

Медико-биологические проблемы жизнедеятельности

Научно-практический рецензируемый журнал

№ 1(23)

2020 г.

Учредитель

Государственное учреждение
«Республиканский научно-
практический центр
радиационной медицины
и экологии человека»

Журнал включен в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования диссертационных исследований по медицинской и биологической отраслям науки (31.12.2009, протокол 25/1)

Журнал зарегистрирован
Министерством информации
Республики Беларусь,
Свид. № 762 от 6.11.2009

Подписано в печать 27.04.20
Формат 60×90/8. Бумага мелованная.
Гарнитура «Times New Roman».
Печать цифровая. Тираж 200 экз.
Усл. печ. л. 23. Уч.-изд. л. 13,57.
Зак. 29.

Издатель ГУ «Республиканский
научно-практический центр
радиационной медицины и
экологии человека»
Свидетельство N 1/410 от 14.08.2014

Отпечатано в КУП
«Редакция газеты
«Гомельская праўда»
г. Гомель, ул. Полесская, 17а

ISSN 2074-2088

Главный редактор, председатель редакционной коллегии

А.В. Рожко (д.м.н., доцент)

Редакционная коллегия

В.С. Аверин (д.б.н., профессор, зам. гл. редактора), В.В. Аничкин (д.м.н., профессор), В.Н. Беляковский (д.м.н., профессор), Н.Г. Власова (д.б.н., доцент, научный редактор), А.В. Величко (к.м.н., доцент), И.В. Веялкин (к.б.н., доцент), А.В. Воропаева (к.м.н., доцент), Д.И. Гавриленко (к.м.н.), В.В. Евсеенко (к.п.с.н.), С.В. Зыблева (к.м.н., отв. секретарь), А.В. Жарикова (к.м.н.), С.А. Игумнов (д.м.н., профессор), И.Н. Коляда (к.м.н.), А.В. Коротаев (к.м.н., доцент), А.Н. Лызилов (д.м.н., профессор), А.В. Макарич (к.м.н., доцент), С.Б. Мельнов (д.б.н., профессор), Я.Л. Навменова (к.м.н., доцент), Э.А. Надыров (к.м.н., доцент), И.А. Новикова (д.м.н., профессор), Э.Н. Платошкин (к.м.н., доцент), Э.А. Повелица (к.м.н.), А.С. Подгорная (к.м.н.), Ю.И. Рожко (к.м.н., доцент), И.П. Ромашевская (к.м.н.), М.Г. Русаленко (к.м.н., доцент), А.П. Саливончик (к.б.н.), А.Е. Силин (к.б.н., доцент), А.Н. Стожаров (д.б.н., профессор), А.Н. Цуканов (к.м.н.), Н.И. Шевченко (к.б.н., доцент), Ю.И. Ярец (к.м.н., доцент),

Редакционный совет

Е.Л. Богдан (МЗ РБ, Минск), А.В. Аклеев (д.м.н., профессор, Челябинск), О.В. Алейникова (д.м.н., чл.-кор. НАН РБ, Минск), С.С. Алексанин (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Д.А. Базыка (д.м.н., профессор, Киев), А.П. Бирюков (д.м.н., профессор, Москва), Л.А. Бокерия (д.м.н., академик РАН и РАМН, Москва), А.Ю. Бушманов (д.м.н., профессор, Москва), И.И. Дедов (д.м.н., академик РАМН, Москва), В.И. Жарко (Минск), М.П. Захарченко (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Л.А. Ильин (д.м.н., академик РАМН, Москва), К.В. Котенко (д.м.н., профессор, Москва), В.Ю. Кравцов (д.б.н., профессор, Санкт-Петербург), Н.Г. Кручинский (д.м.н., Пинск), Т.В. Мохорт (д.м.н., профессор, Минск), Д.Л. Пиневиц (МЗ РБ, Минск), В.Ю. Рыбников (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Н.Д. Тронько (д.м.н., профессор, Киев), А.Л. Усс (д.м.н., профессор, Минск), В.А. Филонюк (к.м.н., доцент, Минск), Р.А. Часнойть (к.э.н., Минск), В.Е. Шевчук (к.м.н., Минск), В.Д. Шило (Минск)

Технический редактор

С.Н. Никонович

Адрес редакции 246040 г. Гомель, ул. Ильича, д. 290,
ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ», редакция журнала
тел (0232) 38-95-00, факс (0232) 37-80-97
<http://www.mbp.rcrm.by> e-mail: mbp@rcrm.by

© Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека», 2020

№ 1(23)

2020

Medical and Biological Problems of Life Activity

Scientific and Practical Journal

Founder

Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

Journal registration
by the Ministry of information
of Republic of Belarus

Certificate № 762 of 6.11.2009

© Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

ISSN 2074-2088

Обзоры и проблемные статьи

- Ю.В. Бондарева, А.В. Величко, Т.А. Величко
Анатомо-гистологические особенности строения паращитовидных желез (обзор литературы) 6
- А.Н. Котеров, Л.Н. Ушенкова, М.В. Калинина, А.П. Бирюков
Краткий обзор мировых исследований лучевых и нелучевых эффектов у работников ядерной индустрии 17
- М.И. Краснобаева, И.С. Соболевская, О.Д. Мяделец
Циркадные ритмы – как один из факторов регуляции биологии волосяных фолликулов (обзор литературы) 32
- О.В. Петкевич, З.А. Дундаров
Феномен транслокации кишечной микробиоты у умерших органных доноров (обзор литературы) 41
- С.А. Цуканова, А.В. Жарикова, А.Н. Цуканов, О.В. Кобылко, В.И. Ходулев
Патофизиологические механизмы дискогенных поясничных радикулопатий (Обзор литературы) 48

