

УДК 57.084:571.27:612.1/.8

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ ДИНАМИКИ РАЗВИТИЯ И ХАРАКТЕРА ХИМЕРИЗМА С ПРОЯВЛЕНИЯМИ РТПХ В ОРГАНАХ МЫШЕЙ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЦЕЛЬНОГО КОСТНОГО МОЗГА

© 2024 г. Е. В. Богданенко^{1, *}, Л. А. Сергиевич², А. В. Карнаухова²,
Н. А. Карнаухова², И. А. Лизунова²

¹ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315, Россия

² Институт биофизики клетки РАН, Пущино Московской области, 142290, Россия

* E-mail: lenabogdval@mail.ru

Поступила в редакцию 20.09.2023 г.

После доработки 19.10.2023 г.

Принята к публикации 20.10.2023 г.

В клинике аллогенная трансплантация костного мозга (ТКМ) часто вызывает реакцию “трансплантат против хозяина” (РТПХ). РТПХ объясняют тем, что Т-лимфоциты, которые вводятся одновременно с кроветворными клетками при трансплантации, а затем вновь образуются и созревают в тимусе реципиента из донорских клеток-предшественников, распознают и атакуют клетки хозяина. Однако полного объяснения феномена РТПХ не существует, а химеризация организма реципиента как возможная причина поражения его органов в расчет не принимается. Поэтому целью нашей работы было моделирование аллогенной трансплантации цельного костного мозга (КМ, эксперимент) и сравнение ее результатов с сингенной трансплантацией (контроль) на основе исследования заселения клетками донорского происхождения основных органов-мишеней РТПХ. Донорами КМ являлись мыши Tg(АСТВ-EGFP)1Osб/J, несущие ген зеленого флуоресцентного белка (EGFP), реципиентами – животные инбредных линий СВА и С57Bl/6 в возрасте 2–10 мес. За 1 сут до ТКМ ($1.5 \cdot 10^7$ кл./мышь) всех реципиентов облучали в дозе 6.5 Гр (LD 50/30). Через 1, 3, 5, 7, 11, 14, 21, 28, 35 и 55 сут с помощью флуоресцентного микроскопа исследовали развитие химеризма в печени, коже и прямой кишке животных. Уже через 1 сут отдельные фибробластоподобные донорские клетки встречали в прямой кишке, через 7 сут – в коже и печени. Через 14–28 сут после ТКМ донорские клетки формировали в печени в основном строму, в коже – фибробласты и кератиноциты, а в прямой кишке они замещали погибшие после облучения клетки ворсин, стромы и паренхимы Пейеровых бляшек. В отличие от контроля, в опыте в строме печени, в коже и в прямой кишке были найдены гигантские GFP⁺-фибробласты около 30 мкм в длину; в печени – множество GFP⁺-перемычек и фибробластоподобных клеток Ито очень сложной конфигурации. Через 35–55 сут после аллогенной ТКМ донорские клетки в печени и в ворсинах прямой кишки начинали разрушаться, ворсины обрастали слоями соединительнотканых GFP⁺-клеток и деформировались, стенка кишки истончалась, а кожа полностью заменялась на новую (чего никогда не наблюдали в контроле). Нами выдвинуто предположение, что наряду с признаками РТПХ (истончением стенки кишки и множеством округлых GFP⁺-клеток с внутренней стороны кожи) остальные признаки разрушения исследованных органов после аллогенной ТКМ говорят о том, что образовавшиеся из мезенхимных стволовых клеток цельного донорского КМ клетки органов становятся мишенью для Т-клеток реципиента, т.е. о реакции “хозяин против трансплантата” (РХПТ). Явное проявление иммунных реакций напрямую совпадает со временем массового заселения исследованных органов клетками донорского происхождения и восстановления собственной иммунной системы хозяина, т.е. развитие химеризма определяет развитие поражения органов. Это объясняет картину РТПХ из медицинской практики (атрофию слизистых, избыточную продукцию коллагена, склерозирование желчных протоков, повреждение кожи, колит) и сроки ее проявления.

Ключевые слова: РТПХ, РХПТ, цельный костный мозг, МСК, мышь, GFP, флуоресцентная микроскопия, аллогенная трансплантация

Принятые сокращения: КМ – костный мозг; МСК – мезенхимные стволовые клетки; РТПХ – реакция “трансплантат против хозяина”; РХПТ – реакция “хозяин против трансплантата”; ТКМ – трансплантация костного мозга; GFP и EGFP – зеленый флуоресцентный белок (fluorescent protein) и усиленный GFP (enhanced GFP) соответственно; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор.

DOI: 10.31857/S0041377124020085, **EDN:** RJUJHW

Трансплантация костного мозга (КМ) часто используется в онкогематологии. Трансплантация называется сингенной, если донор и реципиент являются однойцевыми близнецами (Gorin et al., 2006). В том случае, когда донор и реципиент отличаются генетически, даже если у них наблюдается полное совпадение по всем аллелям главного комплекса гистосовместимости (HLA), трансплантация КМ (ТКМ) называется аллогенной (Chao, Blume, 1989). Несмотря на то, что протоколы трансплантации высоко оптимизированы и могут быть точно подстроены под каждого человека, ТКМ остается терапией высокого риска с потенциально опасными для жизни осложнениями и смертностью более 30% (Blazar et al., 2012).

Одним из основных осложнений ТКМ является реакция “трансплантат против хозяина” (РТПХ). Текущая догма гласит, что при ней донорские Т-лимфоциты чрезмерно активируются, и происходит нарушение регуляции выработки цитокинов (Ferrara et al., 2009; Divito et al., 2020). Эти иммунокомпетентные клетки распознают чужеродные антигены минорного локуса на клетках реципиента и атакуют их.

Острая РТПХ в типичных случаях развивается на 7–10-е сутки после введения КМ и сопровождается поражением эпидермиса, желчных протоков и слизистой оболочки пищеварительного тракта, а также легких (Müsken et al., 2021). Она индуцируется, как считается, теми Т-лимфоцитами, которые вводят одновременно с кроветворными клетками при трансплантации, а их концентрация определяет сроки развития и интенсивность реакции (Mogeno, Cid, 2019).

Несмотря на процедуры очистки от этих клеток трансплантата, их полное удаление невозможно, поскольку они участвуют в защите организма реципиента, которого обычно подвергают миелоаблативному лечению с помощью лучевой или химиотерапии, чтобы разрушить его большой костный мозг и ослабить его иммунную систему (Chao, Blume, 1989; Vossen, 1998). Хроническая РТПХ индуцируется вновь образованными из кроветворных клеток Т-лимфоцитами (Щуцаева и др., 1988).

Другой причиной РТПХ называют несоответствие по Н-У антигенам, кодируемым на У-хромосоме. Оно приводит к более низкой и безрецидивной выживаемости, более высокой частоте как тяжелой острой РТПХ, так и обширного поражения органов при хронической РТПХ (Dzierzak-Mietla et al., 2012), поскольку Н-У антигены

являются минорными антигенами гистосовместимости, высокоиммуногенными и ни с чем не схожими (Popli et al., 2014).

Однако есть факты, не укладывающиеся в общепринятую теорию РТПХ. Так, на мышах получены доказательства, что после ТКМ во время острой РТПХ собственные функциональные, а вовсе не донорского происхождения Т-лимфоциты всегда присутствуют в коже и толстой кишке (Divito et al., 2020). Кроме того, при контактном использовании МСК (мезенхимных стволовых клеток) свиньи для лечения дефекта нижней челюстной кости у бестимусных крыс (у которых отсутствовали Т-лимфоциты) наблюдали сильную инфильтрацию нейтрофилов и макрофагов в область раны, хотя это и происходило позже, чем у иммунокомпетентных крыс. И, значит, по крайней мере при ксеногенной трансплантации, чужеродные МСК определяются врожденным иммунитетом хозяина (Tee, Sun, 2020). Есть ряд работ, в которых показано, что после ТКМ при РТПХ повреждаются гематopoэтические стволовые и прогениторные клетки донора, а не хозяина, а их не должны атаковать Т-лимфоциты донорского же происхождения (Van Dijken et al., 1991; Garvy et al., 1993; Shono et al., 2010).

Одним из способов лечения РТПХ является трансплантация культивированных МСК как противовоспалительного средства (Dubnyak et al., 2016; Lohan et al., 2017). Большинство исследователей считают, что при ТКМ они неиммуногенны и не способны навредить пациенту (Liu et al., 2006). Однако трансплантируемый КМ и так, помимо гематopoэтических клеток, содержит в себе МСК.

Уже давно показано, что при ТКМ и у животных, и у людей при использовании как цельного, так и обработанного КМ наблюдается химеризация не только КМ, лимфоузлов, тимуса и селезенки, но и кожи, кишечника, печени и легких (Körbling et al., 2002; Krause, 2002; Suratt et al., 2003; Tran et al., 2003) и, как оказалось позже – именно за счет МСК. Степень трансдифференцировки этих клеток в специализированные клетки органов и тканей реципиентов после аллогенной ТКМ с тех пор вызывает разногласия у исследователей (Kanazawa, Verma, 2003; Tolar et al., 2013; Egawa, Kabashima, 2018; Hünefeld et al., 2018), однако после облучения и сингенной ТКМ их участие в заживлении ран с превращением практически во все элементы кожи уже доказано (Fujita et al., 2010; Богданенко и др., 2020).

Некоторые исследования показывают, что после дифференцировки аллогенные МСК демонстрируют повышенную иммуногенность (Chen et al., 2007; Lohan et al., 2014, 2017). Таким образом, аллогенный иммунный ответ может быть неизбежен в случае некоторых линий клеток, дифференцированных от МСК (Mohammadi et al., 2020), и, следовательно, избавление от РТПХ может быть нерешаемой задачей, поскольку химеризация создает для этого непреодолимое препятствие.

