrophages, IL-17 and FOXP3 cells in aplastic

anemia and their relation to prognosis / K. Vaht, J. Brenner, S. B. Ednersson [et al.] // *European Journal of Haematology*. – 2023. – Vol. 110. – № 3. – P. 313-321. DOI: 10.1111/EJH.13908.

46. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. / I. G. Winkler, N. A. Sims, A. R. Pettit [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 116. – № 23. – P. 4815-28. DOI: 10.1182/blood-2009-11-253534.

47. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. / A. Augello, R. Tasso, S. M. Negrini [et al.] // *European journal of immunology*. – 2005. – Vol. 35. – № 5. – P. 1482-90. DOI: 10.1002/eji.200425405.

48. Bone marrow mesenchymal stem cells from patients with aplastic anemia maintain functional and immune properties and do not contribute to the pathogenesis of the disease / C. Bueno, M. Roldan, E. Anguita [et al.] // *Haematologica*. – 2014. – Vol. 99. – № 7. – P. 1168-1175. DOI: 10.3324/haematol.2014.103580.

49. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells / S. Glennie, I. Soeiro, P. J. Dyson [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 105. – № 7. – P. 2821-2827. DOI: 10.1182/blood-2004-09-3696.

50. Bone marrow microenvironment in multiple myeloma progression / S. Manier, A. Sacco, X. Leleu [et al.] // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 2012. DOI: 10.1155/2012/157496.

51. Bone Marrow Plasma Cytokine Signature Profiles in Severe Aplastic Anemia / B. Liu, Y. Shao, Z. Liu [et al.] // *BioMed research international*. – 2020. – Vol. 2020. DOI: 10.1155/2020/8789275.

52. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production / K. Németh, A. Leelahavanichkul, P. S. T. Yuen [et al.] // *Nature Medicine*. – 2009. – Vol. 15. – № 1. – P. 42-49. DOI: 10.1038/nm.1905.

53. Brief Report: Factors Released by Megakaryocytes Thrombin Cleave Osteopontin to Negatively Regulate Hematopoietic Stem Cells / M. J. Storan, S. Y. Heazlewood, C. K. Heazlewood [et al.] // *Stem Cells*. – 2015. – Vol. 33. – № 7. – P. 2351-2357. DOI: 10.1002/STEM.2038.

54. Broudy, V. C. Stem Cell Factor and Hematopoiesis / V. C. Broudy // *Blood*. – 1997. – Vol. 90. – № 4. – P. 1345-1364. DOI: 10.1182/BLOOD.V90.4.1345.

55. Butler, J. M. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors / J. M. Butler, H. Kobayashi, S. Rafii // *Nature reviews. Cancer*. – 2010. – Vol. 10. – № 2. – P. 138-146. DOI: 10.1038/NRC2791.

56. Camitta, B. M. Aplastic anemia (second of two parts): pathogenesis, diagnosis, treatment, and prognosis / B. M. Camitta, R. Storb, E. D. Thomas // *The New England journal of medicine*. – 1982. – Vol. 306. – № 12. – P. 712-8. DOI: 10.1056/NEJM198203253061204.

57. Cancer-associated ASXL1 mutations may act as gain-of-function mutations of the ASXL1-

BAP1 complex / A. Balasubramani, A. Larjo, J. A. Bassein [et al.] // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. DOI: 10.1038/NCOMMS8307.

58. Cao, C. [Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells]. / C. Cao, Y. Dong, Y. Dong // *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*. – 2005. – Vol. 19. – № 8. – P. 642-7.

59. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. / A. I. Caplan // *Journal of orthopaedic research*. – 1991. – Vol. 9. – № 5. – P. 641-50. DOI: 10.1002/jor.1100090504.

60. CD106 is a novel mediator of bone marrow mesenchymal stem cells via NF- κ B in the bone marrow failure of acquired aplastic anemia / S. Lu, M. Ge, Y. Zheng [et al.] // *Stem Cell Research and Therapy*. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 1-14. DOI: 10.1186/S13287-017-0620-4/FIGURES/7.

61. CD39-mediated effect of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the human Th17 cell function / J. J. Lee, H. J. Jeong, M. K. Kim [et al.] // *Purinergic Signalling*. – 2014. – Vol. 10. – № 2. – P. 357-365. DOI: 10.1007/S11302-013-9385-0/FIGURES/8.

62. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells / K. English, J. M. Ryan, L. Tobin [et al.] // *Clinical and experimental immunology*. – 2009. – Vol. 156. – № 1. – P. 149-160. DOI: 10.1111/J.1365-2249.2009.03874.X.

63. Chan, J. K. C. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies / J. K. C. Chan, C. S. Ng, P. K. Hui // *Histopathology*. – 1988. – Vol. 12. – № 5. – P. 461-480. DOI: 10.1111/J.1365-2559.1988.TB01967.X.

64. Characterization of bone marrow mesenchymal stromal cells in aplastic anaemia / E. Hamzic, K. Whiting, E. Gordon Smith, R. Pettengell // *British journal of haematology*. – 2015. – Vol. 169. – № 6. – P. 804-813. DOI: 10.1111/BJH.13364.

65. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. / H. Castro-Malaspina, R. E. Gay, G. Resnick [et al.] // *Blood*. – 1980. – Vol. 56. – № 2. – P. 289-301.

66. Chen, M. H. An update on the regulation of adipogenesis / M. H. Chen, Q. Tong // *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. – 2013. – Vol. 10. – № 1-2. – P. e15-e19. DOI: 10.1016/J.DDMEC.2013.04.002.

67. Clinical and prognostic significance of small paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia / B. Fattizzo, R. Ireland, A. Dunlop [et al.] // *Leukemia*. – 2021. – Vol. 35. – № 11. – P. 3223-3231. DOI: 10.1038/S41375-021-01190-9.

68. Clinical significance and origin of leukocytes that lack HLA-A allele expression in patients with acquired aplastic anemia / H. Maruyama, T. Katagiri, K. Kashiwase [et al.] // *Experimental Hematology*. – 2016. – Vol. 44. – № 10. – P. 931-939.e3. DOI: 10.1016/J.EXPHEM.2016.05.013.

69. Clonal analysis and hierarchy of human bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells. / C. C. I. Lee, J. E. Christensen, M. C. Yoder, A. F. Tarantal // *Experimental hematology*. – 2010. – Vol. 38. – № 1. – P. 46-54. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.11.001.
70. Clonal composition of human multipotent mesenchymal stromal cells. / A. E. Bigildeev, O. A. Zhironkina, I. N. Shipounova [et al.] // *Experimental Hematology*. – 2012. – Vol. 40. – № 10. – P. 847-856. DOI: 10.1016/j.exphem.2012.06.006.
71. Colter, D. C. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. / D. C. Colter, I. Sekiya, D. J. Prockop // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. 98. – № 14. – P. 7841-5. DOI: 10.1073/pnas.141221698.
72. Cord-Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Downmodulate CD4(+) T-Cell Activation by Inducing IL-10-Producing Th1 Cells. / S. Selleri, M. M. Dieng, S. Nicoletti [et al.] // *Stem cells and development*. – 2013. – Vol. 22. – № 7. – P. 1063-75.
73. Cristancho, A. G. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation / A. G. Cristancho, M. A. Lazar // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2011. – Vol. 12. – № 11. – P. 722-734. DOI: 10.1038/nrm3198.
74. Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. / M. A. Scott, V. T. Nguyen, B. Levi, A. W. James // *Stem cells and development*. – 2011. – Vol. 20. – № 10. – P. 1793-804.
75. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance / A. Greenbaum, Y. M. S. Hsu, R. B. Day [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 495. – № 7440. – P. 227-230. DOI: 10.1038/nature11926.
76. Defective monocyte-to-macrophage maturation in patients with aplastic anemia / R. Andreesen, W. Brugger, C. Thomssen [et al.] // *Blood*. – 1989. – Vol. 74. – № 6. – P. 2150-2156. DOI: 10.1182/BLOOD.V74.6.2150.2150.
77. Deletion of the PDGFR-beta gene affects key fibroblast functions important for wound healing / Z. Gao, T. Sasaoka, T. Fujimori [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – № 10. – P. 9375-9389. DOI: 10.1074/JBC.M413081200.
78. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging / Y. Xie, T. Yin, W. Wiegraebe [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 457. – № 7225. – P. 97-101. DOI: 10.1038/NATURE07639.
79. Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches / N. Asada, Y. Kunisaki, H. Pierce [et al.] // *Nature cell biology*. – 2017. – Vol. 19. – № 3. – P. 214-223. . DOI: 10.1038/NCB3475.
80. Differential Gene Expression Profile Associated with the Abnormality of Bone Marrow

Mesenchymal Stem Cells in Aplastic Anemia / J. Li, S. Yang, S. Lu [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – № 11. – P. 47764. DOI: 10.1371/journal.pone.0047764.

81. Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line / E. H. Allan, P. W. M. Ho, A. Umezawa [et al.] // Journal of Cellular Biochemistry. – 2003. – Vol. 90. – № 1. – P. 158-169. DOI: 10.1002/JCB.10614.

82. Ding, L. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. / L. Ding, S. J. Morrison // Nature. – 2013. – Vol. 495. – № 7440. – P. 231-5. DOI: 10.1038/nature11885.

83. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis / T. Itkin, S. Gur-Cohen, J. A. Spencer [et al.] // Nature. – 2016. – Vol. 532. – № 7599. – P. 323-328. DOI: 10.1038/nature17624.

84. Distinctive and common features of moderate aplastic anaemia / B. J. Patel, S. V. Barot, T. Kuzmanovic [et al.] // British Journal of Haematology. – 2020. – Vol. 189. – № 5. – P. 967-975. DOI: 10.1111/BJH.16460.

