

# ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗЫ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Мамонов В.Е.<sup>\*</sup>, Садовская А.В., Петинати Н.А., Шипунова И.Н., Дорофеева А.И., Дризе Н.И., Лукина Е.А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, г. Москва, Российская Федерация

## РЕЗЮМЕ

**Введение.** При проведении заместительной ферментной терапии у больных болезнью Гоше (БГ) рекомбинантной глюкоцереброзидазой (ГЦБ) наблюдаются изменения в костной ткани, которые могут быть обусловлены нарушением дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК).

**Цель** — изучить изменения в МСК здоровых доноров и больной БГ при культивировании в присутствии ГЦБ.

**Методы.** МСК выделяли из костного мозга 17 здоровых доноров и 1 больной БГ стандартным методом, культивировали в присутствии различных концентраций ГЦБ после второго пассажа от 2 до 7 недель. Анализировали пролиферацию клеток, способность к дифференцировке, в том числе после индукции. Оценку проводили методами дифференциального окрашивания, элюции и экспрессии генов — маркеров дифференцировки методом ПЦР в реальном времени.

**Результаты.** Низкие дозы рекомбинантной ГЦБ (0,25–1,5 ед/мл) не влияли на пролиферативную активность МСК. Длительное культивирование МСК в присутствии низких концентраций ГЦБ приводило к изменению дифференцировочного потенциала этих клеток в направлении адипогенеза. Дозы фермента 3–5 ед/мл угнетали пролиферацию МСК и вызывали существенные изменения в дифференцировке клеток. Высокие концентрации ГЦБ (7–10 ед/мл) обладали цитотоксическим эффектом и приводили к гибели клеток в течение одного пассажа. Пролиферативный и дифференцировочный потенциал МСК больной БГ существенно отличались от клеток здоровых доноров по исследованным параметрам.

**Заключение.** Культивирование МСК доноров в присутствии рекомбинантной ГЦБ изменяет пролиферацию и дифференцировочный потенциал этих клеток. Эти изменения зависят от дозы фермента в среде и длительности культивирования.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, глюкоцереброзидаза, дифференцировка, экспрессия генов

**Благодарности:** авторы благодарят сотрудников отделения химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток и Отдела орфанных заболеваний за предоставление материала для исследования.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** работа выполнена в рамках государственного задания «Оптимизация диагностики, лечения и мониторинга неопухольных заболеваний крови у взрослых на основе молекулярно-генетических, иммунофенотипических, биологических параметров», рег. № НИОКТР 122012700239–9.

**Для цитирования:** Мамонов В.Е., Садовская А.В., Петинати Н.А., Шипунова И.Н., Дорофеева А.И., Дризе Н.И., Лукина Е.А. Влияние рекомбинантной глюкоцереброзидазы на пролиферацию и дифференцировку мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека. Гематология и трансфузиология. 2024; 69(3):330–343. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2024-69-3-330-343>

# EFFECT OF GLUCOCEREBROSIDASE ON HUMAN BONE MARROW MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL

Mamonov V.E.\*; Sadovskaya A.V., Petinati N.A., Shipounova I.N., Dorofeeva A.I., Drize N.I., Lukina E.A.

National Medical Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

## ABSTRACT

**Introduction.** During enzyme replacement therapy in patients with Gaucher disease (GD) with recombinant glucocerebrosidase (GCCase), regression of bone manifestations is possible, but with prolonged therapy osteonecrosis may occur. These changes may be due to impaired differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs).

**Aim:** to study changes in the MSCs of healthy donors and a patient with GD when cultured in the presence of GCCase.

**Material and methods.** MSCs were isolated from the bone marrow of 17 healthy donors and a female patient with GD by a standard method and cultured in the presence of various concentrations of GCCase after the second passage from 2 to 7 weeks. Cell proliferation and the ability to differentiate were analyzed, including after induction. The assessment was carried out by differential staining, elution, and expression of differentiation marker genes by real-time PCR.

**Results.** Low concentrations of recombinant GCCase (0.25–1.5 U/ml) did not affect the proliferative activity of MSCs. Prolonged cultivation of MSCs in the presence of low doses of GCCase led to a change in the differentiation potential of these cells in the direction of adipogenesis. Concentrations of GCCase of 3–5 U/ml inhibited the proliferation of MSCs and caused significant changes in cell differentiation. High doses of the enzyme (7–10 U/ml) had a cytotoxic effect and led to cell death within one passage. The proliferative and differentiation potential of the MSCs of a patient with GD differed significantly from the cells of healthy donors in all the parameters studied.

**Conclusion.** The cultivation of donor MSCs in the presence of recombinant GCCase alters the proliferation and differentiation potential of these cells. These changes depend on the dose of the enzyme in the medium and the duration of cultivation.

**Keywords:** multipotent mesenchymal stromal cells, glucocerebrosidase, differentiation, expression of genes

**Acknowledgement:** the authors would like to thank the staff of the Department of Hemoblastosis Chemotherapy and Bone Marrow and Hematopoietic Stem Cell Transplantation and the Department of Orphan Diseases for providing the material for the study.

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**Financial disclosure:** the study was carried out on assignment: "Optimization of diagnosis, treatment and monitoring of non-tumor blood diseases in adults based on molecular-genetic, immunophenotypic, biological parameters" # 122012700239-9.

**For citation:** Mamonov V.E., Sadovskaya A.V., Petinati N.A., Shipounova I.N., Dorofeeva A.I., Drize N.I., Lukina E.A. Effect of glucocerebrosidase on human bone marrow multipotent mesenchymal stromal. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2024; 69(3):330–343 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2024-69-3-330-343>

## Введение

Болезнь Гоше (БГ) — ферментопатия, обусловленная дефицитом активности кислой β-глюкозидазы, или глюкоцереброзидазы (ГЦБ), наследуемым по аутосомно-рецессивному типу. Это одна из наиболее распространенных форм наследственных ферментопатий, объединенных в группу лизосомных болезней накопления [1]. За счет дефицита ГЦБ в лизосомах клеток различных тканей накапливается глюкозилцерамид.

В основном это происходит в клетках моноцитарного-макрофагального ряда. БГ — первая лизосомная болезнь накопления, для которой было разработано эффективное патогенетическое лечение — заместительная ферментная терапия (ЗФТ). Применение ЗФТ при БГ показало существенный регресс гематологических и висцеральных проявлений заболевания [2]. Наряду с этим некоторые костные проявления

БГ не отвечают на патогенетическое лечение, а асептические остеонекрозы могут возникать у больных, длительно получавших ЗФТ даже в высоких дозах. Поэтому костная патология при БГ остается открытой проблемой даже после внедрения в клиническую практику ЗФТ. Поражение скелета при БГ служит показанием к назначению непрерывной длительной ЗФТ высокими дозами рекомбинантной ГЦБ (60 ед./кг каждые 2 недели) [3]. Однако костная ткань реагирует на ЗФТ неодинаково, она в некоторой степени невосприимчива к терапии [4]. Напротив, описано, что комбинация высоких доз ГЦБ и многолетнего воздействия не предупреждает развития такой костной патологии, как остеонекроз, даже если гематологические и висцеральные симптомы хорошо контролируются ЗФТ [5, 6].

Данные, полученные в экспериментах на мышах, свидетельствуют, что возникновение костной патологии при БГ обусловлено нарушением функции остеобластов и их предшественников [7]. Нарушение пролиферации остеобластов зависит от снижения активности протеинкиназы С из-за накопления глюкозилсфингозина и, в меньшей степени, глюкозилцерамида. Накопление сфингозина рассматривается как наиболее вероятная причина повреждения остеобластов в этой модели [8]. Самые ранние доступные для изучения *in vitro* предшественники остеобластов — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга (МСК). Из этих клеток образуются все стромальные клетки костного мозга, включая остециты, хондроциты и адипоциты. МСК также участвуют в регуляции костной массы [9, 10]. Возможно, МСК участвуют в развитии или прогрессии заболевания костей при БГ [11]. Показано, что в МСК больных БГ наблюдается сниженная активность ГЦБ. В связи с этим МСК больных склонны к апоптозу и старению из-за нарушения аутофагии и способности к репарации ДНК [12].

Процесс обновления костной ткани включает резорбцию остеокластами и формирование костной ткани остеобластами. В физиологических условиях эти процессы строго регулируются, в том числе остеокластами, которые являются конечным этапом дифференцировки остеобластов. При БГ нарушена функция остеокластов, имеющих кроветворное происхождение. Некоторые данные свидетельствуют о том, что физиологические процессы, происходящие в остеобластах, тоже изменены [8, 13]. Остеобласты дифференцируются из МСК, и изучение влияния ГЦБ на МСК и их потомки может помочь понять механизмы изменения костной ткани у больных БГ, получающих ЗФТ.

Несмотря на то что некоторые костные проявления БГ наблюдались у больных, длительно получавших ЗФТ [5, 6], до настоящего времени не исследовано влияние рекомбинантной ГЦБ на МСК, в частности на их способность к дифференцировке и пролиферации.