Прежде чем сделать окончательный вывод по этой проблеме, необходимо провести дополнительные работы по химеризму на животных-биоделах, поскольку из-за отсутствия легко детектируемых маркеров, позволяющих отслеживать клетки донора в крови реципиентов, и невозможности прижизненного определения химеризма внутренних органов достоверно определять это явление у людей сложно и дорого (Waterhouse et al., 2021).

Таким образом, несмотря на большой перечень осложнений РТПХ, недостаточно работ по развитию химеризма и исследованию поведения донорских клеток в организме реципиента после ТКМ. При этом возможность взаимосвязи между выраженностью РТПХ и степенью химеризации органов практически не рассматривается. Но, возможно, именно потерей химеризма объясняется отсутствие выраженной РТПХ у реципиента и, в конечном счете, его выживаемость (Богданенко и др., 2021). Интересно, что при РТПХ в наибольшей степени поражаются органы, имеющие максимальное количество соединительной ткани, а именно кожа, кишечник, легкие и желчные протоки печени. Поскольку соединительная ткань образуется фибробластоподобными клетками, у нас возникло предположение, что химеризм этой ткани у реципиентов после ТКМ выражен сильнее.

В связи с указанными проблемами, не исследуемыми в достаточной мере, целью работы был поиск различий динамики развития химеризма между аллогенной и сингенной трансплантацией после облучения реципиентов и его связи с проявлениями РТПХ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. Их содержали в виварии ИБК РАН на рационе из гранулированного корма. В качестве доноров использовали мышей Tg(ACTB-EGFP)10sb/J в возрасте 2–10 мес (чистопородные, разводимые на основе инбредной линии C57BL/6), несущих ген зеленого флуоресцентного

белка EGFP (enhanced green fluorescent protein). В случае аллогенной трансплантации реципиентами были мыши CBA, сингенной – животные линии C57BL/6 GFP⁻. При всех типах подсадки учитывали пол донора и реципиента; подсадка КМ от самцов самкам не допускалась, так как на успешность трансплантации органов влияет H-Y антиген, и несоответствие пола донора и реципиента может приводить к отторжению трансплантата (Eichwald et al., 1958). Трансгенный белок EGFP в клетках донора (GFP⁺-мышь) использовали как витальную метку для определения их приживаемости в организме реципиента, не несущего этот трансген (GFP⁻-мышь). При освещении светом с длиной волны в диапазоне 395–488 нм GFP флуоресцирует в зеленой области спектра с максимумом флуоресценции с длиной волны 508 нм. Всего в работе было использовано 56 животных.

Получение КМ. Бедренные кости донора очищали от мягких тканей и растирали в фарфоровой ступке в 600 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS). Полученную массу фильтровали через капроновое сито с размером пор 70 мкм. Образовавшуюся суспензию доводили до объема 500 мкл. КМ, полученный из двух бедренных костей одного донора, использовали для 3–4 реципиентов. Клетки донора (1.5×10^7 в объеме 100 мкл) вводили в хвостовую вену реципиенту, находящемуся в сознании, инсулиновым шприцем.

Облучение мышей. За 1 сут до трансплантации КМ проводили тотальное однократное облучение всех мышей-реципиентов на рентгеновской установке РУТ-250-15-2 для подавления иммунной реакции. Доза облучения составляла 6.5 Гр, что соответствует дозе ЛД50/30 для данных линий мышей, мощность излучения – 1 Гр/мин. Для определения характера распределения и приживания клеток донора в организме реципиента животных после аллогенной и сингенной трансплантации забивали дислокацией шейных позвонков в соответствии с инструкцией American Physiological Society (1995).

Исследование флуоресценции GFP в тканях. Участок прямой кишки реципиента длиной около 1.5 см промывали от содержимого и разрезали вдоль. Из правой доли печени нарежали лезвием слайсы, начиная приблизительно в 3 мм от края доли. Для исследования кожи вырезали ее участок из поясничной области после частичного удаления шерсти пинцетом или бритвенным станком так, чтобы она не мешала рассматривать поверхность органа.

Образцы помещали на предметное стекло, наносили на них PBS во избежание высыхания и исследовали с двух сторон. Селезенку и кусочек доли печени протирали с помощью скальпеля через капроновый фильтр с размером пор 70 мкм, который затем промывали PBS в объеме 2 мл. Строму и паренхиму помещали отдельно на предметное стекло, наносили на них PBS и накрывали покровным стеклом. Никакой предварительной или последующей фиксации образцы не подвергались. В работе использовали флуоресцентный микроскоп Axio-Imager Z1 с цветной цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия).

Образцы органов исследовали при общем увеличении 50, 100, 200 и 400× через 1, 3, 5, 7, 11, 14, 21, 28, 35 и 55 суток после трансплантации. В таблицах отражены результаты заселения органов 2–4 мышей-реципиентов донорскими клетками на каждый срок исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для обнаружения различий между аллогенной и сингенной трансплантациями КМ на клеточном уровне нами были исследованы динамика и особенности заселения органов мышей донорскими клетками.

Кожа. В коже с 1-х по 5-е сут после обоих видов ТКМ у части животных GFP⁺-клетки отсутствовали, а у части наблюдали только единичные округлые или неправильной формы недифференцированные GFP⁺-клетки, а после аллогенной ТКМ – также единичные флуоресцирующие макрофаги. На 7-е сут уже у всех животных изнутри детектировали мелкие округлые клетки и фибробласты донорского происхождения, до 10–15 в

поле зрения в общей сложности после сингенной и единичные в некоторых полях зрения – после аллогенной ТКМ при увеличении объектива 20×(табл. 1).

На 11–21-е сут после сингенной ТКМ у всех животных в коже изнутри наблюдали стабильно большое количество округлых клеток, но с 28-х сут оно снижалось и до 55-х сут не превышало 10 в поле зрения. При такой ТКМ, с 21-х и по 55-е сут, концентрация фибробластов донорского происхождения, наоборот, всегда на порядок превосходила исходную. В то же время после аллогенной ТКМ у всех животных на 14–21-е сут происходило резкое увеличение количества GFP⁺-округлых клеток, которое оставалось очень значительным до конца наблюдения. При этом концентрация GFP⁺-фибробластов с 21-х по 28-е сут в коже по-прежнему оставалась невысокой.

По форме фибробласты донорского происхождения варьировали от обычных веретенообразных в начальные сроки до изогнутых и паукообразных, начиная с 14-х сут после обоих видов ТКМ. В то же время на 21-е сут после аллогенной ТКМ у одного из животных их размер составил 25–30 против обычных 10–15 мкм. Округлые клетки наблюдали в основном с внутренней стороны кожи, а фибробласты – снаружи.

У мышей СВА наблюдали большую задержку появления кератиноцитов – на 28-е сут после ТКМ против 14 сут у животных линии С57Bl/6. Из-за свечения кератина кератиноциты были видны в основном в виде теней, но у отдельных животных они определялись совершенно четко и однозначно.

В некоторых случаях после обоих видов ТКМ наблюдали паракератоз (сохранение ядер в ро-

Таблица 1. Результаты детекции клеток, несущих маркерный ген зеленого флуоресцентного белка EGFP, в коже мышей – реципиентов линий С57Bl/6 и СВА

Тип клеток	Линия	Время после трансплантации, сут						
		7	11	14	21	28	35	55
Округлые недифференцированные	С57Bl/6	+	++	++	++	+	+	+
	СВА	+	+	+++	+++	++	++/++/++	++
Фибробласты	С57Bl/6	+	+	+	++	++	++	+++
	СВА	+	+	+	++	++	++/+++/++	++
Кератиноциты	С57Bl/6	–	–	+	+	+	++	–
	СВА	–	–	–	–	+	++/++/–	±
Скопления округлых, овальных, угловатых клеток и фибробластов на месте повреждения	С57Bl/6	++	–	++	+	++	+++	–
	СВА	+	–	++	–	++	++/+++/–	+++

Условные обозначения в табл. 1–3 (при увел. об.: 20×): (–) – отсутствие клеток в препарате; (±) – единичные клетки на весь препарат; (+) – единичные клетки в каждом поле зрения; (++) – десятки клеток в поле зрения; (+++) – сотни клеток в поле зрения.

говом слое – рис. 1а) или дискератоз (хаотичное расположение в эпидермисе) кератиноцитов (рис. 1б). К 35-м сут мыши СВА значительно различались по состоянию кожи.

У одного животного обнаружили мощное диффузное свечение кератина, в котором находились кератиноциты донорского происхождения разных форм и размеров. В толще – множество GFP⁺-фибробластов, изнутри – GFP⁺-клетки округлые и фибробласты, но в меньших количествах, чем в предыдущие сроки (21-е и 28-е сут). Шерсть не выпадала, выглядела здоровой.

У второго животного шерстный покров выглядел изреженным, на мордочке почти отсутствовал, верхний слой кожи снимался чешуями. При этом снаружи наблюдали сплошное заселение кожи GFP⁺-фибробластами, а изнутри – множество округлых GFP⁺-клеток.

У третьего животного кожа снималась отсохшими пластами вместе с шерстью, но под ней находилась новая целая безволосая розовая кожа без признаков зачесов или кровотечения. С внешней стороны в этой новой коже наблюдали множество флуоресцирующих фибробластов и кератиноцитов (рис. 1в). В то же время изнутри в образце была обнаружена всего одна, хотя и крупная, колония круглых GFP⁺-клеток, а фибробласты донорского происхождения отсутствовали. В мертвой коже изнутри обнаруживали флуоресцирующие коллагеновые тяжи и кератиноциты с ядрами (рис. 1з).

