

УДК 612.119+616.155.392-036.12+616.15-07

І. Свєженцева, асп., Д. Білько, канд. біол. наук, Н. Білько, д-р мед. наук
Національний університет "Києво-Могилянська академія", Київ,
І. Дягіль, д-р мед. наук
ДУ "Науковий центр радіаційної медицини НАМН України", Київ

ОСОБЛИВОСТІ ЕРИТРОПОЕЗУ ПРИ ХРОНІЧНІЙ МІЄЛОЇДНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ У РАЗІ ТЕРАПІЇ ІНГІБІТОРАМИ ТИРОЗИНКІНАЗ

Проведено оцінку функціональної активності клітин еритроїдної ланки кровотворення пацієнтів при ХМЛ у разі терапії інгібіторами тирозинкіназ (ІТК) першого та другого покоління. У зразках кісткового мозку пацієнтів зі стійкістю до терапії ІТК виявлено збільшення кількості еритроїдних колоній за умов наявності еритропоетину у середовищі для культивування. Крім того, було встановлено, що при стійкості до іматинібу та нілотинібу клітини лейкоїчного клону в культурі *in vitro* набувають здатності диференціюватися у еритроїдному напрямку за відсутності у середовищі для культивування екзогенного еритропоетину. Таким чином, визначення проліферативної активності еритроїдної ланки кровотворення у культурі клітин *in vitro* може слугувати важливим прогностичним фактором для подальшого вибору стратегії лікування.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія, інгібітори тирозинкіназ, еритропоєз, культура клітин *in vitro*.

Вступ. Відомо, що при хронічній мієлоїдній лейкемії (ХМЛ) виявляється збільшення в культурі клітин гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників, що свідчить про активацію мієлоїдної ланки гемопоєзу. Разом з тим, еритропоєз при ХМЛ в культурі клітин в залежності від способу лікування не вивчався, тому дослідження функціонування еритроїдної ланки гемопоєзу виявилось доречним. Молекулярний механізм ХМЛ полягає в тому, що захворювання виникає на рівні плюрипотентної стовбурової клітини-попередника мієлоїдної ланки кровотворення у результаті реципрокної транслокації між довгими плечима 9-ї та 22-ї хромосом [1]. Утворену при цій перебудові дериватну хромосому 22 називають Філадельфійською за місцем її виявлення [2]. На ній утворюється онкоген BCR-ABL, у результаті експресії якого формується онкопротеїн – BCR-ABL-тирозинкіназа. В наслідок її діяльності клітини лейкоїчного клону набувають проліферативної переваги, порівняно з нормальними клітинами кісткового мозку, незалежно від ростових та проапоптотичних факторів, а також характеризуються порушеною здатністю до диференціювання [1,2,3].

Загалом вважають, що ХМЛ – це захворювання, яке характеризується підвищенням кількості гранулоцитарно-макрофагальних клітин у кістковому мозку пацієнтів [4]. Однак, Філадельфійську хромосому також виявляють у еритроїдних клітинах, що свідчить про виникнення транслокації BCR-ABL у ранній клітині-попереднику, з якої походить еритроїдна, і гранулоцитарно-макрофагальна ланка кровотворення [5]. Крім того, у різних фазах ХМЛ кількість еритроїдних колоній відрізняється, як відрізняється й чутливість клітин-попередників еритропоєзу до еритропоетину [6]. Проте, вплив препаратів групи TKI на еритроїдну ланку кровотворення до кінця не вивчено.

Метою роботи було визначення особливостей функціонування еритроїдної ланки гемопоєзу в культурі клітин *in vitro* при хронічній мієлоїдній лейкемії у разі терапії інгібіторами тирозинкіназ.

Матеріали і методи. Досліджували пункти кісткового мозку 30 пацієнтів, котрі у якості протилейкемічної терапії отримували інгібітори тирозинкіназ (ІТК) – нілотиніб та іматиніб. Окрему групу складали пацієнти, у яких ХМЛ було діагностовано вперше (n=4). Для підтвердження діагнозу та оцінки відповіді на терапію ІТК здійснювали цитогенетичне дослідження клітин кісткового мозку пацієнтів на 12-й місяць від початку терапії, вираховуючи процентний вміст метафаз, що містять Ph-хромосому. Відповідно до показників цитогенетичного дослідження, пацієнти після 12 місяців прийому TKI підрозділялися на групи: ті, котрі мали оптимальну відповідь на терапію (кількість Ph-хро-

мосом у кістковому мозку складає 0%) та пацієнти, що характеризувалися відсутністю відповіді на лікування та стійкістю до препаратів, у кістковому мозку яких визначалося 1 – 100 % Ph⁺ клітин.