Для изучения действия ЗФТ на человеческие МСК на сегодняшний день доступна только модель *in vitro*.

Целью работы было изучение клеточной пролиферации и экспрессии генов — маркеров дифференцировки в МСК здоровых доноров и больной БГ на различных сроках культивирования в присутствии ГЦБ.

## Материалы и методы

МСК выделяли из 3–5 мл костного мозга, полученного во время эксфузии у доноров и диагностической пункции у больной БГ после подписания ими информированного согласия [14]. МСК культивировали в среде альфа-МЕМ (Hyclone, США) с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (Hyclone, США), 2 мМ глутамин (Hyclone, США), 100 ед/мл пенициллина (ОАО «Синтез», Россия) и 50 мг/мл стрептомицина (ООО «БиоФармГарант», Россия) при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. По достижении конfluence клетки промывали 2 раза раствором Версена и снимали 0,25% трипсином («ПанЭко», Россия). Клетки рассаживали по 4000 на 1 см<sup>2</sup> дна флакона.

В работе использовали МСК 17 здоровых доноров (8 мужчин и 9 женщин, медиана возраста 24 года) и 1 больной БГ (женщина, 53 года, ЗФТ в течение 17 лет, в последние 5 лет в режиме 20 ед./кг 1 раз в месяц) с тяжелыми костными проявлениями заболевания. Для анализа действия фермента МСК на втором пассаже, т.е. когда культура не содержала примесей макрофагов, сажали в 5 мл полной питательной среды по 100 000 на флакон с площадью дна 25 см<sup>2</sup> (Corning, США) и добавляли ГЦБ 1 раз в неделю во время смены среды или пассирования культуры. ГЦБ (препараты «Велаглюцераза альфа» 10 мг (400 ЕД), Shire, США, и «Глуразим» 400 ЕД, «Генериум», Россия) растворяли в воде 10 ед./мкл. Фермент добавляли так, чтобы в 1 мл среды было 1, 2, 3, 4, 5, 7 и 9 ед. фермента. Для изучения пролиферации МСК клетки рассаживали по 1000 на ячейку 96-луночного планшета (Sarstedt, США) и культивировали 7 дней в присутствии различных концентраций ГЦБ. Тест проводили с помощью CellTiter 96 AQ MTS (Promega, США) по инструкции производителя. Оптическую плотность (ОП) измеряли через 3 ч на приборе «Multiscan» (ThermoFisher, США), длина волны 492 нм. Количество клеток в лунке вычисляли с помощью калибровочной кривой по формуле:

$$Y = 7768,5 \times \text{ОП} - 342,08,$$

где Y — число клеток в лунке.

Остеогенную дифференцировку индуцировали добавлением в стандартную культуральную среду 0,1 мкМ дексаметазона (Sigma), 0,15 мМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты тринатриевой соли (Sigma) и 3 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma). Адипогенную дифференцировку индуцировали с помощью 1 мкМ дексаметазона (Sigma), 60 мкМ индометацина (Sigma) и 5 мкг/мл

инсулина (Sigma). Смену соответствующей среды осуществляли каждые 3–4 дня, инкубацию проводили при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub> в течение 14 дней для остеогенной дифференцировки и 21 день для адипогенной. По истечении времени инкубации из части клеток выделяли тотальную РНК, а часть клеток окрашивали для фотografiрования и детекции дифференцировки методом элюции. Для детекции костной дифференцировки использовали краситель, количественно связывающий кальций, — ализариновый красный (ДиАМ, Россия). Из части образцов ализариновый красный элюировали в растворе 20% метанола и 10% уксусной кислоты. Планшеты встряхивали на шейкере в течение 15 мин, а затем измеряли адсорбцию при длине волны 450 нм. Для детекции жировой дифференцировки применяли окрашивание OilRed O (Sigma), количественно связывающим жиры. Из части образцов OilRed O элюировали в изопропанол. Планшеты встряхивали на шейкере в течение 15 мин, а затем измеряли адсорбцию при длине волны 492 нм.

Определение уровня экспрессии генов в МСК осуществляли на всех пассажах методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (модификация Taq-Man) на приборе «CFX96» (Bio-Rad). РНК выделяли с помощью реагента Trizol (Life Technologies,

США), используя стандартный протокол с небольшими модификациями. Обратную транскриптазу (M-MLV, Promega) использовали для построения первых цепей ДНК после гибридизации мРНК со смесью поли-Т праймеров и случайных гексамеров. Гены «домашнего хозяйства» GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа) и BACT (бета-актин) использовали для нормализации образцов; методом ΔΔCt [15] рассчитывали относительный уровень экспрессии (ОУЭ) генов. Состав праймеров представлен в таблице 1.

*Статистический анализ.* Статистический анализ выполняли с помощью программы GraphPad Prism версии 8–1 (GraphPad Software Inc.). Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты

### Влияние рекомбинантной ГЦБ на пролиферативную активность МСК

Добавление различных концентраций ГЦБ до 1,25 ед./мл не влияло на клеточную продукцию МСК, однако добавление от 2 до 5 ед./мл достоверно уменьшало клеточную пролиферацию за 2–3 пассажа в зависимости от культивирования от 1,7 до 2 раз (рис. 1). Добавление ГЦБ в концентрации от 7 до 10 ед./мл приводило к гибели 50–100% клеток.

**Таблица 1.** Нуклеотидные последовательности использованных олигонуклеотидов

**Table 1.** Nucleotide sequences of used Oligonucleotides

Ген Gene	Роль олигонуклеотида Oligonucleotide purpose	Последовательность Sequence
BACT	Праймер прямой/Primer, forward	5'-CAACCCGCGAGAAGATGACC-3'
BACT	Праймер обратный/Primer, reverse	5'-CAGAGGCGTACAGGGATAGC-3'
BACT	Зонд/Probe	ROX-AGACCTTCAACACCCAGCCATGTACG-BHQ2
GAPDH	Праймер прямой/Primer, forward	5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'
GAPDH	Праймер обратный/Primer, reverse	5'-TGGGTGGAATCATATTGGAACA-3'
GAPDH	Зонд/Probe	ROX-CTCTGGTAAAGTGGATATTGTTGCCATCA-BHQ2
PPARG	Праймер прямой/Primer, forward	5'-TACTGTCTGGTTTCAGAAATGC-3'
PPARG	Праймер обратный/Primer, reverse	5'-CAACAGCTTCTCCTTCTCG-3'
PPARG	Зонд/Probe	FAM-CCATCAGGTTTGGGCGGATGCC-RTQ1
FABP4	Праймер прямой/Primer, forward	5'-ATGATAAACTGGTGGTGAAT-3'
FABP4	Праймер обратный/Primer, reverse	5'-TCAATGCGAACTTCAGTCC-3'
FABP4	Зонд/Probe	FAM-TGGCTTATGCTCTCTCATAAACTCTCG-RTQ1
ALPL	Праймер прямой/Primer, forward	5'-GGTCACCTCCATCCTGCG-3'
ALPL	Праймер обратный/Primer, reverse	5'-CATCTCGTTGTCTGAGTACC-3'
ALPL	Зонд/Probe	FAM-CAATGCCACAGATTCCCAGCGTCCT-RTQ1
PTHRI	Праймер прямой/Primer, forward	5'-ATCATCCAGGTGCCATCC-3'
PTHRI	Праймер обратный/Primer, reverse	5'-GGTCTCCCGCAGCTTGGT-3'
PTHRI	Зонд/Probe	FAM-CCTCCATTGTGCTCAACTCATCCTCTTCA-RTQ1
SPP1	Праймер прямой/Primer, forward	5'-ATAGTGTGGTTTATGGACTGAG-3'
SPP1	Праймер обратный/Primer, reverse	5'-ATTCAACTCCTCGCTTCC-3'
SPP1	Зонд/Probe	FAM-CCAGTACCCTGATGCTACAGACGAG-RTQ1
BGLAP	Праймер прямой/Primer, forward	5'-GCAGCGAGGTAGTGAAGAG-3'
BGLAP	Праймер обратный/Primer, reverse	5'-GAAAGCCGATGTGGTCAG-3'
BGLAP	Зонд/Probe	FAM-CTCCCAGCCATTGATACAGGTAGC-RTQ1

При анализе действия ГЦБ на МСК больной БГ была выявлена другая зависимость пролиферации этих клеток от концентрации ГЦБ в культуральной среде: концентрация 1–2 ед./мл увеличивала клеточную продукцию, тогда как более высокие концентрации ее снижали (рис. 2 и 3).

Большие дозы фермента сильно влияли на пролиферацию МСК, и клетки гибли после 2 недель культивирования. В связи с этим эксперименты, связанные с длительным воздействием ГЦБ, были поставлены только для низких концентраций (от 0,25 до 1,5 ед./мл), которые не влияли на пролиферацию МСК.