Медико-биологические проблемы

- И.В. Веялкин, Ю.В. Чайкова, С.Н. Никонич, Е.А. Дрозд, О.Ф. Сороко, О.Н. Захарова, С.В. Панкова, О.П. Овчинникова, И.П. Боровская
Оценка рисков для здоровья у работников Полесского государственного радиационно-экологического заповедника 59
- А.С. Владыко, Е.П. Счесленок, Е.Г. Фомина, Е.Е. Григорьева, Т.В. Школина, Н.А. Дубков, П.А. Семижон
Особо опасные парамиксовирусы Нипа и Хендра 66
- Н.А. Козелько, Е.В. Толстая
Взаимосвязь психологического состояния у подростков и предпочитаемых компьютерных игр 79

Reviews and problem articles

- Y.V. Bondareva, A.V. Velichko, T.A. Velichko
Anatomical and histological features of the structure of parathyroid glands (literature review) 6
- A.N. Koterov, L.N. Ushenkova, M.V. Kalinina, A.P. Biryukov
Brief review of world researches of radiation and non-radiation effects in nuclear industry workers 17
- M.I. Krasnobaeva, I.S. Sobolevskaya, O.D. Myadelets
Circadian rhythms - as one of the factors in the regulation of the biology of hair follicles 32
- O.V. Petkevich, Z.A. Dundarov
The phenomenon of intestinal microbiota translocation of deceased organ donors (review of literature) 41
- S.A. Tsukanova, A.V. Zharikova, A.N. Tsukanov, O.V. Kobylko, V.I. Hodulev
Pathophysiological mechanisms of lumbar disc radiculopathies [literature review] 48

Medical-biological problems

- I.V. Veyalkin, Yu.V. Chaykova, S.N. Nikonovich, E.A. Drozd, O.F. Soroko, O.N. Zakharova, S.V. Pankova, O.P. Ovchinnikova, I.P. Borovskaya
Health risk assessment for employees of the Polesky State Radiation-Ecological Reserve 59
- A.S. Vladyko, E.P. Scheslenok, E.G. Fomina, E.E. Grigorieva, T.V. Schkolina, N.A. Dubkov, P.A. Semizhon
Especially dangerous paramixoviruses Nipah and Hendra 66
- N.A. Kozelko, E.V. Tolstaya
The relationship of the psychological state in adolescents and preferred computer games 79

В.С. Костюнина, Е.В. Васина, Н.В. Гончарова, Н.В. Петёвка Закономерности развития гранулоцитарно-моноцитарного и мегакариоцитарного ростков миелопоэза CD34+ клеток пуповинной и периферической крови	86	V.S. Kostyunina, E.V. Vasina, N.V. Goncharova, N.V. Petyovka Developmental patterns of granulocyte-monocyte and megakaryocyte lineages from cord and peripheral blood CD34+ cells	
Т.А. Прокопенко, Н.И. Нечипуренко, А.Н. Батян, И.Д. Пашковская, А.П. Зажогин Морфологическая структура биожидкостей и про-, антиоксидантное состояние у пациентов с хронической ишемией мозга при использовании лазерной гемотерапии	94	T.A. Prokopenko, N.I. Nechipurenko, A.N. Batyan, I.D. Pashkovskaya, A.P. Zajogin Morphological structure of bioliquid and pro-, antioxidant state in patients with chronic cerebral ischemia under of laser hemotherapy	
Л.Н. Эвентова, А.Н. Матарас, Г.Н. Евтушкова, Н.Г. Власова Усовершенствование метода оценки доз облучения населения в ситуации существующего облучения после аварии на Чернобыльской АЭС	102	L.N. Eventova, A.N. Mataras, G.N. Evtushkova, N.G. Vlasova Improvement of the method for assessment of doses of exposed population in the current radiation situation after Chernobyl accident	
<i>Клиническая медицина</i>		<i>Clinical medicine</i>	
М.В. Белевцев, Е.А. Ласюков, М.Г. Шитикова, А.Н. Купчинская, Ю.Е. Марейко, Л.В. Мовчан, Т.В. Шман Особенности восстановления субпопуляций лимфоцитов у пациентов с первичными иммунодефицитами после аллогенной трансплантации гемопоэтической стволовой клетки	109	M.V. Belevtsev, J.A. Lasjukov, M.G. Shytikova, A.N. Kupchinskaya, J.E. Mareiko, L.V. Movchan, T.V. Shman Features of recovery of lymphocyte subpopulations in patients with primary immunodeficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	
С.В. Зыблева Периферические дендритные клетки в диагностике ранней дисфункции почечного трансплантата	118	S.V. Zybleva Peripheral dendritic cells in the diagnosis of early allograft dysfunction	
Э.В. Могилевец, Л.Ф. Васильчук Лечение многократно рецидивирующего кровотечения из варикозно расширенных вен пищевода и желудка	123	E.V. Mahiliavets, L.F. Vasilchuk Consecutive approach in treatment of resistant bleeding from esophageal varices	
И.В. Орадовская, Т.Т. Радзивил Иммунный статус персонала Сибирского химического комбината при наличии хронических заболеваний	135	I.V. Oradovskaya, T.T. Radzivil Immune status of personnel of Siberian chemical plant in the presence of chronic diseases	

Н.Н. Усова, А.Н. Цуканов, Т.В. Дробова,
А.П. Савостин, В.В. Мельник

Бессимптомный синдром запястного
канала у женщин молодого возраста 148

Т.М. Шаршакова, В.А. Рожко, И.В. Веялкин
Комплексная организационно-меди-
цинская оценка формирования первич-
ной заболеваемости аутоиммунным
тиреоидитом в Республике Беларусь 154

Обмен опытом

В.Я. Латышева, А.Е. Филюстин,
Н.В. Юрашкевич, В.В. Рожин, Г.В. Коваль-
чук, А.А. Лапеко