К 55-м сут после аллогенной ТКМ у еще одного экспериментального животного произошла полная замена кожного покрова, и новая шерсть отросла приблизительно до 0.5 см в длину, была очень мягкой и шелковистой. Кожа была очень нежной и тонкой, но целой и здоровой на вид. Под волосками наблюдали десятки очень мелких GFP⁺-фибробластов и единичные флуоресцирующие кератиноциты. С внутренней стороны кожи обнаружили десятки GFP⁺-фибробластов, в основном очень тонких и длинных, флуоресцирующих округлых и угловатых клеток. После сингенной ТКМ на 35-е и 55-е сут мощное диффузное свечение мешало рассматривать отдельные клетки. При этом снаружи наблюдали множество GFP⁺-фибробластов и кератиноцитов (рис. 1д), в толще кожи и с ее внутренней стороны – GFP⁺-фибробласты разных форм и размеров, только изнутри – десятки округлых GFP⁺-клеток (рис. 1е).

На 14-е сут после аллогенной ТКМ у одного из животных был обнаружен участок кожи с зачесом,

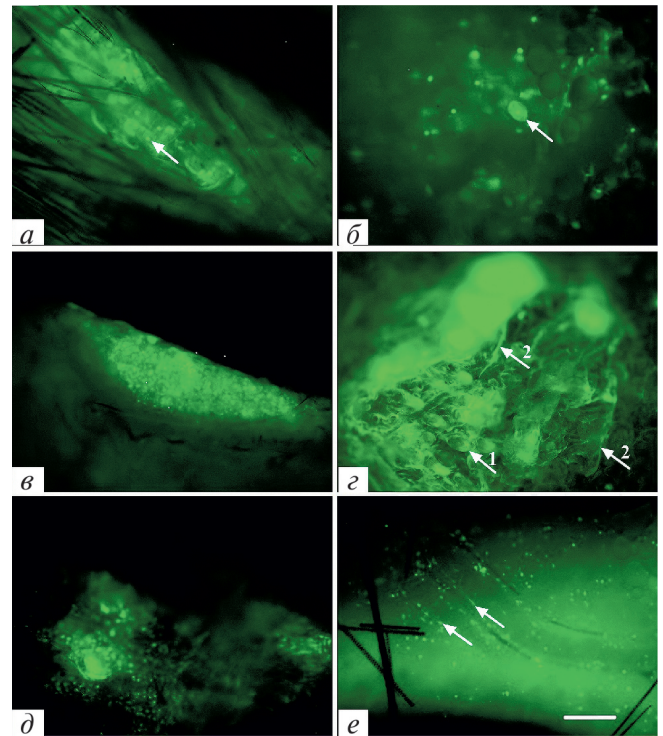


Рис. 1. Химеризация кожи с дифференцировкой донорских клеток: а – кератиноциты с ядрами (паракератоз) в роговом слое через 21 сут после сингенной трансплантации костного мозга (ТКМ); б – одиночный кератиноцит в глубине кожи с внутренней стороны (дискератоз) через 28 сут после аллогенной ТКМ (стрелка); в – внешняя сторона новой кожи с множеством флуоресцирующих клеток через 35 сут после аллогенной ТКМ; з – флуоресцирующие коллагеновые тяжи, бесклеточная масса и кератиноциты с ядрами в отслоившейся мертвой коже через 35 сут после аллогенной ТКМ изнутри. Стрелкой 1 указан кератиноцит, стрелкой 2 – коллагеновые тяжи; д – множество GFP⁺-фибробластов и кератиноцит через 55 сут после сингенной ТКМ снаружи; е – десятки округлых GFP⁺-клеток и единичные фибробласты изнутри через 35 сут после сингенной ТКМ. Стрелками указаны фибробласты. Масштабная линейка: 50 мкм. Ув. об.: 20×.

из которого был взят образец для сравнения с неповрежденной кожей с поясницы. Клетки донорского происхождения на этом участке отличались от всех других образцов тем, что были не округлыми среднего размера (около 5 мкм в диаметре), не веретенообразными и не кератиноцитами, а довольно крупными и овальными. В то же время как после сингенной ТКМ, так и после аллогенной у части реципиентов в коже с поясницы были обнаружены механические повреждения, похожие на покусывания, и в них находились плотные скопления GFP⁺-фибробластов и круглых клеток, одинаковых по своим показателям с аналогичными клетками реципиентов с неповрежденной кожей.

Таблица 2. Результаты детекции клеток, несущих маркерный ген белка EGFP, в печени мышей – реципиентов линий C57Bl/6 и CBA

Тип GFP ⁺ -клеток и структур	Линия	Время после трансплантации, сут						
		7	11	14	21	28	35	55
Фибробласты 5–15 мкм	C57Bl/6	±	±	±	±	±	±	±
	CBA	±	±	±	±	±	±	±
Фибробласты 16–30 мкм	C57Bl/6	±	±	±	±	±	±	+
	CBA	±	±	±	±	±	±	+
Округлые и овальные 5–10 мкм	C57Bl/6	±	±	+	+	±	+	±
	CBA	±	±	+	±	±	+	±
Мегакариоциты	C57Bl/6	–	–	–	±	±	–	±
	CBA	±	–	±	–	±	±	+
Перегородки	C57Bl/6	±	±	±	±	±	+	+
	CBA	±	±	+	+	+	++	++
Клетки Ито	C57Bl/6	±	+	+	+	++	++	+++
	CBA	+	++	++	++	++	+++	+++
Гепатоциты	C57Bl/6	±	±	±	±	±	±	±
	CBA	–	±	±	–	±	±	±

Эти различия наводят на мысль, что уровень специализации, которого могут достичь МСК КМ, зависит не только от типа трансплантации, но и от характера повреждения кожного покрова, поскольку в облученной, но неповрежденной коже поясничной области после обоих типов ТКМ нами обнаружена дифференцировка МСК и в фибробласты, и в кератиноциты, как и в случае с кусками.

Печень. Чтобы понять, являются ли гепатоцитами обнаруженные нами на слайсах крупные одно- и двуядерные структуры донорского происхождения, окруженные темной зоной (предположительно цитоплазмой) без видимой мембраны, и ответить на вопрос, существуют ли вообще экспрессирующие GFP гепатоциты, мы исследовали образцы печени у доноров – мышей Tg(АСТВ-EGFP)10sb/J, разводимых на основе инбредной линии C57BL/6, и гибридов самка Tg(АСТВ-EGFP)10sb/J × самец CBA. У доноров на слайсах в гепатоцитах флуоресцировали и ядра, и цитоплазма, либо только ядра. Эти клетки были приурочены к строме органа, прикрепляясь к ней относительно небольшими группами (кластерами). У гибридов GFP⁺-гепатоциты наблюдали в очень крупных скоплениях и наряду с полностью флуоресцирующими клетками одновременно мы обнаруживали такие, у которых были темные ядра и светилась только цитоплазма, и такие, у которых одно или два очень ярких ядра были окружены темной цитоплазмой. Последняя разновидность гепатоцитов у обоих типов доноров морфологи-

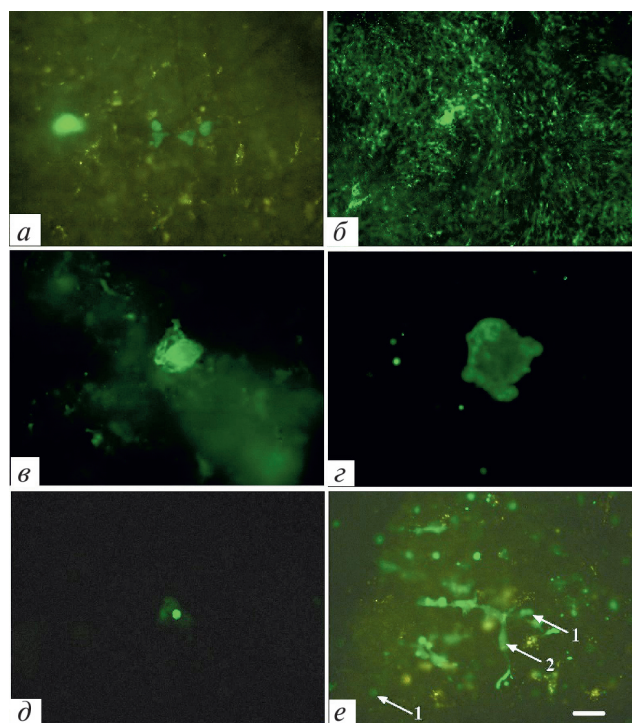


Рис. 2. Химеризация печени и селезенки с дифференцировкой донорских клеток: *a* – GFP⁺-клетки неправильной формы и треугольные в печени через 1 сут после аллогенной ТКМ; *б* – GFP⁺-структуры из клеток Ито в печени в виде вихрей, колец и лучей через 35 сут после аллогенной ТКМ; *в*, *г* – GFP⁺-мегакариоцит в печени и селезенке соответственно через 55 сут после аллогенной ТКМ; *д* – гепатоцит донорского происхождения через 35 сут после сингенной ТКМ; *е* – GFP⁺-гепатоциты (1) рядом с GFP⁺-клеткой Ито донорского происхождения (2) через 28 сут после аллогенной ТКМ. Масштабная линейка: 50 мкм. Ув. об.: 40× (*a*, *в*–*е*), 10× (*б*).

чески соответствовала тем структурам, которые наблюдали у животных в нашем эксперименте, что позволило нам утверждать, что мы наблюдаем у реципиентов именно гепатоциты.