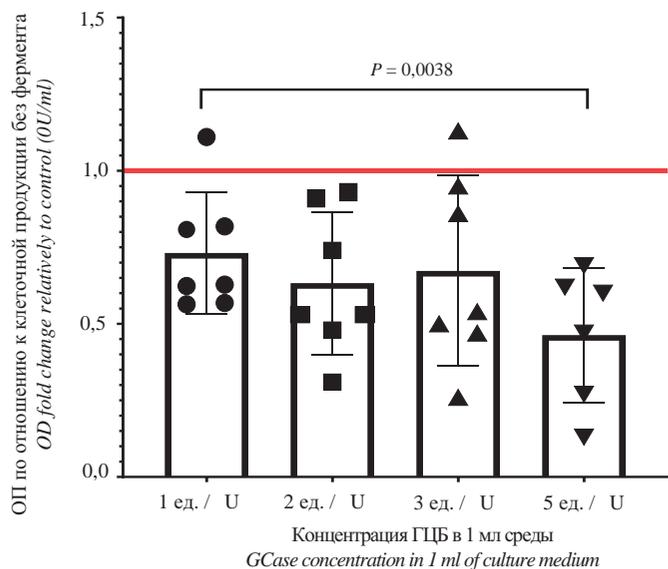
### Влияние рекомбинантной ГЦБ на дифференцировку МСК при длительном культивировании

При длительном культивировании МСК в присутствии низких концентраций ГЦБ менялась экспрессия генов, участвующих в жировой и остеогенной диффе-

ренцировке. Через 48 дней экспрессия генов — маркеров жировой дифференцировки (*PPARG* и *FABP4*) увеличивалась в 2 раза при культивировании в среде с добавлением 1,5 ед./мл ГЦБ (рис. 3 А).

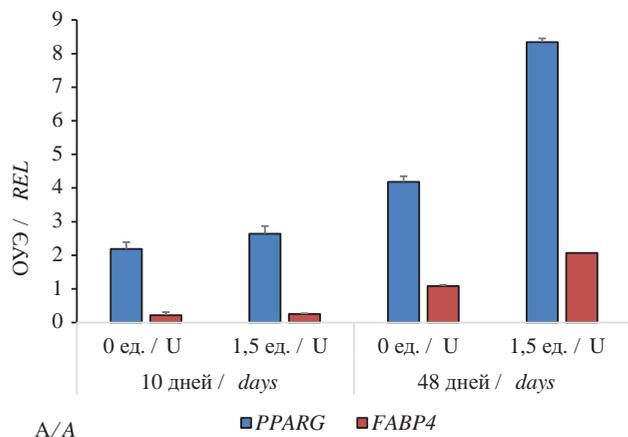
Экспрессия гена — маркера остеогенной дифференцировки *ALPL*, напротив, снижалась в 2 раза через 48 дней при добавлении 1,5 ед./мл ГЦБ (рис. 3 Б). При индукции жировой и остеогенной дифференцировки МСК, культивированных в присутствии ГЦБ, уровень экспрессии *PPARG* и *FABP4* снижался в клетках доноров, индуцированных к обеим дифференцировкам (достоверно только при адипогенной дифференцировке), тогда как в контрольных клетках, также обработанных ГЦБ, но не индуцированных к дифференцировке, он значимо повышался (рис. 4 А, Б). Данные по индукции дифференцировки МСК, культивированных без ГЦБ представлены в таблице 2.

ОУЭ гена — маркера остеогенной дифференцировки *ALPL* после индукции повышался в МСК доноров,



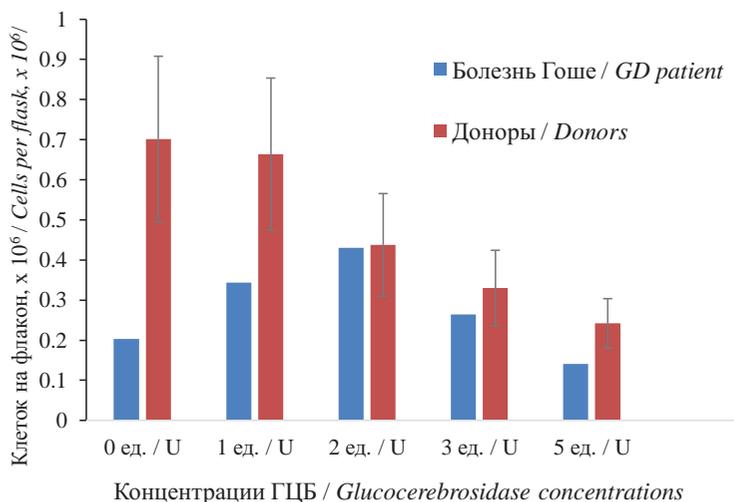
**Рисунок 1.** Относительная клеточная продукция МСК в присутствии различных концентраций ГЦБ

**Figure 1.** Relative MSC cell production in the presence of GCCase.



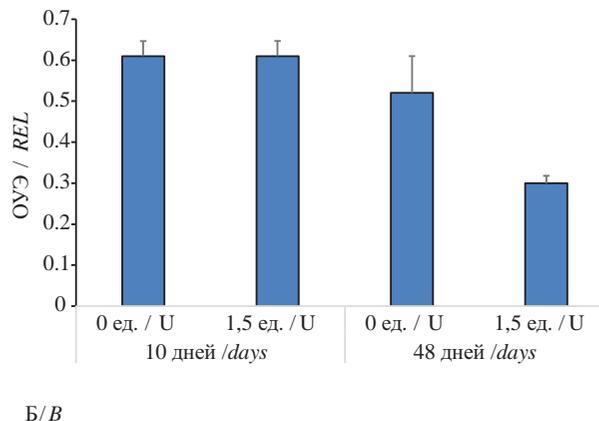
А/А

■ *PPARG* ■ *FABP4*



**Рисунок 2.** Клеточная продукция МСК здоровых доноров и больной БГ за 1 пассаж в присутствии ГЦБ

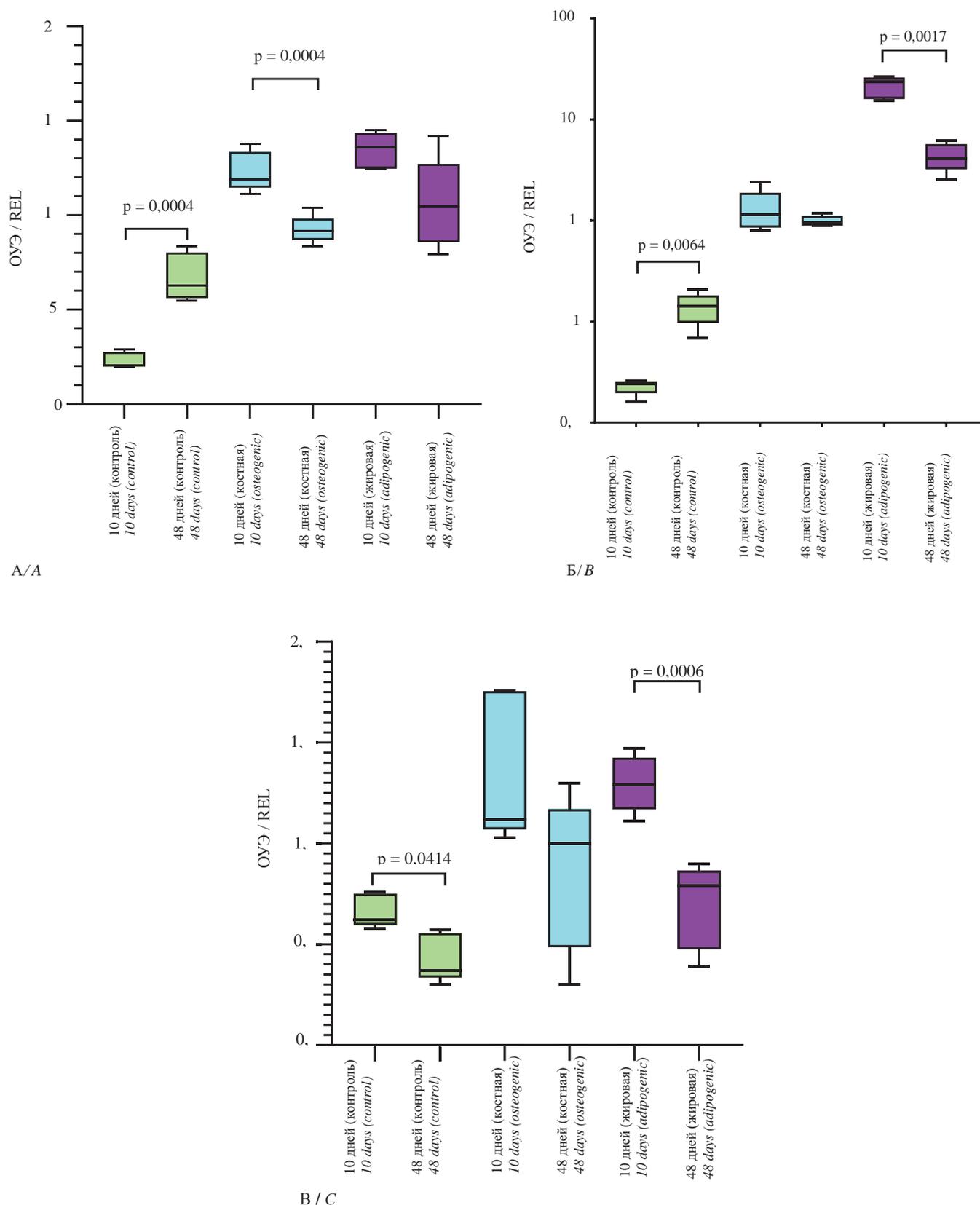
**Figure 2.** Cell production of MSCs of donors and Gaucher disease (GD) patient in the presence of GCCase



