

ЗДАТНІСТЬ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ КІСТКОВОГО МОЗКУ ПАЦІЄНТІВ ІЗ ХРОНІЧНОЮ МІЄЛОЇДНОЮ ЛЕЙКЕМІЄЮ ДО АВТОНОМНОГО РОСТУ У СУСПЕНЗІЙНІЙ КУЛЬТУРИ *IN VITRO* БЕЗ ДОДАВАННЯ ЕКЗОГЕННИХ РОСТОВИХ ФАКТОРІВ

М.В. Дяченко, Н.М. Білько, І.С. Дягіль

Національний університет «Києво-Могилянська академія» (Київ)

Національний дослідницький центр радіаційної медицини

НАМН України (Київ)

Вступ

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) є першою формою лейкемії, яка була визначена та описана як окреме захворювання [7]. Подальші дослідження підтвердили наявність специфічної хромосомної трансформації (Філадельфійської хромосоми, Ph) у гемопоетичних клітинах із утворенням химерного гену *bcr-abl*, та постійно активної тирозинової кінази Bcr-Abl, що відіграє основну роль у патогенезі ХМЛ [10, 12]. На сьогодні все більше результатів проведених досліджень дозволяють припускати вирішальну роль не лише гемопоетичних стовбурових клітин, але й клітин-попередників кісткового мозку як у виникненні, так і у прогресуванні захворювання [11, 17].

Розробка специфічних інгібіторів активності білку Bcr-Abl (інгібітори тирозинової кінази, TKI) [9] дозволила досягнути високого рівня ефективності сучасних терапевтичних підходів до лікування ХМЛ. Не зважаючи на це, у пацієнтів відзначається значна індивідуальна варіабельність відповіді на терапію TKI. До того ж, такі фактори, як нечутливість лейкемічних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку до TKI та про-апоптотичних сигналів, а також зміни у функціональних властивостях цих клітин, можуть призводити до прогресування захворювання та неможливості досягнення повної молекулярної ремісії [5, 6]. Оскільки раніше було показано, що прогресування ХМЛ визначається змінами властивостей клітин саме на рівні популяції клітин-попередників кісткового мозку їх всебічне дослідження може дозволити виявлен-

ня ранніх змін клітин гемопоетичної системи, що характерні для прогресування захворювання.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано на базі Центру молекулярних та клітинних досліджень Національного Університету «Києво-Могилянська академія» в рамках державної теми: «Розробка способів ранньої діагностики онкогематологічних захворювань і критеріїв оцінки успішності результатів їх лікування» (№ державної реєстрації 0112U003161).

Метою даної роботи було виявити функціональні, цитогенетичні та цитоморфологічні особливості гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ, що характерні для прогресування захворювання.

Матеріали та методи дослідження

Матеріалом для дослідження був кістковий мозок осіб із хронічною мієлоїдною лейкемією у хронічній фазі, яким проводилось клінічне обстеження у відділенні радіаційної онкогематології та трансплантації стовбурових клітин ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини» НАМН України. Загалом було досліджено зразки кісткового мозку 44-х осіб (23 жінки та 21 чоловік), середнім віком $45,0 \pm 8,3$ року (від 20 до 70 років). Частина пацієнтів (загалом 28 осіб) отримували терапію інгібітором тирозинкіназ – препаратом Іматиніб мезилат (Glivec, Novartis) у дозі 400 мг/добу протягом періоду від 6-и до 118-и місяців.

Залежно від наявності клітин кісткового мозку, у яких під час проведення цитогенетичного аналізу виявляли Ph хромосому, було сформовано три групи пацієнтів. Перша група – пацієнти із оптимальною відповіддю на терапію TKI, загалом 15 осіб (відсутність Ph позитивних клітин у кістковому мозку). Другу групу складали пацієнти із субоптимальною відповіддю на терапію (наявність Ph позитивних клітин у кістковому мозку), загалом 18 пацієнтів. Ще одну групу складали зразки пацієнтів, які отримували лікування гідрооксисечовиною та не отримували терапію TKI – загалом 11 пацієнтів.