Семиотика, диагностика и лечение
гнойного эпидурита. Клинические на-
блюдения 161

М.Г. Русаленко, В.В. Сукристый, И.Г. Сава-
стеева, С.В. Панкова

Распространенность хронических забо-
леваний по результатам диспансериза-
ции сотрудников ГУ «РНПЦ радиаци-
онной медицины и экологии человека» 169

Е.С. Пашинская

Способ культивации *Toxoplasma gondii*
на мышинной модели *in vivo* 176

Юбилей

Захарченко Михаил Петрович
(к 70-летию со дня рождения) 180

N.N. Usova, A.N. Tsukanov, T.V. Drobova,
A.P. Savostin, V.V. Melnik

Asymptomatic carpal tunnel syndrome in
young women

T.M. Sharshakova, V.A. Rozhko, I.V. Veyalkin
Integrated organizational and medical
estimation of primary incidence rates of
autoimmune thyroiditis in the Republic
of Belarus

Experience exchange

V.Ya. Latysheva, A.E. Filustin, N.V. Yurashk-
evich, V.V. Rozhin, G.V. Kovalchuk, A.A. La-
peko

Semiotics, diagnostics and treatment of
purulent epiduritis. Clinical cases

M.G. Rusalenko, V.V. Sukristy, I.G. Savaste-
eva, S.V. Pankova

The prevalence of chronic diseases based on
the results of dispensary examination of em-
ployees of the Republican research center
for radiation medicine and human ecology

E.S. Pashinskaya

The method of cultivation of *Toxoplasma*
gondii in a mouse model *in vivo*

Jubilee

Zaharchenko Mihail Petrovich
(On the 70th anniversary)

УДК 612.119:[616.155.34+616.155.244]:
618.48-018:616.15

В.С. Костюнина, Е.В. Васина,
Н.В. Гончарова, Н.В. Петёвка

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАЗВИТИЯ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МОНОЦИТАРНОГО И МЕГАКАРИОЦИТАРНОГО РОСТКОВ МИЕЛОПОЭЗА CD34+ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий», г. Минск, Беларусь

Проведена 6-суточная экспансия CD34+ клеток пуповинной крови и мобилизованных Г-КСФ CD34+ клеток периферической крови (ПК) на подложке мезенхимных стромальных клеток костного мозга в присутствии ростовых факторов SCF, Flt3-лиганда и тромбopoэтина. Прирост ядрoсoдepжaщих клеток (ЯСК) и CD34+ клеток пуповинной крови был выше: 33 (23-42) разa и 13 (11-16) раз соответственно против 15 (7-18) и 9 (7-11) раз в периферической крови, различия статистически значимы. Прирост КОЕ-Э и БОЕ-Э, КОЕ-Г и КОЕ-ГЭММ после экспансии соответствовал приросту ЯСК. Отличительной особенностью экспансии пуповинной крови в сравнении с ПК является преимущественный прирост КОЕ-М и КОЕ-ГМ (130 (37-175) против 28 (4-62) раз, $p=0,003$ и 44 (11-218) против 10 (2-37), $p=0,025$). При этом прирост КОЕ-Мк пуповинной крови был ниже ожидаемого и не отличался от ПК (19 (9-20) против 20 (5-49) раз, $p=0,7$), что согласуется с данными о неэффективной коррекции тромбоцитопении после трансплантации пуповинной крови, подвергнутой экспансии *ex vivo*. Мегакариоцитарные предшественники пуповинной и периферической крови после экспансии отличались по экспрессии CD34: 2% (0,6-8,1) и 11% (6-23) соответственно. Пролиферативный ответ стволовых и прогениторных CD34+ клеток пуповинной и периферической крови на внешние стимулы *in vitro* обусловлен онтогенетическими различиями регуляции миелопоэза новорожденного и взрослого человека. Несмотря на одинаковые культуральные условия, только в культуре пуповинной крови наблюдается перераспределение долей КОЕ: значительный прирост моноцит-содержащих колоний (КОЕ-М и КОЕ-ГМ) и угнетение мегакариоцитарного ростка.

Ключевые слова: CD34+ клетки, экспансия *in vitro*, пуповинная кровь, КОЕ-ГМ, КОЕ-Мк

Введение

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) пуповинной крови для лечения как детей, так и взрослых применяется в течение более чем тридцати лет. Однако, в отличие от трансплантации ГСК периферической крови (ПК) или костного мозга (КМ), после трансплантации пуповинной крови у пациентов наблюдается длительный дефицит форменных элементов крови, вызванный отсроченным приживлением стволовых кроветворных клеток. Так, тромбоцитопения при трансплантации ГСК ПК составляет в среднем 13 суток, нейтропения – 11 суток, тогда как при

трансплантации пуповинной крови острый недостаток тромбоцитов длится в среднем 35 суток, а нейтрофилов – 18 суток [1]. Разница в кинетике приживления обусловлена тем, что в отличие от пуповинной крови, в трансплантате ПК содержится в 7-12 раз больше клеток, кратковременно репопулирующих костный мозг [2]. К сокращению времени приживления также приводит увеличение количества клеток в трансплантате. Так, при трансплантации пуповинной крови с объёмом в 2-4 раза больше среднего ($2,5-4,9 \times 10^7$ клеток/кг), восстановление нейтрофилов ($0,5 \times 10^9/\text{л}$) и тромбоцитов ($50 \times 10^9/\text{л}$) наступало в 1,8 раз быстрее ($p < 0,001$) [3].