Уже через 1 сут после ТКМ у реципиентов обеих линий в печени в образцах как стромы, так и паренхимы в некоторых полях зрения обнаруживали лежащие поодиночке флуоресцирующие перемычки, овальные и неправильной формы крупные клетки длиной 10–15 мкм, фибробласты (эпителиоциты) длиной 5–15 мкм, угловатые, округлые и овальные клетки длиной 5–10 мкм, единичные макрофаги и лейкоциты. Кроме того, детектировали еще и одиночные флуоресцирующие, неправильной формы и треугольные гигантские клетки до 30 мкм в диаметре – возможно, клетки Купфера или активированные клетки Ито (рис. 2а), а также единичные GFP⁺-гепатоциты. Подобную картину мы наблюдали до 7 сут после ТКМ. Затем, начиная с 11-х сут, в строме и паренхиме печени концентрация клеток Ито размером до 30 мкм донорского происхождения причудливых форм со всевозможными сложными отростками постоянно увеличивалась (табл. 2). Они формировали к поздним срокам наблюдения упорядоченные GFP⁺-структуры в виде вихрей, колец и лучей, пронизывающих весь орган (рис. 2б), однако после аллогенной ТКМ мембраны этих клеток выглядели полуразрушенными, чего никогда не наблюдали в контроле.

Кроме того, с 14-х сут у мышей линии СВА в паренхиме печени практически в каждом поле зрения обнаруживали флуоресцирующие перемычки и лейкоциты; количество последних к концу наблюдения возрастало. Что касается реципиентов линии С57Bl/6, то в период 14–55 сут после ТКМ подобные элементы и клетки в печени присутствовали в намного меньших количествах, а представительство клеток донорского происхождения таких типов, как овальные клетки разных размеров (5–15 мкм), округлые и угловатые (5–10 мкм), фибробласты и клетки неправильной формы (10–15 мкм), было стабильно низким (1–5 в некоторых полях зрения). GFP⁺-мегакариоциты при этом встречались с частотой 1–2 на весь препарат или отсутствовали. Через 1–35 сут после аллогенной ТКМ эти клетки также были единичными. Однако на 55-е сут их концентрация становилась больше практически на порядок по сравнению с первоначальной как при исследовании слайсов, так и в паренхиме после перетиранья кусочка печени.

Это позволило предположить, что данное явление было компенсаторной реакцией организ-

ма животного на недостаточное кроветворение в костном мозге, хотя дополнительное исследование мазка крови показало картину, типичную для успешного приживления донорского КМ: поля GFP⁺-тромбоцитов и лейкоциты до 10 клеток в поле зрения. Действительно, в диафизах бедренных костей мыши СВА на 55-е сут после ТКМ костный мозг отсутствовал.

Поскольку селезенка наряду с КМ также является органом кроветворения, мы предположили, что и в ней после аллогенной ТКМ могут происходить нетипичные гемопоэтические процессы. Действительно, в гомогенате селезенки было обнаружено значительное количество активно пролиферирующих GFP⁺-бластных клеток, GFP⁺-мегакариобласты и мегакариоциты. По всей вероятности, именно этим объяснялось длительное выживание животного после аллогенной ТКМ, несмотря на отторжение и полную замену кожного покрова. На рис. 2в, г представлены фото GFP⁺-мегакариоцитов GFP⁺ в печени и в селезенке мыши СВА соответственно. Гепатоциты донорского происхождения встречались поодиночке или небольшими группами после обоих видов ТКМ (рис. 2д, е) в некоторых полях зрения.

Прямая кишка. В прямой кишке с внешней стороны единичные округлые и овальные недифференцированные GFP⁺-клетки, а также небольшие фибробластоподобные клетки донорского происхождения появлялись у реципиентов линии С57Bl/6 уже через 1 сут после трансплантации, а у мышей линии СВА значительно позже – через 3 и 7 сут после этой процедуры (табл. 3).

На 11-е сут недифференцированные GFP⁺-клетки с внешней стороны у реципиентов обеих линий замещались флуоресцирующими фибробластами, которых, начиная с 14-х сут, наблюдали уже десятками в поле зрения при увеличении объектива 20× (общем увеличении 200×). Однако если на 14-е сут после сингенной ТКМ они всегда имели размер 5–15 мкм и веретенообразную форму (рис. 3а), то после аллогенной ТКМ часть GFP⁺-фибробластов у одного животного была гигантского размера (до 30 мкм в длину) и с разветвлениями (рис. 3б).

Интересно, что ни до, ни после этого такую картину мы не наблюдали. В последующие сроки у животных в стенке кишки снаружи после обоих типов ТКМ появлялись расположенные между гладкомышечными волокнами в виде цепочек и прикрепленные к волокнам нитевидные и очень тонкие паукообразные клетки с длинными отростками.

Таблица 3. Результаты детекции клеток, несущих маркерный ген белка EGFP, в прямой кишке мышей – реципиентов линий C57Bl/6 и CBA

Тип клеток	Линия	Время после трансплантации, сут						
		7	11	14	21	28	35	55
Округлые и овальные недифференцированные	C57Bl/6	+	+	–	–	–	–	–
	CBA	–	±	–	–	–	–	±
Фибробласты	C57Bl/6	±	+	++	++	++	++	++
	CBA	±	±	++	++	++	++	++
Клетки Пейеровых бляшек	C57Bl/6	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	CBA	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Клетки ворсин	C57Bl/6	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	CBA	–	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Округлые и овальные соединительнотканые	C57Bl/6	–	++	++	+++	+++	+++	+++
	CBA	–	–	++	+++	+++	+++	+++

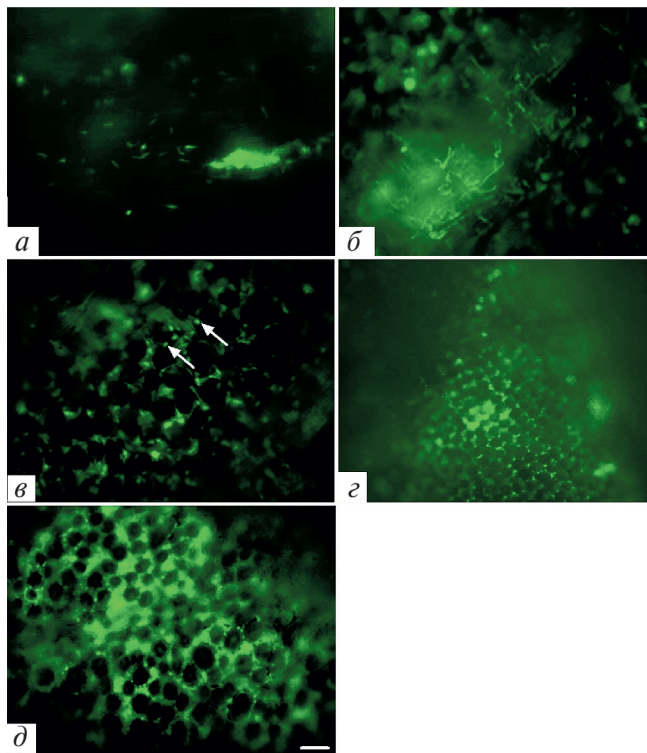


Рис. 3. Химеризация прямой кишки с дифференцировкой донорских клеток: *а* – GFP⁺-фибробласты нормального размера через 14 сут с внешней стороны кишки (в мышечном слое) после сингенной ТКМ; *б* – GFP⁺-фибробласты гигантского размера с разветвлениями с внешней стороны кишки (в мышечном слое) через 14 сут после аллогенной ТКМ; *в* – GFP⁺-клетки, похожие на бокаловидные (стрелки), через 14 сут после аллогенной ТКМ; *г* – основания ворсин правильной 6-гранной формы в поперечном сечении через 35 сут после сингенной ТКМ; *д* – деформированные, разного размера ворсины, окруженные слоями соединительнотканых GFP⁺-клеток через 35 сут после аллогенной ТКМ. Масштабная линейка: 50 мкм. Ув. об.: 20× (*а*, *б*, *г*, *д*), 10× (*в*).

На 35-е сут у всех животных линии C57BL/6 стенка кишки имела нормальные толщину и цвет, а у животных линии CBA была гиперемированной. У одного из троих животных кишка была плотной со множеством ясно видимых фибробластов, узких прямых и разветвленных, идущих как в продольном, так и в поперечном направлениях, что было близко к картине 28-х сут. У других двух мышей стенка кишки была истончена до такой степени, что сквозь нее были ясно видны основания ворсин и GFP⁺-фибробласты едва просматривались; они имели нитевидную форму и были нормального размера. На 55-е сут у мыши линии CBA также детектировали GFP⁺-фибробласты, до 20 в поле зрения (при увеличении объектива 20× и общем увеличении 200×), но к ним добавились округлые GFP⁺-клетки, предположительно лейкоциты. Несмотря на отторжение кожи, произошедшее за 2–3 недели до забора органов, кишка не выглядела ни истонченной, ни воспаленной, что наблюдалось в более ранние сроки у других животных после аллогенной ТКМ. Это указывает на индивидуальность порядка развития РТПХ в разных органах и ее силу.

В Пейеровых бляшках флуоресцирующие клетки появлялись через 5 сут после обоих видов ТКМ и наблюдались до конца эксперимента. Однако у мышей CBA таких бляшек было мало по сравнению с мышами C57BL/6 или они не вообще не обнаруживались (21-е сут после ТКМ).

На 35-е сут в толще кишки одного из этих животных была найдена только одна бляшка, но гигантских размеров и оплетенная кровеносными сосудами, которые на более ранних сроках были малозаметными. Количество GFP⁺-клеток в стро-

ме и паренхиме бляшек было настолько большим, что нефлуоресцирующие клетки в них не просматривались.