Б/Б

**Рисунок 3.** Относительный уровень экспрессии: А — генов жировой дифференцировки в МСК, культивированных в присутствии 1,5 ед./мл ГЦБ; Б — *ALPL*, гена — маркера остеогенной дифференцировки, в МСК, культивированных в присутствии 1,5 ед./мл ГЦБ

**Figure 3.** Relative expression level: A — of adipogenic differentiation marker genes *PPARG* and *FABP4* in MSCs in the presence of 1,5U/mL of GCCase and without it; B — of *ALPL* in MSCs in the presence of 1,5 U/mL of GCCase and without it



**Рисунок 4.** Относительный уровень экспрессии генов в МСК

**А.** Относительный уровень экспрессии *PPARG* в МСК, индуцированных к адипогенной и остеогенной дифференцировкам, через 10 и 48 дней культивирования в присутствии ГЦБ. **Б.** Относительный уровень экспрессии *FABP4* в МСК, индуцированных к адипогенной и остеогенной дифференцировкам, через 10 и 48 дней культивирования в присутствии ГЦБ. **В.** Относительный уровень экспрессии *ALPL* в МСК, индуцированных к адипогенной и остеогенной дифференцировкам через 10 и 48 дней культивирования в присутствии ГЦБ

**Figure 4.** Genes relative expression level in MSCs

**A.** *PPARG* relative expression level in MSCs induced to osteogenic or adipogenic differentiation after 10 or 48 days of cultivation in the presence of GCCase. **B.** *FABP4* relative expression level in MSCs induced to osteogenic or adipogenic differentiation after 10 or 48 days of cultivation in the presence of GCCase. **C.** *ALPL* relative expression level in MSCs induced to osteogenic or adipogenic differentiation after 10 or 48 days of cultivation in the presence of GCCase

**Таблица 2.** ОУЭ генов после индукции дифференцировки в МСК, культивированных без ГЦБ

**Table 2.** Relative expression levels of the genes after differentiation induction in the donors' MSCs cultivated without GCCase

Время культивирования, дни Culture time, days	PPARG			FABP4			ALPL		
	контроль control	костная osteogenic	жировая adipogenic	контроль control	костная osteogenic	жировая adipogenic	контроль control	костная osteogenic	жировая adipogenic
10	2,19	13,15	13,77	0,22	10,38	312,08	0,61	1,18	1,18
48	4,18	7,73	8,83	1,08	4,82	25,92	0,52	1,67	1,27

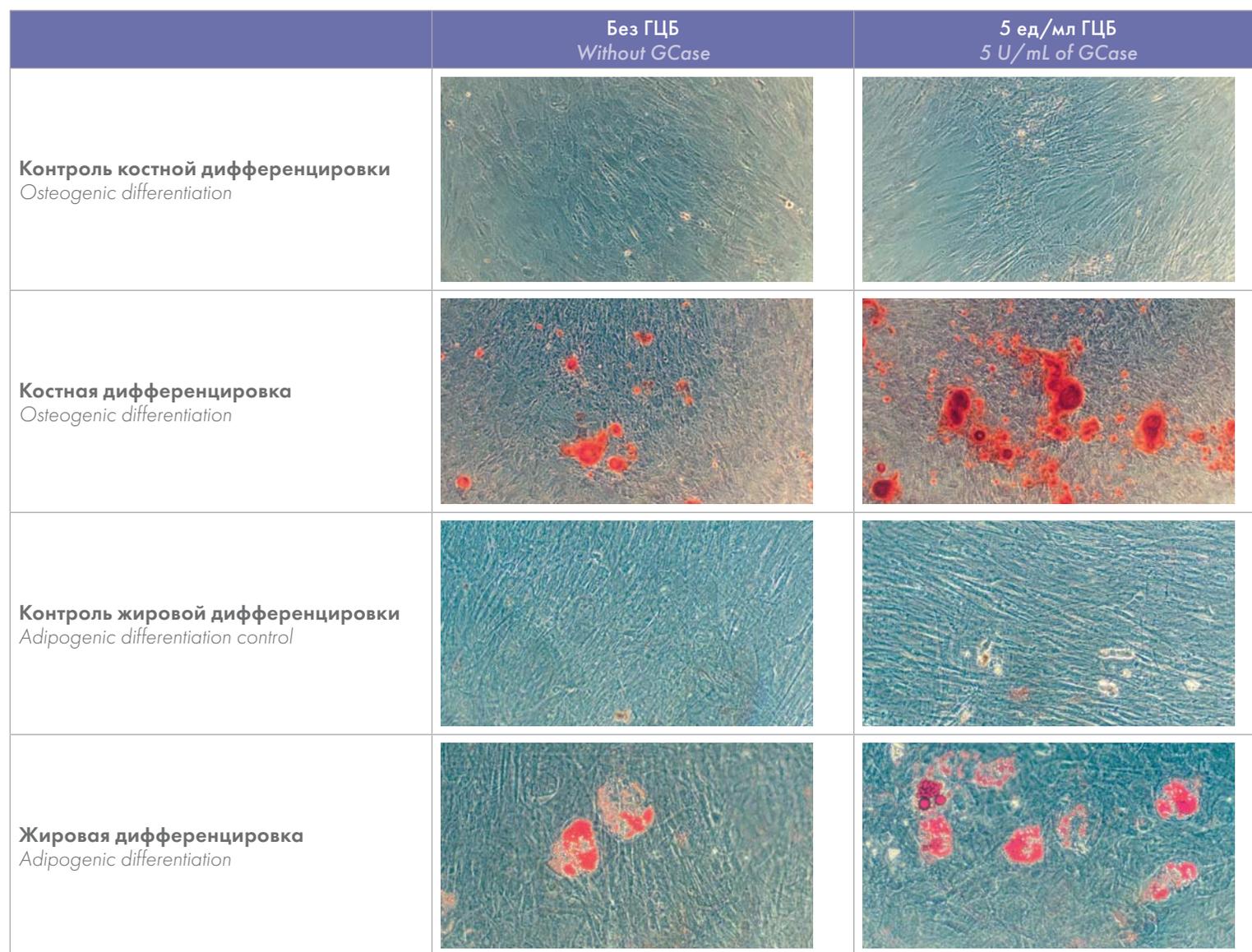
**Таблица 3.** Коэффициент корреляции (Пирсон) между дозой ГЦБ и относительным уровнем экспрессии генов – маркеров жировой дифференцировки PPARG и FABP4 на 48-й день

**Table 3.** Pearson correlation coefficient of GCCase concentration and RELs of PPARG and FABP4 at day 48

Ген / Gen	PPARG			FABP4		
Дифференцировка Differentiation	контроль control	костная osteogenic	жировая adipogenic	контроль control	костная osteogenic	жировая adipogenic
<b>R (Пирсон/Pearson)</b>	0,969*	0,411	0,857*	0,761*	0,262	0,807*

Примечание: \* p < 0,05.

Note: \* p < 0,05.



**Рисунок 5.** Индукция адипогенной и остеогенной дифференцировки в МСК донора без фермента и в присутствии 5 ЕД/мл ГЦБ.

**Figure 5.** Induction of adipogenic and osteogenic differentiation in donor MSCs without and in the presence of 5 U/ml GCCase

культивированных в присутствии ГЦБ (рис. 4В). В отсутствие ГЦБ индукция жировой дифференцировки повышала экспрессию *ALPL* через 10 и 48 дней культивирования (табл. 2). Однако при длительном культивировании в присутствии ГЦБ это повышение было достоверно ниже (рис. 4В).