Одним из способов увеличения объема трансплантата является размножение кроветворных клеток (экспансия) *ex vivo* [4]. Ряд клеточных продуктов, полученных экспансией ГСК пуповинной крови, в настоящее время проходят клинические исследования. По результатам третьей фазы клинических испытаний клеточного продукта NiCord период приживания нейтрофилов сокращается до 11 суток (группа сравнения 21 сутки), что соответствует средней продолжительности нейтропении при трансплантации ПК. Период восстановления тромбоцитов также сокращается в среднем до 34 суток против 46 суток в группе сравнения, однако тромбоцитопения остается в среднем в три раза более длительной в сравнении с трансплантацией ПК [5].

Существуют методы оценки потенциала трансплантата восстанавливать количество тромбоцитов в периферическом русле. Так, суммарное содержание уни- и бипотентных колониеобразующих единиц (КОЕ) гранулоцитов-моноцитов (Г+М+ГМ), или мегакариоцитов (Мк), а также CD41+ клеток в трансплантате ПК отрицательно коррелирует с длительностью периода тромбоцитопении [6, 7]. При трансплантации пуповинной крови подобной закономерности не установлено.

Разработанный и запатентованный нами ранее способ экспансии *ex vivo* CD34+ клеток крови в условиях кратковременного (5-6 суток) сокультивирования с мезенхимными стромальными клетками костного мозга (МСК КМ) в присутствии ростовых факторов SCF, FLT-3L и TPO/IL-3 позволяет размножить и сохранить не только более поздние кроветворные предшественники всех миелоидных ростков, но и долговременно репопулирующие костный мозг ГСК, преимущественно ассоциированные в культуре с подложкой [8, 9]. С целью выявления особенностей развития мегакариоцитарного и гранулоцитарно-моноцитарного ростков миелопоэза нами был проведен анализ содержания и прироста уни- и полипотентных миелоидных

колониеобразующих предшественников в ходе экспансии *in vitro* клеток пуповинной крови в сравнении с экспансией клеток периферической крови в тех же условиях.

Материал и методы исследований

Забор образцов пуповинной крови (n=17) производили после нормальных физиологических родов с информированного согласия рожениц в родильном отделении ГУ РНПЦ «Мать и дитя», г. Минск. Пунктаты КМ здоровых доноров и пациентов, а также лейкоконцентрат периферической крови пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями были предоставлены Республиканским центром гематологии и пересадки костного мозга. В качестве протоколов мобилизации ГСК применялись Г-КСФ-VAD, Г-КСФ-DHAP, Г-КСФ-Dexa-VEAM. МСК костного мозга (n=4) получали, как описано в работе S. Kosmacheva с соавторами [10]. Для исключения сывороточных компонентов ксеногенного происхождения в культуральной среде вместо эмбриональной телячьей сыворотки использовали сыворотку крови человека группы АВ производства РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий.

CD34+ клетки пуповинной и периферической крови получали из мононуклеарной фракции и лейкоконцентрата соответственно методом положительной иммуномагнитной сепарации, согласно инструкции производителя (EasySep, Stemcell Technologies, Канада). Клетки сокультивировали с МСК в бессывороточной среде в присутствии 100 нг/мл SCF, 100 нг/мл Flt3-лиганда и 25 нг/мл TPO (все R&D Systems, США) в течение 5-6-ти суток, как описано ранее [8]. При экспансии CD34+ клеток ПК в совместной культуре использовали аутологичные МСК КМ пациента, в случае пуповинной крови – МСК КМ здоровых доноров. Иммунофенотип кроветворных клеток определяли методом многоцветной проточной цитофлуориметрии с использованием флуоресцентно меченых моноклональных антител к CD14, CD33, CD34, CD36, CD38, CD41, CD45, CD117, HLA-

DR (Beckman Coulter, Франция). Субпопуляционный состав колониеобразующих единиц (КОЕ) исследовали в полужидкой среде с цитокинами (MethoCult GF+ H4435 и MegaCult-C, Stemcell Technologies, Канада) в соответствии с инструкцией производителя. Анализировали прирост колониеобразующих единиц гранулоцитов (КОЕ-Г), моноцитов (КОЕ-М), гранулоцитов-моноцитов (КОЕ-ГМ), колониеобразующих и бурстобразующих единиц эритроцитов (КОЕ-Э+БОЕ-Э), смешанных колоний, содержащих предшественники миелоидного ряда (КОЕ-ГЭММ), мегакариоцитов (КОЕ-Мк). Секретию цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8, Г-КСФ и ГМ-КСФ определяли методом ИФА (Вектор-Бест, Россия; Life Technologies, США) на 2-е сутки после достижения культурами МСК КМ монослоя.

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение GraphPad Prism 7. Для оценки различий двух групп использовали t-критерий Стьюдента при нормальном распределении выборок и U-критерий Манна-Уитни в качестве непараметрического метода сравнения. Данные представлены в виде среднего значения (М) для нормально распределенных выборок или медианы (Ме) в случае ненормального распределения и 95% доверительного интервала (95% ДИ).

Результаты исследования

Исходные фракции CD34+-обогащенных моноклеаров пуповинной крови (Ме = 90%, 82-96, n=17,) и лейкоконцентрата Г-КСФ-мобилизованных клеток периферической крови (Ме=95%, 72-99, n=8) были представлены преимущественно коммитированными миелоидными предшественниками с фенотипом CD33+CD38+CD117+HLA-DR+ (более 90%). И те, и другие CD34+ клетки экспрессировали CD45. В результате экспансии *in vitro* количество ядросодержащих клеток (ЯСК) пуповинной крови увеличилось в 33 раза (М, 23-42, n=11), тогда как периферической – только в 13 раз (М, 11-16, n=16), количество CD34+ клеток в 15

(Ме, 7-18) и 9 раз (М, 7-11) соответственно. Различия были статистически значимы (p=0,004 и p=0,013).

