

## ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Гипотетический сценарий происходящих событий при реинфузии пациенту К.  
реконструированных гемопоэтических стволовых клеток

### Базовая информация, необходимая для объяснения произошедших событий

Для последующего анализа необходимо привести известные табличные значения, провести расчеты и охарактеризовать некоторые параметры, дающие представление о биологии CD34+ гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Был проведен расчет количества CD34+ клеток в костном мозге (КМ) и в лейкоконцентрате, используемом для терапевтической реинфузии. При сборе лейкомассы после мобилизации колониестимулирующим фактором выделяется подушка лейкоцитов объемом ~10 мл. В биопрепарате после мобилизации содержится в среднем ~1 % CD34+ клеток. Известно, что в 1 мкл лейкоцитарного концентрата содержится ~10<sup>6</sup> клеток. Во всей лейкомассе количество клеток составляет 10<sup>10</sup>, из которых 10<sup>8</sup> приходится на долю CD34+ ГСК.

КМ составляет 1.5–4 % (в среднем 2 %) от массы тела человека (в организме человека с массой 70 кг будет присутствовать 1.4 л ткани КМ (для простоты расчета округлим эту цифру до 1 л)). В КМ в 1 мкл ткани содержится ~10<sup>5</sup> ядродержащих клеток. В пересчете на весь КМ это будет составлять ~10<sup>11</sup> клеток. CD34+ клетки костного мозга составляют около 1 % от всей клеточной мононуклеарной массы, что в абсолютных цифрах выглядит как 10<sup>9</sup> CD34+ ГСК. Таким образом, при реинфузии обогащенной CD34+ клетками мононуклеарной массы в организм доставляется около 10 % стволовых клеток от общего оценочного содержания ГСК в костном мозге.

Нами установлено (Ruzanova et al., 2024), что интернализированные в ГСК фрагменты дцДНК индуцируют коммитирование стволовых клеток, пролиферацию потомков и колониобразование.

Также в работах (Potter et al., 2024; Ruzanova et al., 2024) показано, что активированные интернализированными фрагментами дцДНК стволовые клетки делятся как симметрично, так и несимметрично. Причем индекс пролиферативной активности, оцененной по суммарной клеточности на 15-е сутки культивирования на метилцеллюлозной среде, может достигать 150 %. *То есть можно предположить, что реконструированные ГСК заселят КМ, будут активно делиться и производить потомков как со стволовыми свойствами, так и коммитированных.*

В колониях процент стволовых клеток достигает для мышинной модели ~14 %, а для человека – ~3 %.

В работе (Ruzanova et al., 2025) показано, что интернализированные фрагменты индуцируют процесс амплификации теломерных повторов, который не связан с активностью теломеразы, а реализуется через ALT (механизм альтернативного удлинения теломер). В цитируемой статье был получен результат, свидетельствующий о том, что ГСК с реконструированным геномом (увеличение длины теломер) не колонизируют костномозговое пространство (признак удлинения теломер не сохраняется на дальних сроках анализа) после реинфузии экспериментальным животным. Предполагается, что такой эффект связан с тем, что реинфузия проводилась без предварительной миелоредукции и что все костномозговые стволовые ниши находились под контролем резидентных ГСК. *И, по всей видимости, для успешной репопуляции КМ реконструированными ГСК требуется абляция костномозгового пространства.*

### Элементы биологии гемопоэтических стволовых клеток, известные из литературных источников, необходимые для оценки произошедших в клиническом случае событий

Необходимыми являются данные по скорости деления ГСК и скорости репопуляции костного мозга ГСК. Также важной является информация об эффективности сохранения стволовых свойств пролиферирующими ГСК после заселения костномозгового пространства.

Для мышинной модели показано, что долгоживущие ГСК делятся 1 раз в 30–50 дней (Cheshier et al., 1999; Kiel et al., 2007) или даже реже – 5 раз в течение жизни (Wilson et al., 2008; Foudi et al., 2009). Долгоживущие недифференцированные клетки, которые делятся не чаще чем 1 раз в 200 дней, обладают наибольшим репопуляционным потенциалом при трансплантации, составляют около 15 % от всех ГСК и, по-видимому, служат в качестве резервуара для быстрого ответа при воспалении. Оцененная скорость деления ГСК человека составляет 175–350 сут, при этом основное количество ГСК находится в состоянии покоя G0 (Shepherd et al., 2004; Catlin et al., 2011). При репопуляции долгоживущими ГСК человека развитие ксенографта в иммунодефицитных мышцах происходит от 3 до 8 мес. (Benveniste et al., 2010; Notta et al., 2011; Doulatov et al., 2012). Анализ свидетельствует, что восполнение истощенного костного мозга (например, после терапевтического