85. Dual Regulation of Proliferation and Growth Arrest in Prostatic Stromal Cells by Transforming Growth Factor- β 1 / W. Zhou, I. Park, M. Pins [et al.] // Endocrinology. – 2003. – Vol. 144. – № 10. – P. 4280-4284. DOI: 10.1210/EN.2003-0554.

86. Effects of Mesenchymal Stem Cells on Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells / W. Zhang, W. Ge, C. Li [et al.] // Stem Cells and Development. – 2004. – Vol. 13. – № 3. – P. 263-271. DOI: 10.1089/154732804323099190.

87. Efficient transplantation via antibody-based clearance of hematopoietic stem cell niches / A. Czechowicz, D. Kraft, I. L. Weissman, D. Bhattacharya // Science. – 2007. – Vol. 318. – № 5854. – P. 1296-1299. DOI: 10.1126/science.1149726.

88. Eltrombopag and improved hematopoiesis in refractory aplastic anemia / M. J. Olnes, P. Scheinberg, K. R. Calvo [et al.] // The New England journal of medicine. – 2012. – Vol. 367. – № 1. – P. 11-19. DOI: 10.1056/NEJMOA1200931.

89. Eltrombopag restores trilineage hematopoiesis in refractory severe aplastic anemia that can be sustained on discontinuation of drug / R. Desmond, D. M. Townsley, B. Dumitriu [et al.] // Blood. – 2014. – Vol. 123. – № 12. – P. 1818-1825. DOI: 10.1182/blood-2013-10-534743.

90. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells / L. Ding, T. L. Saunders, G. Enikolopov, S. J. Morrison // Nature. – 2012. – Vol. 481. – № 7382. – P. 457-462. DOI: 10.1038/NATURE10783.

91. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. / J. M. Butler, D. J. Nolan, E. L. Vertes [et al.] // Cell stem cell. – 2010. – Vol. 6. – № 3. – P. 251-64. DOI: 10.1016/j.stem.2010.02.001.

92. English, K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. / K. English // *Immunology and cell biology*. – 2013. – Vol. 91. – № 1. – P. 19-26.
93. Epidemiological, clinical and genetic characterization of aplastic anemia patients in Pakistan / Z. Akram, P. Ahmed, S. Kajigaya [et al.] // *Annals of Hematology*. – 2019. – Vol. 98. – № 2. – P. 301-312. DOI: 10.1007/S00277-018-3542-Z/TABLES/3.
94. Epigenetic and in vivo comparison of diverse MSC sources reveals an endochondral signature for human hematopoietic niche formation / A. Reinisch, N. Etchart, D. Thomas [et al.] // *Blood*. – 2015. – Vol. 125. – № 2. – P. 249-260. DOI: 10.1182/BLOOD-2014-04-572255.
95. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma / S. T. Holgate, D. E. Davies, P. M. Lackie [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2000. – Vol. 105. – № 2. – P. 193-204. DOI: 10.1016/S0091-6749(00)90066-6.
96. Evaluation of Angiogenesis and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in the Bone Marrow of Patients with Aplastic Anemia / W. Füreder, M. T. Krauth, W. R. Sperr [et al.] // *The American Journal of Pathology*. – 2006. – Vol. 168. – № 1. – P. 123-130. DOI: 10.2353/AJPATH.2006.050034.
97. Evaluation of Bone Marrow Microvessel Density in Patients with Aplastic Anemia / V. Somasundaram, M. S. Tevatia, A. Purohit [et al.] // *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. – 2016. – Vol. 33. – № 2. – P. 169-174. DOI: 10.1007/S12288-016-0707-6.
98. Expression and function of c-Kit in fetal hemopoietic progenitor cells: transition from the early c-Kit-independent to the late c-Kit-dependent wave of hemopoiesis in the murine embryo. / M. Ogawa, S. Nishikawa, K. Yoshinaga [et al.] // *Development*. – 1993. – Vol. 117. – № 3. – P. 1089-98.
99. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. / J. K. Fraser, I. Wulur, Z. Alfonso, M. H. Hedrick // *Trends in biotechnology*. – 2006. – Vol. 24. – № 4. – P. 150-4. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.01.010.
100. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells / L. A. Solchaga, K. Penick, J. D. Porter [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2005. – Vol. 203. – № 2. – P. 398-409. DOI: 10.1002/JCP.20238.
101. Foxwell, B. M. J. The Mechanisms of Action of Cyclosporine / B. M. J. Foxwell, B. Ryffel // *Immunology and Allergy Clinics of North America*. – 1989. – Vol. 9. – № 1. – P. 79-93. DOI: 10.1016/S0889-8561(22)00589-6.
102. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia / T. Katagiri, A. Sato-Otsubo, K. Kashiwase [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 118. – № 25. – P. 6601-6609. DOI: 10.1182/BLOOD-2011-07-365189.
103. Friedenstein, A. J. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. / A. J. Friedenstein // *Haematology and blood transfusion*. – 1980. – Vol. 25.

– P. 19-29.

104.Friedenstein, A. J. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. / A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhyan, U. V Gerasimov // *Cell and tissue kinetics*. – 1987. – Vol. 20. – № 3. – P. 263-72. DOI: 10.1007/BF01622200.

105.Friedenstein, A. J. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. / A. J. Friedenstein, J. F. Gorskaja, N. N. Kulagina // *Experimental hematology*. – 1976. – Vol. 4. – № 5. – P. 267-74.

106.Functional characterization of CD4+ T cells in aplastic anemia. / S. Kordasti, J. Marsh, S. Al-Khan [et al.] // *Blood*. – 2012. – Vol. 119. – № 9. – P. 2033-43. DOI: 10.1182/blood-2011-08-368308.

107.Functions of natural killer cells / E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin [et al.] // *Nature Immunology*. – 2008. – Vol. 9. – № 5. – P. 503-510. DOI: 10.1038/ni1582.

108.Gene expression profiling in CD34 cells to identify differences between aplastic anemia patients and healthy volunteers / W. Zeng, G. Chen, S. Kajigaya [et al.] // *Blood*. – 2004. – Vol. 103. – № 1. – P. 325-332. DOI: 10.1182/BLOOD-2003-02-0490.

109.Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation / B. Kulterer, G. Friedl, A. Jandrositz [et al.] // *BMC Genomics*. – 2007. – Vol. 8. DOI: 10.1186/1471-2164-8-70.

110.Gregoire, F. M. Adipocyte Differentiation: From Fibroblast to Endocrine Cell / F. M. Gregoire // *Experimental Biology and Medicine*. – 2001. – Vol. 226. – № 11. – P. 997-1002.

111.Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. / S. Méndez-Ferrer, D. Lucas, M. Battista, P. S. Frenette // *Nature*. – 2008. – Vol. 452. – № 7186. – P. 442-7. DOI: 10.1038/nature06685.

112.Haploinsufficiency for DNA methyltransferase 3A predisposes hematopoietic cells to myeloid malignancies / C. B. Cole, D. A. Russler-Germain, S. Ketkar [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2017. – Vol. 127. – № 10. – P. 3657-3674. DOI: 10.1172/JCI93041.

113.Heldin, C. H. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor / C. H. Heldin, B. Westermark // *Physiological reviews*. – 1999. – Vol. 79. – № 4. – P. 1283-1316. DOI: 10.1152/PHYSREV.1999.79.4.1283.

114.Hematopoietic recovery following chemotherapy is improved by BADGE-induced inhibition of adipogenesis / R. J. Zhu, M. Q. Wu, Z. J. Li [et al.] // *International Journal of Hematology*. – 2013. – Vol. 97. – № 1. – P. 58-72. DOI: 10.1007/s12185-012-1233-4.

115.Hematopoietic stem cell loss and hematopoietic failure in severe aplastic anemia is driven by macrophages and aberrant podoplanin expression. / A. McCabe, J. N. P. Smith, A. Costello [et al.] // *Haematologica*. – 2018. – Vol. 103. – № 9. – P. 1451-1461. DOI: 10.3324/haematol.2018.189449.

116.Hierarchy of mesenchymal stem cells: Comparison of multipotent mesenchymal stromal cells

with fibroblast colony forming units / I. N. Shipounova, N. A. Petinati, A. E. Bigildeev [et al.] // Journal of Biomedical Science and Engineering. – 2013. – Vol. 06. – № 08. – P. 66-73. DOI: 10.4236/jbise.2013.68A1007.

117.Horse versus rabbit antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia / P. Scheinberg, O. Nunez, B. Weinstein [et al.] // The New England journal of medicine. – 2011. – Vol. 365. – № 5. – P. 430-438. DOI: 10.1056/NEJMOA1103975.

118.Horvitz, H. R. Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. / H. R. Horvitz, I. Herskowitz // Cell. – 1992. – Vol. 68. – № 2. – P. 237-55.

119.Human aplastic anaemia-derived mesenchymal stromal cells form functional haematopoietic stem cell niche in vivo / I. M. Michelozzi, A. Pievani, F. Pagni [et al.] // British journal of haematology. – 2017. – Vol. 179. – № 4. – P. 669-673. DOI: 10.1111/BJH.14234.

120.Human Bone Marrow- and Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stromal Cells are Immunosuppressive In vitro and in a Humanized Allograft Rejection Model / M. R. Rhijn, M. Khairoun, S. S. Korevaar [et al.] // Journal of stem cell research & therapy. – 2013. – Vol. Suppl 6. – № 1. DOI: 10.4172/2157-7633.S6-001.

121.Human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells differentially inhibit cytokine production by peripheral blood monocytes subpopulations and myeloid dendritic cells / P. Laranjeira, J. Gomes, S. Pedreiro [et al.] // Stem Cells International. – 2015. – Vol. 2015. DOI: 10.1155/2015/819084.