Содержание CD41+ мегакариоцитарных клеток в исходных CD34+ фракциях пуповинной и периферической крови не отличалось и составляло 6% (Ме, 1-14, n=7) и 4% (Ме, 3-9), из них 1,3% (Ме, 0,3-5,9) и 1,6% (Ме, 0,2-3) находились в примесной CD34- популяции клеток. По данным проточной цитометрии клетки субпопуляций CD41+CD34+ и CD41+CD34- имеют сходные размеры, гранулярность и морфологию, образуют популяцию, находящуюся в регионе бластов. В ходе экспансии в пуповинной крови содержание CD41+CD34+ и CD41+CD34- клеток статистически значимо не изменялось (2% (Ме), 0,6-8,1 и 3% (Ме), 1-8 соответственно), таким образом, их количество увеличивалось пропорционально общему приросту ЯСК. В ПК происходило увеличение содержания CD41+ клеток до 15% (Ме, 7-26, n=6, p=0,036). Основной прирост CD41+ клеток периферической крови происходил за счет фракции CD41+CD34+ клеток: после экспансии их доля увеличилась с 4% (Ме, 3-6) до 11% (Ме, 6-23), тогда как доля CD41+CD34- клеток статистически значимо не изменилась (1,6% (Ме, 0,2-3) на 1-е и 2% (Ме, 1-6) на 6-е сутки экспансии). Литературные данные подтверждают наличие двух типов мегакариоцитарной дифференцировки, связанных с экспрессией CD34: в пуповинной крови вследствие альтернативного пути созревания предшественники имеют преимущественно фенотип CD41+CD34-, тогда как в культуре ПК – CD41+CD34+ [11]. В результате, несмотря на значимую разницу по приросту общего числа ЯСК, полученное на 6-е сутки экспансии количество CD41+ клеток в культурах пуповинной крови и ПК не различалось (рисунок 1).

Используемая при экспансии комбинация цитокинов способствует главным образом приросту ранних некоммитированных предшественников. При этом рецептор к SCF сохраняется на клетках гранулоцитарно-моноцитарного ростка до поздних ста-

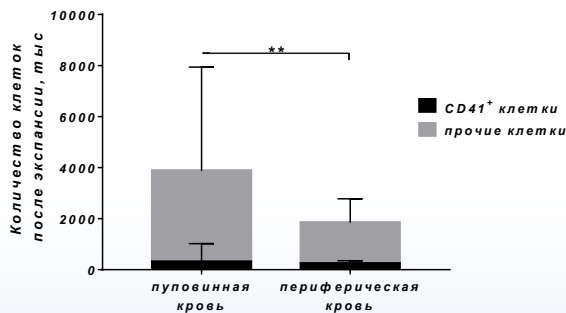


Рисунок 1 – Количество ЯСК и CD41+ клеток пуповинной и периферической крови на 6-е сутки экспансии 100 тыс. CD34+ клеток (Me, 95% ДИ)

дий созревания, что будет способствовать их преимущественному преобладанию [12]. После экспансии содержание коммитированных клеток гранулоцитарно-моноцитарного ряда (CD14+, CD15+) в культуре статистически значимо увеличивалось (таблица 1). Одновременно увеличивалась доля клеток, выражающих CD36 – общий маркер ранних бипотентных эритроидно-мегакариоцитарных предшественников и созревающих моноцитов.

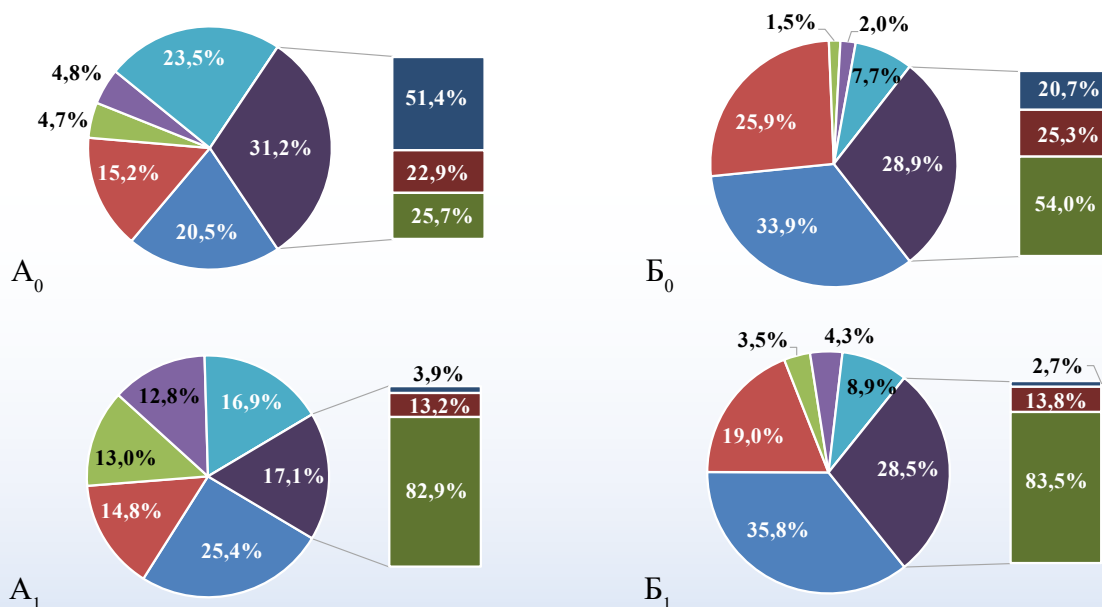
Анализ колониеобразования показал, что в исходных культурах клеток пуповин-

Таблица 1 – Содержание клеток пуповинной крови, несущих линейно-специфические маркеры до и после экспансии *in vitro*

Фенотип	Содержание клеток (Me, 95% ДИ), %	
	до экспансии (n=5)	после экспансии (n=5)
CD41+	5,9 (1,3-14,1)	3,2 (2,7-20)
CD14+	2,9 (2-4,3)	10 (7,7-19,6)*
CD15+	4,7 (4-6,6)	26,5 (26,3-30,7)*
CD36+	11 (8-14)	29,8 (24,9-43,4)*

* – различия статистически значимы при $p < 0,05$.