облучения) сохранившимися резидентными долгоживущими ГСК (Haas et al., 2018; Jurecic, 2019) может занимать достаточно продолжительное время – до года и более. **Это означает, что при хоуминге реконструированных ex vivo ГСК развитие клона может растянуться на длительный срок.** Для успешного восстановления КМ после лучевой или высокодозовой химиотерапии требуется большое количество CD34+ клеток (~3–4 × 10<sup>6</sup>/кг массы тела человека, ~10<sup>8</sup>) (Kumar, Geiger, 2017). Именно такое количество реконструированных и активированных к пролиферации ГСК (~10<sup>8</sup>) содержалось в лейкоцитарной массе, которую реинфузировали пациенту К. За месяц до проведения клеточной интервенции пациенту К. проводилась высокочастотная радиационная терапия, а за неделю до обработки – мобилизация и сбор костномозговых предшественников. То есть в момент реинфузии реконструированных ГСК популяция недифференцированных клеток костного мозга пациента была значительно редуцирована (истощена).

При дифференцировке ГСК в культуре при использовании стандартных активаторов происходит потеря свойства самообновления, что, как считается, также может происходить с трансплантированными клетками. Этот эффект снижает терапевтическую эффективность трансплантации ГСК. Обнаружены химические вещества (например, SR1 – StemRegerin-1), поддерживающие низкодифференцированное состояние стволовых клеток (сохранение CD34+/CD133 маркеров). Причем при экспозиции клеток с препаратом SR1 количество упомянутых выше клеток продолжает увеличиваться в процессе культивирования (Voitano et al., 2010). В этом месте анализа следует вернуться к данным, полученным в наших исследованиях (Potter et al., 2024; Ruzanova et al., 2024). В работах показано, что интернализация фрагментов экстраклеточной дцДНК инициирует как симметричное, так и несимметричное деление клеток в колониях. В этом случае активность симметричного деления сопровождается увеличением количества стволовых клеток в колониях до 14 % для мышинной модели и до 3 % для клеток человека, что ~10-кратно превышает их исходное количество и сопоставимо с цифрами (17 %), полученными для обработки ГСК SR-1 (Doulatov et al., 2012). То есть интернализированные фрагменты дцДНК сравнимы по эффекту воздействия на поддержание стволовых свойств ГСК со StemRegerin-1 компаундом.

Из проведенного анализа следует, что заселение костномозгового пространства реконструированными ГСК требует присутствия свободного физиологического пространства для хоуминга обновленных ГСК. Клетки будут делиться как симметрично, так и несимметрично, одновременно пополняя редуцированный костномозговой резервуар стволовыми клетками и создавая клеточную массу периферической крови с откорректированным генотипом. Процесс может занять промежуток времени до 1 года и более. Возможно, пролиферативная активность реконструированных ГСК в направлении симметричного деления будет усиливаться, давая постоянный прирост ГСК.

### **Характеристика некоторых молекулярных процессов, происходящих в ГСК после интернализации фрагментов дцДНК**

Фрагменты дцДНК после интернализации индуцируют процесс коммитирования ГСК. Причем при таком варианте активации, как было сказано, стволовая клетка делится как симметрично, так и несимметрично. То есть потомками одной реконструированной ГСК будут как стволовые, так и дифференцированные клетки. Фрагменты дцДНК в ГСК индуцируют рекомбинационную ситуацию, где становятся субстратом для гомологической рекомбинации. Как показывают наши экспериментальные данные (Oshikhmina et al., 2026), гомологическая рекомбинация между фрагментами экстрахромосомальной дцДНК исходно экстраклеточной локализации и ДНК хромосом происходит по механизму однонитевой ассимиляции (single strand assimilation) (Leung et al., 1997; Langston, Symington, 2005).