Кістковий мозок отримували шляхом стерильної пункції груднини із дотриманням умов стерильності. Суспензію клітин розділяли центрифугуванням протягом 30 хвилин при 300 g у градієнті щільності Nystopaque (Sigma, США) щільністю 1,077 г/мл. Культивування мононуклеарів кісткового мозку проводили у культурі суспензійній культурі *in vitro* [3, 4]. Для цього суспензію клітин вно-

сили у кінцевій концентрації 2 г. Відтак, проводили аналіз здатності мононуклеарів кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ підтримувати тривалу культуру у суспензії *in vitro* за умови відсутності зовнішніх ростових факторів, які в нормі необхідні для підтримання життєдіяльності гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку. Для реалізації цього завдання проводили визначення клітинного складу суспензії, що культивується, на 7-у, 14-у та 21-у добу культивування (рис. 1). Суспензія культивованих клітин відбиралась мікропіпеткою із подальшим виготовленням препаратів з використанням цитоцентрифуги.

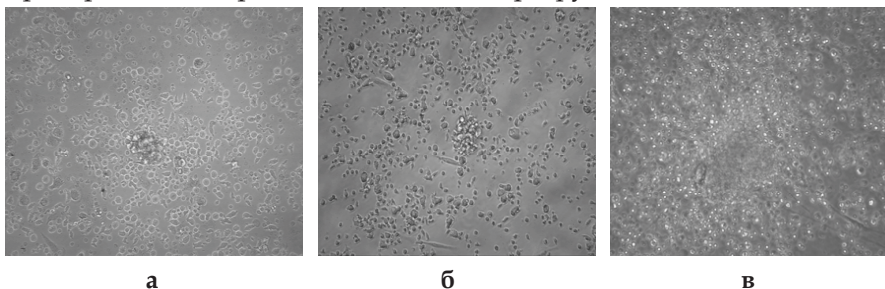


Рис. 1. Суспензійна культура мононуклеарів кісткового мозку *in vitro* пацієнта із ХМЛ на різні терміни культивування: а – 7-а доба культивування; б – 14-а доба культивування; в – 21-а доба культивування. Збільшення $\times 100$.

Для визначення особливостей клітинного складу суспензії проводили диференційне забарвлення клітин, отриманих на різні терміни культивування із використанням методики забарвлення за Папенгеймом.

Результати проведених досліджень показали, що гемопоетичні стовбурові клітини та клітини-попередники кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ здатні існувати у заданих умовах культивування без додавання екзогенних ростових факторів та цитокінів до 21-ї доби (для групи пацієнтів до початку лікування ТКІ). У препаратах, виготовлених після 7-и діб культивування мононуклеарів кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ у суспензійній культурі, виявляли гемопоетичні клітини на різних стадіях дозрівання (рис. 2). Натомість, у препаратах, виготовлених після 14-ї та 21-ї доби культивування переважали більш зрілі форми гемопоетичних клітин різних гілок кровотворення. При цьому слід відмітити, що загальна клітинність суспензії мононуклеарів дещо знижувалась після 14-ї доби культивування із подальшим зростанням кількості клітин у культурі після 21-ї доби інкубування. Така особливість, хоч і не мала статистичної достовірності, була притаманна як для мононуклеарів кісткового мозку пацієнтів до початку лікування ТКІ, так і для стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку пацієнтів із субоптимальною відповіддю на лікування ТКІ.

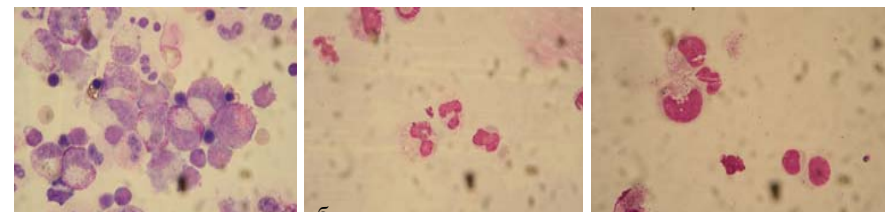


Рис. 2. Мікрофотографії препаратів, виготовлених у різні терміни культивування мононуклеарів кісткового мозку пацієнта 1.8 у суспензійній культурі *in vitro*: а – 7-а доба культивування; б – 14-а доба культивування; в – 21-а доба культивування. Збільшення $\times 1000$.

Із метою встановлення особливостей кількісних показників клітинного складу суспензії, що отримали після культивування мононуклеарів кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ як до початку терапії ТКІ, так і для груп пацієнтів із оптимальною та субоптимальною відповіддю на терапію ТКІ, проводили диференційний підрахунок клітин у препаратах, виготовлених у різні терміни культивування гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ.