Зразки кісткового мозку поміщали у пробірку, що попередньо була оброблена гепарином (Sigma, США). Виділяли мононуклеари шляхом центрифугування у градієнті щільності Histopaque (Gibco, США) з густиною 1,077 г/мл. Отримані мієлокаріоцити культивували в метилцелюлозі та напіврідкому агарі *in vitro* за раніше опублікованими методиками [7]. Суспензію клітин для культивування готували із використанням середовища RPMI-1640 (Sigma, США) із додаванням 20 % фетальної телячої сироватки (Invitrogen, Німеччина), 2 мМоль L-глутаміну (Sigma, США), пеніциліном та стрептоміцином (по 100 Од/мл) (Київмедпрепарат, Україна). Для культури в напіврідкому середовищі клітинну суспензію змішували з метилцелюлозою (Sigma, США) та проводили її культивування із розрахунку 1×10^5 клітин на комірку культурального планшету (Nunc, США), використовуючи 50 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора (Sigma, США), 30 нг/мл еритропоетину (Sigma, США), по 20 нг/мл інтерлейкіну-6 та інтерлейкіну-9 (Sigma, США). Для культури в напіврідкому агарі суспензію клітин змішували з напіврідким агаром (Difco, США) концентрацією 0,33 % та гранулоцитарно-макрофагальним колонієстимулюючим фактором GM-CSF (Sigma, США) концентрацією 50 нг/мл. Культивування клітин кісткового мозку пацієнтів здійснювали у CO₂-інкубаторі (LEEC, Велика Британія) в умовах абсолютної вологості та 5% CO₂ у атмосфері, протягом 10 – 12 діб та оцінювали кількість клітинних агрегатів, а саме, кластерів (більше 5 клітин) та колоній (більше 50 клітин) за допомогою інвертованого мікроскопа (Olympus, Японія). За ефективність колонієутворення приймали кількість колоній, які формуються до 13-ї доби культивування на 1×10^5 експлантованих клітин.

Статистична обробка результатів проводилася за допомогою U-критерію Манна-Уїтні для порівняння непараметричних вибірок. Висновок про статистичну значущість результатів визначали при P<0,05.

Результати та їх обговорення. Внаслідок культивування отримували як гранулоцитарно-макрофагальні колонії та кластери, так і еритроїдні колонії – бурст утворюючі одиниці еритроїдні (БУО-Е), які складалися з дрібних клітин, що розміщувалися компактно та мали червоний відтінок за рахунок синтезу гемоглобіну клітинами-попередниками еритропоєзу (рис. 1). У комірці культурального планшету еритроїдні колонії переважно розміщувалися по периферії, біля стінок комірки.

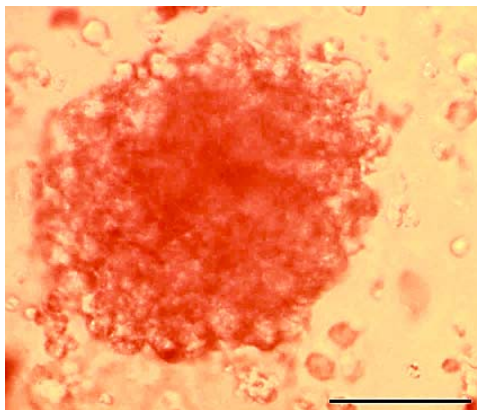


Рис. 1. Бурст-утворююча еритроїдна колонія при культивуванні в метилцелюлозі *in vitro* клітин кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ у разі терапії інгібіторами тирозинкіназ першого та другого покоління. Інвертований мікроскоп. $\times 400$

У результаті аналізу функціональної активності клітин еритроїдної ланки кровотворення виявили, що у культурах гемопоетичних клітин різних груп їх кількість відрізняється (рис. 2). Так, у зразках кісткового мозку із вперше діагнованим ХМЛ кількість БУО-Е становила $51,3 \pm 1,8$ на 1×10^5 експлантованих мононуклеарів. В

свою чергу, у культурах клітин кісткового мозку пацієнтів, що після терапії іматинібом та нілотинібом характеризувалися відсутністю клітин із Філадельфійською хромосомою, кількість БУО-Е була значно меншою та становила $17,2 \pm 0,8$ і $13,3 \pm 0,7$ на 1×10^5 експлантованих мононуклеарів, відповідно.