122.Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors / S. Rafii, F. Shapiro, R. Pettengell [et al.] // Blood. – 1995. – Vol. 86. – № 9. – P. 3353-3363. DOI: 10.1182/blood.v86.9.3353.bloodjournal8693353.

123.Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. / R. Meisel, A. Zibert, M. Laryea [et al.] // Blood. – 2004. – Vol. 103. – № 12. – P. 4619-21. DOI: 10.1182/blood-2003-11-3909.

124.Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. / M. Di Nicola, C. Carlo-Stella, M. Magni [et al.] // Blood. – 2002. – Vol. 99. – № 10. – P. 3838-43.

125.Human Leukocyte Antigen-G5 Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells Is Required to Suppress T Lymphocyte and Natural Killer Function and to Induce CD4 + CD25 high FOXP3 + Regulatory T Cells / Z. Selmani, A. Naji, I. Zidi [et al.] // Stem Cells. – 2008. – Vol. 26. – № 1. – P. 212-222. DOI:10.1634/stemcells.2007-0554.

126.Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells / X. X. Jiang, Y. Zhang, B. Liu [et al.] // Blood. – 2005. – Vol. 105. – № 10. – P. 4120-4126. DOI: 10.1182/BLOOD-2004-02-0586.

127. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. / A. Corcione, F. Benvenuto, E. Ferretti [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol. 107. – № 1. – P. 367-72. DOI: 10.1182/blood-2005-07-2657.

128. Human mesenchymal stem cells shift CD8⁺ T cells towards a suppressive phenotype by inducing tolerogenic monocytes / I. Hof-Nahor, L. Leshansky, S. Shivtiel [et al.] // *Journal of Cell Science*. – 2012. – Vol. 125. – № 19. – P. 4640-4650. DOI: 10.1242/JCS.108860/263021/AM/HUMAN-MESENCHYMAL-STEM-CELLS-SHIFT-CD8-T-CELLS.

129. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone / R. A. Dodds, J. R. Connor, I. E. James [et al.] // *Journal of bone and mineral research*. – 1995. – Vol. 10. – № 11. – P. 1666-1680. DOI: 10.1002/JBMR.5650101109.

130. Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia / Y. Zaimoku, H. Takamatsu, K. Hosomichi [et al.] // *Blood*. – 2017. – Vol. 129. – № 21. – P. 2908-2916. DOI: 10.1182/BLOOD-2016-11-752378.

131. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size / J. Zhang, C. Niu, L. Ye [et al.] // *Nature*. – 2003. – Vol. 425. – № 6960. – P. 836-841. DOI: 10.1038/NATURE02041.

132. Immunohistochemical demonstration of a 44-KD phosphoprotein in developing rat bones / M. P. Mark, C. W. Prince, T. Oosawa [et al.] // *The journal of histochemistry and cytochemistry*. – 1987. – Vol. 35. – № 7. – P. 707-715. DOI: 10.1177/35.7.3295029.

133. Immunomodulation by Mesenchymal Stromal Cells and Their Clinical Applications / J. Cagliani, D. Grande, E. P. Molmenti [et al.] // *Journal of stem cell and regenerative biology*. – 2017. – Vol. 3. – № 2. – P. 1-14. DOI: 10.15436/2471-0598.17.022.

134. Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. / S. Bodmer, K. Strommer, K. Frei [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 1989. – Vol. 143. – № 10. – P. 3222-3229. DOI: 10.4049/JIMMUNOL.143.10.3222.

135. In-vivo dominant immune responses in aplastic anaemia: molecular tracking of putatively pathogenetic T-cell clones by TCR β -CDR3 sequencing / A. M. Risitano, J. P. Maciejewski, S. Green [et al.] // *The Lancet*. – 2004. – Vol. 364. – № 9431. – P. 355-364. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16724-X.

136. In patients with chronic aplastic anemia, bone marrow-derived MSCs regulate the Treg/Th17 balance by influencing the Notch/RBP-J/FOXP3/ROR γ t pathway / H. Li, L. Wang, Y. Pang [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. DOI: 10.1038/srep42488.

137. In Vitro Human Haematopoietic Stem Cell Expansion and Differentiation / Y. K. Bozhilov, I. Hsu, E. J. Brown, A. C. Wilkinson // *Cells*. – 2023. – Vol. 12. – № 6. – P. 896. DOI: 10.3390/CELLS12060896.

138. In Vitro Proliferation and Differentiation of Megakaryocytic Progenitors in Patients with

Aplastic Anemia, Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, and the Myelodysplastic Syndromes / C. V. Cox, S. B. Killick, S. Patel [et al.] // *Stem Cells*. – 2000. – Vol. 18. – № 6. – P. 428-434. DOI: 10.1634/stemcells.18-6-428.

139. Inaba, M. Asymmetric Stem Cell Division: Precision for Robustness / M. Inaba, Y. M. Yamashita // *Cell Stem Cell*. – 2012. – Vol. 11. – № 4. – P. 461-469. DOI: 10.1016/j.stem.2012.09.003.

140. Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34+ cells of patients with aplastic anaemia / J. P. Maciejewski, C. Selleri, T. Sato [et al.] // *British journal of haematology*. – 1995. – Vol. 91. – № 1. – P. 245-252. DOI: 10.1111/J.1365-2141.1995.TB05277.X.

141. Indomethacin Promotes Adipogenesis of Mesenchymal Stem Cells Through a Cyclooxygenase Independent Mechanism / M. Styner, B. Sen, Z. Xie [et al.] // *Journal of cellular biochemistry*. – 2010. – Vol. 111. – № 4. – P. 1042-1050. DOI: 10.1002/JCB.22793.

142. Inflammatory Cytokine-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Mesenchymal Stem Cells Are Critical for Immunosuppression / G. Ren, X. Zhao, L. Zhang [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 184. – № 5. – P. 2321-2328. DOI: 10.4049/jimmunol.0902023.

143. Integrated Single-Cell Analysis Maps the Continuous Regulatory Landscape of Human Hematopoietic Differentiation / J. D. Buenrostro, M. R. Corces, C. A. Lareau [et al.] // *Cell*. – 2018. – Vol. 173. – № 6. – P. 1535-1548.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.074.

144. Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells / P. A. Sotiropoulou, S. A. Perez, A. D. Gritzapis [et al.] // *Stem Cells*. – 2006. – Vol. 24. – № 1. – P. 74-85. DOI: 10.1634/STEMCELLS.2004-0359.

145. Interferon-gamma modification of mesenchymal stem cells: implications of autologous and allogeneic mesenchymal stem cell therapy in allotransplantation. / K. N. Sivanathan, S. Gronthos, D. Rojas-Canales [et al.] // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2014. – Vol. 10. – № 3. – P. 351-75. DOI: 10.1007/s12015-014-9495-2.

146. Interferon- γ mediates the immunosuppression of bone marrow mesenchymal stem cells on T-lymphocytes in vitro / C. Liang, E. Jiang, J. Yao [et al.] // *Hematology*. – 2018. – Vol. 23. – № 1. – P. 44-49. DOI: 10.1080/10245332.2017.1333245.

147. Interleukin-1 beta enhances human multipotent mesenchymal stromal cell proliferative potential and their ability to maintain hematopoietic precursor cells / A. E. Bigildeev, E. A. Zezina, I. N. Shipounova, N. J. Drize // *Cytokine*. – 2015. – Vol. 71. – № 2. – P. 246-254. DOI: 10.1016/j.cyto.2014.10.018.

148. Interleukin-1 beta is an irradiation-induced stromal growth factor / A. E. Bigildeev, O. A. Zhironkina, O. N. Lubkova, N. J. Drize // *Cytokine*. – 2013. – Vol. 64. – № 1. – P. 131-137. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.07.003.

149. Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro / E. Redondo-Castro, C. Cunningham, J. Miller [et al.] // *Stem Cell Research and Therapy*. – 2017. – Vol. 8. DOI: 10.1186/s13287-017-0531-4.

150. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. / O. K. Lee, T. K. Kuo, W.-M. Chen [et al.] // *Blood*. – 2004. – Vol. 103. – № 5. – P. 1669-75. DOI: 10.1182/blood-2003-05-1670.

151. Lange, T. De. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres / T. De Lange // *Genes & Development*. – 2005. – Vol. 19. – № 18. – P. 2100-2110. DOI: 10.1101/GAD.1346005.

152. Langenbach, F. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. / F. Langenbach, J. R. Handschel // *Stem cell research & therapy*. – 2013. – Vol. 4. – № 5.

153. Li, W.-G. The expression of N-cadherin, fibronectin during chondrogenic differentiation of MSC induced by TGF-beta(1). / W.-G. Li, X.-X. Xu // *Chinese Journal of Traumatology = Zhonghua Chuang Shang za zhi*. – 2005. – Vol. 8. – № 6. – P. 349-351.

154. Loss of Cxcl12/Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression / Y. S. Tzeng, H. Li, Y. L. Kang [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 117. – № 2. – P. 429-439. DOI: 10.1182/BLOOD-2010-01-266833.

155. Low Expression of Basic Fibroblastic Growth Factor in Mesenchymal Stem Cells and Bone Marrow of Children with Aplastic Anemia / S. Y. Jiang, X. T. Xie, H. Jiang [et al.] // *Pediatric Hematology and Oncology*. – 2014. – Vol. 31. – № 1. – P. 11-19. DOI: 10.3109/08880018.2013.792402.

156. Luzzatto, L. Advances in understanding the pathogenesis of acquired aplastic anaemia / L. Luzzatto, A. M. Risitano // *British Journal of Haematology*. – 2018. – Vol. 182. – № 6. – P. 758-776. DOI: 10.1111/bjh.15443.