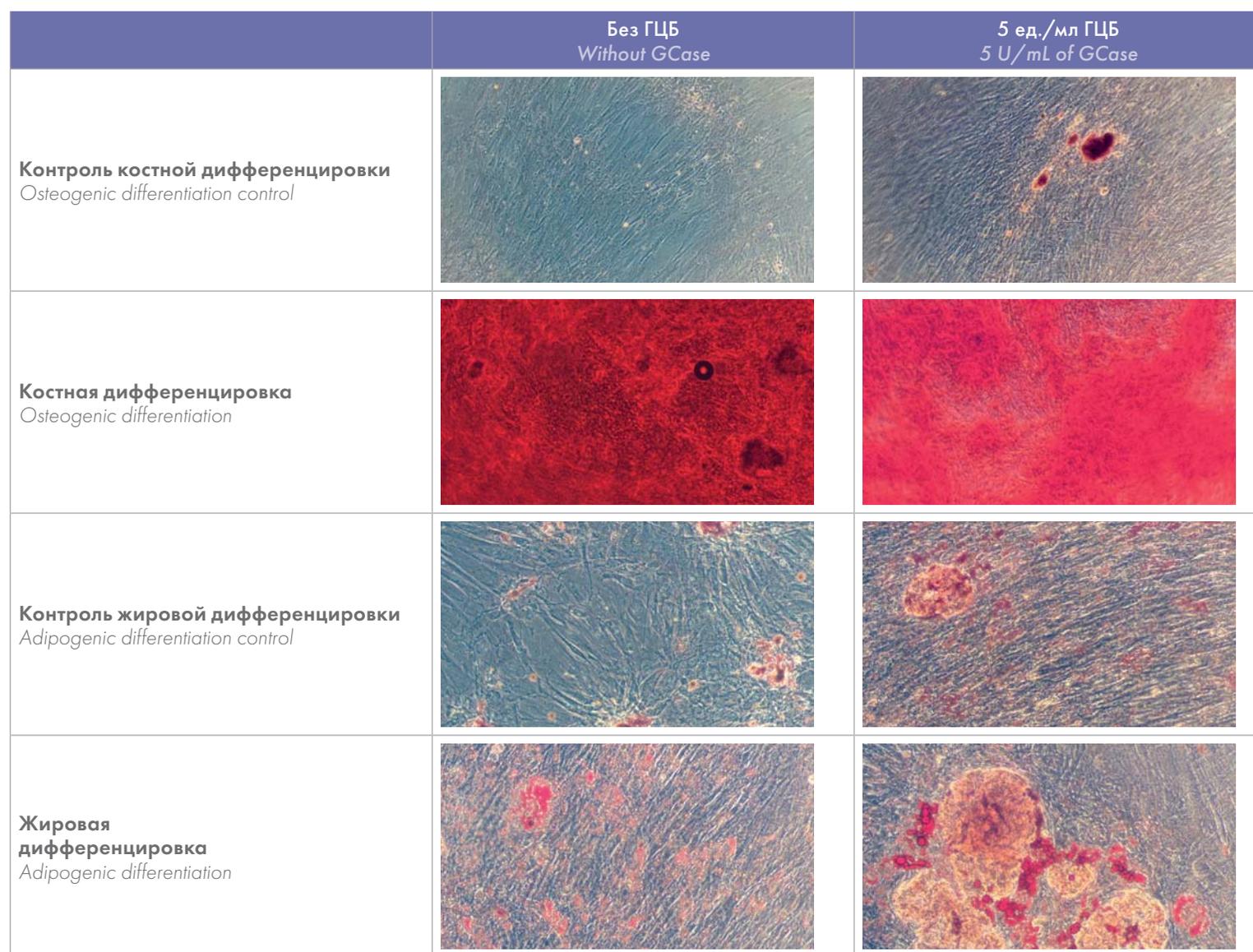
После длительного культивирования в присутствии различных доз (0,5–1,5 ед./мл) ГЦБ и индукции дифференцировки относительный уровень экспрессии генов *PPARG* и *FABP4* прямо коррелировал с дозой фермента при индукции адипогенной дифференцировки. Корреляция при индукции остеогенной дифференцировки отсутствовала (табл. 3).

Таким образом, длительное воздействие ГЦБ изменяло ответ МСК на индукцию адипогенной и остеогенной дифференцировки. Этот результат указывает на высокую чувствительность МСК к экзогенному ферменту.

### Влияние дозы рекомбинантной ГЦБ на дифференцировку МСК при индукции остеогенной и адипогенной дифференцировки

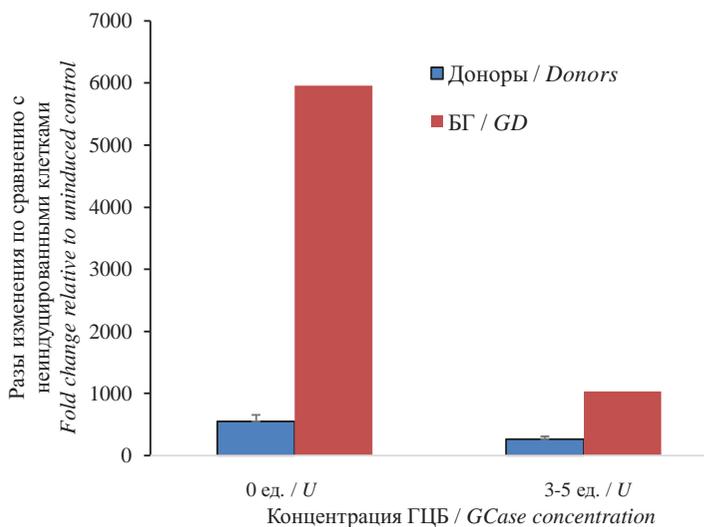
Визуальный анализ индукции дифференцировки в культуре МСК доноров после предварительного культивирования в присутствии ГЦБ в концентрации 5 ед./мл показал активацию как остеогенной, так и адипогенной дифференцировки по сравнению с контролем без фермента (рис. 5).

При анализе в культуре МСК больной БГ наблюдали иную картину. В контроле остеогенной дифференцировки не наблюдали отложений кальция, тогда как при индукции остеогенной дифференцировки был виден избыток образования кальция в культуре (рис. 6). Образование жировых клеток в культуре МСК больной БГ наблюдали и без индукции жировой дифференцировки, а индукция адипогенной дифференцировки повышала образование жировых капель.



**Рисунок 6.** Индукция адипогенной и остеогенной дифференцировки в МСК больной БГ без фермента и в присутствии 5 ЕД/мл ГЦБ.

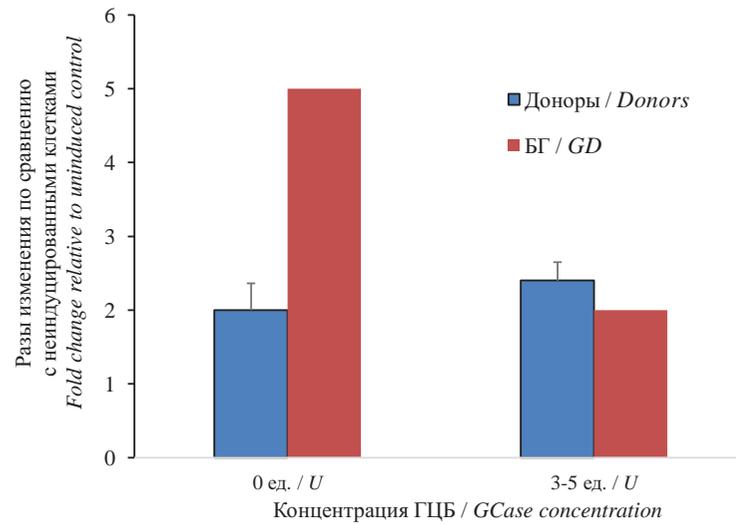
**Figure 6.** Induction of adipogenic and osteogenic differentiation in MSCs of GD patient without and in the presence of 5 U/ml GCCase



А / А

**Рисунок 7.** Изменение ОП элюатов. А. Изменение ОП элюатов по сравнению с контролем в МСК доноров и больной БГ после культивирования в присутствии ГЦБ при индукции костной дифференцировки. Б. Изменение ОП элюатов по сравнению с контролем в МСК доноров и больной БГ после культивирования в присутствии ГЦБ при индукции жировой дифференцировки

**Figure 7.** Fold change of eluted OD. A. Fold change of eluted alizarin red OD relative to undifferentiated control after osteogenic differentiation induction in MSCs of healthy donors and Gaucher disease patient's (GD) MSCs in the presence of GCase. B. Fold change of eluted OD relative to undifferentiated control after osteogenic differentiation induction in MSCs of healthy donors and Gaucher disease (GD) patient MSCs in the presence of GCase



Б / В

После культивирования МСК больной в присутствии 5 ед./мл ГЦБ значительно повышалось отложение кальция. В случае жировой дифференцировки также виден выраженный эффект (рис. 6).

При анализе остеогенной дифференцировки после индукции методом элюции оказалось, что у доноров ОП окрашенного раствора в среднем  $222,5 \pm 69,8$ , тогда как у больной БГ этот показатель был увеличен больше, чем на порядок, до 3958. Подтверждение такой большой продукции кальция МСК можно видеть при окрашивании (рис. 6). Адипогенная дифференцировка также активирована у МСК больной БГ. Средний показатель ОП у доноров составил  $2,2 \pm 0,2$ , а у больной был равен 5.

