

<https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-4-424-435>

ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ-ПРЕДШЕСТВЕННИЦАХ СТРОМАЛЬНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ В ДЕБЮТЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И В ХОДЕ ЛЕЧЕНИЯ

Петинати Н. А.^{1,1}, Шипунова И. Н.¹, Бигильдеев А. Е.¹, Сац Н. В.¹, Чельшева Е. Ю.², Шухов О. А.², Петрова А. Н.², Туркина А. Г.², Дризе Н. И.¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии», лаборатория физиологии кроветворения Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии», научно-консультативное отделение химиотерапии миелопролиферативных заболеваний Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. У больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) изменены свойства клеток-предшественниц стромального микроокружения — мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) и колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕф).

Цель — сравнительное изучение клеток-предшественниц стромального микроокружения ММСК и КОЕф, полученных из костного мозга больных ХМЛ в дебюте заболевания, через год после начала лечения и на длительных сроках лечения ингибиторами тирозинкиназ (ИТК).

Материалы и методы. Были проанализированы характеристики ММСК и концентрация КОЕф в костном мозге больных ХМЛ, а также относительный уровень экспрессии генов (REL), связанных с дифференцировкой и участвующих в регуляции кроветворения. Анализ проводили в дебюте заболевания, через год после начала лечения, через 3–8 лет и через 9–16 лет терапии ИТК. В качестве контроля использовали ММСК и КОЕф здоровых доноров.

Результаты. Концентрация КОЕф в дебюте заболевания не отличалась от таковой у доноров, однако в колониях из КОЕф был увеличен относительный уровень экспрессии генов, относящихся к дифференцировке. Через год после начала лечения ИТК концентрация КОЕф снижалась в 4 раза, а затем увеличивалась и достигала нормальных значений через 8 лет приема ИТК. Суммарная клеточная продукция ММСК не была изменена в дебюте заболевания, но снижалась через год приема ИТК с последующим восстановлением. В ММСК больных была изменена экспрессия многих генов: экспрессия *REL Uf* была увеличена в 10, а *JAG1* — в 2 раза, экспрессия *REL Uf* снижалась по мере лечения, но всегда оставалась выше, чем в ММСК доноров, а экспрессия *JAG1* нормализовывалась. В ММСК больных, достигших глубокого молекулярного ответа (ГМО) в течение 17 месяцев лечения, экспрессия *REL Uf* в дебюте заболевания была в три раза ниже, чем у тех, кто не достиг ГМО за 50 месяцев, а *JAG1* не отличался от доноров.

Заключение. Изменения в стромальных клетках предшественницах связаны не только с влиянием опухолевых клеток, но и с лечением ИТК. Нормальный уровень экспрессии *JAG1* и сниженный уровень экспрессии *Uf* в ММСК больных ХМЛ в дебюте заболевания могут быть предикторами достижения ГМО.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, хронический миелолейкоз, относительный уровень экспрессии генов (ОУЭ), глубокий молекулярный ответ

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Благодарности. Авторы благодарят Т.В. Сорокину за предоставление РНК из ММСК первичных больных и Н.М. Капанова за предоставление графического изображения результатов иммунофенотипирования ММСК.

Для цитирования: Петинати Н.А., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Сац Н.В., Чельшева Е.Ю., Шухов О.А., Петрова А.Н., Туркина А.Г., Дризе Н.И. Изменения в клетках-предшественницах стромального микроокружения костного мозга больных хроническим миелолейкозом в дебюте заболевания и в ходе лечения. Гематология и трансфузиология. 2019; 64(4): 424–435. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-4-424-435>

CHANGES IN STROMAL PROGENITOR CELLS DERIVED FROM BONE MARROW IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOGENOUS LEUKAEMIA AT THE ONSET OF THE DISEASE AND DURING TREATMENT

Petinati N. A.¹, Shipunova I. N.¹, Bigildeev A. E.¹, Sats N. V.¹, Chelysheva E. Yu.², Shukhov O. A.², Petrova A. N.², Turkina A. G.², Drize N. I.¹

¹National Research Center for Hematology, Laboratory for Physiology of Hematopoiesis, 125167, Moscow, Russia

²National Research Center for Hematology, Scientific Advisory Department for Chemotherapy of Myeloproliferative Disorders, 125167, Moscow, Russia

ABSTRACT

Introduction. The properties of progenitor cells in the stromal microenvironment, i.e. multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) and fibroblast colony-forming units (CFU-F), undergo changes in patients with chronic myelogenous leukaemia (CML).