157. Macrophage TNF- α licenses donor T cells in murine bone marrow failure and can be implicated in human aplastic anemia. / W. Sun, Z. Wu, Z. Lin [et al.] // *Blood*. – 2018. – Vol. 132. – № 26. – P. 2730-2743. DOI: 10.1182/blood-2018-05-844928.

158. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. / T. Sugiyama, H. Kohara, M. Noda, T. Nagasawa // *Immunity*. – 2006. – Vol. 25. – № 6. – P. 977-88. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.10.016.

159. Mattar, P. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. / P. Mattar, K. Bieback // *Frontiers in immunology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 560. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00560.

160. Medyounf, H. The microenvironment in human myeloid malignancies: Emerging concepts and

therapeutic implications / H. Medyouf // *Blood*. – 2017. – Vol. 129. – № 12. – P. 1617-1626. DOI: 10.1182/blood-2016-11-696070.

161. Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of thrombopoietin / A. Nakamura-Ishizu, K. Takubo, M. Fujioka, T. Suda // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2014. – Vol. 454. – № 2. – P. 353-357. DOI: 10.1016/J.BBRC.2014.10.095.

162. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells / M. Zhao, J. M. Perry, H. Marshall [et al.] // *Nature Medicine*. – 2014. – Vol. 20. – № 11. – P. 1321-1326. DOI: 10.1038/nm.3706.

163. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion / I. Bruns, D. Lucas, S. Pinho [et al.] // *Nature Medicine*. – 2014. – Vol. 20. – № 11. – P. 1315-1320. DOI: 10.1038/nm.3707.

164. Mendelson, A. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. / A. Mendelson, P. S. Frenette // *Nature medicine*. – 2014. – Vol. 20. – № 8. – P. 833-46. DOI: 10.1038/nm.3647.

165. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. / K. Akiyama, C. Chen, D. Wang [et al.] // *Cell stem cell*. – 2012. – Vol. 10. – № 5. – P. 544-55. DOI: 10.1016/j.stem.2012.03.007.

166. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. / S. Méndez-Ferrer, T. V Michurina, F. Ferraro [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 466. – № 7308. – P. 829-34. DOI: 10.1038/nature09262.

167. Mesenchymal Stem Cell Benefits Observed in Bone Marrow Failure and Acquired Aplastic Anemia / V. F. Gonzaga, C. V. Wenceslau, G. S. Lisboa [et al.] // *Stem Cells International*. – 2017. – Vol. 2017. DOI: 10.1155/2017/8076529.

168. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. / L. Sun, K. Akiyama, H. Zhang [et al.] // *Stem cells*. – 2009. – Vol. 27. – № 6. – P. 1421-32. DOI: 10.1002/stem.68.

169. Mesenchymal stem cells: precursor hierarchy / I. N. Shipounova (Nifontova), D. A. Svinareva, J. L. Chertkov, N. J. Drize // *Cellular Therapy and Transplantation*. – 2008. – Vol. 1. – № 2. – P. 44-48.

170. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells / A. Ribeiro, P. Laranjeira, S. Mendes [et al.] // *Stem Cell Research and Therapy*. – 2013. – Vol. 4. – № 5. DOI: 10.1186/scrt336.

171. Mesenchymal Stem Cells Induce Functionally Active T-Regulatory Lymphocytes in a Paracrine Fashion and Ameliorate Experimental Autoimmune Uveitis / R. Tasso, C. Ilengo, R. Quarto [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2012. – Vol. 53. – № 2. – P. 786-793. DOI: 10.1167/IOVS.11-8211.

172. Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H. / Z. Tu, Q. Li, H. Bu, F. Lin // *Stem cells and development*. – 2010. – Vol. 19. – № 11. – P. 1803-9. DOI: 10.1089/scd.2009.0418.

173. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2 / G. M. Spaggiari, A. Capobianco, H. Abdelrazik [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 111. – № 3. – P. 1327-1333. DOI: 10.1182/blood-2007-02-074997.

174. Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion / X. Qu, X. Liu, K. Cheng [et al.] // *Experimental Hematology*. – 2012. – Vol. 40. – № 9. – P. 761-770. DOI: 10.1016/J.EXPHEM.2012.05.006.

175. Mesenchymal stem cells suppress T cells by inducing apoptosis and through PD-1/B7-H1 interactions / Z. Yan, Y. Zhuansun, G. Liu [et al.] // *Immunology Letters*. – 2014. – Vol. 162. – № 1. – P. 248-255. DOI: 10.1016/j.imlet.2014.09.013.

176. Mesenchymal stromal cells and chronic inflammatory bowel disease / M. Algeri, A. Conforti, A. Pitisci [et al.] // *Immunology Letters*. – 2015. – Vol. 168. – № 2. – P. 191-200. DOI: 10.1016/J.IMLET.2015.06.018.

177. Mesenchymal stromal cells impair the differentiation of CD14⁺⁺ CD16⁻ CD64⁺ classical monocytes into CD14⁺⁺ CD16⁺ CD64⁺⁺ activate monocytes / B. Du Rocher, A. L. Mencialha, B. E. Gomes, E. Abdelhay // *Cytherapy*. – 2012. – Vol. 14. – № 1. – P. 12-25. DOI: 10.3109/14653249.2011.594792.

178. Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation / R. Tatara, K. Ozaki, Y. Kikuchi [et al.] // *Cytherapy*. – 2011. – Vol. 13. – № 6. – P. 686-694. DOI: 10.3109/14653249.2010.542456.

179. MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-gamma challenge / W. K. Chan, A. Sik-Yin Lau, J. Chun-Bong Li [et al.] // *Experimental Hematology*. – 2008. – Vol. 36. – № 11. – P. 1551-1561. DOI: 10.1016/j.exphem.2008.06.008.

180. Miano, M. The diagnosis and treatment of aplastic anemia: a review. / M. Miano, C. Dufour // *International journal of hematology*. – 2015. – Vol. 101. – № 6. – P. 527-35. DOI: 10.1007/s12185-015-1787-z.

181. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller [et al.] // *Cytherapy*. – 2006. – Vol. 8. – № 4. – P. 315-317. DOI: 10.1080/14653240600855905.

182. Mohty, M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond / M. Mohty // *Leukemia*. – 2007. – Vol. 21. – № 7. – P. 1387-1394. DOI: 10.1038/sj.leu.2404683.

183. Multifaceted characterization of the signatures and efficacy of mesenchymal stem/stromal

cells in acquired aplastic anemia / J. Huo, L. Zhang, X. Ren [et al.] // *Stem Cell Research and Therapy*. – 2020. – Vol. 11. – № 1. DOI: 10.1186/s13287-020-1577-2.

184. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. / M. F. Pittenger, a M. Mackay, S. C. Beck [et al.] // *Science*. – 1999. – Vol. 284. – № 5411. – P. 143-7.

185. Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis / H. M. Kwon, S. M. Hur, K. Y. Park [et al.] // *Vascular Pharmacology*. – 2014. – Vol. 63. – № 1. – P. 19-28. DOI: 10.1016/J.VPH.2014.06.004.

186. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages / S. M. Melief, E. Schrama, M. H. Brugman [et al.] // *Stem Cells*. – 2013. – Vol. 31. – № 9. – P. 1980-1991. DOI: 10.1002/stem.1432.

187. Murine VCAM-1. Molecular cloning, mapping, and analysis of a truncated form. / A. G. Kumar, X. Y. Dai, C. A. Kozak [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 1994. – Vol. 153. – № 9. – P. 4088-4098. DOI: 10.4049/JIMMUNOL.153.9.4088.

188. Murphy, M. B. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine / M. B. Murphy, K. Moncivais, A. I. Caplan // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2013. – Vol. 45. – № 11. – P. e54. DOI: 10.1038/emm.2013.94.

189. Myeloid dendritic cells in severe aplastic anemia patients exhibit stronger phagocytosis / Y. Sun, C. Wu, C. Liu [et al.] // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 2021. – Vol. 35. – № 12. DOI: 10.1002/JCLA.24063.

190. Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. / K. Schepers, E. M. Pietras, D. Reynaud [et al.] // *Cell stem cell*. – 2013. – Vol. 13. – № 3. – P. 285-99.

191. Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms / L. Arranz, A. Sánchez-Aguilera, D. Martín-Pérez [et al.] // *Nature*. – 2014. – Vol. 512. – № 7512. – P. 78-81. DOI: 10.1038/nature13383.

192. Nilsson, S. K. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches / S. K. Nilsson, H. M. Johnston, J. A. Coverdale // *Blood*. – 2001. – Vol. 97. – № 8. – P. 2293-2299. DOI: 10.1182/BLOOD.V97.8.2293.

193. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. / S. Yamazaki, H. Ema, G. Karlsson [et al.] // *Cell*. – 2011. – Vol. 147. – № 5. – P. 1146-58. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.053.

194. Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 cell polarization according to the state of CD4+ T cell activation / F. Carrión, E. Nova, P. Luz [et al.] // *Immunology Letters*. – 2011. – Vol. 135. – № 1-2. – P. 10-16. DOI: 10.1016/J.IMLET.2010.09.006.

195. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche / L. M. Calvi, G. B. Adams, K.

W. Weibrecht [et al.] // *Nature*. – 2003. – Vol. 425. – № 6960. – P. 841-846. DOI: 10.1038/NATURE02040.

196. Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells / J. Zhu, R. Garrett, Y. Jung [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 109. – № 9. – P. 3706-3712. DOI: 10.1182/BLOOD-2006-08-041384.