ной и периферической крови содержание КОЕ-Мк не отличалось, тогда как их распределение по размерам было различным (рисунок 2 A₀, B₀). Размеры КОЕ-Мк свидетельствуют о пролиферативном потенциале колониеобразующей клетки и косвенно указывают на её степень созревания: ранние предшественники образуют более крупные колонии. Исходно среди КОЕ-Мк пуповинной крови, в отличие от ПК, преобладали крупные колонии с числом более 50 мегакариоцитов. После экспансии распределение колоний по размерам внутри



А – пуповинная кровь, Б – периферическая кровь;

0 – до экспансии *in vitro*, 1 – после экспансии *in vitro*

Рисунок 2 – Субпопуляционный состав КОЕ CD34+-обогащенных фракций пуповинной и периферической крови (обозначения в тексте)

мегакариоцитарного роста становилось одинаковым в пуповинной крови и в ПК. Преимущественно образовывались малочисленные колонии, содержащие не более 20 мегакариоцитов (рисунок 2 А₁, Б₁). Образование более крупных КОЕ-Мк клетками пуповинной крови в сравнении с ПК описывается как одно из основных различий между данными типами клеток [13]. После экспансии доля КОЕ-Мк пуповинной крови в общем пуле миелоидных КОЕ, в отличие от ПК, снижалась почти в 2 раза (рисунок 2 А₁, Б₁).

Приросты большинства миелоидных колоний (КОЕ-Э+БОЕ-Э, КОЕ-Г и КОЕ-ГЭММ) после экспансии клеток пуповинной крови и ПК соответствовали приростам ЯСК. Приросты КОЕ-Мк пуповинной крови в среднем были почти в 2 раза ниже прироста ЯСК, тогда как в ПК наблюдалась обратная закономерность. При этом приросты КОЕ-Мк в пуповинной крови и ПК не имели статистически значимых различий ($p=0,7$) (рисунок 3) и составляли 19 (9-20) и 20 (5-49) раз соответственно, что согла-

суется с данными анализа CD41+ клеток методом проточной цитометрии.

Среди КОЕ других ростков кроветворения в исходной фракции CD34+ клеток пуповинной крови выявлялось большее содержание мультипотентных КОЕ-ГЭММ, чем в ПК, тогда как в ПК была большая, чем в пуповинной крови, доля унипотентных БОЕ и КОЕ эритроидного и гранулоцитарного ростков (рисунок 2 А₀, Б₀). Содержание КОЕ-М и КОЕ-ГМ в обоих случаях было незначительным и не превышало 2-5% от всех миелоидных колоний (рисунок 2 А₀, Б₀). После экспансии ПК сумма уни- и бипотентных КОЕ гранулоцитарно-моноцитарного ряда (КОЕ-Г+М+ГМ) значимо не менялась в субпопуляционном составе, также как и пропорция мультипотентных и эритроидных КОЕ. Однако доля КОЕ-М и КОЕ-ГМ увеличивалась с 1,5-2% до 4% за счет снижения содержания КОЕ-Г (рисунок 2 Б₀, Б₁). В случае пуповинной крови доля уни- и бипотентных КОЕ, содержащих предшественники моноцитов (КОЕ-М и КОЕ-ГМ), также увеличивалась (до 13% каждая), тогда как доля КОЕ-Г оставалась постоянной. В результате в культуре клеток пуповинной крови, полученной после экспансии, количество КОЕ моноцитарного ряда стало сопоставимо с количеством других миелоидных КОЕ (КОЕ-Г, КОЕ-ГЭММ) (рисунок 2 А₁).

Отличительной особенностью экспансии пуповинной крови в сравнении с ПК является преимущественный прирост КОЕ-М и КОЕ-ГМ 101, (37-175) против 14 (4-62) раз, $p=0,003$ и 92 (11-218) против 10 (2-37), $p=0,025$) (рисунок 3). Преимущественный прирост уни- и бипотентных предшественников моноцитарного ростка *in vitro* может быть стимулирован условиями культивирования: добавлением в питательную среду рекомбинантного Flt3-лиганда и секрецией подложкой МСК цитокинов, поддерживающих данный росток. 60-80% CD34+ клеток несут рецептор Flt3, экспрессия которого значительно возрастает при созревании клеток в гранулоцитарно-моноцитарном направ-

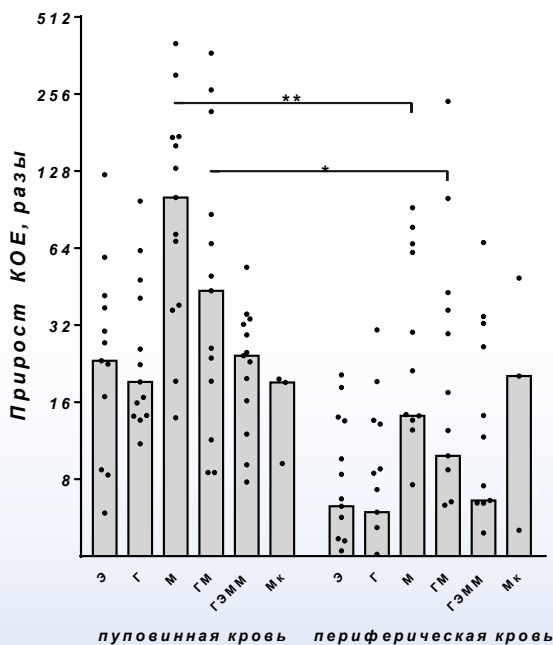


Рисунок 3 – Приросты КОЕ после экспансии CD34+ клеток пуповинной или периферической крови *in vitro* в течение 6 суток (обозначения в тексте)

лении, тогда как на предшественниках мегакариоцитарно-эритроидного ростка – сокращается. Кроме того, рецептор Flt3 выявляется и на более зрелых миеломоноцитарных клетках [14].