При культивировании МСК в присутствии 3–5 ед./мл ГЦБ при индукции остеогенной дифференцировки оптическая плотность окрашенного раствора снижалась как в МСК здоровых доноров, так и в МСК больной БГ. Несмотря на то что оптическая плотность элюата, полученного из культуры МСК больной, была существенно выше, чем у элюатов культур донорских МСК, было отмечено снижение ОП в 6 раз по сравнению с контрольной культурой МСК больной без фермента (рис. 7А). При индукции адипогенной дифференцировки ОП элюатов из МСК больной БГ была повышена в случае культивирования без ГЦБ. В присутствии ГЦБ ОП элюатов из МСК больной существенно уменьшалась и становилась меньше, чем среднее значение ОП элюатов из МСК доноров (рис. 7Б).

Экспрессия генов — маркеров жировой (*PPARG* и *FABP4*), костной (*ALPL*, *PTHRI*, *BGLAP* и *SPPI*) и хрящевой (*SOX9*) дифференцировок при кратковременном

(2–3 пассажа) культивировании не индуцированных МСК доноров не зависела от концентрации фермента в среде культивирования (табл. 4, 5).

В МСК больной БГ без индукции дифференцировки ОУЭ генов сильно отличался от средних значений у доноров (табл. 5). В МСК больной БГ была повышена экспрессия генов, связанных с жировой (*PPARG* и *FABP4*), костной (*ALPL*, *SPPI*) и хрящевой (*SOX9*) дифференцировками. Кроме того, были значительно снижены уровни экспрессии рецептора к паратиреоидному гормону (*PTHRI*) и гормона остеокальцина (*BGLAP*), что указывает напрямую на возможные нарушения костной дифференцировки. Повышение дозы ГЦБ приводило к снижению ОУЭ генов маркеров как адипогенной, так и остеогенной дифференцировки в культуре МСК больной БГ.

Индукция как остеогенной, так и адипогенной дифференцировки приводила к повышению экспрессии всех изученных генов. Экспрессия *PPARG* повышалась примерно в 10 раз при индукции остеогенной дифференцировки и в 20 раз при индукции адипогенной дифференцировки (рис. 8А и Б). Предварительное культивирование с ферментом не изменяло экспрессию *PPARG* в МСК здоровых доноров, но в образце МСК больной БГ ОУЭ этого гена уменьшался на порядок после культивирования в присутствии ГЦБ при остеогенной дифференцировке и значительно меньше при индукции адипогенной дифференцировки, что указывало на повышенную чувствительность МСК больной к ферменту и нарушение остеогенной дифференцировки этих клеток. Ген *FABP4*, участвующий в биогенезе липидов, был высоко экспрессирован в МСК больной БГ при индук-

**Таблица 4.** Относительный уровень экспрессии генов, участвующих в дифференцировке МСК, в зависимости от концентрации ГЦБ при культивировании

**Table 4.** Relative expression levels of the differentiation marker genes in the MSCs cultivated in the presence of different concentrations of GCase

Ген / Gene	Концентрация ГЦБ / Gcase concentrations			
	0 ед./мл / U/mL	1 ед./мл / U/mL	3 ед./мл / U/mL	5 ед./мл / U/mL
PPARG	1,090 ± 0,300	1,158 ± 0,350	1,282 ± 0,370	1,282 ± 0,330
FABP4	0,085 ± 0,020	0,129 ± 0,050	0,085 ± 0,020	0,132 ± 0,060
PGC1A	0,017 ± 0,010	0,018 ± 0,010	0,011 ± 0,000	0,011 ± 0,000
ALPL	0,018 ± 0,010	0,031 ± 0,010	0,020 ± 0,010	0,026 ± 0,010
PTHRI	0,002 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,002 ± 0,000	0,002 ± 0,000
BGLAP	1,850 ± 0,590	1,826 ± 0,530	1,900 ± 0,540	1,986 ± 0,610
SPP1	0,062 ± 0,020	0,095 ± 0,040	0,067 ± 0,020	0,071 ± 0,020
SOX9	0,813 ± 0,090	0,860 ± 0,060	0,841 ± 0,130	0,959 ± 0,140

**Таблица 5.** ОУЭ генов, связанных с дифференцировкой, в МСК доноров и больной БГ после культивирования в присутствии ГЦБ

**Table 5.** Relative expression levels of the differentiation marker genes in the donors' and the patient's MSCs cultivated in the presence of glucocorticoid

Гены / Gene	МСК доноров / Donor MSCs				МСК больной БГ / GD patient MSCs			
	0 ед./мл U/ml	1 ед./мл U/ml	3 ед./мл U/ml	5 ед./мл U/ml	0 ед./мл U/ml	1 ед./мл U/ml	3 ед./мл U/ml	5 ед./мл U/ml
PPARG	1,09	1,16	1,28	1,28	1,25	3,89	2,46	1,93
FABP4	0,08	0,13	0,09	0,13	0,12	2,42	1,08	0,15
ALPL	0,02	0,03	0,02	0,03	0,34	2,49	0,47	0,34
PTHRI	0,002	0,001	0,002	0,002	0,001	НД	0,0004	0,0002
BGLAP	1,85	1,83	1,90	1,99	0,91	0,68	0,50	0,36
SPP1	0,06	0,10	0,07	0,07	0,16	0,14	0,41	0,32

ции дифференцировки (рис. 8В и Г). Предварительное культивирование в присутствии ГЦБ существенно снижало ОУЭ этого гена. Эффект был гораздо сильнее выражен в случае индукции адипогенной дифференцировки. Экспрессия всех генов, связанных с костной дифференцировкой, была существенно снижена в МСК больной БГ. Наибольшее снижение наблюдалось в экспрессии генов *ALP* и *BGLAP* (рис. 8Д, Е, Л).

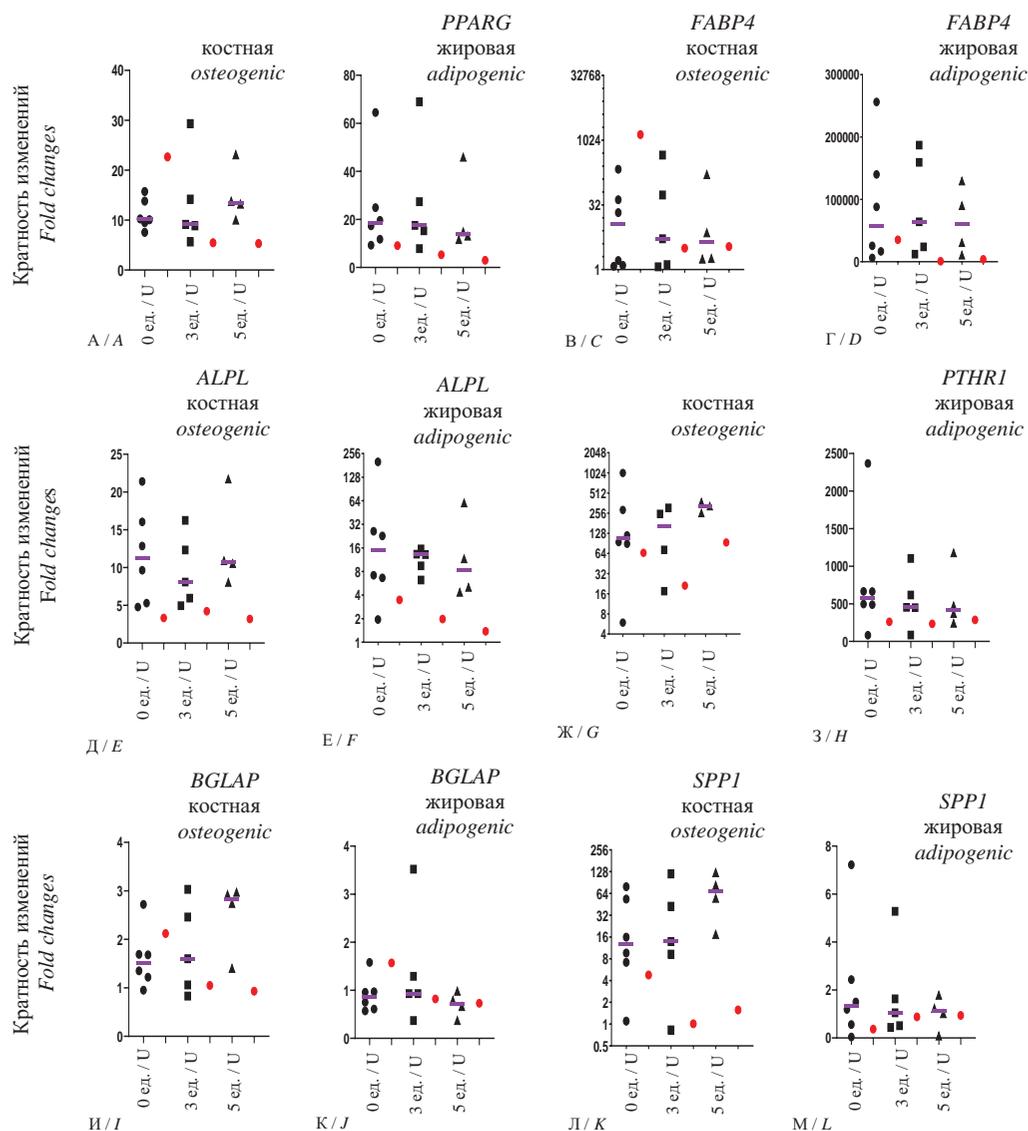
## Обсуждение

Использованная в исследовании модель имеет ряд ограничений. Известно, что *in vivo* экзогенная ГЦБ определяется в крови в течение нескольких минут после введения. Период полувыведения свободного фермента из крови больного составляет от 5 до 12 мин. Высокий клиренс фермента (6,7–7,6 мл/мин/кг) определяется быстрым поглощением фермента макрофагами при участии рецепторов к маннозе [16, 17]. Сколько времени активный фермент сохраняется в среде культивирования, неизвестно. В МСК больных БГ, как и во всех клетках организма, снижена активность ГЦБ [18]. Успеет ли фермент после введения попасть в МСК костного мозга больных — неизвестно. Еще одно ограничение модели связано с небольшим числом пассажей, которые могут пройти МСК.