Aim. To compare the progenitor cells of the stromal microenvironment (MMSCs and CFU-Fs) obtained from the bone marrow of CML patients at the onset of the disease, one year after the start of the treatment and during the long-term treatment with tyrosine kinase inhibitors (TKI).

Materials and methods. The study involved an analysis of the characteristics of MMSCs, the concentration of CFU-Fs in the bone marrow of CML patients, as well as the relative expression level of genes (REL) associated with differentiation and involved in the regulation of haematopoiesis. The analysis was performed at the onset of the disease, one year after the start of the treatment, as well as 3–8 and 9–16 years after the TKI therapy. MMSCs and CFU-Fs of healthy donors were used for control purposes.

Results. The concentration of CFU-Fs at the onset of the disease did not differ from that in donors; however, the relative expression level of genes associated with differentiation was increased in the CFU-F colonies. A year after the start of TKI treatment, the concentration of CFU-Fs decreased by four times. Subsequently, the concentration increased to reach normal values following 8 years of TKI treatment. The total production of MMSCs was not changed at the onset of the disease; however, it decreased after a year of TKI treatment, subsequently returning to normal. The expression of many genes was altered in the MMSCs of patients, i.e. the REL of *LIF* and *JAG1* increased by 10 and 2 times, respectively; in the course of treatment, the REL of *LIF* in MMSCs decreased, always remaining higher than in those of the donors, whereas the expression of *JAG1* returned to normal. At the onset of the disease, the REL of *LIF* in the MMSCs of patients, who achieved a deep molecular response (DMR) within 17 months of the treatment, was three times lower than in the MMSCs of those patients who did not reach DMR within 50 months, with *JAG1* not differing from that of donors.

Conclusion. Changes in stromal progenitor cells are associated with the influence of tumour cells, as well as with TKI therapy. A normal expression level of *JAG1* and a decreased expression level of *LIF* in the MMSCs of CML patients at the onset of the disease may be predictive of DMR achievement.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, chronic myelogenous leukaemia, relative gene expression level, deep molecular response

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

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

Acknowledgement. The authors would also like to thank T. Sorokin for providing RNA from the MMSCs of patients extracted prior to their treatment, as well as to N. Kapranov for providing a graphic image showing the results of MMSC immunophenotyping

For citation: Petinati N.A., Shipunova I.N., Bigildeev A.E., Sats N.V., Chelysheva E. Yu., Shukhov O.A., Petrova A.N., Turkina A.G., Drize N.I. Changes in stromal progenitor cells derived from bone marrow in patients with chronic myelogenous leukaemia at the onset of the disease and during treatment. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2019; 64(4):424–435 [in Russian]. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-4-424-435>

Введение

Кроветворение обеспечивается стволовыми кроветворными клетками (СКК). СКК локализируются в костномозговых нишах, где происходит их регуляция [1]. Костномозговая ниша состоит из множества компонентов: остеобласты, остеокласты, адипоциты, эндотелиальные клетки, обильные хемокиновыми рецепторами 12-го типа ретикулярные клетки (C-X-C chemokine receptor type 12-abundant reticular cells — CAR cells), швановские клетки, мезенхимальные стволовые клетки [2]. В состав кроветворного микроокружения также входят потомки мезенхимальных стволовых клеток — мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) и их производные колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕ-Ф) [3]. Клеточные элементы ниши регулируют кроветворение, в свою очередь, качественные изменения в кроветворении влияют на компоненты кроветворного микроокружения. Показано, что у больных острыми лейкозами происходят значительные изменения в компонентах ниши. В костном мозге больных острыми лейкозами концентрация КОЕ-Ф некоторые свойства ММСК, экспрессия генов в этих стромальных клетках-предшественниках изменены [4–7]. У больных хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ) уменьшена частота встречаемости ММСК в костном мозге [8] и увеличена экспрессия некоторых генов [9].