Заселение ворсин прямой кишки после обоих типов ТКМ едва начиналось через 1 нед., но уже к 11-м сут практически во всех находилось от 1–2 до 5–15 GFP⁺-клеток (см. табл. 3). Некоторые ворсины к этому сроку замещались соединительнотканными структурами донорского происхождения после сингенной и через 14 сут – после аллогенной ТКМ.

Во втором случае в слизистой оболочке детектировали еще и круглые флуоресцирующие клетки, выступающие из стенок ворсин, похожие на бокаловидные, которые после этого ни разу не обнаруживались (см. рис. 3в). С 21-х сут и до конца наблюдения картина заселения и состояния слизистой оболочки кишки у мышей C57BL/6 практически не менялась: во всех ворсинах было множество GFP⁺-клеток, а сами основания ворсин имели правильную 6-гранную форму в поперечном сечении (см. рис. 3г).

У мышей линии СВА к 21-м сут картина заселения была иной. Многие ворсины были без GFP⁺-клеток, у многих донорские клетки были угловатыми и укороченными. К 28-м сут к этому добавилось изменение формы большинства ворсин кишки с 6-гранной на овальную, а к 35-м сут такими стали все ворсины. Они потеряли однородность по размеру, так что разница по толщине между некоторыми достигала двукратной. Местами между ворсинами были пустые промежутки, при этом практически каждая была окружена двойным или тройным слоем соединительнотканых клеток донорского происхождения (см. рис. 3д). У мыши, дожившей до 55 сут, состояние слизистой оболочки было таким же.

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие РТПХ-фенотипа у мышей характеризуется изменениями кожи и шерсти, потерей веса и диареей (Vrubaker, 1993), склерозированием желчных протоков и колитом (Brandon et al., 2010), поэтому нами для исследования связи проявлений РТПХ со степенью химеризма были выбраны кожа, прямая кишка и печень. Аллогенная трансплантация КМ мышам СВА от мышей линии C57BL/6 моделировала неродственную аллогенную подсадку КМ у человека с неполным соответствием по HLA, так как известно, что ли-

нии СВА и C57BL/6 имеют несколько отличий по лейкоцитарным антигенам (Бландова и др., 1983).

Развитие РТПХ после подобной ТКМ исследовали и ранее, но невозможность дифференцировать клетки донора от клеток реципиента не позволяла отследить судьбу первых в организме хозяина (Цуцаева и др., 1988). Ген *GFP* был выделен из медузы *Aequorea victoria*. Поскольку для флуоресценции белка GFP не требуются экзогенные субстраты и кофакторы, он может быть использован как маркер экспрессии и локализации гена в живых организмах (Chalfie, 1995). Были созданы трансгенные линии мышей (Okabe et al., 1997), имеющие усиленный ген *GFP* (*EGFP*), находящийся под бета-актиновым промотором и цитомегаловирусным энхансером, и предложили использовать их в различных экспериментах по трансплантации.

Использование EGFP в нашем случае позволяло проводить визуализацию восстановления исследуемых органов реципиента после облучения за счет донорских клеток, а также однозначно связать с ними процессы гистогенеза. При этом было возможно исследовать большой объем органа (печени, кожи) или весь орган (прямая кишка) на наличие клеток донорского происхождения без какой-либо фиксации, ПЦР, FISH, окрашивания на Y-хромосому или гистохимии.

Данный метод исследования химеризма после ТКМ широко известен в экспериментальной биологии (Krause, 2002; Миллер и др., 2016; Egawa, Kabashima, 2018; Hünfeldt et al., 2018). Он позволяет моделировать на животных-биомоделях процессы, которые очень сложно изучать на людях, перенесших ТКМ, в частности степень заселения донорскими клетками органов реципиента и РТПХ, для чего нужны сложные молекулярно-биологические методы или биопсия (Körbling, 2002; Tolar et al., 2013; van der Torren, 2015; Waterhouse et al., 2021).

Мы провели пошаговое исследование с забором у мышей-реципиентов органов-мишеней РТПХ на 10 сроках после аллогенной и сингенной трансплантации, чего не обнаружили в работах других авторов, которые изучали химеризм в течение одного или двух сроков после ТКМ без всякого объяснения выбора времени и при неясности того, какое время соответствует максимуму заселения донорскими клетками или началу гибели клеток.

В нашей работе после обоих видов ТКМ у реципиентов в коже наблюдали как округлые недифференцированные клетки, так и фибробласты и кератиноциты донорского происхождения.

Из дифференцированных клеток подавляющее большинство составляли клетки соединительной ткани (фибробласты). После аллогенной ТКМ GFP⁺-кератиноциты появлялись довольно поздно (28 сут) по сравнению с сингенной (14 сут). Накопление кератина в обоих случаях сопровождалось мощным свечением кожи.

Присутствие кератиноцитов донорского происхождения после сингенной ТКМ показано и в наших работах, и в работах других авторов (Fujita et al., 2010; Богданенко и др., 2020, 2022). Что касается аллогенной ТКМ, то есть работа, в которой показано, что XY-положительный сигнал определялся с частотой 6% через 867 сут после трансплантации в цитокератин-положительных клетках образцов кожи женщин-реципиентов, получивших КМ от доноров-мужчин. В эпидермисе клетки донорского происхождения располагались в глубине мальпигиевого слоя, близко к зернистому слою (Körbling et al., 2002).

В другой работе по аллогенной ТКМ биопсия кожи пациентов выявила наличие донорских CD45⁻-клеток, экспрессировавших коллаген VII типа (Tolar et al., 2013). Однако у мышей-биомоделей с эпидермальной буллезой через 10–12 недель после полулетальной и летальной дозы облучения и экспериментального лечения аллогенной ТКМ кератиноциты в коже отсутствовали при наличии только донорских недифференцированных клеток, которые авторы определяли как клетки лейкоцитарного происхождения, так как они несли на своих мембранах кластер дифференцировки CD45 (Egawa, Kabashima, 2018; Hünefeld et al., 2018).

Дифференцировка стволовых клеток КМ (СККМ) в кератиноциты была очень слабой у мышей даже после летального облучения и травмирования кожи, так как только 0.1% кератиноцитов в месте раны определялись как донорские, причем они не флуоресцировали, хотя несли ген *GFP*, и были выявлены иммунофлуоресцентным окрашиванием на цитокератин и Y-хромосому (Harris et al., 2004).

Возможно, что отличие наших результатов от указанных состоит в количестве трансплантированных клеток ($1.5 \cdot 10^7$ против $1 \cdot 10^6$), сроках детекции кератиноцитов (28–55 сут против 70–84 после ТКМ) и степени антигенных различий между донором и реципиентом. В нашем случае мы наблюдали полную замену кожи в период с 35-х по 45-е сут после аллогенной ТКМ, о чем ничего не сообщается у других авторов (Egawa, Kabashima, 2018; Hünefeld et al., 2018), но, возможно, была

ими не замечена, поскольку о наблюдениях за ее промежуточным состоянием не сообщалось.

Возможно, что на период замены кожи кератиноциты могут исчезать (что и наблюдалось нами у одного животного на 35-е сут) или присутствовать в ней в минимальных количествах (у животного на 55-е сут). Мы считаем, что в механизме замены кожи могут участвовать Т-клетки реципиента, поскольку есть работа, в которой острую кожную РТПХ наблюдали в присутствии 100% Т-клеток хозяина; при этом большинство антиген-представляющих клеток в коже было донорского происхождения и наблюдалось непосредственно рядом с Т-клетками хозяина (Divito et al., 2020). В пользу этой гипотезы говорит тот факт, что и в указанной, и в нашей работе наблюдали паракератоз и дискератоз кератиноцитов именно донорского происхождения, что свидетельствует о наличии иммунной атаки, причем со стороны Т-клеток хозяина, так как эти явления характерны для воспалительных заболеваний.

Наблюдаемые в нашей работе во внутреннем слое кожи округлые GFP⁺-клетки могут быть и лейкоцитами донорского происхождения, по крайней мере частично, поскольку после сингенной ТКМ их количество в этом слое существенно ниже по сравнению с аллогенной. Это явление, а также усиление химеризма кожи (в основном за счет фибробластов) вплоть до события ее отторжения, исчезновение с внутренней поверхности новой кожи большинства GFP⁺-клеток, а затем их новое размножение к 55-м сут после аллогенной ТКМ может обозначать наличие перекрестной иммунной реакции в этом органе, т.е. одновременно и РТПХ, и реакции “хозяин против трансплантата” (РХПТ).

Наличие фибробластов в коже поясницы, наблюдаемое нами не только после сингенной, но и после аллогенной ТКМ, указывает на возможность дифференцировки стволовых клеток КМ в этом органе при определенных условиях. Однако ясно, что одного облучения может быть недостаточно. Наличие довольно глубоких механических травм (покусов, порезов) вызывает усиление образования фибробластов.

Подобная реакция показана нами и другими авторами при использовании облучения и последующего нанесения травмы при сингенной ТКМ (Rea et al., 2009; Rodriguez-Menocal et al., 2015; Богданенко и др., 2020). Но поверхностное повреждение кожи перед аллогенной ТКМ приводило к появлению в ее толще только крупных донорских недифференцированных клеток, что совпада-

ет с данными других авторов (Egawa, Kabashima, 2018; Hünefeld et al., 2018).

Возможно, причиной нарушения дифференцировки донорских клеток в коже может быть не только работа иммунной системы хозяина, но и отсутствие необходимых для этого сигналов в нужной концентрации или нужного качества. Роль сигнальных молекул, необходимых для регуляции дифференцировки стволовых клеток, отводят, в частности, некодирующим кольцевым РНК. При культивировании стволовых клеток различного происхождения они способны либо усиливать, либо ослаблять данный процесс (Lin et al., 2021).