197. Osteodifferentiated mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue express HLA-G and display immunomodulatory properties in HLA-mismatched settings: Implications in bone repair therapy / F. Montespan, F. Deschaseaux, L. Sensébé [et al.] // *Journal of Immunology Research*. – 2014. – Vol. 2014. DOI: 10.1155/2014/230346.

198. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells / S. K. Nilsson, H. M. Johnston, G. A. Whitty [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 106. – № 4. – P. 1232-1239. DOI: 10.1182/blood-2004-11-4422.

199. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. / S. Stier, Y. Ko, R. Forkert [et al.] // *The Journal of experimental medicine*. – 2005. – Vol. 201. – № 11. – P. 1781-91. DOI: 10.1084/jem.20041992.

200. Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing / L. Chen, E. E. Tredget, P. Y. G. Wu [et al.] // *PLOS ONE*. – 2008. – Vol. 3. – № 4. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0001886.

201. 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 [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 112. – № 2. – P. 295-307. DOI: 10.1182/BLOOD-2007-07-103697.

202. PDGF receptor beta is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. / A. Tokunaga, T. Oya, Y. Ishii [et al.] // *Journal of bone and mineral research*. – 2008. – Vol. 23. – № 9. – P. 1519-28.

203. PDGFR α and CD51 mark human Nestin⁺ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion / S. Pinho, J. Lacombe, M. Hanoun [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2013. – Vol. 210. – № 7. – P. 1351-1367. DOI: 10.1084/jem.20122252.

204. Peslak, S. A. Diagnosis and Treatment of Aplastic Anemia. / S. A. Peslak, T. Olson, D. V Babushok // *Current treatment options in oncology*. – 2017. – Vol. 18. – № 12. DOI: 10.1007/s11864-017-0511-z.

205. Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions / R. Gruber, F. Karreth, B. Kandler [et al.] // *Platelets*. – 2004. – Vol. 15. – № 1. – P. 29-35. DOI: 10.1080/09537100310001643999.

206. Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model / M. Schmidt, P. Zickler, G. Hoffmann [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 100. – № 8. – P. 2737-2743. DOI: 10.1182/blood-2002-02-0407.

207. Ponomarenko, V. M. [Enhanced osteogenesis in severe aplastic anemia]. / V. M. Ponomarenko, K. M. Abdulkadyrov, V. I. Rugal' // *Gematologiya i Transfuziologiya*. – 1993. – Vol. 38. – № 6. – P. 44-45.

208. Poor potential of proliferation and differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells derived from children with severe aplastic anemia / Y. H. Chao, C. T. Peng, H. J. Harn [et al.] // *Annals of Hematology*. – 2010. – Vol. 89. – № 7. – P. 715-723. DOI: 10.1007/S00277-009-0892-6/FIGURES/5.

209. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. / A. J. Friedenstein, U. F. Deriglasova, N. N. Kulagina [et al.] // *Experimental hematology*. – 1974. – Vol. 2. – № 2. – P. 83-92.

210. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. / F. Casiraghi, N. Azzollini, P. Cassis [et al.] // *Journal of immunology*. – 2008. – Vol. 181. – № 6. – P. 3933-46.

211. Primary treatment of acquired aplastic anemia: Outcomes with bone marrow transplantation and immunosuppressive therapy / K. Doney, W. Leisenring, R. Storb, F. R. Appelbaum // *Annals of Internal Medicine*. – 1997. – Vol. 126. – № 2. – P. 107-115. DOI: 10.7326/0003-4819-126-2-199701150-00003.

212. Pro-osteogenic trophic effects by PKA activation in human mesenchymal stromal cells / J. Doorn, J. van de Peppel, J. P. T. M. van Leeuwen [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – № 26. – P. 6089-6098. DOI: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.05.010.

213. Prockop, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. / D. J. Prockop // *Science*. – 1997. – Vol. 276. – № 5309. – P. 71-4.

214. Prognostic value of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: results of two-centre prospective study / A. Kulagin, I. Lisukov, M. Ivanova [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2014. – Vol. 164. – № 4. – P. 546-554. DOI: 10.1111/BJH.12661.

215. PTH regulates osteogenesis and suppresses adipogenesis through Zfp 467 in a feed-forward, PTH1R-cyclic AMP-dependent manner / H. Liu, A. Wada, I. Le [et al.] // *eLife*. – 2023. – Vol. 12. DOI: 10.7554/ELIFE.83345.

216. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. / S. Tsutsumi, A. Shimazu, K. Miyazaki [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2001. – Vol. 288. – № 2. – P. 413-9. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5777.

217. Roelen, B. A. J. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGFβ family members

/ B. A. J. Roelen, P. Ten Dijke // *Journal of Orthopaedic Science*. – 2003. – Vol. 8. – № 5. – P. 740-748. DOI: 10.1007/S00776-003-0702-2.

218. Role for Interferon- γ in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells / M. Krampera, L. Cosmi, R. Angeli [et al.] // *Stem Cells*. – 2006. – Vol. 24. – № 2. – P. 386-398. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0008.

219. Role of fibroblast growth factor receptors (FGFR) and FGFR like-1 (FGFRL1) in mesenchymal stromal cell differentiation to osteoblasts and adipocytes / T. E. Kähkönen, K. K. Ivaska, M. Jian [et al.] // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2018. – Vol. 461. – P. 194-204. DOI: 10.1016/J.MCE.2017.09.015.

220. Schmittgen, T. D. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. / T. D. Schmittgen, K. J. Livak // *Nature protocols*. – 2008. – Vol. 3. – № 6. – P. 1101-8.

221. Self-renewal of multipotent long-term repopulating hematopoietic stem cells is negatively regulated by Fas and tumor necrosis factor receptor activation / D. Bryder, V. Ramsfjell, I. Dybedal [et al.] // *The Journal of experimental medicine*. – 2001. – Vol. 194. – № 7. – P. 941-952. DOI: 10.1084/JEM.194.7.941.

222. Short telomeres result in chromosomal instability in hematopoietic cells and precede malignant evolution in human aplastic anemia / R. T. Calado, J. N. Cooper, H. M. Padilla-Nash [et al.] // *Leukemia*. – 2012. – Vol. 26. – № 4. – P. 700-707. DOI: 10.1038/LEU.2011.272.

223. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow / Y. Katayama, M. Battista, W. M. Kao [et al.] // *Cell*. – 2006. – Vol. 124. – № 2. – P. 407-421. DOI: 10.1016/J.CELL.2005.10.041.

224. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. / M. J. Kiel, O. H. Yilmaz, T. Iwashita [et al.] // *Cell*. – 2005. – Vol. 121. – № 7. – P. 1109-21. DOI: 10.1016/j.cell.2005.05.026.

225. Solchaga, L. A. Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Tips and Tricks / L. A. Solchaga, K. J. Penick, J. F. Welter // *Methods in Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 698. – P. 253-278. DOI: 10.1007/978-1-60761-999-4_20/FIGURES/13_20.

226. Splenic pooling and loss of VCAM-1 causes an engraftment defect in patients with myelofibrosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / C. Hart, S. Klatt, J. Barop [et al.] // *Haematologica*. – 2016. – Vol. 101. – № 11. – P. 1407-1416. DOI: 10.3324/HAEMATOL.2016.146811.

227. 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 [et al.] // *Transplantation*. – 1974. – Vol. 17. – № 4. – P. 331-40.

228. Susceptibility to aplastic anemia is associated with HLA-DRB1*1501 in an aboriginal

population in Sabah, Malaysia / J. S. Dhaliwal, L. Wong, M. A. Kamaluddin [et al.] // *Human Immunology*. – 2011. – Vol. 72. – № 10. – P. 889-892. DOI: 10.1016/J.HUMIMM.2011.06.013.

229.T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia / A. Bacigalupo, M. Valle, M. Podestà [et al.] // *Experimental Hematology*. – 2005. – Vol. 33. – № 7. – P. 819-827. DOI: 10.1016/j.exphem.2005.05.006.

230.Telomerase gene therapy rescues telomere length, bone marrow aplasia, and survival in mice with aplastic anemia / C. Bär, J. M. Povedano, R. Serrano [et al.] // *Blood*. – 2016. – Vol. 127. – № 14. – P. 1770-1779. DOI: 10.1182/BLOOD-2015-08-667485.

231.TGF- β Family Signaling in Mesenchymal Differentiation / I. Grafe, S. Alexander, J. R. Peterson [et al.] // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2018. – Vol. 10. – № 5. DOI: 10.1101/CSHPERSPECT.A022202.

232.Th17 cells in inflammation and autoimmunity / R. P. Singh, S. Hasan, S. Sharma [et al.] // *Autoimmunity Reviews*. – 2014. – Vol. 13. – № 12. – P. 1174-1181. DOI: 10.1016/J.AUTREV.2014.08.019.

233.The differential diagnosis between aplastic anemia and hypocellular myelodysplasia in patients with pancytopenia / I. Lorand-Metze, D. Meira, C. Lima [et al.] // *Haematologica*. – 1999. – Vol. 84. – № 6. – P. 564-565.

234.The Negative Co-Signaling Molecule B7-H4 Is Expressed by Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Mediates its T-Cell Modulatory Activity / Q. Xue, X.-Y. Luan, Y.-Z. Gu [et al.] // *Stem Cells and Development*. – 2010. – Vol. 19. – № 1. – P. 27-38. DOI: 10.1089/scd.2009.0076.

235.The R882H DNMT3A Mutation Associated with AML Dominantly Inhibits WT DNMT3A by Blocking its Ability to Form Active Tetramers / D. A. Russler-Germain, D. H. Spencer, M. A. Young [et al.] // *Cancer cell*. – 2014. – Vol. 25. – № 4. – P. 442-454. DOI: 10.1016/J.CCR.2014.02.010.