В настоящее время более 90 % больных ХМЛ благодаря клинической эффективности ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) выживают, имея хорошее качество жизни [10]. Наличие лейкозных стволовых клеток (ЛСК) обуславливает развитие лейкоза. ЛСК имеют очень много таких же свойств, как у СКК: они резистентны к действию цитостатиков за счет повышенной способности удалять из клетки чужеродные вещества, т.е. обладают множественной лекарственной устойчивостью [11]. Повышенная лекарственная устойчивость ЛСК определяет резистентность их к терапии [12]. Немногие ЛСК, оставшиеся после терапии, вызывают рецидив заболевания примерно у 50 % больных ХМЛ после отмены ИТК [13]. Функционирование и устойчивость ЛСК связаны со стромальным микроокружением костного мозга, поддерживающим и защищаю-

щим ЛСК [14]. Опухолевые клетки-предшественники при ХМЛ измененно взаимодействуют с микроокружением костного мозга, и их состояние непрерывной пролиферации может происходить из-за разрегулированных функций важных молекул межклеточной адгезии на поверхности ЛСК [15, 16]. В работе W.A. Sands и соавт. [17] было показано, что ЛСК могут изменять нишу, секретируя различные костимулирующие молекулы и супрессирующие цитокины, которые нацелены на метаболические пути и облегчают уход от иммунного надзора и индукцию резистентности к химиотерапевтическим препаратам. Эти цитокины включают CXCL12, фактор роста стволовых клеток 1 (stem cell factor-1, SCF-1), интерлейкин-6 (ИЛ-6), несколько факторов роста, таких как фактор роста опухоли бета (transforming growth factor beta, TGF- β), основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor, bFGF) и фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF). Во время лейкогенеза злокачественные клоны постепенно становятся независимыми от физиологического контроля ниши [10]. Более того, ММСК экспрессируют различные факторы, участвующие в поддержании ЛСК как в хронической фазе заболевания, так и при наличии глубокого молекулярного ответа (ГМО) [9].

Цель работы — сравнительное изучение клеток-предшественниц стромального микроокружения ММСК и КОЕФ, полученных из костного мозга больных ХМЛ в дебюте заболевания, через год после начала лечения и на длительных сроках лечения ИТК.

Материалы и методы

Больные и доноры костного мозга

В исследование были включены 73 больных: 18 больных в дебюте ХМЛ (12 из них также были обследованы через год), 32 — через 3–8 лет и 23 — через 9–16 лет после начала лечения ИТК. Данные больных представлены в таблице 1.

Все больные и доноры подписали информированное согласие на забор костного мозга. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ гема-

Таблица 1. Характеристики больных, включенных в исследование
Table 1. Characteristics of CML patients included in the study

Группы Groups	Мужчины/ женщины Males/Females	Медиана возраста, (разброс), лет Median age, (range), years	Время лечения ИТК, медиана, лет Median duration of TKI treatment, years
Больные ХМЛ в дебюте заболевания и через 1 год терапии Patients before treatment and 1 year after the TKI treatment	10/8	40,5 (19–74)	0–1
ГМО и лечение 3–8 лет DMR and TKI treatment for 3–8 years	19/13	34,5 (23–63)	5
ГМО и лечение 9–16 лет DMR and TKI treatment for 9–16 years	10/13	53 (32–80)	11

тологии» МЗ РФ. Образцы костного мозга получали в момент рутинных диагностических пункций костного мозга. Все больные после длительного лечения ИТК имели ГМО, пункции костного мозга выполнялись в связи с планируемой отменой ИТК.

Поскольку характеристики ММСК и КОЕф зависят от возраста, в качестве контроля для ММСК и КОЕф больных в дебюте заболевания, больных через 1 и 3–8 лет после начала терапии использовали ММСК и КОЕф из костного мозга 60 здоровых доноров (24 мужчины и 36 женщин), в возрасте от 20 до 78 лет (медиана 49 лет), для больных через 9–16 лет после начала терапии использовали ММСК и КОЕф из костного мозга 43 здоровых доноров лет (21 мужчина, 21 женщина) в возрасте от 31 до 78 лет (медиана 50 лет).