Результати проведеного аналізу показали, що для трьох описаних нами груп пацієнтів здатність мононуклеарів кісткового мозку до підтримання довготривалої культури за умов культивування у суспензійній культурі без додавання екзогенних ростових факторів, значно відрізнялась. Так, під час культивування мононуклеарів, отриманих із кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ до початку лікування ТКІ, активний гемопоєз відзначали до 21-ї доби культивування. Про це може свідчити наявність у культурі лейкоцитів на різних стадіях дозрівання (бластних клітин, міелоцитів, метаміелоцитів, паличкоядерних та сегментоядерних гранулоцитів), а також ретикулоцитів та моноцитів (рис. 3).

Кількість малодиференційованих клітин знижувалась в процесі культивування. Так, кількість бластних клітин для групи пацієнтів

ентів до початку терапії ТКІ, становила $12,45 \pm 2,34$ клітин після 7-и діб культивування, та знижувалась до $2,73 \pm 0,23$ клітин на 14-у добу культивування та до $2,53 \pm 0,32$ клітин на 21-у добу культивування. Кількість міелоцитів та метаміелоцитів у суспензійній культурі мононуклеарів кісткового мозку для групи пацієнтів до початку терапії ТКІ також знижувалась із збільшенням тривалості культивування. Середні кількості клітин склали $10,04 \pm 1,98$ клітин та $26,70 \pm 5,35$ клітин на 7-у добу культивування, $2,79 \pm 0,56$ та $3,02 \pm 0,90$ клітин на 14-у добу культивування; $2,60 \pm 0,60$ та $2,95 \pm 1,03$ клітин на 21-у добу культивування для міелоцитів та метаміелоцитів відповідно.

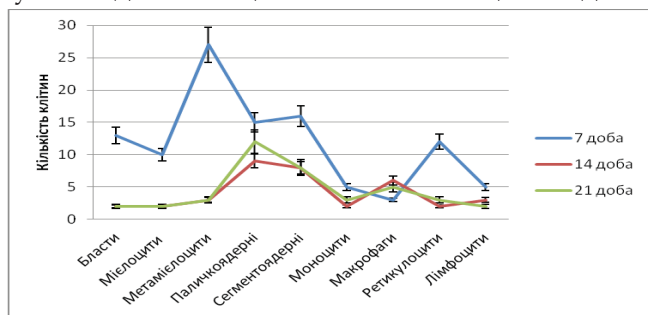


Рис. 3. Клітинний склад суспензії, отриманої після культивування гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку пацієнтів до початку терапії ТКІ у культурі *in vitro* без додавання екзогенних ростових факторів.

Загальна кількість паличкоядерних гранулоцитів також знижувалась протягом періоду культивування, проте частка цих клітин була вищою на 21-у добу культивування, ніж на 14-у. Середнє значення кількості паличкоядерних гранулоцитів у досліджуваній суспензії через 7 діб інкубації складало $15,12 \pm 3,40$ клітин та знижувалось на 14-й день культивування до $7,89 \pm 1,57$ клітин. Проте на 21-у добу культивування середнє значення паличкоядерних гранулоцитів складало $12,70 \pm 3,74$ клітин, що статистично достовірно не відрізнялось від показника, встановленого для 7-ї доби культивування ($p > 0,05$).

Схожа тенденція спостерігалась і для показника частки сегментоядерних гранулоцитів. Їх середнє значення складало $16,10 \pm 2,78$ клітин на 7-у добу культивування та знижувалось до $8,12 \pm 1,54$ клітин на 14-у добу культивування. Середня кількість сегментоядерних гранулоцитів на 21-у добу культивування достовірно не відрізнялась від показника для 14-ї доби та складала $8,04 \pm 1,61$ клітин ($p > 0,05$).

При цьому кількість макрофагів у даних культурах була досить низькою та становила $3,01 \pm 0,50$ клітин на 7-у добу культивування, проте поступово зростала у процесі культивування та складала $5,12 \pm 1,67$ та $5,06 \pm 1,74$ клітин для 14-ї та 21-ї доби культивування відповідно.