Известно, что 30-50% CD34+ клеток экспрессируют рецептор к ИЛ-6, при этом большая часть этих клеток дает начало КОЕ-ГМ [3, 5]. В двухдневной кондиционированной среде от культур МСК КМ методом ИФА нами была выявлена высокая биологически значимая концентрация ИЛ-6 (4,1 (3,5-4,6) нг/мл). Содержание хемокина ИЛ-8, гранулоцитарного и гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующих факторов было низким или не выявлялось используемыми тест-системами (0,3 (0,15-0,4) нг/мл, <20 пг/мл и 3 пг/мл соответственно).

Культуральные условия не могут объяснить повышенный прирост КОЕ-М и КОЕ-ГМ в пуповинной крови в сравнении с ПК. Выявленные различия могут быть связаны с особенностями гемопоэза у детей и взрослых. Типы миелоидных клеток у новорожденных и взрослых отличаются функционально, и даже одинаковые условия культивирования не всегда нивелируют эту разницу, как показано при получении эритроцитов пуповинной крови, содержащих фетальный гемоглобин, или мегакариоцитов, существенно отличающихся по ploидности и, соответственно, по способности к тромбоцитобразованию от аналогичных клеток взрослого. В отличие от клеток эритроидного и мегакариоцитарного ростков, способность моноцитов и гранулоцитов новорожденных к фагоцитозу и цитотоксической активности уступает взрослому незначительно и проявляется только в сужении спектра инфекций [15]. Повышенный прирост колоний унипотентных предшественников моноцитарного ряда и рост содержания CD14+ клеток в пуповинной крови при экспансии *in vitro* указывает на онтогенез-обусловленные особенности моноцитарного ростка кроветворения. Выявленные закономерности согласуются с данными по увеличению

в 1,7 раза количества КОЕ-М в ПК детей в LTC-IC-тесте в сравнении с клетками взрослых [16] и более эффективному приживлению моноцитарного ростка после трансплантации пуповинной крови [17].

Прирост CD41+ и КОЕ-Мк пуповинной крови в наших исследованиях значимо не отличался от ПК. По-видимому, количественный прирост данных клеток полностью не компенсирует их функционально-качественные отличия, – в частности, низкую экспрессию на мегакариоцитарных предшественниках пуповинной крови хемокинового рецептора CXCR4, отвечающего за миграцию в КМ [13]. Поэтому предварительная экспансия пуповинной крови *ex vivo* может иметь меньшее влияние на приживление тромбоцитарного ростка после внутривенной трансплантации, чем на приживление нейтрофильного и моноцитарного.

Заключение

Экспансия CD34+ клеток пуповинной крови на подложке МСК КМ в присутствии цитокинов SCF, Flt3-лиганда и ТРО приводит к статистически значимо большему приросту ядросодержащих и CD34+ клеток, чем экспансия ПК в тех же условиях ($p=0,004$ и $p=0,013$). После экспансии популяция клеток пуповинной крови, коммитированных в мегакариоцитарном направлении, представлена в равной степени CD41+CD34+ и CD41+CD34- клетками, тогда как ПК – преимущественно CD41+CD34+ клетками. Общий прирост CD41+ клеток не отличается в зависимости от источника крови ($p>0,05$).

Показано, что CD34+ клетки пуповинной крови и ПК по-разному отвечают на одни и те же стимулы в культуре *in vitro*, что может быть обусловлено различиями регуляции миелопоэза в процессе онтогенеза. Отличительной особенностью экспансии пуповинной крови в сравнении с ПК является преимущественный прирост КОЕ-М и КОЕ-ГМ, который приводит к увеличению их пропорции до значений, сопоставимых с гранулоцитарным рост-

ком. При этом прирост КОЕ-Мк пуповинной крови – ниже ожидаемого в два раза и не отличается от аналогичного для ПК. После экспансии в культуре пуповинной крови наблюдается перераспределение долей КОЕ: увеличение пропорции моноцит-содержащих колоний (КОЕ-М и КОЕ-ГМ) и относительное угнетение мегакариоцитарного роста.

Коллектив авторов выражает благодарность за предоставленные для исследования образцы КМ, лейкоцитарного концентрата и пуповинной крови заведующему отделением анестезиологии и реанимации №3 (гематологическим) ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» Оводу Александру Евгеньевичу и врачу родильного отделения ГУ РНПЦ «Мать и дитя», г. Минск Литвинович Наталье Георгиевне. А также сотруднику ГУ РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова Северину Игорю Николаевичу за анализ иммунофенотипа клеток методом проточной цитометрии.

Исследования проведены в рамках грантов Программы Союзного государства «Разработка новых методов и технологий восстановительной терапии патологически измененных тканей и органов с использованием стволовых клеток» и ГНПТ «Новые технологии диагностики и лечения», подпрограмма «Трансплантология и регенеративная медицина».

Библиографический список

1. Comparative outcomes between cord blood transplantation and bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation from unrelated donors in patients with hematologic malignancies: a single-institute analysis / Y. Chen [et al.] // Chinese medical journal. – 2013. – №. 13. – P. 2499-2503.