Как показывает наша работа, большинство GFP⁺-клеток в печени дифференцировались в клетки соединительной ткани — фибробласты, клетки Ито и клетки перемычек. Поскольку мы могли видеть клетки целиком и живыми, нельзя было принять один тип клеток за другой. Есть работа, в которой через 70 сут после сингенной трансплантации GFP⁺-клетки цельного КМ в печеночных долях дифференцировались в клетки, подобные купферовским, со звездчатой морфологией (Filip et al., 2014), т.е. в клетки Ито. Нам удалось обнаружить превращение донорских стволовых клеток КМ в гепатоциты, независимо от типа трансплантации, хотя их число не превышало 1–5 в некоторых полях зрения. Этот результат не противоречит данным о возникновении после ТКМ химеризма гепатоцитов у животных (Krause, 2001) и человека (Körbling et al., 2002).

Наличие гепатоцитов донорского происхождения при использовании в качестве метки Y-хромосомы (Körbling et al., 2002) можно считать спорным, поскольку увидеть всю клетку одновременно при нарезании срезов фиксированного органа невозможно без ее компьютерной реконструкции, которую обычно не делают. Чтобы избежать подобной ошибки, некоторые авторы используют методы окрашивания срезов печени реципиентов веществами, связывающимися с белками, вырабатываемыми гепатоцитами. Однако морфологически определить обнаруживаемые таким способом клетки, как гепатоциты в данном случае, обычно нельзя, и в ряде работ авторы употребляют термин “гепатоцитоподобные клетки” (Caplan, 2013).

В то же время есть работа, где обнаруженные клетки донорского происхождения действительно морфологически выглядят как гепатоциты. По крайней мере, так утверждают авторы (Francois et al., 2013). Неверие в возможность использования стволовых клеток КМ для терапии токсических повре-

ждений печени выразили другие авторы (Kanazawa, Verma, 2003): при использовании трех разных способов детекции гепатоцитов им удалось найти только пять гепатоцитов на множестве срезов препаратов, полученных от нескольких животных. Ничтожная доля гепатоцитов донорского происхождения, обнаруженных после летальной дозы облучения и аллогенной ТКМ и детектированных в печени по Y-хромосоме, подтверждает этот вывод (Harris et al., 2004).

При нашем методе исследования печени в большинстве GFP⁺-гепатоцитов подопытных животных флуоресцировали только ядра. Возможно, при этом способе подготовки ткани печени к исследованию повреждался актиновый цитоскелет GFP⁺-клеток, и этот белок, экспрессируемый под актиновым промотором, терял нативную структуру в первую очередь в цитоплазме клеток. В то же время GFP⁻-клетки печени выглядели здоровыми во все сроки наблюдения после аллогенной ТКМ, что говорит об отсутствии иммунной реакции против них со стороны донорских Т-клеток.

Прогрессирующее заселение печени GFP⁺-клетками Ито и фибробластами и формирование ими стромы реципиента в нашей работе совпадают по времени с развитием холангитов и склерозированием желчных протоков после моделирования РТПХ (Brandon et al., 2010). Известно, что при хроническом повреждении печени происходит активация клеток Ито, что приводит к секреции матрикса, вследствие чего развивается фиброз или даже цирроз (Iredale, 2001). Из этого следует, что именно увеличение химеризма соединительной ткани с течением времени, наблюдаемое нами, должно усиливать иммунные реакции в печени.

Наличие там значительного количества GFP⁺-мегакариоцитов подтверждает возможность образования дополнительных центров кроветворения из донорских клеток у мышей после аллогенной трансплантации и развития РТПХ (Цуцаева и др., 1988). Поскольку показано, что РТПХ вызывает подавление недифференцированных гемопоэтических клеток и блокирует дифференцировку мегакариоцитов в костном мозге на мышинной модели (Lin et al., 2014), компенсация образования тромбоцитов выглядит целесообразной для организма в целом. Однако то, что она проходит за счет донорских клеток, вызывает вопрос о том, за счет каких сигналов это происходит. Засилье донорских клеток в селезенке на 55-е сут после аллогенной ТКМ и наличие там еще одного очага размножения GFP⁺-мегакариоцитов одновременно с большим количеством ярко флуоресцирующих бластов указывает на само-

организацию всей популяции донорских клеток для поддержания их нормального существования в организме реципиента.

По данным литературы, даже после видимого полного восстановления кишечника после острого радиационного поражения миофибробласты, эпителиальные и эндотелиальные клетки КМ-происхождения могут быть найдены в тканях этого органа (Brittan et al., 2002, 2005; Okamoto et al., 2002). Через 7 сут после сингенной ТКМ таких клеток в кишке еще совсем мало (Ch'ang et al., 2012), но уже через 11–14 сут происходит экспоненциальное заселение ими практически всех ворсин толстой кишки (Сергиевич и др., 2021). К 30 сут после такой трансплантации строма ворсинок кишечника обильно колонизирована клетками с GFP, а через 70 сут GFP⁺-клетки образуют рыхлую соединительную ткань ворсинок (Filip et al., 2014).

Эта картина не противоречит той, которую наблюдали в наших экспериментах. В то же время некоторая задержка заселения мышечного слоя прямой кишки фибробластами и отклонение их размеров от обычных после аллогенной ТКМ заставляет предположить, что, как и в случае с дифференцировкой клеток донорского происхождения в фибробласты печени или кератиноциты, после аллогенной трансплантации имеет место недостаток необходимых для этого сигналов в нужной концентрации или нужного качества.

Свидетельством РТПХ, вероятно, является истончение стенки кишки практически до ее полной прозрачности после аллогенной ТКМ, при том что GFP⁺-фибробласты до конца жизни мышей не повреждались. Однако деформация или отсутствие GFP⁺-клеток во многих ворсинах, а затем и деформация большинства ворсин кишки, потеря ими однородности по размеру позволяют предположить, что в данном случае имеет место иммунная атака со стороны клеток хозяина, а не донора. Это предположение подкрепляется тем фактом, что практически каждая ворсина к поздним срокам была окружена двойным или тройным слоем соединительнотканых клеток донорского происхождения, а, как известно, именно хроническая иммунная атака провоцирует разрастание соединительной ткани.

Отсутствие в бедренных костях костно-мозговых клеток не только реципиента, но и донора через 55 сут после аллогенной ТКМ подтверждает возможность существования перекрестной иммунной реакции. Поскольку при аллогенной ТКМ как Т-клетки, так и HSPCs (hematopoietic stem and

progenitor cells) являются донорскими, следовало бы ожидать, что эти клетки будут защищены от прямого повреждения при РТПХ после трансплантации (Müskens et al., 2021). Однако несколько исследований доказали, что РТПХ приводит к снижению количества и функции HSPC. Это позволило предположить, что они повреждаются при РТПХ (Martínez-Jaramillo et al., 2001; Shono et al., 2010).

Вопрос заключается в том, повреждаются ли донорские HSPCs непосредственно Т-клетками хозяина. В пользу этого предположения говорят факты, полученные на мышах: присутствие только собственных функциональных Т-лимфоцитов во всех исследованных образцах кожи и толстой кишки во время острой РТПХ при почти полном их отсутствии в крови и, наоборот, наличие в основном в ней Т-клеток донорского происхождения в отсутствие РТПХ (Divito et al., 2020). Как мы полагаем, это явление указывает на то, что после ТКМ, кроме РТПХ, имеет место и реакция РХПТ.

В практическом применении в медицине КМ считается субстанцией, состоящей из стволовых клеток, которые затем специализируются в клетки крови. Однако при этом упускают из виду, что в КМ содержится большое количество МСК. Хотя МСК считаются неуловимыми для иммунитета и даже иммуносупрессивными, свежие данные свидетельствуют о том, что после их дифференцировки при аллогенной ТКМ иммунный ответ хозяина может быть неизбежным (Mohammadi et al., 2020). В частности, кожно-резидентные Т-клетки реципиента выживают при “истощении лимфоцитов”, так как, несмотря на отсутствие циркулирующих лимфоцитов, у пациентов с глубокой лимфопенией после химиотерапии все еще может развиваться опосредованная Т-клетками лекарственная сыпь (Divito et al., 2020).

Как видно из нашей работы, стволовые клетки КМ превращаются в основном в клетки соединительной ткани. В то же время они оказываются способными дифференцироваться в специализированные клетки органов.

При этом, очевидно, они заселяют ниши, занимаемые до того клетками хозяина и погибшими при его облучении, необходимым для успеха трансплантации. Иммунная система реципиента может восстанавливаться после облучения, после чего, как мы предполагаем, клетки донорского происхождения становятся ее мишенью.

Однако РТПХ, согласно своему названию, подразумевает повреждение органов после алло-

генной ТКМ донорскими Т-клетками, которые вводятся одновременно с кроветворными клетками при трансплантации, а затем вновь образуются из гематопоэтических клеток. Из всех наблюдаемых нами признаков такой атаки выделяются массы недифференцированных округлых GFP⁺-клеток с внутренней поверхности кожи и истончение стенки прямой кишки, заселенной относительно небольшим количеством GFP⁺-фибробластов. Все остальные повреждения органов после аллогенной ТКМ – отторжение кожи, в которой находится множество клеток донорского происхождения (в основном GFP⁺-фибробластов), деформация ворсин в слизистой оболочке прямой кишки и частичная деформация и потеря ими GFP⁺-клеток, массово их заселивших, усиленное размножение соединительнотканых GFP⁺-клеток в печени и кишке, наличие полуразрушенных клеток Ито на поздних сроках, опустошение КМ реципиента – указывают на то, что атака на них в данном случае идет со стороны иммунной системы реципиента, а не донорских Т-лимфоцитов.