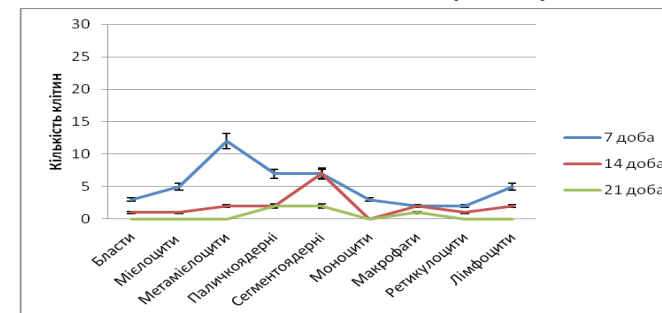


Рис. 4. Клітинний склад суспензії, отриманої після культивування гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку пацієнтів із оптимальною відповіддю на терапію ТКІ у культурі *in vitro* без додавання екзогенних ростових факторів.

Кількість моноцитів, лімфоцитів та клітин еритроцитарного ряду зменшувалась із збільшенням тривалості культивування та достовірно не відрізнялась на 14-у та 21-у добу культивування ($p > 0,05$).

Щодо показників клітинного складу суспензії мононуклеарів кісткового мозку, пацієнтів із оптимальною відповіддю на терапію (рис. 4), було встановлено, що вже на 7-у добу культивування у суспензійній культурі *in vitro* без додавання екзогенних ростових факторів кількість клітин значно знижувалась. Тенденція до зниження загальної кількості клітин, а особливо ранніх клітин-попередників кісткового мозку (бластних клітин, міелоцитів, метаміелоцитів) зберігалась і протягом подальшої інкубації. При цьому зростання загальної клітинності культивованої суспензії мононуклеарів кісткового мозку на 21-у добу культивування порівняно із 14-ю добою культивування, що спостерігалась для двох інших груп зразків кісткового мозку, для даної групи не виявляли. При цьому середня кількість бластних клітин знижувалась із рівня $3,89 \pm 0,46$ клітин, що встановлювалась при дослідженні препаратів суспензії мононуклеарів кісткового мозку після 7-и діб культивування до $2,03 \pm 0,13$ клітин на 14-у та $0,24 \pm 0,09$ клітин на 21-у добу інкубації. Середнє значення кількості міелоцитів та метаміелоцитів також знизилось із $5,10 \pm 1,23$ та $11,87 \pm 2,13$ клітин до показників

2,21±0,43 та 3,42±0,67 клітин відповідно на 14-у добу культивування та 0,22±0,14 та 0,32±0,11 клітин на 21-у добу культивування.

Кількість більш диференційованих клітин міелоцитарної лінії, таких як паличкоядерні та сегментоядерні гранулоцити, під час культивування моноклеарів кісткового мозку пацієнтів із оптимальною відповіддю на лікування ТКІ також знижувалась із збільшенням тривалості культивування. Так, кількість паличкоядерних гранулоцитів із значення 7,35±2,01 клітин, що відмічали на 7-й день культивування зменшилась до 2,45±0,78 та 2,38±0,86 клітин на 14-у та 21-у добу культивування відповідно. Щодо сегментоядерних гранулоцитів, то їх кількість достовірно не відрізнялась на 7-у та 14-у добу культивування, проте достовірно знижувалась до 21-ї доби інкубації.

Кількість ретикулоцитів, лімфоцитів та моноцитів теж достовірно знижувалась від 7-ї до 21-ї доби культивування. Кількість макрофагів, як і у випадку культивування зразків кісткового мозку групи пацієнтів до початку терапії ТКІ, зростала із збільшенням тривалості культивування.

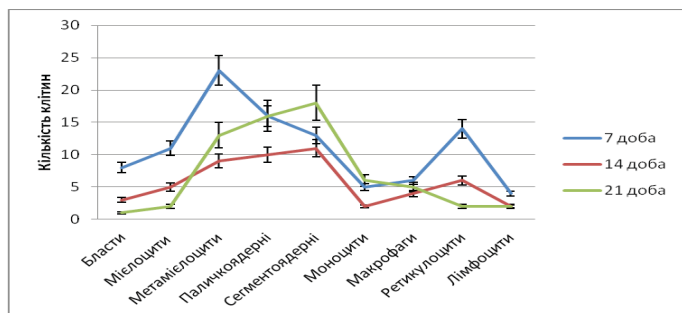


Рис. 5. Клітинний склад суспензії, отриманої після культивування гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку пацієнтів із субоптимальною відповіддю на терапію ТКІ у культурі *in vitro* без додавання екзогенних ростових факторів