2. Hematopoietic activity of human short-term repopulating cells in mobilized peripheral blood cell transplants is restricted to the first 5 months after transplantation / O. Zavidij [et al.] // Blood. – 2010. – №. 24. – P. 5023-5025. doi: 10.1182/blood-2010-02-271528

3. Barker, J.N. Combined effect of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies/ J.N. Barker, A. Scaradavou, C.E. Stevens // Blood. – 2010. – №. 9. – P. 1843-1849. doi: 10.1182/blood-2009-07-231068

4. Lund, T.C. Umbilical cord blood expansion: are we there yet? / T.C. Lund // Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2018. – №. 7. – P. 1311-1312. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.05.002

5. Phase I/II study of stem-cell transplantation using a single cord blood unit expanded *ex vivo* with nicotinamide / M.E. Horwitz [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2019. – №. 5. – P. 367. doi: 10.1200/JCO.18.00053

6. Relationship of infused CFU-GM and CFU-Mk mobilized by chemotherapy with or without G-CSF to platelet recovery after autologous blood stem cell transplantation / Y. Takamatsu [et al.] // Experimental hematology. – 1995. – №. 1. – P. 8-13.

7. CD41+ and CD42+ hematopoietic progenitor cells may predict platelet engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation / T. Demirer [et al.] // Journal of Clinical Apheresis: The Official Journal of the American Society for Apheresis. – 2001. – №. 2. – P. 67-73. doi: 10.1002/jca.1015

8. Васина, Е.В. Экспансия кроветворных клеток пуповинной и периферической крови в совместной культуре с механизмами стромальными клетками человека / Е.В. Васина, В.С. Костюнина, Н.В. Петёвка // Гематология и трансфузиология. – 2015. – Т. 60, № 2. – С. 22-26.

9. Петёвка, Н.В. Способ экспансии *ex vivo* кроветворных клеток человека: пат. 26459 Евраз.: МПК С12N 5/078, С12N 5/0789 / Н.В. Петёвка, Е.В. Васина, В.С. Костюнина; заявитель и патентообладатель: РНПЦ трансфузиол. и мед. биотехнологии. – №201500099; заявл. 27.11.14; опубл. 28.04.17, Бюл. № 4. – 1 с.

10. Hepatogenic potential of human bone marrow and umbilical cord blood mesenchymal stem cells / S.M. Kosmacheva [et al.] // Bulletin of experimental biology and medi-

cine. – 2011. – №. 1. – P. 142-149. doi: 10.1007/s10517-011-1276-1

11. Different expression of CD41 on human lymphoid and myeloid progenitors from adults and neonates / N. Debili [et al.] // *Blood*. – 2001. – №. 7. – P. 2023-2030. doi: 10.1182/blood.v97.7.2023

12. Ex vivo expansion of megakaryocyte progenitor cells: cord blood versus mobilized peripheral blood / C.D. Bruyn [et al.] // *Stem cells and development*. – 2005. – №. 4. – P. 415-424. doi: 10.1089/scd.2005.14.415

13. Liu, Z.J. Neonatal and adult megakaryopoiesis / Z.J. Liu, M. Sola-Visner // *Current opinion in hematology*. – 2011. – №. 5. – P. 330-337. doi: 10.1097/MOH.0b013e3283497ed5

14. Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase / I. Rappold [et al.] // *Blood*. – 1997. – №. 1. – P. 111-125.

15. Marodi, L. Characteristics and functional capacities of human cord blood granulocytes and monocytes / L. Marodi, P.C.J. Leijh, R. Van Furth // *Pediatric research*. – 1984. – №. 11. – P. 1127. doi: 10.1203/00006450-198411000-00014

16. Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood CD34+ cells from children contain the same levels of long-term culture-initiating cells producing the same numbers of colony-forming cells as those from adults, but display greater *in vitro* monocyte/macrophage potential / N. Boiret [et al.] // *British journal of haematology*. – 2001. – №. 3. – P. 806-813. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02604.x

17. Monocyte Subpopulation Recovery as Predictors of Hematopoietic Cell Transplantation Outcomes / L.M. Turcotte [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2019. – №. 5. – P. 883-890. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.01.003

V.S. Kostyunina, E.V. Vasina, N.V. Goncharova, N.V. Petyovka

DEVELOPMENTAL PATTERNS OF GRANULOCYTE-MONOCYTE AND MEGAKARYOCYTE LINEAGES FROM CORD AND PERIPHERAL BLOOD CD34+ CELLS

The 6-days expansion of cord blood (CB) and mobilized peripheral blood (PB) CD34+ cells in co-culture with BM MSCs with addition of SCF, Flt3 ligand and TPO was performed. Fold expansion of CB cells was higher: 33 (23-42) for CB nucleated cells (TNC) vs 13 (11-16) for PB TNC ($p=0,004$) and 15 (7-18) for CB CD34+ cells vs. 9 (7-11) for PB CD34+ cells ($p=0,013$). The mean fold expansion of CFU-E, BFU-E, CFU-G, CFU-GEMM cord blood was comparable to TNC fold increase. The high production of CFU-M and CFU-GM after the CB expansion is a distinctive difference of CB myelopoiesis, in contrast to PB cells (130 (37-175) vs. 28 (4-62), $p = 0,003$; 44 (11-218) vs. 10 (2-37), $p = 0,025$). CB CFU-Mk fold expansion was lower than expected and was the same as PB CFU-Mk (19 (9-20) vs. 20 (5-49), $p = 0,7$). These data is consistent with ineffective counteraction of chemotherapy-induced thrombocytopenia by transplantation of expanded CB. Different CD34 expression on CB and PB megakaryocyte progenitors was observed. Ontogenically related myelopoiesis of CB and PB cells leads to different proliferative responses to cultural stimuli. Despite the same cultural conditions, only in the CB culture there was a redistribution of CFU proportions: a significant increase of monocyte-containing colonies (CFU-M and CFU-GM) and inhibition of the megakaryocytic lineage.

Key words: CD34+ cells, expansion *in vitro*, cord blood, CFU-GM, CFU-Mk

Поступила 30.12.2019