236.The regulatory role of c-MYC on HDAC2 and PcG expression in human multipotent stem cells / D. R. Bhandari, K. W. Seo, J. W. Jung [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2011. – Vol. 15. – № 7. – P. 1603-1614. DOI: 10.1111/J.1582-4934.2010.01144.X.

237.The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. / T. Papayannopoulou, C. Craddock, B. Nakamoto [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1995. – Vol. 92. – № 21. – P. 9647-9651. DOI: 10.1073/PNAS.92.21.9647.

238.Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. / F. Arai, A. Hirao, M. Ohmura [et al.] // *Cell*. – 2004. – Vol. 118. – № 2. – P. 149-61. DOI: 10.1016/j.cell.2004.07.004.

239.Tie2 activation contributes to hemangiogenic regeneration after myelosuppression / H. G.

Kopp, S. T. Avecilla, A. T. Hooper [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 106. – № 2. – P. 505-513. DOI: 10.1182/BLOOD-2004-11-4269.

240. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation / G. S. Stein, J. B. Lian, J. L. Stein [et al.] // *Physiological Reviews*. – 1996. – Vol. 76. – № 2. – P. 593-629. DOI: 10.1152/PHYSREV.1996.76.2.593.

241. Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow-repopulating and spleen colony-forming hematopoietic stem cells in the mouse / R. E. Ploemacher, J. P. Van der Sluijs, C. A. J. Van Beurden [et al.] // *Blood*. – 1991. – Vol. 78. – № 10. – P. 2527-2533. DOI: 10.1182/blood.v78.10.2527.bloodjournal78102527.

242. Vascular and perivascular niches, but not the osteoblastic niche, are numerically restored following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with aplastic anemia / L. Wu, W. Mo, Y. Zhang [et al.] // *International journal of hematology*. – 2017. – Vol. 106. – № 1. – P. 71-81. DOI: 10.1007/S12185-017-2217-1.

243. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells / P. J. Simmons, B. Masinovsky, B. M. Longenecker [et al.] // *Blood*. – 1992. – Vol. 80. – № 2. – P. 388-395. DOI: 10.1182/BLOOD.V80.2.388.388.

244. Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance / I. G. Winkler, V. Barbier, B. Nowlan [et al.] // *Nature Medicine*. – 2012. – Vol. 18. – № 11. – P. 1651-1657. DOI: 10.1038/nm.2969.

245. Wang, L. D. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells / L. D. Wang, A. J. Wagers // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2011. – Vol. 12. – № 10. – P. 643-655. DOI: 10.1038/nrm3184.

246. Warr, M. R. Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies / M. R. Warr, E. M. Pietras, E. Passegué // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. – 2011. – Vol. 3. – № 6. – P. 681-701. DOI: 10.1002/WSBM.145.

247. Young, N. S. Aplastic Anemia / N. S. Young // *New England Journal of Medicine*. – 2018. – Vol. 379. – № 17. – P. 1643-1656. DOI: 10.1056/NEJMra1413485.

248. Young, N. S. Hematopoietic cell destruction by immune mechanisms in acquired aplastic anemia / N. S. Young // *Seminars in Hematology*. – 2000. – Vol. 37. – № 1. – P. 3-14. DOI: 10.1016/S0037-1963(00)90026-X.

249. Young, N. S. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia / N. S. Young, R. T. Calado, P. Scheinberg // *Blood*. – 2006. – Vol. 108. – № 8. – P. 2509-2519. DOI: 10.1182/BLOOD-2006-03-010777.

250. Young, N. S. The epidemiology of acquired aplastic anemia. / N. S. Young, D. W. Kaufman

// Haematologica. – 2008. – Vol. 93. – № 4. – P. 489-92. DOI: 10.3324/haematol.12855.

251.Zeng, Y. The complex pathophysiology of acquired aplastic anaemia / Y. Zeng, E. Katsanis // Clinical & Experimental Immunology. – 2015. – Vol. 180. – № 3. – P. 361-370. DOI: 10.1111/cei.12605.

252.Zhou, B. O. Hematopoietic stem and progenitor cells regulate the regeneration of their niche by secreting Angiopoietin-1. / B. O. Zhou, L. Ding, S. J. Morrison // eLife. – 2015. – Vol. 4. DOI: 10.7554/eLife.05521.

253.Zoumbos, N. C. Interferon is the suppressor of hematopoiesis generated by stimulated lymphocytes in vitro. / N. C. Zoumbos, J. Y. Djeu, N. S. Young // The Journal of Immunology. – 1984. – Vol. 133. – № 2. – P. 769-774. DOI: 10.4049/JIMMUNOL.133.2.769.

Приложение А

(справочное)

Характеристики больных апластической анемией и здоровых доноров, включенных в исследование

Таблица А.1 – Клинические характеристики больных АА, включенных в исследование

Больные №№	Пол	Возраст, лет	Диагноз	Размер клона ПНГ, %	Гемоглобин, г/л	Тромбоциты x 10 ⁹ /л	Нейтрофилы x 10 ⁹ /л
1	муж	22	ТАА	0,04	49	12	0,18
2	жен	25	НАА	1,82	89	19	0,86
3	жен	27	НАА	0,03	52	15	0,77
4	муж	49	ТАА	0	62	18	0,48
5	муж	20	ТАА	5,23	94	27	0,46
6	муж	23	ТАА	25,6	66	24	0,92
7	муж	40	НАА	2,59	74	18	0,68
8	муж	51	НАА	0	78	7	1,39
9	жен	39	НАА	4,55	79	24	1,4
10	жен	32	НАА	0,40	74	15	1,23
11	жен	29	ТАА	7,16	72	29	0,48
12	муж	20	ТАА	10,1	66	3	0,13
13	муж	37	НАА	0	49	7	0,77
14	муж	21	НАА	0,23	100	32	1,49
15	жен	20	ТАА	9,91	89	33	0,36
16	жен	18	ТАА	0,04	73	15	0,43
17	жен	29	НАА	19,0	74	15	0,96
18	жен	31	НАА	0,18	89	14	0,4
19	муж	24	НАА	0,95	70	22	1,08
20	муж	35	НАА	1,30	78	10	0,7
21	жен	35	ТАА	0,62	68	12	1,95
22	муж	49	НАА	0,09	79	8	2,04

Продолжение таблицы А.1

Больные №№	Пол	Возраст, лет	Диагноз	Размер клона ПНГ, %	Гемоглобин, г/л	Тромбоциты $\times 10^9/\text{л}$	Нейтрофилы $\times 10^9/\text{л}$
23	муж	26	СТАА	0,27	65	3	0,11
24	жен	49	ТАА	0	59	11	0,27
25	муж	28	СТАА	0,26	71	17	0,04
26	жен	46	НАА	0	60	5	0,4
27	муж	26	НАА	0	81	9	0,65
28	жен	43	ТАА	0,39	60	5	0,09
29	жен	31	НАА	29,8	76	10	0,7
30	жен	28	ТАА	0	61	12	0,65
31	муж	26	ТАА	1,58	60	3	0,3
32	муж	63	ТАА	0,48	66	15	0,23
33	жен	22	НАА	19,5	74	6	1,99
34	муж	36	НАА	0,38	68	7	0,63
35	муж	19	СТАА	0	41	13	0,17
36	жен	31	НАА	28,7	90	14	0,71
37	муж	26	НАА	65,1	74	29	0,74
38	муж	28	СТАА	0	72	16	0,03
39	муж	22	ТАА	0,07	66	12	0,34
40	жен	31	НАА	6,24	86	7	1,18
41	жен	57	ТАА	0,03	70	9	0,14
42	муж	21	СТАА	0,15	60	8	0,09
43	муж	33	НАА	13,7	84	5	1,76

Таблица А.2 – Характеристики здоровых доноров КМ, включенных в исследование

Доноры, №№	Пол	Возраст, лет	Доноры, №№	Пол	Возраст, лет
1	муж	22	16	муж	14
2	жен	61	17	муж	14
3	муж	24	18	муж	19
4	жен	28	19	муж	41
5	жен	50	20	муж	34
6	муж	27	21	жен	38
7	муж	52	22	муж	36
8	жен	41	23	жен	38
9	муж	17	24	жен	22
10	жен	41	25	жен	32
11	жен	15	26	муж	19
12	жен	19	27	муж	23
13	жен	34	28	муж	29
14	муж	21	29	жен	32
15	муж	25	30	муж	34

Приложение Б

(справочное)

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованных для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Таблица Б.1 – Последовательности праймеров и зондов, использованные для проведения ПЦР в режиме реального времени

Ген	Праймер/зонд	Последовательность
<i>ИДО-1</i>	прямой	AGCGTCTTTCAGTGCTTTG
	обратный	GGATTTGACTCTAATGAGCACA
	зонд	FAM-ACATGCTGCTCAGTTCCTCCAGG-RTQ1
<i>ИЛ-1β</i>	прямой	ATTCTCTTCAGCCAATCTTCA
	обратный	AAGGAGCACTTCATCTGTTTA
	зонд	FAM-AGAACAAGTCATCCTCATTGCCAC-RTQ1
<i>ИЛ-1P1</i>	прямой	СТААТGAGACAATGGAAGTAGAC
	обратный	AGCACTGGGTCATCTTCATC
	зонд	FAM- CAGTTGAGTGACATTGCTTACTGGAA -RTQ1
<i>ИЛ-4P</i>	прямой	ATAATCCAGGATGCTCAGGG
	обратный	TCCAGAAAACAGGGCAAGAG
	зонд	FAM-AGAAGCGGTCCCGAGGCCAGG-RTQ1
<i>ИЛ-10</i>	прямой	CCGTGGAGCAGGTGAAGA
	обратный	TTGTCATGTAGGCTTCTATGTAGT
	зонд	FAM-ATAAGCTCCAAGAGAAAGGCATCTAC-RTQ1
<i>ACTB</i>	прямой	CAACCGCGAGAAGATGACC
	обратный	CAGAGGCGTACAGGGATAGC
	зонд	ROX-AGACCTTCAACACCCCAGCCATGTACG-BHQ2
<i>ALPL</i>	прямой	GGTCACCTCCATCCTGCG
	обратный	CATCTCGTTGTCTGAGTACC
	зонд	FAM- CAATGCCACAGATTTCCAGCGTCCT -RTQ1