Полученные в настоящем исследовании данные для образцов периферической крови свидетельствуют о следующем. Для 15 % гетерозиготных генов частота встречаемости принадлежащих этим генам SNP достоверно снижается, в пределах от 8 до 18 %. Этот факт означает, что происходит гомологическая конверсия в белок-кодирующих областях анализируемых генов (активно транскрибирующихся локусах). Данный факт характерен только для гетерозигот и не детектируется в генах, находящихся в гомозиготе. Предполагается, что такой эффект связан с давлением отбора, поддерживающим существующие герминальные доброкачественные аллели. При этом SNP гетерозигот не подвержены давлению отбора (именно это определяет возможность гетерозиготного состояния карิโอ типа), и для таких мутаций можно оценить изменение частоты их встречаемости. Изменение частоты встречаемости (понижение) будет свидетельствовать о коррекции SNP немутантными аллелями. И, таким образом, мутантные SNP аллели корректируются немутантными последовательностями, пришедшими из препарата hDNA<sup>gr</sup>, которым были обработаны ГСК пациента в со-

стае мононуклеаров в процессе терапевтической процедуры, что определяется как их отсутствие (общее понижение частоты SNP). Мы полагаем, что такая частота коррекции, если она распространяется на весь экзом (гены клонального гемопоэза как маркерная платформа событий, разворачивающихся по всему геному), может составлять причину описанных значительных положительных клинических последствий.

### **Гипотетический сценарий происходящих событий при реинфузии пациенту К. реконструированных гемопоэтических стволовых клеток**

На основании проведенного анализа мы смоделировали возможный сценарий событий при реинфузии реконструированных ГСК пациенту К.

Костный мозг пациента был деплицирован проведенными лечебными процедурами, облучением и мобилизацией ГСК. Геном ГСК, собранных в результате мобилизации и присутствующих в составе реинфузированных мононуклеаров, был реконструирован препаратом hDNA<sup>gr</sup>. Мутантные локусы в кодирующих (и, возможно, некодирующих) областях генов клонального гемопоэза у части ГСК были восстановлены. Указанные гены в данном случае являются маркерной платформой общего процесса реконструкции мутантных аллелей по всему геному.

Реконструированные ГСК, содержащие интернализированные фрагменты дцДНК препарата hDNA<sup>gr</sup>, были реинфузированы пациенту. Количество CD34+ ГСК в составе биопрепарата оценивалось как 10 % от общего числа гемопоэтических прогениторов костного мозга. Реинфузированные гемопоэтические предшественники хоумингом заселили освободившиеся в результате миелоредукции костномозговые ниши, при этом они были активированы к пролиферации и колониеобразованию. Как следует из результатов наших работ, в такой ситуации ГСК делятся как симметрично, так и несимметрично, причем направление симметричного деления дает уверенный рост недифференцированных клеток в потомстве, который для модели клеток костного мозга человека достигает 3 %. Вследствие активной пролиферации CD34+ потомки реконструированных и активированных препаратом hDNA<sup>gr</sup> ГСК заселяют свободные костномозговые ниши и конкурируют с резидентными ГСК. Формируются клеточные клоны с восстановленными до нормы мутантными аллелями, которые начинают уверенно детектироваться в образцах крови пациента через 27 мес. после проведенной интервенции. Генетически обновленные клетки, по всей видимости, запускают масштабные регенерационные процессы в организме, что ярко проявилось в состоянии пациента, который через четыре года после проведенной терапии жив, основной патологический процесс находится в состоянии глубокой ремиссии, а симптомы сопутствующих заболеваний купированы.