У культурах стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку пацієнтів із субоптимальною відповіддю на лікування ТКІ (рис. 5), уже на 7-у добу культивування загальна кількість клітин у культурі була досить високою (в середньому 7×10^3 клітин у 1 мл), життєздатність клітин зберігалась на рівні 80 – 85 %. До 14-ї доби спостерігалась тенденція до зменшення загальної кількості клітин, проте відмічали наявність клітин на усіх стадіях дозрівання. До 21-ї доби культивування

ня загальна кількість клітин знову зростала, проте кількість незрілих форм лейкоцитів знижувалась. Так, середня кількість бластних клітин на 7-у добу культивування моноклеарів кісткового мозку становила $7,98 \pm 1,79$ клітин, а вже на 14-у добу культивування показник середньої кількості бластних клітин становив $3,21 \pm 1,32$, а на 21-у добу культивування – $1,56 \pm 0,67$ клітин. Середня кількість міелоцитів, що через 7 днів культивування складала $11,88 \pm 2,45$, знизилась через 14 днів культивування до показника $5,10 \pm 1,33$ та $2,49 \pm 0,87$ клітин через 21 добу культивування. Щодо показника середнього значення метаміелоцитів, на 7-у добу культивування відмічали значну кількість цих клітин порівняно із зразками кісткового мозку інших груп пацієнтів (середня кількість складає $22,89 \pm 3,90$ клітин). На 14-у добу культивування спостерігали значне достовірне зниження середньої кількості цих клітин до показника $8,21 \pm 2,20$ ($p < 0,05$) клітин із подальшим підвищенням кількості метаміелоцитів через 21-у добу культивування до $12,30 \pm 3,23$ клітин. Проте, таке підвищення середнього значення метаміелоцитів на 21-у добу культивування не мало статистичної достовірності ($p > 0,05$).

На відміну від особливостей кількісних показників для малодиференційованих клітин міелоцитарної гілки кровотворення, кількість яких в процесі культивування знижувалась, середні показники паличкоядерних та сегментоядерних гранулоцитів у суспензії моноклеарів кісткового мозку зростали із збільшенням терміну культивування. Середній показник кількості паличкоядерних гранулоцитів був достовірно нижчим лише на 14-у добу культивування ($10,10 \pm 1,79$ клітин), в той час як на 21-у добу культивування кількість паличкоядерних гранулоцитів знову збільшувалась та досягала рівня показника середньої кількості цих клітин на 7-у добу культивування (середні значення складали $15,78 \pm 2,45$ та $15,81 \pm 3,06$ клітин на 7-у та 21-у добу культивування відповідно). Середня кількість сегментоядерних гранулоцитів достовірно не відрізнялась на 7-у ($13,24 \pm 2,21$ клітин) та 14-у ($10,67 \pm 2,30$ клітин), проте значно зростала на 21-у добу культивування до показника $17,17 \pm 3,10$ клітин.

Щодо показників кількості моноцитів, ретикулоцитів та лімфоцитів, як і для суспензій моноклеарів зразків кісткового мозку пацієнтів із двох інших груп, середні значення цих клітин також знижувались в процесі культивування. При цьому кількість макрофагів недостовірно зростала на 14-у та 21-у добу культивування порівняно із показником, що відмічався на 7-у добу культивування.

Таким чином, результати проведених досліджень показали здатність мононуклеарів кісткового мозку груп пацієнтів, що не отримували таргетної терапії ТКІ, а також у пацієнтів із субоптимальною відповіддю лікування ТКІ, до підтримання довготривалої культури за відсутності екзогенних ростових факторів. Здатність до тривалого збереження життєздатності у суспензійній культурі без додавання екзогенних ростових факторів може свідчити про можливість аутокринної секреції ростових факторів гемопоетичними стовбуровими клітинами та клітинами-попередниками кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ, що припускалось раніше при дослідженні властивостей трансформованих клітин при ХМЛ [16].