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

ММСК выделяли из 3–5 мл костного мозга больных и здоровых доноров. Для выделения мононуклеаров костный мозг смешивали с равным объемом среды аMEM media (ICN), содержащей 0.2 % метилцеллю-

лозы (1500 cP, Sigma-Aldrich). Через 40 мин большинство эритроцитов и гранулоцитов оседали, в то время как мононуклеарные клетки оставались в суспензии. Затем верхнюю фракцию (суспензию) отбирали и центрифугировали в течение 10 мин при 450 G. Клеточный осадок ресуспендировали в стандартной среде для культивирования, состоящей из среды аMEM с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) Hyclone, 2 mM L-глутамин (ICN), 100 ЕД/мл пенициллина (Ferein) и 50 мкг/мл стрептомицина (Ferein). Клетки культивировали по 3×10^6 клеток на флакон T25 см² (Corning-Costar). После формирования конфлюэнтного монослоя клетки отмывались 0,02 % ЭДТА (ICN) в физиологическом растворе (Sigma-Aldrich), а затем обрабатывались трипсином (ICN). Клетки рассаживали по 4×10^5 клеток на см² площади флакона. Культуры при 37 °C в атмосфере с 5 % CO₂.

ММСК были иммунофенотипированы [18] для определения поверхностных молекул [19] (рис. 1А) и получены данные по дифференцировке клеток *in vitro* в остеобласты и адипоциты стандартным методом [20] (рис. 1Б).

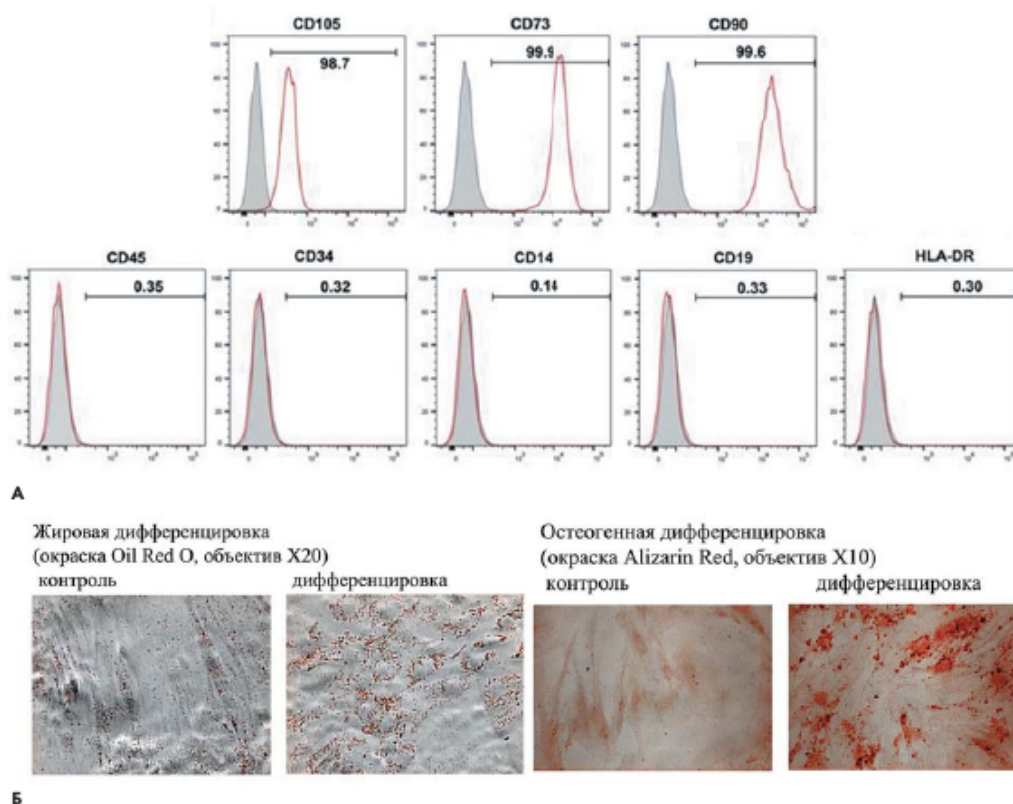


Рисунок 1. Характеристики ММСК: А — иммунофенотип ММСК, экспрессированы антигены CD105, CD73, CD90; не экспрессированы маркеры кроветворных клеток CD45, CD34, CD14, CD19 и HLA-DR; Б — дифференцировка ММСК в остеогенном и адипогенном направлениях