### **Список литературы**

- Benveniste P., Frelin C., Janmohamed S., Barbara M., Herrington R., Hyam D., Iscove N.N. Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell Stem Cell*. 2010;6(1):48-58. doi 10.1016/j.stem.2009.11.014
- Boitano A.E., Wang J., Romeo R., Bouchez L.C., Parker A.E., Sutton S.E., Walker J.R., Flavney C.A., Perdew G.H., Denison M.S., Schultz P.G., Cooke M.P. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science*. 2010;329(5997):1345-1348. doi 10.1126/SCIENCE.1191536
- Catlin S.N., Busque L., Gale R.E., Guttrop P., Abkowitz J.L. The replication rate of human hematopoietic stem cells in vivo. *Blood*. 2011;117(17):4460-4466. doi 10.1182/BLOOD-2010-08-303537
- Cheshier S.H., Morrison S.J., Liao X., Weissman I.L. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(6):3120-3125. doi 10.1073/PNAS.96.6.3120
- Doulatov S., Notta F., Laurenti E., Dick J.E. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012;10(2):120-136. doi 10.1016/j.stem.2012.01.006
- Foudi A., Hochedlinger K., Van Buren D., Schindler J.W., Jaenisch R., Carey V., Hock H. Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2009;27(1):84-90. doi 10.1038/NBT.1517
- Haas S., Trumpp A., Milsom M.D. Causes and consequences of hematopoietic stem cell heterogeneity. *Cell Stem Cell*. 2018;22(5):627-638. doi 10.1016/j.stem.2018.04.003
- Jurecic R. Hematopoietic stem cell heterogeneity. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1169:195. doi 10.1007/978-3-030-24108-7\_10
- Kiel M.J., He S., Ashkenazi R., Gentry S.N., Teta M., Kushner J.A., Jackson T.L., Morrison S.J. Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. *Nature*. 2007;449(7159):238-242. doi 10.1038/NATURE06115; KWRD=SCIENCE
- Kumar S., Geiger H. HSC Niche biology and HSC expansion ex vivo. *Trends Mol Med*. 2017;23(9):799. doi 10.1016/J.MOLMED.2017.07.003
- Langston L.D., Symington L.S. Opposing roles for DNA structure-specific proteins Rad1, Msh2, Msh3, and Sgs1 in yeast gene targeting. *EMBO J*. 2005;24(12):2214-2223. doi 10.1038/SJ.EMBOJ.7600698/ASSET/809F8F04-F2DF-4843-8E4F-8095FAD52419/ASSETS/GRAPHIC/EMBJ7600698-FIG-0007-M.JPG

- Leung W.Y., Malkova A., Haber J.E. Gene targeting by linear duplex DNA frequently occurs by assimilation of a single strand that is subject to preferential mismatch correction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(13):6851-6856. doi 10.1073/PNAS.94.13.6851
- Notta F., Doulatov S., Laurenti E., Poeppl A., Jurisica I., Dick J.E. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*. 2011;333(6039):218-221. doi 10.1126/SCIENCE.1201219
- Oshikhmina S.G., Ruzanova V.S., Ritter G.S., Dolgova E.V., Kirikovich S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., ... Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Proskurina A.S., Bogachev S.S. Concept of natural genome reconstruction. Part 4. Integration of extracellular double-stranded DNA fragments into the genome of hematopoietic stem cells and the formation of extrachromosomal intermediates. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2026;30(2):163-180. doi 10.18699/vjgb-26-18
- Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Ruzanova V.S., Efremov Y.R., Kirikovich S.S., Oshikhmina S.G., Mamaev A.L., Taranov O.S., Bryukhovetskiy A.S., Grivtsova L.U., Kolchanov N.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Stimulation of mouse hematopoietic stem cells by angiogenin and DNA preparations. *Brazilian J Med Biol Res*. 2024;57. doi 10.1590/1414-431X2024E13072
- Ruzanova V.S., Oshikhmina S.G., Proskurina A.S., Ritter G.S., Kirikovich S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., Karamysheva T.V., Meschaninova M.I., Mamaev A.L., Taranov O.S., Bogachev A.S., Sidorov S.V., Nikonov S.D., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Dolgova E.V., Bogachev S.S. A concept of natural genome reconstruction. Part 2. Effect of extracellular double-stranded DNA fragments on hematopoietic stem cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2024;28(8):993-1007. doi 10.18699/vjgb-24-106
- Ruzanova V.S., Oshikhmina S.G., Ritter G.S., Dolgova E.V., Kirikovich S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., Karamysheva T.V., Bogomolov A.G., Meschaninova M.I., Mamaev A.L., Taranov O.S., Sidorov S.V., Nikonov S.D., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Proskurina A.S., Bogachev S.S. Concept of natural genome reconstruction. Part 3. Analysis of changes in the amount of telomeric DNA in colony cells as a new amplified feature that arose during the processing of hematopoietic bone marrow stem cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(4):479-495. doi 10.18699/vjgb-25-52
- Shepherd B.E., Guttorp P., Lansdorp P.M., Abkowitz J.L. Estimating human hematopoietic stem cell kinetics using granulocyte telomere lengths. *Exp Hematol*. 2004;32(11):1040-1050. doi 10.1016/j.exphem.2004.07.023
- Wilson A., Laurenti E., Oser G., van der Wath R.C., Blanco-Bose W., Jaworski M., Offner S., Dunant C.F., Eshkind L., Bockamp E., Lió P., MacDonald H.R., Trumpp A. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008;135(6):1118-1129. doi 10.1016/j.cell.2008.10.048