Поэтому мы предполагаем, что после аллогенной ТКМ, кроме РТПХ, имеет место и РХПТ. Это предположение подкрепляется данными клинической картины после аллогенной ТКМ из медицинской практики – повреждением кожи, эпителия желчных протоков, но не гепатоцитов, и слизистой оболочки пищеварительного тракта, избыточной продукцией коллагена – и согласуется с работами о наличии реципрокных иммунных реакций после аллогенной ТКМ (Vossen, 1998; Dzierzak-Mietla et al., 2012). Явное проявление иммунных реакций (21–35 сут после ТКМ) напрямую совпадает со временем массового заселения исследованных органов клетками донорского происхождения и их дифференцировки, т.е. развитие химеризма определяет развитие поражения органов.

Это наблюдение подтверждается тем фактом, что по результатам другой нашей работы потеря химеризма крови через 2–7 нед. после аллогенной (от мышей линии C57Bl/6) и полуаллогенной трансплантации (от гибридов ♀C57BL/6 GFP⁺ × ♂СВА) мышам СВА приводила к увеличению выживаемости реципиентов (до 9 мес. после облучения) по сравнению с теми животными, у которых химеризм наблюдали до конца жизни. При этом присмертное исследование животных с потерей химеризма крови показало полное или частичное отсутствие химеризма внутренних органов без видимых признаков РТПХ (Богданенко и др., 2021).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансирована за счет средств бюджета Института общей патологии и патофизиологии и Института биофизики клетки РАН. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>) и были одобрены этическим комитетом Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии (протокол № 4 от 12.09.2022 г.) в соответствии с инструкцией Американского физиологического общества (1995).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.В.Б.: идея, помощь при проведении инъекций и облучении, забой животных, анализ данных для таблиц, подбор фотографий и данных из литературы, трактовка результатов, написание текста.

Л.А.С.: извлечение КМ из бедренных костей, приготовление суспензии клеток, введение КМ в хвостовую вену, взятие образцов органов, работа на флуоресцентном микроскопе, ведение протоколов, подготовка фотографий для публикации.

А.В.К.: подбор дозы облучения, обсуждение результатов, подбор литературы, утверждение окончательной версии статьи.

Н.А.К.: анализ микрофотографий, написание резюме, утверждение окончательной версии статьи.

И.А.Л.: подготовка животных для эксперимента, ведение мышей после трансплантации, обсуждение результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бландова З.К., Душкин В.А., Малашенко А.М., Шмидт Е.Ф. 1983. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. М.: Наука. (Blandova Z.K., Dushkin V.A., Malashenko A.M., Shmidt Ye.F. 1983. Linii laboratornykh zhivotnykh dlya mediko-biologicheskikh issledovaniy. M.: Nauka.)

- Богданенко Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухова А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А. 2021. Выживаемость и устойчивость химеризма крови у мышей линии СВА после трансплантации костного мозга от доноров различного происхождения, несущих ген EGFP. Патогенез. Т. 19. № 4. С. 30. (Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova I.A. 2021. Survival and stability of blood chimerism in CBA mice after bone marrow transplantation from donors of various origin carrying the EGFP gene. Patogenez. V. 19. No. 4. P. 30.)
- Богданенко Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухова А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А. 2022. Исследование распределения донорских клеток при заживлении резаных ран после аллогенной и сингенной безоблучательной трансплантации цельного костного мозга с использованием мышей, несущих ген EGFP. Патогенез Т. 20. № 4. С. 69. (Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova I.A. 2022. The distribution of donor cells during healing of incised wounds after allogeneic and syngeneic transplantation of whole bone marrow without irradiation, using mice carrying the EGFP gene. Patogenez. V. 20. № 4. P. 69.)
- Богданенко Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухова А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А., Карнаухова В.Н. 2020. Изучение регенеративного потенциала стволовых клеток цельного костного мозга для лечения механических травм кожи в модельных экспериментах на мышах. Патол. физиол. и экспер. терапия. Т. 64. № 1. С. 31. (Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova I.A., Karnaukhov V.N. 2020. The regenerative potential of stem cells from the whole bone marrow for the treatment of skin mechanical trauma in a murine model. Patol. fiziol. i eksper. terapiya (Pathol. Physiol. Exper. Ther.). V. 64. No. 1. P. 31.)
- Богданенко Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухова А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А. 2022. Исследование распределения донорских клеток при заживлении резаных ран после аллогенной и сингенной безоблучательной трансплантации цельного костного мозга с использованием мышей, несущих ген EGFP. Патогенез Т. 20. № 4. С. 69. (Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova I.A. 2022. The distribution of donor cells during healing of incised wounds after allogeneic and syngeneic transplantation of whole bone marrow without irradiation, using mice carrying the EGFP gene. Patogenez. V. 20. № 4. P. 69.)
- Миллер Т.В., Повещенко А.Ф., Лыков А.П., Повещенко О.В., Бондаренко Н.А., Петровская И.Ф., Завьялов Е.Л., Деметьева Е.В., Захарова И.С., Грицык О.Б., Шурлыгина А.В., Коненков В.И. 2016. Сравнительный анализ миграционной активности популяций клеток костного мозга в лимфоидные и нелимфоидные органы в норме и на модели сахарного диабета. Современные проблемы науки и образования. № 2. С. 137. (Miller T.V., Poveshchenko A.F., Lykov A.P., Poveshchenko O.V., Bondarenko N.A., Petrovskaya I.F., Zavjalov E.L., Demytyeva E.V., Zakharova I.S., Gritsyk O.B., Shurlygina A.V., Konenkov V.I. 2016. Comparative analysis of the migratory activity of populations of bone marrow cells in lymphoid and non-lymphoid organs in norm and in experimental models of diabetes. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya. No. 2. P. 137.)
- Сергиевич Л.А., Богданенко Е.В., Карнаухова А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А. 2021. Флуоресцентная визуализация динамики распределения GFP⁺-клеток донора в органах мышей после трансплантации нативного или криоконсервированного костного мозга. Цитология. Т. 63. № 6. С. 568. (Sergievich L.A., Bogdanenko E.V., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova I.A. Fluorescent visualization of the dynamics of donor GFP⁺-cells distribution in mouse organs after native or cryopreserved bone marrow transplantation. Tsitologiya. V. 63. No. 6. P. 568.)
- Цуцаева А.А., Гольцев А.Н., Попов Н.Н., Останкова Л.В., Лобасенко Н.П., Микулинский Ю.Е. 1988. Кривоиммунология. Киев: Наукова думка. (Tsutsaeva A.A., Goltsev A.N., Popov N.N., Ostankova L.V., Lobasenko N.P., Mikulinsk Yu.E. 1988. Krioiimmunologiya. Kiev: Naukova dumka.)
- Blazar B.R., Murphy W.J., Abedi M. 2012. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. Nat. Rev. Immunol. V. 12. P. 443.
- Brandon J.A., Perez J., Jennings C.D., Cohen D.A., Sindhava V.J., Bondada S., Kaplan A.M., Bryson J.S. 2010. Association between chronic liver and colon inflammation during the development of murine syngeneic graft-versus-host disease. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. V. 299. № 3. P. G602.
- Brittan M., Chance V., Elia G., Poulson R., Alison M.R., MacDonald T., Wright N.A. 2005. A regenerative role for bone marrow following experimental colitis: contribution to neovasculogenesis and myofibroblasts. Gastroenterol. V. 128. P. 1984.
- Brittan M., Hunt T., Jeffery R., Poulson R., Forbes S.J., Hodivala-Dilke K., Goldman J., Alison M.R., Wright N.A. 2002. Bone marrow derivation of pericyptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. Gut. V. 50. P. 752. <https://doi.org/10.1136/gut.50.6.752>
- Brubaker D.B. 1993. Immunopathogenic mechanisms of posttransfusion graft-vs-host disease. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. V. 202. P. 122.
- Caplan A.I. 2013. Adult mesenchymal stem cells and the NO pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 110. P. 2695. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221406110>
- Chao N.J., Blume K.G. 1989. Bone marrow transplantation. Part I – Allogeneic. West J. Med. V. 151. P. 638.
- Chalfie M. 1995. Green fluorescent protein. Photochem. Photobiol. V. 62. P. 651.
- Ch'ang H.-J., Lin L.-M., Pu-Yuan C., Chi-Wen L., Ya-Hui C., Chou C.-K., Chen H.H. 2012. Bone marrow transplantation enhances trafficking of host-derived myelomonocytic cells that rescue intestinal mucosa after whole body radiation. Radiother. Oncol. V. 104. P. 401.
- Chen X., McClurg A., Zhou G.Q., McCaigue M., Armstrong M.A., Li G. 2007. Chondrogenic differentiation alters the immunosuppressive property of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, and the effect is partially