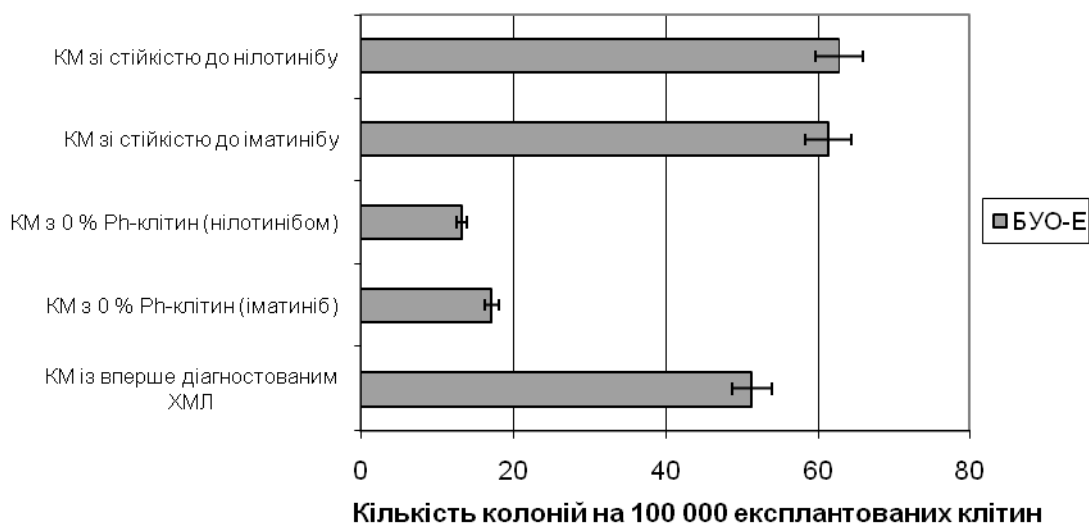


Рис. 2. Показники ефективності формування еритроїдних колоній кістковим мозком пацієнтів *in vitro*

Натомість у зразках кісткового мозку зі стійкістю до іматинібу кількість БУО-Е була значно вищою та становила $61,4 \pm 2,7$ на 1×10^5 експлантованих мієлокаріоцитів, відповідно. У культурах кісткового мозку, що незважаючи на терапію нілотинібом містили клітини із Філадельфійською хромосомою, число БУО-Е сягало $62,8 \pm 3,2$ на 1×10^5 експлантованих мононуклеарів.

Таким чином, при відновленні лейкоемічного клону внаслідок формування стійкості до препаратів групи ТКІ кількість еритроїдних колоній зростала порівняно з числом таких у зразках кісткового мозку, у яких, за даними цитогенетичного дослідження, не виявлялося клітин із Філадельфійською хромосомою. Наразі причини підвищення проліферативної активності клітин еритроїдного ростка кровотворення лишаються невідомими. Хоча в експериментальних дослідженнях виявляли пригнічення диференціювання гранулоцитарного ростка кровотворення та підвищення кількості БУО-Е у напіврідкому середовищі *in vitro* при введенні гену BCR-ABL у CD34⁺ клітини кордової крові людини. Автори дослідження припустили, що процес перепрограмування ранніх клітин-попередників мієлоїдної

ланки кровотворення відбувається на користь еритроїдного ростка кровотворення [6]. Хоча в умовах *in vivo* зазвичай спостерігається розширення гранулоцито-макрофагального ростка кровотворення. Ймовірно це відбувається за рахунок змін у спектрі регуляторних молекул кісткового мозкового мікрооточення [5].

З іншого боку, під час культивування мієлокаріоцитів у напіврідкому агарі *in vitro*, за умов присутності у культуральному середовищі лише гранулоцито-макрофагального росткового фактора та фетальної телячої сироватки, у культурах кісткового мозку пацієнтів зі стійкістю до терапії іматинібом та нілотинібом спостерігалось спонтанне формування БУО-Е (рис. 3). Їх кількість була значно меншою, порівняно з культурами, що містили еритропоетин. Так, у зразках кісткового мозку, що незважаючи на терапію іматинібом містили клітини лейкоемічного клону, кількість БУО-Е становила $7,3 \pm 2,8$ на 1×10^5 експлантованих мононуклеарів, а у культурах кісткового мозку зі стійкістю до нілотинібу число БУО-Е сягало $8,4 \pm 3,6$ на 1×10^5 експлантованих мононуклеарів.