Тем не менее результаты проведенных исследований указывают на существенные нарушения в пролифе-

рации и дифференцировке МСК здоровых доноров и МСК больной БГ при культивировании в присутствии ГЦБ. Пролиферативная активность МСК как доноров, так и больной БГ зависела от концентрации ГЦБ. Низкие концентрации (0–1,25 ед./мл) не влияли на пролиферацию и суммарную клеточную продукцию МСК здоровых доноров. МСК больной БГ росли лучше в присутствии фермента при концентрации до 2 ед./мл. При увеличении концентрации ГЦБ свыше 2 ед./мл суммарная клеточная продукция уменьшалась как у МСК здоровых доноров, так и у МСК больной БГ. Высокие концентрации ГЦБ (7–10 ед./мл) обладали цитотоксическим эффектом.

При низких концентрациях ГЦБ в МСК здоровых доноров через 10 дней культивирования отмечена тенденция к повышению относительного уровня экспрессии *PPARG* и *FABP4* — маркеров жировой дифференцировки, а еще через 38 дней увеличение относительного уровня экспрессии этих генов становилось выраженным. Повышение экспрессии *PPARG* как при индукции адипогенной дифференцировки, так и при индукции остеогенной объяснимо тем, что в обе индуцирующие дифференцировку среды добавляли дексаметазон, только в среде для адипогенной дифференцировки его концентрация была намного выше, чем в остеогенной. *PPARG* — ядерный рецептор полиненасыщенных жирных кислот, основные функ-



**Рисунок 8.** Кратность изменения ОУЭ генов по сравнению с недифференцированным контролем (без индукции дифференцировки) в МСК доноров (обозначены черным) и больной БГ (обозначена красным) при индукции адипогенной и остеогенной дифференцировки при культивировании в присутствии ГЦБ. А. Разы изменения *PPARG* при костной дифференцировке. Б. Разы изменения *PPARG* при жировой дифференцировке. В. Разы изменения *FABP4* при костной дифференцировке. Г. Разы изменения *FABP4* при жировой дифференцировке. Д. Разы изменения *ALPL* при костной дифференцировке. Е. Разы изменения *ALPL* при жировой дифференцировке. Ж. Разы изменения *PTHR1* при костной дифференцировке. З. Разы изменения *PTHR1* при жировой дифференцировке. И. Разы изменения *BGLAP* при костной дифференцировке. К. Разы изменения *BGLAP* при жировой дифференцировке. Л. Разы изменения *SPP1* при костной дифференцировке. М. Разы изменения *SPP1* при жировой дифференцировке.

**Figure 8.** Fold change in the genes' REL, compared to the control (without differentiation induction) in MSCs from donors (marked in black) and a GD patient (marked in red) during induction of adipogenic and osteogenic differentiation during cultivation in the presence of GCCase. A. *PPARG* fold change in osteogenic differentiation. B. *PPARG* fold change in adipogenic differentiation. C. *FABP4* fold change in osteogenic differentiation. D. *FABP4* fold change in adipogenic differentiation. E. *ALPL* fold change in osteogenic differentiation. F. *ALPL* fold change in adipogenic differentiation. G. *PTHR1* fold change in osteogenic differentiation. H. *PTHR1* fold change in adipogenic differentiation. I. *BGLAP* fold change in osteogenic differentiation. J. *BGLAP* fold change in adipogenic differentiation. K. *SPP1* fold change in osteogenic differentiation. L. *SPP1* fold change in adipogenic differentiation.

ции которого — активация адипогенеза [19] и ингибирование остеогенеза [20]. Более того, *PPARG* ингибирует функции остеокластов, регулируя экспрессию гена *c-Fos* [21]. *FABP4* — белок, связывающий жирные кислоты, 4, который в высокой степени экспрессируется в жировой ткани и функционирует как белок — шаперон липидов [22]. Экспрессия генов этих двух белков коррелирует с адипогенной дифференцировкой. Повышение экспрессии *PPARG* может ингибировать остеогенную дифференцировку.

У больной БГ была незначительно повышена экспрессия *PPARG* без добавления ГЦБ. Культивирование в присутствии 1 ед./мл ГЦБ увеличивало экспрессию

этого гена в 3,4 раза. ОУЭ *PPARG* снижался при повышении концентрации ГЦБ до 3 и более ед./мл, всегда оставаясь выше, чем в МСК доноров, в 1,5–2 раза. Экспрессия *FABP4* вела себя схожим образом, повышаясь в присутствии 1 ед./мл ГЦБ в 18,8 раза. Эти данные перекликаются с результатами работы А. Crivago и соавт. [23], работавших на клеточных линиях МСК, полученных из индуцированных плюрипотентных клеток. В этой работе наблюдалось снижение активности *ALPL* в МСК больных БГ. В настоящей работе были получены противоположные результаты, что может быть объяснено другим происхождением МСК. ОУЭ *ALPL* был повышен у больной БГ в 18 раз по сравне-

нию с донорами, еще сильнее повышался в присутствии 1 ед./мл ГЦБ и снижался при повышении концентрации ГЦБ, оставаясь значительно выше, чем в МСК доноров с теми же концентрациями ГЦБ. Возможно, дальнейшее накопление данных позволит выявить причины этих несовпадений.

Еще 2 маркера костной дифференцировки — гены *SPPI* и *BGLAP*. Без фермента и в его присутствии экспрессия *SPPI* в МСК больного БГ выше, чем в МСК доноров, а *BGLAP* — ниже. При длительном культивировании МСК в присутствии малых концентраций ГЦБ заметно снижается относительный уровень экспрессии *ALPL* (рис. 4 Б), а экспрессия *SPPI* и *BGLAP* значительно не изменялась. Ген *ALPL* кодирует тканевую неспецифическую щелочную фосфатазу (ТНСАЛР), центральный регулятор минерализации кости [24]. Щелочная фосфатаза необходима для процесса минерализации, при котором соли кальция и фосфора откладываются в развивающихся костях и зубах. Минерализация имеет решающее значение для формирования костей. Щелочная фосфатаза предотвращает старение костей и участвует в дифференцировке костной ткани из МСК [25].

При индукции дифференцировки в МСК здоровых доноров добавление 5 ед./мл ГЦБ в среду культивирования приводило к увеличению отложения кальция при индукции остеогенной дифференцировки и накопления жировых капель при индукции адипогенной дифференцировки. У больной БГ без добавления ГЦБ значительно усилена остеогенная и адипогенная дифференцировка, при этом жировая дифференцировка наблюдалась и без добавления индукторов. Усиление костной дифференцировки не совпадает с результатами других авторов [23]. В другой работе той же группы [26] было отмечено уменьшение липидных капель в МСК больных БГ при индукции жировой дифференцировки, что также не совпадает с данными, полученными в настоящем исследовании. Авторы [26]

показывают, что у больных БГ происходит расщепление жиров, в то время как в настоящем исследовании наблюдалось их накопление. Более того, авторы [26] считают, что это связано и с нарушением синтеза липидов, что способствует дисбалансу костной ткани при БГ. Культивирование в присутствии 5 ед./мл ГЦБ еще больше усиливает жировую дифференцировку и уменьшает костную дифференцировку.

Экспрессия генов во всех случаях подтверждает индукцию дифференцировки. Индукционная среда как для остеогенной, так и для адипогенной дифференцировки содержит дексаметазон в разных концентрациях. Его наличие приводит к повышению экспрессии маркеров жировой дифференцировки *PPARG* и *FABP4* и при индукции остеогенной дифференцировки. В МСК больной БГ при культивировании в присутствии ГЦБ в концентрации 3 ед./мл и более ОУЭ этих генов значительно снижался. Это означает нарушение реакции МСК на индукторы дифференцировки, что может приводить к дисбалансу костной ткани.