Той факт, що отримані нами показники клітинного складу суспензії мононуклеарів кісткового мозку та тенденції до збереження високої клітинності протягом 21-ї доби культивування були спільними для зразків кісткового мозку груп пацієнтів до початку терапії ТКІ та пацієнтів із субоптимальною відповіддю на терапію ТКІ, дозволяє припускати можливість накопичення трансформованих лейкоемічних клітин у кістковому мозку пацієнтів із субоптимальною відповіддю на терапію ТКІ. Такі лейкоемічні стовбурові клітини та трансформовані гемопоетичні клітини-попередники, будучи нечутливими як до ТКІ, так і до екзогенних ростових факторів, можуть забезпечувати прогресування ХМЛ до стадії акселерації та подальшого розвитку бластної кризи [15].

Щодо зразків кісткового мозку групи пацієнтів із оптимально відповіддю на терапію ТКІ, отримані результати дозволяють робити припущення про зниження здатності до проліферації стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку цієї групи пацієнтів за умови відсутності екзогенних ростових факторів. Зниження кількості життєздатних клітин у процесі культивування мононуклеарів кісткового мозку групи пацієнтів із оптимальною відповіддю на ТКІ у суспензійній культурі дозволяє робити припущення про переважання у кістковому мозку цих пацієнтів нормального гемопоезу.

Слід також зазначити, що для культивування у суспензійній культурі використовували суспензію мононуклеарів кісткового мозку без розділення на фракції за імунофенотиповими характеристиками. Відтак, у культурах могли бути також мезенхімальні стовбурові клітини та стромальні клітини кісткового мозку, а не лише гемопоетичні стовбурові клітини та клітини-попередники. Таким чином

забезпечували наявність мікрооточення для гемопоетичних клітин та мінімізували рівень апоптозу, що міг виникнути не за рахунок відсутності екзогенних ростових факторів, а через втрату зв'язку стовбурових клітин та клітин-попередників із їх звичним мікрооточенням. Як відомо, мікрооточення гемопоетичних клітин також змінюється у процесі розвитку лейкоемічного процесу, однак такі зміни є надзвичайно багатограничними і вимагають проведення подальших досліджень, які б дозволили врахувати всі особливості взаємодії клітин «ніші» із лейкоемічними стовбуровими клітинами та трансформованими клітинами-попередниками кісткового мозку на різних стадіях розвитку захворювання при ХМЛ [13, 14].

Висновки

1. Проведені дослідження дозволяють робити висновки щодо наявності функціональних змін та відмінностей у здатності до диференціювання гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ, а саме:

2. Виявлено здатність гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку до підтримання суспензійної культури *in vitro* без додавання екзогенних ростових факторів.

3. Здатність до підтримання тривалої культури була виявлена лише для клітин кісткового мозку групи пацієнтів із субоптимальною відповіддю на терапію ТКІ (присутність клітин мієлоїдної та моноцитарної лінії до 21-ї доби культивування).

4. Отримані результати дозволяють припускати імовірність накопичення в процесі лікування ТКІ клітин, які знаходяться у стані спокою та не чутливі до дії ТКІ та здатні до секреції аутокринних ростових факторів.

5. Подальше всебічне дослідження клітин кровотворної системи на різних стадіях диференціювання дозволить виявити додаткові механізми, що призводять до прогресування ХМЛ.

Література

1. Білько Н.М. Методи експериментальної гематології / Н.М. Білько. – К.: Києво-Могилянська академія, 2006. – 66 с.
2. Гланц С. Медико-біологічна статистика / С. Гланц; пер. с англ. Ю.А. Данилова. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
3. Гольдберг Е.Д. Методи культури ткани в гематології / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.П. Шахов. – Томск: Изд-во Том. Ун-та, 1992. – 246 с.

4. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биологии) / Под ред. проф. Л.П. Дяконова. – М.: Компания Спутник+, 2000. – С. 7–18, 121–147.
5. Bhatia R. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment / R. Bhatia, M. Holtz, N. Niu [et al.] // *Blood*. – 2003. – Vol. 101. – P. 4701–4707.
6. Corbin A.S. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity / A.S. Corbin, A. Agarwal, M. Loriaux [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121, № 1. – P. 396–409.
7. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy / S. Faderl, M. Talpaz, Z. Estrov, H.M. Kantarjian // *Ann. Intern. Med.* – 1999. – Vol. 131. – P. 207–219.
8. Growth advantage of chronic myeloid leukemia CFU-GM in vitro: survival to growth factor deprivation, possibly related to autocrine stimulation, is a more common feature than hypersensitivity to GM-CSF/IL3 and is efficiently counteracted by retinoids / Gorre M.E. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification / M.E. Gorre, M. Mohammed, K. Ellwood [et al.] // *Science*. – 2001. – Vol. 293. – P. 876–880.
9. Graham S.M. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro / S.M. Graham // *Blood*. – 2002. – Vol. 99, № 1. – P. 319–325.
10. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML / C.H. Jamieson, L.E. Ailles, S.J. Dylla [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 351. – P. 657–667.
11. Jorgensen H.G. Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukaemia / H.G. Jorgensen, T.L. Holyoake // *Biochemical Society Transactions*. – 2007. – Vol. 35, part 5. – P. 1347–1351.
12. Lane S.W. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities / S.W. Lane, D.T. Scadden, D.G. Gilliland // *Blood*. – 2009. – Vol. 114, № 6. – P. 1150–1157.
13. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells / A. Colmone, M. Amorim, A.L. Pontier [et al.] // *Science*. – 2008. – Vol. 322. – P. 1861–1865.
14. Sloma I. Insights into the stem cells of chronic myeloid leukemia / I. Sloma, X. Jiang, A.C. Eaves, C.J. Eaves // *Leukemia*. – 2010. – Vol. 24. – P. 1823–1833.
15. Stuart S. A. The CML stem cell: evolution of the progenitor / S.A. Stuart, Y. Minami, J.Y.J. Wang // *Cell Cycle*. – 2009. – Vol. 8, № 9. – P. 1338–1343.
16. Talpaz M. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study / M. Talpaz, R.T. Silver, B.J. Druker [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 99. – P. 1928–1937.

17. Wang Y. Adaptive secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mediates imatinib and nilotinib resistance in BCR/ABL+ progenitors via JAK-2/STAT-5 pathway activation / Y. Wang, D. Cai, C. Brendel [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 109. – P. 2147–2155.

Резюме

Дяченко М.В., Білько Н.М., Дягіль І.С. Здатність клітин-попередників кісткового мозку пацієнтів із хронічною мієлоїдною лейкемією до автономного росту у суспензійній культурі *in vitro* без додавання екзогенних ростових факторів.

Визначення факторів, що можуть вказувати на прогресування захворювання при хронічній мієлоїдній лейкемії (ХМЛ) є актуальною темою гематології, онкології та клітинної біології. Оцінка клітин гемопоетичної системи пацієнтів із ХМЛ на різних стадіях диференціювання (стовбурові клітини та клітини-попередники) є тим підходом, який дозволяє виявляти ранні зміни у кровотворенні, що можуть призвести до прогресування ХМЛ. У роботі досліджено такі показники, як здатність гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку підтримувати довготривалу суспензійну культуру без додавання екзогенних ростових факторів, а також проведено аналіз морфологічних та фенотипових особливостей клітин при культивуванні. Показано, що зміни у функціональних властивостях клітин кісткового мозку є співставними для груп пацієнтів до початку терапії ТКІ та із субоптимальною відповіддю на лікування ТКІ, що може свідчити про накопичення у процесі лікування клітин, які знаходяться у стані спокою та не чутливі до дії ТКІ, а також здатні до секреції аутокринних ростових факторів. Подальше дослідження гемопоетичних клітин пацієнтів із ХМЛ дозволить встановити додаткові механізми, що можуть призводити до прогресування захворювання.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія, клітини-попередники кісткового мозку, функціональна активність, нечутливість до ростових факторів, прогресування захворювання при ХМЛ.

Резюме

Дяченко М.В., Білько Н.М., Дягіль І.С. Способность клеток-предшественников костного мозга пациентов с хронической миелоидной лейкемией к автономному росту в суспензионной культуре *in vitro* без добавления экзогенных ростовых факторов.