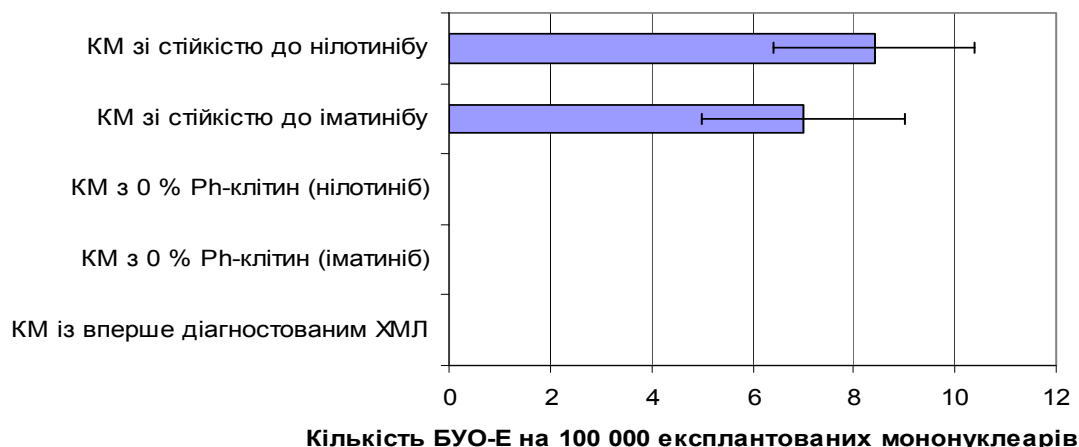


Рис. 3. Показники ефективності формування еритроїдних колоній зразків кісткового мозку досліджуваних груп за умов відсутності еритропоєтину у культуральному середовищі

З літературних джерел відомо, що фетальна теляча сироватка в суспензійній культурі *in vitro* сприяє синтезу гемоглобіну, але не сприяє диференціюванню мієлокаріоцитів у еритроїдному напрямку [6]. Однак, при ХМЛ наявність 10 % фетальної телячої сироватки може викликати спонтанне утворення еритроїдних колоній. Проте, у нашому дослідженні спонтанного утворення колоній у зразках кісткового мозку пацієнтів із вперше діагностованим ХМЛ не спостерігалось. Так, Ш. Ісаад та колеги припустили, що причиною еритропоєтиннезалежної появи КУО-Е у культурах клітин кісткового мозку при ХМЛ може бути підвищена кількість рецептора еритропоєтину на поверхні клітин лейкоемічного клону, яка викликана підвищеною експресією BCR-ABL [6]. Виходячи з цього твердження, ми можемо припустити, що у клітинах кісткового мозку пацієнтів зі стійкістю до терапії ІТК могла відбутися ампліфікація гену BCR-ABL, що й могло призвести до його надекспресії та підвищення кількості рецепторів до еритропоєтину на поверхні лейкоемічних клітин. Визначені характерні відмінності у культивуванні гемопоетичних клітин кісткового мозку у пацієнтів зі стійкістю до препаратів ТКІ при ХМЛ свідчать про те, що еритроїдні клітини попередники є більш чутливими до еритропоєтину, який може синтезуватися в культурі *in vitro* у якості аутокринного фактору безпосередньо гемопоетичними та мікрооточення за умов наявності фетальної телячої сироватки.

Висновки. Результати проведених досліджень свідчать, що при набутті клітинами лейкоемічного клону стійкості до іматинібу та нілотинібу кількість БУО-Е підвищується за умов наявності у культуральному середовищі еритропоєтину. Крім того, при відсутності екзоген-

ного еритропоєтину у культуральному середовищі клітини кісткового мозку пацієнтів зі стійкістю до зазначених тирозинкіназних інгібіторів набувають здатності диференціюватися у еритроїдному напрямку, що може бути зумовлено підвищенням експресії онкогену BCR-ABL. Отримані дані свідчать про те, що визначення функціональної активності еритроїдних клітин-попередників пацієнтів при ХМЛ може використовуватися у якості додаткового методу моніторингу відповіді пацієнтів на терапію інгібіторами тирозинкіназ.