Продолжение таблицы Б.1

Ген	Праймер/зонд	Последовательность
<i>ANGPT1</i>	прямой	CAGTCAGAGGCAGTACATGCTAAG
	обратный	TTCCTGCTGTCCCAGTGTGA
	зонд	FAM-TGAATAGGCTCGGTCCCTTCCCAGT-RTQ1
<i>CD274</i>	прямой	CCGAGGCTCCGCACCAG
	обратный	TCAGCAAATGCCAGTAGGTC
	зонд	FAM-AGATGAGGATATTTGCTGTCTTTATA-RTQ1
<i>CFH</i>	прямой	TTACCCTTACAGGAGGAAATGT
	обратный	GCTGTCACTGGTAAACACTTC
	зонд	FAM-CTTCACATATAGGAATATCATTGGTCCAT-RTQ1
<i>CXCL12</i>	прямой	CTACAGATGCCCATGCCGAT
	обратный	TAGCTTCGGGTCAATGCACA
	зонд	FAM-CAGTTTGGAGTGTTGAGAATTTGAG-RTQ1
<i>FABP4</i>	прямой	ATGATAAACTGGTGGTGGAAAT
	обратный	TCAATGCGAACTTCAGTCC
	зонд	FAM-TGGCTTATGCTCTCTCATAAACTCTCG-RTQ1
<i>FGF2</i>	прямой	GAAGAGCGACCCTCACATCAAG
	обратный	TCCGTAACACATTTAGAAGCCAGTA
	зонд	FAM-TCATAGCCAGGTAACGGTTAGCACACACTCCT-RTQ1
<i>FGFR1</i>	прямой	CAGAATTGGAGGCTACAAGG
	обратный	TGATGCTGCCGTA CT CATTC
	зонд	FAM- CATCATAATGGACTCTGTGGTGC-RTQ1
<i>FGFR2</i>	прямой	CTCATTATGGAAAGTGTGGTC
	обратный	TGGGCCGGTGAGGCGATC
	зонд	FAM- CAGGTGGTACGTGTGATTGATGGA -RTQ1
<i>GAPDH</i>	прямой	GGTGAAGGTCGGAGTCAACG
	обратный	TGGGTGGAATCATATTGGAACA
	зонд	ROX-CTCTGGTAAAGTGGATATTGTTGCCATCA-BHQ2

Продолжение таблицы Б.1

Ген	Праймер/зонд	Последовательность
<i>HLA-DRA</i>	прямой	AGCCTCTTCTCAAGCACTGG
	обратный	AAGATGGTCCCAATAATGATGC
	зонд	FAM-ATGCTCCAAGCCCTCTCCCAGAGACTACA-RTQ1
<i>KITLG</i>	прямой	TCTGCAGGAATCGTGTGACT
	обратный	TCTCGCTTATCCAACAATGAC
	зонд	FAM-CTTCCAAAAGACTACATGATAACC-RTQ1
<i>MYC</i>	прямой	CACCAGCAGCGACTCTGAG
	обратный	TGAGGACCAGTGGGCTGTG
	зонд	FAM-AGTCTGGATCACCTTCTGCTGGA-RTQ1
<i>NES</i>	прямой	ACCTCAAGATGTCCCTCAGC
	обратный	GGGAGCAAAGATCCAAGACG
	зонд	FAM-CTCCAAGACTTCCCTCAGCTTTCAG-RTQ1
<i>PDGFRA</i>	прямой	TGGCTAAGAATCTCCTTGGA
	обратный	ACCAGGACAATAAGTGAGATG
	зонд	FAM-CAATCACCAACAGCACCAGGACT-RTQ1
<i>PDGFRB</i>	прямой	CTCCCTTATCATCCTCATCA
	обратный	TCCACGTAGATGTACTIONCATG
	зонд	FAM-TCACAGACTCAATCACCTTCCATC-RTQ1
<i>PPARG</i>	прямой	TACTGTCGGTTTCAGAAATGC
	обратный	CAACAGCTTCTCCTTCTCG
	зонд	FAM-CCATCAGGTTTGGGCGGATGCC-RTQ1
<i>PTH1R</i>	прямой	ATCATCCAGGTGCCCATCC
	обратный	GGTCTCCCGCAGCTTGGT
	зонд	FAM-CCTCCATTGTGCTCAACTTCATCCTCTTCA-RTQ1
<i>SPP1</i>	прямой	ATAGTGTGGTTTATGGACTGAG
	обратный	ATTCAACTCCTCGCTTCC
	зонд	FAM-CCAGTACCCTGATGCTACAGACGAG-RTQ1

Продолжение таблицы Б.1

Ген	Праймер/зонд	Последовательность
<i>TGFB1</i>	прямой	TGCGTCTGCTGAGGCTCAA
	обратный	CGGTGACATCAAAAGATAACC
	зонд	FAM-AGGAATTGTTGCTGTATTTCTGGTAC-RTQ1
<i>TGFB2</i>	прямой	AGTGCCTGAACAACGGATTG
	обратный	CACAACCTTTGCTGTTCGATGTA
	зонд	FAM-ATATCAGATTCTCAAGTCCAAAGATTT-RTQ1
<i>VCAM1</i>	прямой	CCGAAAGGCCAGTTGAAG
	обратный	CACGAGAAGCTCAGGAGAAA
	зонд	FAM-AACAAAGTTGGCTCACAATTAAGAAGTTT-RTQ1
<i>VEGFA</i>	прямой	AGGCGAGGCAGCTTGAGTTA
	обратный	ACCCTGAGGGAGGCTCCTT
	зонд	FAM-CCTCGGCTTGTACATCTGCAAGTACGT-RTQ1

Приложение В

(справочное)

Количественные характеристики и функциональные свойства стромальных предшественников из костного мозга больных апластической анемией

Таблица В.1 – Концентрация КОЕф и характеристики стромальных клеток из КМ здоровых доноров, больных НАА, ТАА и СТАА. Отсутствие данных в соответствующей графе обозначено прочерком

Группа	Доноры (N=18)	НАА (N=19)	ТАА (N=12)	СТАА (N=3)	ТАА + СТАА (N=15)
Концентрация КОЕф, на 10 ⁶ мононуклеаров КМ	25,4±6,6	27,2±11,2	42,6±18,2	4,0±2,1	34,9±15,0
Группа	Доноры (N=13)	НАА (N=9)	ТАА (N=8)	СТАА (N=0)	-
Доля стромальных клеток среди мононуклеаров КМ, %	0,023±0,003	0,107±0,063	0,076±0,021	-	-
Группа	Доноры (N=11)	НАА (N=9)	ТАА (N=6)	СТАА (N=0)	-
Доля клоногенных среди стромальных, %	16,9±5,0	11,6±4,4	7,1±2,9	-	-

Таблица В.2 – Пролиферативные характеристики ММСК больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров. * – достоверные отличия от доноров (p < 0,05)

Группа	Доноры (N=22)	НАА (N=20)	ТАА (N=13)	СТАА (N=3)	ТАА+СТАА (N=16)
Время до ПО, дни	13,4±0,6	20,5±2,3 *	19,2±2,6 *	23,0±5,5	19,9±2,3 *
Среднее ВУП, дни	3,8±0,5	5,9±0,8 *	4,4±0,7	10,2±0,8	6,0±1,0
Суммарная клеточная продукция, x10 ⁶ клеток	14,5±1,9	21,4±5,7	16,8±3,7	3,0±0,3	13,0±3,3

Таблица В.3 – ОУЭ маркерных генов остеогенной и адипогенной дифференцировки в ММСК больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров. (К обозначает ОУЭ в контрольных образцах ММСК, О, А – в ММСК, инкубированных с индукторами остеогенной и адипогенной дифференцировки, соответственно). * – достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

Направление дифференцировки	Ген	Группа	Доноры (N=15)	НАА (N=16)	ТАА (N=8)	СТАА (N=3)	ТАА+СТАА (N=11)
Остеогенная	<i>ALPL</i>	К	0,067±0,023	0,068±0,019	0,164±0,062	0,009±0,007	0,122±0,049
		О	0,36±0,07 *	0,29±0,07 *	0,52±0,27	0,13±0,06	0,41±0,20 *
	<i>PTH1R</i>	К	0,030±0,006	0,037±0,012	0,050±0,044	0,009±0,003	0,037±0,029
		О	0,56±0,14 *	1,42±0,76 *	0,89±0,34 *	0,26±0,12	0,68±0,25 *
Адипогенная	<i>FABP4</i>	К	0,0021±0,0012	0,0018±0,0005	0,0039±0,0024	0,0013±0,0002	0,0031±0,002
		А	0,30±0,13 *	0,74±0,32 *	0,53±0,25 *	0,09±0,08	0,40±0,19 *
	<i>PPARG</i>	К	0,16±0,03	0,12±0,03	0,11±0,03	0,12±0,06	0,11±0,02
		А	0,68±0,12 *	0,67±0,11 *	0,93±0,28 *	0,50±0,27	0,81±0,22 *

Таблица В.4 – Концентрация КООБ7 и КООБ28 на подслоях ММСК больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров. * – достоверные отличия от доноров ($p < 0,05$)