Figure 1. Characteristics of MMSCs. A. Immunophenotype of MMSCs, antigens CD105, CD73, CD90 are expressed; hematopoietic cell markers CD45, CD34, CD14, CD19 and HLA-DR are not expressed. B. Differentiation of multipotent MSCs in osteogenic and adipogenic directions

Анализ колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) из костного мозга

Для анализа КОЕф ядродержащие клетки полученных образцов костного мозга культивировали по 10^6 и 5×10^5 на флакон с площадью дна 25 см^2 в среде альфа-МЕМ с 20 % ЭТС (Hyclone, США), 2 мМ L-глутамин (ICN, США), 100 ед/мл пенициллина («Ферейн», Россия), 50 мкг/мл стрептомицина («Ферейн», Россия) в течение 14 дней. Подсчет колоний производили под бинокулярной лупой (Opton, Германия) после окрашивания в 1 % кристаллвиолете на 20 % метаноле.

Определение относительного уровня экспрессии генов

Определение уровня экспрессии генов проводилось методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (модификация Taq-Man) на приборе Rotor-Gene (Corbett, Australia). Для выделения РНК был использован стандартный протокол с небольшими модификациями [21]. Для построения первых цепей ДНК после гибридизации мРНК со смесью поли-Т-праймеров и случайных гексамеров использовали обратную транскриптазу (M-MLV, Promega) в соответствии с рекомендациями производителя. Для нормализации образцов использовали гены «домашнего хозяйства»

BACT (бета-актин) и GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа), относительный уровень экспрессии генов рассчитывали методом $\Delta\Delta\text{Ct}$ [22].

Статистический анализ. Данные представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего. Достоверность различий средних значений определялась с помощью критерия Манна—Уитни для распределений, отличных от нормального и *t*-критерия Стьюдента для нормальных распределений (достоверными считались при $p < 0,05$).

Результаты

Концентрация КОЕф и ростовые характеристики ММСК

Изучили концентрацию КОЕф и ростовые характеристики ММСК больных ХМЛ в дебюте заболевания и в течение терапии ИТК до 16 лет. В дебюте заболевания и в самом начале лечения концентрация КОЕф в костном мозге больных не отличалась от таковой у доноров (табл. 2). Через год после начала лечения концентрация КОЕф снижалась почти в 4 раза, а затем постепенно увеличивалась в группе больных, которые получали терапию более 8 лет. В этой группе больных концентрация КОЕф в костном мозге не отличалась от концентрации в костном мозге здоровых доноров. Суммарная продукция ММСК за 4 пассажа достоверно снижалась в 2 раза через год после начала терапии, а затем посте-

Таблица 2. Концентрация КОЕ-Ф и культуральные характеристики ММСК больных ХМЛ до начала и во время лечения
Table 2. Concentration of CFU-Fs and the cultural characteristics of MMSCs in CML patients prior to and during TKI treatment

Характеристики Characteristics	Доноры (n = 60) (M = 42 года) Donors (n = 60) (M = 42 years)	Больные до лечения (n = 18) Patients prior to treatment	Лечение ИТК в течение 1 года дебют (n = 18) 1 year of TKI treatment (n = 18)	Лечение ИТК меньше 8 лет (n = 32) Less than 8 years of TKI treatment (n = 32)	Доноры (n = 43) (M = 49 лет) Donors (n = 43) (M = 49 years)	Лечение ИТК больше 8 лет (n = 23) More than 8 years of TKI treatment (n = 23)
Концентрация КОЕф на 10^6 клеток костного мозга Concentration of CFU-Fs per 10^6 bone marrow cells	16,2 \pm 2,8	17,1 \pm 4,6	4,9 \pm 1,2*	11,9 \pm 2,6	17,1 \pm 3,7	14,2 \pm 2,8
Суммарная продукция ММСК за 3 пассажа, $\times 10^6$ Cumulative production of MMSCs during 3 passages, $\times 10^6$	10,9 \pm 1,2	7,4 \pm 1,8	6,5 \pm 0,8*	13,5 \pm 1,8	7,7 \pm 1	8,6 \pm 1,4
Время до РО, дней Time before PO, days	14,4 \pm 0,4	17,9 \pm 0,9*	17,6 \pm 0,8*	14,7 \pm 0,7	14,5 \pm 0,5	15,2 \pm 0,6
Время удвоения популяции, дней Population doubling time, days	2,9 \pm 0,2	6 \pm 0,8*	5 \pm 0,5*	2,7 \pm 0,2	3,1 \pm 0,2	3,5 \pm 0,3