Список використаних джерел

1. Deininger M. W. The Molecular Biology Of Chronic Myeloid Leukemia / M. W. Deininger, J. M. Goldman, J. V. Melo // Blood. – 2000. – Vol. 15 (10). – P. 3343–3356.
2. Goldman J. M. Chronic Myeloid Leukemia – Advances in Biology and New Approaches to Treatment / J. M. Goldman, J. V. Melo // The New England Journal of Medicine – 2003. – Vol. 15 (9). – P. 1451–1464.
3. Frazer R. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century / R. Frazer, A. E. Irvine, M. F. McMullin // Ulster Med. – 2007. – Vol. 76 (1). – P. 8–17.
4. Granulocyte–Macrophage Progenitors as Candidate Leukemic Stem Cells in Blast-Crisis CML / Catriona H. M. Jamieson, et al. // New England Journal of Medicine. – 2004. – Vol. 351 (7). – P. 657–667.
5. Issaad C. Growth of erythroid colonies in chronic myelogenous leukemia is independent of erythropoietin only in the presence of steel factor / C. Issaad, W. Vainchenker // Blood. – 1994. – Vol. 84 (10). – P. 3447–3456.
6. Mayani H. In vitro biology of human myeloid leukemia / H. Mayani, E. Flores-Figueroa, E. Chavez-Gonzalez // Leukemia Research. – 2009. – Vol. 33. – P. 624–637.
7. Helgason C. D. Basic Cell Culture Protocols / Cheryl D. Helgason, Cindy L. Miller. – N. Y. : Humana Press. – 2004.

Надійшла до редколегії 30.10.14

И. Свеженцева, асп., Д. Билько, канд. биол. наук, Н. Билько, д-р мед. наук
Национальный университет "Киево-Могилянская академия", Киев, Украина,
И. Дягиль, д-р мед. наук
ДУ "Научный центр радиационной медицины АМН Украины", Киев, Украина

ОСОБЕННОСТИ ЭРИТРОПОЭЗА

ПРИ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ МИЕЛОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗЫ

Проведена оценка функциональной активности клеток эритроидного звена кроветворения пациентов при ХМЛ при терапии ингибиторами тирозинкиназы первого и второго поколения. В образцах костного мозга пациентов с резистентностью к терапии ингибиторами тирозинкиназ показано увеличение количества эритроидных колоний при условии наличия в среде для культивирования эритропоэтина. Кроме того, было установлено, что при резистентности к иматинибу и nilотинибу клетки лейкоемического клона в культуре *in vitro* приобретают способность дифференцироваться в эритроидном направлении при отсутствии в среде для культивирования экзогенного эритропоэтина. Таким образом, определение пролиферативной активности эритроидного звена кроветворения в культуре клеток *in vitro* может служить важным прогностическим фактором для дальнейшего выбора стратегии лечения.

Ключевые слова: хроническая миелоидная лейкемия, ингибиторы тирозинкиназ, эритропоэз, культура клеток *in vitro*.

I. Sviezhentseva, PhD stud., D. Bilko, PhD, N. Bilko, DSc.
National University of "Kyiv-Mohyla Academy", Kyiv, Ukraine,
I. Dyagil, DSc
ND "Scientific Center for Radiation Medicine, Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine

FEATURES OF THE ERYTHROPOIESIS UPON TREATMENT OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA WITH TYROSINE KINASE INHIBITOR

A functional activity of erythroid hematopoietic cells of patients with chronic myeloid leukemia, who were treated with tyrosine kinase inhibitor of the first and second generation was investigated. Samples of bone marrow of patients with resistance to tyrosine kinase inhibitor treatment show an increase of erythroid colonies number provided that there is erythropoietin in the culture medium. Furthermore, it was found that clone cells in culture in vitro acquire the ability to differentiate towards erythroid direction in the absence of a culture medium culturing exogenous erythropoietin when they have a resistance to imatinib and nilotinib. Thus, the determination of proliferative activity of erythroid hematopoiesis level in cultured cells in vitro may serve as an important prognostic factor for the further choice of treatment strategy.

Key words: chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitors, erythropoiesis, cell culture in vitro.

УДК 577.121.7

К. Дворченко, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ЗМІНИ ЕНЕРГЕТИЧНОГО БАЛАНСУ ПЕЧІНКИ ТА ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ ПРИ ГІПОАЦИДНОМУ СТАНІ ШЛУНКА ТА ПОШУК ПІДХОДІВ ДО ЙОГО ВІДНОВЛЕННЯ

Встановлено, що у печінці та підшлунковій залозі щурів при тривалій шлунковій гіпохлоргідрії порушується енергетичний баланс, про що свідчить зниження вмісту АТФ на фоні збільшення рівня АДФ та АМФ. Мультипробіотик "Симбітер®" сприяє відновленню рівноваги аденілових нуклеотидів у досліджуваних органах щурів з гіпоацидним станом шлунка.