Группы	Доноры (N=12)	НАА (N=14)	ТАА (N=8)	СТАА (N=2)	ТАА+СТАА (N=10)
Концентрация КООБ7, $\times 10^5$ клеток	5,6±1,1	9,6±2,7	6,4±1,8	8,1±6,5	6,7±1,8
Концентрация КООБ28, $\times 10^5$ клеток	1,1±0,3	2,4±0,4 *	1,8±0,5	2,4±1,9	1,9±0,5

Приложение Г

(справочное)

Относительный уровень экспрессии генов в стромальных предшественниках из костного мозга больных апластической анемией и здоровых доноров

Таблица Г.1 – 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)
Промежуточный филамент	<i>NES</i>	0,41±0,14	0,22±0,04
Факторы роста	<i>FGF2</i>	1,71±0,33	0,14±0,03 *
	<i>TGFB1</i>	0,91±0,12	1,24±0,11 *
	<i>TGFB2</i>	1,62±0,27	0,16±0,02 *
	<i>VEGFA</i>	3,2±0,6	2,2±0,3
Рецепторы факторов роста	<i>FGFR1</i>	0,075±0,024	1,153±0,073 *
	<i>FGFR2</i>	0,24±0,06	1,20±0,33
	<i>PDGFRFA</i>	0,41±0,08	0,58±0,10
	<i>PDGFRFB</i>	0,051±0,023	1,048±0,164 *
Рецептор цитокина	<i>IL-1P1</i>	0,68±0,19	0,66±0,08
Адипогенная дифференцировка	<i>FABP4</i>	0,0021±0,0012	2,2585±0,5079 *
	<i>PPARG</i>	0,16±0,03	0,95±0,15 *
Остеогенная дифференцировка	<i>ALPL</i>	0,068±0,022	0,105±0,034
	<i>PTH1R</i>	0,042±0,015	0,071±0,019
Регуляция кроветворения	<i>ANGPT1</i>	2,84±0,42	0,75±0,15 *
	<i>CXCL12</i>	0,6±0,1	1,3±0,2 *
	<i>KITLG</i>	0,44±0,08	1,22±0,19 *
	<i>SPP1</i>	9,3±3,5	552,5±168,2 *
	<i>VCAM1</i>	0,71±0,22	0,18±0,05 *

Продолжение таблицы Г.1

Функциональная группа	Ген	ММСК (N=19)	КОЕф (N=22)
Иммуномодуляция	<i>ИДО-1</i>	0,00064±0,00060	0,0019±0,0004 *
	<i>ИЛ-1β</i>	0,23±0,09	0,43±0,06 *
	<i>ИЛ-10</i>	13,8±3,8	122,5±18,8 *
	<i>CD274</i>	0,29±0,05	0,63±0,11 *
	<i>CFH</i>	0,64±0,11	0,21±0,03 *
	<i>HLA-DRA</i>	1,2±0,3	6,1±1,0 *

Таблица Г.2 – ОУЭ генов в ММСК больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров. * – достоверные отличия от доноров ($p < 0,05$), ** – достоверные отличия от больных НАА ($p < 0,05$)

Ген	Доноры (N=19)	НАА (N=17)	ТАА (N=10)	СТАА (N=1)	ТАА+СТАА (N=11)
<i>FGF2</i>	1,7±0,3	2,7±0,9	2,7±1,8	0,5	2,5±1,6
<i>TGFB1</i>	0,9±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	0,5	0,8±0,1
<i>TGFB2</i>	1,6±0,3	2,8±0,7	5,1±2,2	1,8	4,8±2,0
<i>VEGFA</i>	3,2±0,6	3,3±0,7	3,7±1,3	3,5	3,7±1,2
<i>FGFR1</i>	0,08±0,02	1,1±0,2 *	0,8±0,4	2,0	0,9±0,4 *
<i>FGFR2</i>	0,24±0,06	1,7±0,6 *	1,5±0,7	0,15	1,4±0,6
<i>PDGFRA</i>	0,4±0,1	1,5±0,3 *	0,6±0,1 **	1,9	0,7±0,1
<i>PDGFRB</i>	0,05±0,02	1,3±0,4 *	0,6±0,2	1,2	0,6±0,2 *
<i>MYC</i>	4,9±1,4	5,8±2,0	4,9±2,7	0,7	4,6±2,5
<i>NES</i>	0,4±0,1	0,9±0,3	0,9±0,2 *	0,5	0,8±0,2 *
<i>ИЛ-1P1</i>	0,7±0,2	1,0±0,2	0,9±0,4	0,3	0,8±0,4
<i>ИЛ-4P</i>	0,7±0,4	1,5±0,6 *	1,20±0,6	1,5	1,2±0,5
<i>ANGPT1</i>	2,8±0,4	2,0±0,7	0,8±0,2 *	0,16	0,8±0,2 *
<i>CXCL12</i>	1,3±0,7	0,9±0,2	0,7±0,2	0,03	0,7±0,2
<i>VCAM1</i>	0,7±0,2	0,4±0,1	0,4±0,1	0,5	0,4±0,1
<i>SPPI</i>	9,3±3,5	9,3±3,8	17,5±9,2	3,3	16,2±8,4
<i>KITLG</i>	0,4±0,1	0,6±0,2	0,3±0,1	0,7	0,3±0,1
<i>CFH</i>	0,6±0,1	1,3±0,3	0,8±0,1	0,8	0,8±0,1
<i>ИЛ-1β</i>	0,2±0,1	0,5±0,2	1,3±0,6	0,07	1,1±0,5
<i>ИДО-1</i>	0,00064±0,00060	0,0018±0,0009	0,0079±0,0077	0,0002	0,0070±0,0068
<i>CD274</i>	0,29±0,05	0,9±0,5	0,8±0,5	1,0	0,8±0,4
<i>ИЛ-10</i>	13,8±3,8	7,3±4,4 *	6,9±2,6	0,13	6,3±2,4
<i>HLA-DRA</i>	1,2±0,3	1,7±0,9	0,6±0,3	0,005	0,5±0,3 *

Таблица Г.3 – ОУЭ генов в КОЕф больных НАА, ТАА, СТАА и здоровых доноров. * – достоверные отличия от доноров ($p < 0,05$), ** – достоверные отличия от больных НАА ($p < 0,05$)

Ген	Доноры (N=22)	НАА (N=17)	ТАА (N=9)	СТАА (N=2)	ТАА+СТАА (N=11)
<i>FGF2</i>	0,14±0,03	0,6±0,3	0,3±0,1	0,22±0,02	0,3±0,1
<i>TGFB1</i>	1,2±0,1	0,9±0,2 *	0,7±0,1	1,0±0,42	0,8±0,1
<i>TGFB2</i>	0,16±0,02	0,36±0,14	0,41±0,16 *	0,33±0,07	0,39±0,13 *
<i>VEGFA</i>	2,2±0,3	2,9±0,9	2,9±0,8	2,9±0,6	2,9±0,6
<i>FGFR1</i>	1,2±0,1	1,1±0,2	1,7±0,2 *, **	1,8±0,2	1,7±0,1 *, **
<i>FGFR2</i>	1,2±0,3	1,5±0,3	1,5±0,2	0,6±0,1	1,3±0,2
<i>PDGFRA</i>	0,6±0,1	1,0±0,2	1,2±0,2	2,3±0,5	1,4±0,2 *
<i>PDGFRB</i>	1,0±0,2	1,8±0,4	2,2±0,6	3,9±0,6	2,5±0,5 *
<i>NES</i>	0,22±0,04	0,4±0,1 *	0,7±0,2 *	0,8±0,2	0,7±0,1 *
<i>ИЛ-1P1</i>	0,7±0,1	0,9±0,1	0,9±0,2	0,7±0,3	0,9±0,1
<i>ANGPT1</i>	0,7±0,1	1,4±0,4	1,3±0,2	1,3±0,7	1,3±0,2
<i>CXCL12</i>	1,3±0,2	1,5±0,3	2,1±0,4	1,1±0,2	1,9±0,4
<i>VCAM1</i>	0,18±0,05	0,4±0,2	0,4±0,1	0,5±0,1	0,4±0,1 *
<i>SPP1</i>	553±168	204±41	153±60	20±12	129±51 *
<i>KITLG</i>	1,2±0,2	2,1±0,5 *	1,7±0,3	2,0±0,8	1,8±0,3
<i>CFH</i>	0,21±0,03	0,4±0,1	0,3±0,1	0,35±0,00	0,33±0,04
<i>ИЛ-1β</i>	0,4±0,1	0,4±0,1	0,11±0,04 *, **	0,11±0,09	0,11±0,03 *, **
<i>ИДО-1</i>	0,0019±0,0004	0,0032±0,0025	0,0010±0,0004	0,0002±0,0002	0,0008±0,0003 *
<i>CD274</i>	0,6±0,1	0,6±0,1	0,30±0,04	0,35±0,03	0,30±0,03
<i>ИЛ-10</i>	123±19	172±47	49±12 *	27±18	45±10 *
<i>HLA-DRA</i>	6,1±1,0	7,3±2,1	2,9±0,6	1,1±0,2	2,6±0,5 *
<i>FABP4</i>	2,3±0,5	4,1±2,0	2,0±1,4	0,2±0,1	1,6±1,2
<i>PPARG</i>	1,0±0,1	1,0±0,2	0,5±0,1	0,4±0,1	0,5±0,1
<i>ALPL</i>	0,11±0,03	0,20±0,05	0,3±0,1	0,07±0,05	0,2±0,1
<i>PTH1R</i>	0,07±0,02	0,05±0,01	0,07±0,01	0,02±0,01	0,06±0,01