Экспрессия маркеров костной дифференцировки — *ALPL*, *SPPI* и *BGLAP* — существенно повышалась после индукции как жировой, так и костной дифференцировки в МСК доноров. При этом в МСК больной БГ ОУЭ этих генов повышался меньше, а инкубация в присутствии фермента не изменяла их экспрессию. Наиболее выражено изменялся ОУЭ *PTHRI*, который значительно повышается при индукции адипогенной дифференцировки.

Таким образом, культивирование МСК в присутствии ГЦБ изменяет пролиферацию и дифференцировочный потенциал этих клеток. Изменения в МСК зависели от дозы ГЦБ в среде и длительности культивирования. Характеристики МСК больной БГ и их ответ на присутствие ГЦБ значительно отличались от клеток здоровых доноров, что требует проведения исследования у большего числа больных.

## Литература / References

1. Meikle P.J., Hopwood J.J., Clague A.E., et al. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*. 1999; 281(3): 249–54. DOI: 10.1001/jama.281.3.249.
2. Zimran A. How I treat Gaucher disease. *Blood*. 2011; 118(6): 1463–71. DOI: 10.1182/blood-2011-04-308890.
3. Giuffrida G., Cappellini M.D., Carubbi F., et al. Management of bone disease in Gaucher disease type 1: clinical practice. *Adv Ther*. 2014; 31(12): 1197–212. DOI: 10.1007/s12325-014-0174-0.
4. Mucci J.M., Rozenfeld P. Pathogenesis of Bone Alterations in Gaucher Disease: The Role of Immune System. *J Immunol Res*. 2015; 2015: 192761. DOI: 10.1155/2015/192761.
5. Zimran A., Ilan Y., Elstein D. Enzyme replacement therapy for mild patients with Gaucher disease. *Am J Hematol*. 2009; 84(4): 202–4. DOI: 10.1002/ajh.21369.
6. Lebel E., Elstein D., Peleg A., et al. Histologic findings of femoral heads from patients with Gaucher disease treated with enzyme replacement. *Am J Clin Pathol*. 2013; 140(1): 91–6. DOI: 10.1309/AJCPFVSAEGO67NGT.
7. Mistry P.K., Liu J., Yang M., et al. Glucocerebrosidase gene-deficient mouse recapitulates Gaucher disease displaying cellular and molecular dysregulation beyond the macrophage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(45): 19473–8. DOI: 10.1073/pnas.1003308107.
8. Mistry P.K., Liu J., Sun L., et al. Glucocerebrosidase 2 gene deletion rescues type 1 Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(13): 4934–9. DOI: 10.1073/pnas.1400768111.
9. Morrison S.J., Scadden D.T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014; 505(7483): 327–34. DOI: 10.1038/nature12984.
10. Sun Y., Yuan Y., Wu W., et al. The effects of locomotion on bone marrow mesenchymal stem cell fate: insight into mechanical regulation and bone formation. *Cell Biosci*. 2021; 11(1): 88. DOI: 10.1186/s13578-021-00601-9.
11. Lecourt S., Vanneaux V., Cras A., et al. Bone marrow microenvironment in an in vitro model of Gaucher disease: consequences of glucocerebrosidase deficiency. *Stem Cells Dev*. 2012; 21(2): 239–48. DOI: 10.1089/scd.2011.0365.

12. Squillaro T., Antonucci I., Alessio N., et al. Impact of lysosomal storage disorders on biology of mesenchymal stem cells: Evidences from in vitro silencing of glucocerebrosidase (GBA) and alpha-galactosidase A (GLA) enzymes. *J Cell Physiol.* 2017; 232(12): 3454–67. DOI: 10.1002/jcp.25807.
13. Reed M.C., Schiffer C., Heales S., et al. Impact of sphingolipids on osteoblast and osteoclast activity in Gaucher disease. *Mol Genet Metab.* 2018; 124(4): 278–86. DOI: 10.1016/J.YMGME.2018.06.007.
14. Fastova E.A., Magomedova A.U., Petinati N.A., et al. Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Bull Exp Biol Med.* 2019; 167(1): 150–3. DOI: 10.1007/s10517-019-04480-6.
15. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008; 3(6): 1101–8. DOI: 10.1038/nprot.2008.73.
16. Zimran A., Loveday K., Fratuzzi C., et al. A pharmacokinetic analysis of a novel enzyme replacement therapy with Gene-Activated® human glucocerebrosidase (GA-GCB) in patients with type 1 Gaucher disease. *Blood Cells, Mol Dis.* 2007; 39(1): 115–8. DOI: 10.1016/j.bcmd.2007.02.008.
17. Morris J.L. Velaglycerase Alfa for the Management of Type 1 Gaucher Disease. *Clin Ther.* 2012; 34: 259–71. DOI: 10.1016/j.clinthera.2011.12.017.
18. Lecourt S., Mouly E., Freida D., et al. A Prospective Study of Bone Marrow Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells in Type 1 Gaucher Disease Patients. Dardis A, editor. *PLoS One.* 2013; 8(7): e69293. DOI: 10.1371/journal.pone.0069293.
19. Rosen E.D., Sarraf P., Troy A.E., et al. PPAR $\gamma$  is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell.* 1999; 4(4): 611–7. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)80211-7.
20. Akune T., Ohba S., Kamekura S., et al. PPAR $\gamma$  insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest.* 2004; 113(6): 846–55. DOI: 10.1172/JCI19900.
21. Wan Y., Chong L.W., Evans R.M. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat Med.* 2007; 13(12): 1496–503. DOI: 10.1038/NM1672.
22. Prentice K.J., Saksi J., Hotamisligil G.S. Adipokine FABP4 integrates energy stores and counterregulatory metabolic responses. *J Lipid Res.* 2019; 60(4): 734. DOI:10.1194/JLR.S091793.
23. Crivaro A., Bondar C., Mucci J.M., et al. Gaucher disease-associated alterations in mesenchymal stem cells reduce osteogenesis and favour adipogenesis processes with concomitant increased osteoclastogenesis. *Mol Genet Metab.* 2020; 130(4): 274–82. DOI: 10.1016/J.YMGME.2020.06.003.
24. Mornet E. Hypophosphatasia. *Metabolism.* 2018; 82: 142–55. DOI: 10.1016/J.METABOL.2017.08.013.
25. Liu W., Zhang L., Xuan K., et al. Alpl prevents bone ageing sensitivity by specifically regulating senescence and differentiation in mesenchymal stem cells. *Bone Res.* 2018; 6(1):27. DOI: 10.1038/S41413-018-0029-4.
26. Crivaro A., Mucci J.M., Bondar C., et al. Bone marrow adipocytes alteration in an in vitro model of Gaucher Disease. *Mol Genet Metab Reports.* 2023; 36: 100980. DOI:10.1016/J.YMGMR.2023.100980.

### Информация об авторах

**Мамонов Василий Евгеньевич\***, кандидат медицинских наук, заведующий отделением травматологии и ортопедии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: vasily-mamonov@yandex.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7795-4564>

**Садовская Александра Вячеславовна**, лаборант отдела сопровождения клинических исследований ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: sadovskaya.sasha@gmail.com  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0221-9351>

**Петинати Наталия Арнольдовна**, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией физиологии кроветворения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: petinati.n@blood.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6591-3183>

**Шипунова Ирина Николаевна**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: shipounova.i@blood.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1189-0283>

### Information about the authors

**Vasily E. Mamonov\***, Cand. Sci. (Med.), Head of the Orthopedic Department, National Medical Research Center for Hematology, e-mail: vasily-mamonov@yandex.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7795-4564>

**Aleksandra V. Sadovskaya**, Laboratory Assistant of the Clinical Research Support Department, National Medical Research Center for Hematology, e-mail: sadovskaya.sasha@gmail.com  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0221-9351>

**Nataliya A. Petinati**, Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Hematopoiesis Physiology, National Medical Research Center for Hematology, e-mail: petinati.n@blood.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6591-3183>

**Irina N. Shipounova**, Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher of the Laboratory of Hematopoiesis Physiology, National Medical Research Center for Hematology, e-mail: shipounova.i@blood.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1189-0283>

**Дорофеева Алена Игоревна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: dorofeeva.a@blood.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1154-5669>

**Дризе Нина Иосифовна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: ndrize@yandex.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7150-0403>

**Лукина Елена Алексеевна**, доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением гематологии и химиотерапии орфанных заболеваний ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: lukina.e@blood.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8774-850X>

**\* Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 05.09.2024

Принята к печати: 14.10.2024

**Alena I. Dorofeeva**, Cand. Sci. (Biol.), Researcher of the Laboratory of Hematopoiesis Physiology, National Medical Research Center for Hematology,  
e-mail: dorofeeva.a@blood.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1154-5669>

**Nina I. Drize**, Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher of the Laboratory of Hematopoiesis Physiology, National Medical Research Center for Hematology,  
e-mail: ndrize@yandex.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7150-0403>

**Elena A. Lukina**, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Hematology and Chemotherapy of Orphan Diseases, National Medical Research Medical Center for Hematology,  
e-mail: lukina.e@blood.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8774-850X>

**\* Corresponding author**

Received 05 Sep 2024

Accepted 14 Oct 2024