Определение факторов, которые могут указывать на прогрессирование заболевания при хронической миелоидной лейкемии (ХМЛ) является актуальной темой в гематологии, онкологии и клеточной биологии. Оценка состояния клеток гемопоэтической системы пациентов с ХМЛ на разных стадиях дифференцировки (стволовые клетки и клетки-предшественники) является подходом, позволяющим определять ранние изменения в кровотворении, которые могут привести к прогрессированию ХМЛ. В работе исследованы такие показатели, как способность гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников костного мозга к поддержанию длительной суспензионной культуры без добавления экзогенных ростовых факторов, а также

проведен анализ морфологических и фенотипических особенностей клеток при культивировании. Показано, что изменения в функциональных характеристиках клеток костного мозга были сопоставимыми для групп пациентов до начала терапии TKI и с субоптимальным ответом на лечение TKI, что может свидетельствовать о накоплении в процессе лечения клеток, которые находятся в состоянии покоя и не чувствительны к действию TKI, а также способны к секреции аутокринных ростовых факторов. Дальнейшее исследование гемопоетических клеток пациентов с ХМЛ позволит определить дополнительные механизмы, которые могут приводить к прогрессированию заболевания.

Ключевые слова: хроническая миелоидная лейкемия, клетки-предшественники костного мозга, функциональная активность, нечувствительность к ростовым факторам, прогрессирование заболевания при ХМЛ.

Summary

Diachenko M.V., Bilko N.M., Dyagil I.S. *Ability of bone marrow progenitor cells of patients with chronic myeloid leukemia to autonomous growth in suspension culture in vitro.*

Identification of factors that may indicate disease progression in chronic myeloid leukemia (CML) is a current issue in hematology, oncology and cell biology. Assessment of hematopoietic cells of CML patients at different stages of differentiation (stem cells and progenitor cells) is an approach that allows determining early changes in the blood, which can lead to the progression of CML. We have studied such factors as the ability of hematopoietic stem cells and bone marrow progenitor cells to maintain a long-term suspension culture without addition of exogenous growth factors, and we have analyzed the morphological and phenotypic features of cells during cultivation. It is shown that changes in the functional characteristics of bone marrow cells were comparable for groups of patients prior to initiating therapy with TKI and patients with suboptimal response to TKI treatment that may indicate for accumulation during treatment of cells that are dormant and not sensitive to TKI and are also capable of autocrine secretion of growth factors. Further investigation of hematopoietic cells of patients with CML will establish additional mechanisms that may lead to the progression of disease.

Keywords: chronic myeloid leukemia, bone marrow progenitor cells, functional activity, insensitivity to growth factors, disease progression in CML.

Рецензент: д.біол.н., проф. В.К. Рибальченко

УДК 582.71:582.734.4:547.587.52

ГРАВИЛАТ РЕЧНОЙ (GEUM RIVALE L.) КАК ТАННИДОНОСНОЕ РАСТЕНИЕ

С.А. Козыра, М.А. Кулагина, Е.В. Радько

Национальный фармацевтический университет (Харьков)

Введение

В настоящее время население и предприятия - изготовители проявляют всё больше внимания к лекарственным препаратам и биологически активным добавкам на основе природного растительного сырья [5]. Истинный потенциал отечественных лекарственных растений, несмотря на длительный срок их применения в народной и официальной медицине, далеко не полностью раскрыт.

Одним из таких растений флоры Украины является Гравилат речной (*Geum rivale* L.) [4], который давно используется в народной медицине как противовоспалительное, вяжущее и ранозаживляющее средство [2]. Настой корневищ с корнями Г. речного применяют при поносе, малярии, при маточных и геморроидальных кровотечениях, цинге, мигрени, укусах ядовитых змей, а также после тяжелой болезни как общеукрепляющее средство [3], настой травы Г. речного используют для полоскания горла при ангине, а в виде ванн – при заболевании суставов [2]. Предварительные химические исследования Г. речного выявили в сырье (траве и корневищах с корнями), наличие полифенолов [10-12], для которых характерна противовоспалительная, вяжущая и ранозаживляющая активность [8].

Считают, что для медицинской практики наиболее ценны таниды пирогаллового ряда [6, 7], и соотношение между фракциями пирогалловых и пирокатехиновых производных характеризует терапевтическую ценность танидоносных растений.

Связь работы с научными программами, планами, темами: работа выполнялась соответственно плану научно-исследовательских работ НФаУ по проблеме: «Фармакогностическое изучение биологически – активных веществ, создание лекарственных средств растительного происхождения» (№ государственной регистрации 0103U000476).

Целью этой работы было изучение количественного содержания отдельных фракций таннидов полученных из травы, корневищ с корнями Г. речного.