Ключові слова: тривала шлункова гіпохлоргідрія, підшлункова залоза, аденілові нуклеотиди, мультипробіотик.

Вступ. Значне місце серед патологій травної системи займають гіпоацидні стани, які виникають внаслідок порушення секреції гідрохлоридної кислоти парієтальними клітинами шлунка. Шлункова гіпохлоргідрія має поліетіологічну природу та є наслідком ряду захворювань (атрофічний гастрит, інфекція *H. pylori*, аутоімунні порушення), розвивається при старінні та є результатом прийому фармакологічних препаратів, які гальмують продукування гідрохлоридної кислоти в шлунку (антагоністи H₂-рецепторів та інгібітори протонної помпи) [1, 2].

Шлункова гіпохлоргідрія призводить до цілої низки негативних наслідків у шлунково-кишковому тракті (ШКТ): зниження активації пепсину та інших протеолітичних ферментів, погіршення процесів розщеплення білків та утворення токсичних проміжних продуктів їх розпаду, порушення моторики шлунка та кишечника, зниження всмоктування мікроелементів (Cu, Zn, Se, ін.), вітаміну В₁₂, гіпергастринемії, розмноження патогенної мікрофлори та розвитку дисбіозів [3, 4, 5]. Таким чином, зниження рівня або ж повна відсутність гідрохлоридної кислоти у шлунковому соку є небезпечним станом для здоров'я людини. Зокрема, існує зв'язок між гіпоацидними станами шлунка та можливим розвитком патологічних змін у печінці та підшлунковій залозі [6, 7, 8]. Розвиток патологічних процесів супроводжується зміною енергетичного статусу клітин, від якого залежить баланс та сполучення перебігу біологічних процесів в організмі. Ядром енергетичного обміну клітин є метаболізм аденілових нуклеотидів [9]. Таким чином, баланс АТФ, АДФ та АМФ є інформативним показником при оцінці важкості перебігу патологічного процесу. Для корекції патологічних змін у печінці та підшлунковій залозі щурів з гіпоацидним станом шлунка ми використовували мультипробіотичний препарат ("Симбітер® ацидофільний" концентрований ("Симбітер®")), який здатний зменшувати розлади в травній та інших системах організму [10].

Тому метою роботи було визначити вміст аденілових нуклеотидів у печінці та підшлунковій залозі щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та при введенні мультипробіотика "Симбітер®".

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 160-200 г з дотриманням загальних етичних

принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. За добу до проведення експерименту тварин піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води. Усіх тварин розділяли на чотири експериментальні групи. Першій групі тварин (контроль) вводили інтраперитонеально 0,2 мл та перорально 0,5 мл води для ін'єкцій один раз на добу упродовж 28 днів. Другій групі тварин (контроль на введення пробіотику) вводили перорально 0,14 мл/кг мультипробіотик "Симбітер®", розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій, один раз на добу 28 днів. Третій групі тварин (модель тривалої шлункової гіпохлоргідрії) вводили інтраперитонеально 14 мг/кг омепразол один раз на добу упродовж 28 днів. Четвертій групі тварин сумісно вводили інтраперитонеально 14 мг/кг омепразол, розчинений у 0,2 мл води для ін'єкцій, та перорально 0,14 мл/кг мультипробіотик "Симбітер®", розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій, один раз на добу 28 днів.

Розділення та кількісне визначення аденілових нуклеотидів у тканині печінки та підшлункової залози проводили методом тонкошарової хроматографії на силуфолових пластинках UV-254 за методом [11]. Пряму денситометрію пластин у відбитому світлі здійснювали на швидкісному сканері денситометра CS-920 "Shimadzu" (Японія) у напрямку руху розчинника при довжині хвилі 260 нм. Вміст досліджуваних сполук у хроматографічних плямах визначали за допомогою калібрувальних кривих залежності площі плями від кількості нанесених хроматографічно чистих препаратів АМФ, АДФ та АТФ. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Ст'юдента [12].

Результати та їх обговорення. Встановлено, що в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії у печінці щурів вміст АТФ знижується в 1,6 раза ($p < 0,01$), при цьому підвищується вміст АДФ та АМФ відповідно в 1,4 раза ($p < 0,01$) та в 1,3 раза ($p < 0,01$) відносно контролю (табл. 1). За даних умов експерименту у печінці сумарний вміст аденінінуклеотидів та енергетичний заряд клітин печінки знижується в 1,2 раза порівняно з контрольною групою (табл. 1). В умовах введення му-