- due to the upregulated expression of B7 molecules. *Stem Cells*. V. 25. P. 364.
- Gorin N.-C., Labopin M., Boiron J.-M., Theorin N., Littlewood T., Slavin S., Greinix H., Cahn J.Y., Alessandrino E.P., Rambaldi A., Nagler A., Polge E., Rocha V. 2006. Results of genodentical hemopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning for acute myelocytic leukemia: higher doses of stem cells infused benefit patients receiving transplants in second remission or beyond – the acute leukemia working party of the European cooperative group for blood and marrow transplantation. *Clin. Oncol.* V. 24. P. 3959.
- Divito S.J., Aasebo A.T., Matos T.R., Hsieh P.-C., Collin M., Elco C.P., O'Malley T., Bækkevold E.S., Reims H., Gedde-Dahl T., Hagerstrom M., Hilaire J., Lian J.W., Milford E.L., Pinkus G.S. et al. 2020. Peripheral host T cells survive hematopoietic stem cell transplantation and promote graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* V. 130. P. 4624.
- Dzierzak-Mietla M., Markiewicz M., Siekiera U., Mizia S., Koclega A., Zielinska P., Sobczyk-Kruszelnicka M., Kyrz-Krzemien S. 2012. Antigens' disparities on outcomes of hematopoietic stem cell. Transplantation from HLA-matched sibling donors. *Bone Marrow Res.* <https://doi.org/10.1155/2012/257086>
- Dubnyak D.S., Kuzmina L.A., Drovok M.Y., Petinati N.A., Drize N.J., Vasilyeva V.V., Koroleva O.M., Mikhailtsova E.D., Popova N.N., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. 2016. Treatment of refractory intestinal acute GvHD using multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC). *Cell. Ther. Transplant.* V. 5. P. 34. <https://doi.org/10.18620/ctt-1866-8836-2016-5-3-34-36>
- Egawa G., Kabashima K. 2018. A study to detect bone marrow-derived keratinocyte: negative evidence of direct differentiation from bone-marrow cells to keratinocytes in normal and wounded skin using keratin 5-specific reporter mice. *J. Invest. Dermatol.* V. 138. P. 1228. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.12.032>
- Eichwald E.J., Lustgraaf E.C., Weissman I., Strainer M. 1958. Attempts to demonstrate sex-linked histocompatibility genes. *Transplant. Bull.* V. 5. P. 387. <https://doi.org/10.1097/00006534-195810000-00036>
- Ferrara J.L., Levine J.E., Reddy P., Holler E. 2009. Graft-versus-host disease. *Lancet.* V. 373. P. 1550.
- Filip S., Mokry J., Vavrová J., Sinkorová Z., Mičuda S., Sponek P., Filipová A., Hřebíková H., Dayanithin G. 2014. The peripheral chimerism of bone marrow-derived stem cells after transplantation: regeneration of gastrointestinal tissues in lethally irradiated mice. *J. Cell Mol. Med.* V. 18. № 5. P. 832. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12227>
- Francois S., Mouiseddine M., Allenet-Lepage B., Voswinkel J., Douay L., Benderitter M., Chapel A. 2013. Human mesenchymal stem cells provide protection against radiation-induced liver injury by antioxidative process, vasculature protection, hepatocyte differentiation, and trophic effects. *BioMed. Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2013/151679>
- Fujita Y., Abe R., Inokuma D., Sasaki M., Hoshina D., Natsuga K., Nishie W., McMillan J.R., Nakamura H., Shimizu T., Akiyama M., Sawamura D., Shimizu H. 2010. Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice. *PNAS.* V. 107. P. 14347. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000044107>
- Garvy B.A., Elia J.M., Hamilton B.L., Riley R.L. 1993. Suppression of B-cell development as a result of selective expansion of donor T cells during the minor H antigen graft-versus-host reaction. *Blood.* V. 82. P. 2758.
- Harris R.G., Herzog E.L., Bruscia E.M., Grove J.E., Van Arnam J.S., Krause D.S. 2004. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science.* V. 305. P. 90.
- Hünefeld C., Mezger M., Müller-Hermelink E., Schaller M., Müller I., Amagai M., Handgretinger R., Röcken M.J. 2018. Marrow-derived stem cells migrate into intraepidermal skin defects of a desmoglein-3 knockout mouse model but preserve their mesodermal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* V. 138. P. 1157. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.10.035>
- Iredale J.P. 2001. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin. Liver Dis.* V. 3. P. 427. <https://doi.org/10.1055/s-2001-17557>
- Kanazawa Y., Verma I. 2003. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *PNAS.* V. 100. Suppl. 1. P. 11850.
- Körbling M., Katz R.L., Khanna A., Ruifrok A.C., Rondon G., Albitar M., Champlin R.E., Estrov Z. 2002. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N. Engl. J. Med.* V. 346. P. 738. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa3461002>
- Krause D.S. 2002. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther.* V. 9. P. 754
- Lin Y., Hu X., Cheng H., Pang Y., Wang L., Zou L., Xu S., Zhuang X., Jiang C., Yuan W., Cheng T., Wang J. 2014. Graft-versus-host disease causes broad suppression of hematopoietic primitive cells and blocks megakaryocyte differentiation in a murine model. *Biol. Blood Marrow Transplant.* V. 20. P. 1290.
- Lin Z., Tang X., Wan J., Zhang X., Liu C., Liu T. 2021. Functions and mechanisms of circular RNAs in regulating stem cell differentiation. *RNA Biol.* V. 18. P. 2136.
- Liu H., Kemeny D.M., Heng B.C., Ouyang H.W., Melen-dez A.J., Cao T. 2006. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *J. Immunol.* V. 176. P. 2864.
- Lohan P., Coleman C.M., Murphy J.M., Griffin M.D., Ritter T., Ryan A.E. 2014. Changes in immunological profile of allogeneic mesenchymal stem cells after differentiation: should we be concerned? *Stem Cell Res. Ther.* V. 5. P. 99.
- Lohan P., Treacy O., Griffin M.D., Ritter T., Ryan A.E. 2017. Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells and their extracellular vesicles: are we still learning? *Front. Immunol.* V. 8. P. 1626.
- Martínez-Jaramillo G., Gómez-Morales E., Sánchez-Valle E., Mayani H. 2001. Severe hematopoietic alterations in vitro, in bone marrow transplant recipients who develop graft-

- versus-host disease. *J. Hematother. Stem Cell Res.* V. 10. P. 347.
- Mohammadi N., Mardomi A., Hassannia H., Enderami S.E., Ranjbaran H., Rafiei A., Abediankenari S. 2020. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells acquire immunogenicity concurrent with differentiation to insulin-producing cells. *Immunobiol.* V. 225. P. 157994. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151994>
- Moreno D.F., Cid J. 2019. Graft-versus-host disease. *Med. Clin. (Barc).* V. 152. P. 22. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2018.07.012>
- Müskens K.F., Lindemans C.A., Belderbos M.E. 2021. Hematopoietic dysfunction during graft-versus-host disease: a self-destructive process? *Cells.* V. 10. P. 2051.
- Okabe M., Ikawa M., Kominami K., Nakanishi T., Nishimune Y. 1997. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* V. 407. P. 313.
- Okamoto R., Yajima T., Yamazaki M., Kanai T., Mukai M., Okamoto S., Ikeda Y., Hibi T., Inazawa J., Watanabe M. 2002. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat. Med.* V. 8. P. 1011. <https://doi.org/10.1038/nm755>
- Popli R., Sahaf B., Nakasone H., Lee J.Y.Y., Miklos D.B. 2014. Clinical impact of H-Y alloimmunity. *Immunol. Res.* V. 58. P. 249. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8514-3>
- Rea S., Giles N.L., Webb S., Adcroft K.F., Evill L.M., Strickland D.H., Wood F.M., Fear M.W. 2009. Bone marrow-derived cells in the healing burn wound—More than just inflammation. *Burns.* V. 35. P. 356. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2008.07.011>
- Rodriguez-Menocal L., Shareef S., Salgado M., Shabbir A., Van Badiavas E. 2015. Role of whole bone marrow, whole bone marrow cultured cells, and mesenchymal stem cells in chronic wound healing. *Stem Cell Res. Ther.* V. 6. P. 24. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0001-9>
- Shono Y., Ueha S., Wang Y., Abe J., Kurachi M., Matsuno Y., Sugiyama T., Nagasawa T., Imamura M., Matsushima K. 2010. Bone marrow graft-versus-host disease: Early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* V. 115. P. 5401.
- Suratt B.T., Cool C.D., Serls A.E., Chen L., Varella-Garcia M., Shpall E.J., Brown K.K., Worthen G.S. 2003. Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* V. 168. P. 318. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200301-145OC>
- Tee B.C., Sun Z. 2020. Xenogeneic mesenchymal stem cell transplantation for mandibular defect regeneration. *Xenotransplantation.* V. 27. P. e12625. <https://doi.org/10.1111/xen.12625>
- Tolar J., Wagner J.E. 2013. Allogeneic blood and bone marrow cells for the treatment of severe epidermolysis bullosa: repair of the extracellular matrix. *Lancet.* V. 382. P. 1214. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61897-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61897-8)
- Tran S.D., Pillemer S.R., Dutra A., Barrett A.J., Brownstein M.J., Key S., Pak E., Leakan R.A., Kingman A., Yamada K.M., Baum B.J., Mezey E. 2003. Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells *in vivo*: a molecular analytical study. *Lancet.* V. 361. P. 1084. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12894-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12894-2)
- Van der Torren C.R., van Hensbergen Y., Luther S., Aghai Z., Stachová Rychnavská Z., Slot M., Scherjon S., Kröger N., Ganser A., Weissinger E.M., Goulmy E., Hambach L. 2015. Possible role of minor H antigens in the persistence of donor chimerism after stem cell transplantation; relevance for sustained leukemia remission. *PLoS One.* V. 10. P. e0119595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119595>
- Van Dijken P.J., Wimperis J., Crawford J.M., Ferrara J.L.M. 1991. Effect of graft-versus-host disease on hematopoiesis after bone marrow transplantation in mice. *Blood.* V. 78. P. 2773.
- Vossen J. 1998. Allogeneic bone marrow transplantation: relation between chimaerism and immunity. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.* V. 60. P. 111. Discussion 143.
- Waterhouse M., Pennisi S., Pfeifer D., Deuter M., von Bubnoff N., Scherer F., Strüßmann T., Wehr C., Duyster J., Bertz H., Finke J., Duque-Afonso J. 2021. Colon and liver tissue damage detection using methylated SESN3 and PTK2B genes in circulating cell-free DNA in patients with acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* V. 56. P. 327.