Примечание. M — медиана возраста; * — обозначает $p < 0,05$ при сравнении с соответствующей группой доноров при помощи *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок.

Note. M — median age; * — denotes $p < 0.05$ when compared to the corresponding donor group using the Student's *t*-test for independent samples.

ленно увеличивалась и не отличалась от таковой у доноров. У больных в дебюте заболевания время до P0, т.е. достижения конфлюэнтного монослоя после установления культуры, было достоверно увеличено, что указывало на уменьшение концентрации стромальных предшественников в костном мозге. Далее время до P0 постепенно уменьшалось и после 8 лет лечения не отличалось от такового у доноров. Время удвоения популяции ММСК было в 2 раза больше в дебюте заболевания по сравнению с ММСК доноров и оставалось увеличенным в течение года лечения ИТК, после еще нескольких лет лечения оно нормализовалось и не отличалось от доноров соответственного возраста.

Анализ экспрессии генов в КОЕФ и ММСК

Экспрессия многих генов изменялась в КОЕФ в дебюте заболевания. К ним относятся гены, связанные с хрящевой, жировой и костной дифференцировкой (*SOX9*, *PPARG* и *BGLAP*, *SPPI*), экспрессия которых достоверно повышалась. Это означает, что КОЕФ были индуцированы к дифференцировке и, скорее всего, обеспечивали взрослыми стромальными клетками костный мозг более интенсивно, что, в свою очередь, связано с повреждением стромального микроокружения опухолевыми клетками. Экспрессия генов, связанных с пролиферацией предшественников, сильно не изменялась. Экспрессия *BMP4* была значительно повышена, и достоверно отличалась от таковой у доноров.

Анализ относительного уровня экспрессии генов в ММСК больных ХМЛ показал, что в дебюте заболевания стромальные клетки-предшественники были активированы по сравнению с таковыми у доноров. Относительный уровень экспрессии генов факторов, регулирующих кроветворные клетки и ЛСК (*IL6* и *LIF*), был достоверно повышен в 2,5 и 14 раз соответственно (табл. 4). По мере лечения экспрессия генов этих факторов постепенно снижалась, однако уровень экспрессии *IL6* все равно оставался выше, чем у доноров. Некоторые факторы роста ММСК (*FGF2*, его рецепторы — *FGFR1*, *FGFR2*, рецептор фактора роста из тромбоцитов — *PDGFRα*) были повышены в дебюте заболевания, тогда как экспрессия фактора роста сосудистого эндотелия — *VEGF*, опухолевого фактора роста 1 и 2 — *TGFβ1* и *TGFβ2* не были из-

менены (табл. 4). Среди изученных молекул адгезии достоверное снижение в 2 раза было отмечено только для *ICAM*, остальные молекулы не были изменены. Экспрессия генов, участвующие в дифференцировке ММСК (*SPPI*, *SOX9*, *PPARG*), была повышена в дебюте заболевания. Относительный уровень экспрессии *PPARG* оставался повышенным через год после начала лечения, а затем постепенно нормализовался. Экспрессия гена маркера костной дифференцировки (*SPPI*) постепенно повышалась по мере лечения, экспрессия маркера хрящевой (*SOX9*) дифференцировки была увеличена в дебюте заболевания и в течение года лечения, однако при длительном лечении ИТК достоверно снижалась в 2 раза по сравнению с таковыми у доноров. Экспрессия генов, характерных для ММСК (*NES*, *JAG1* и *IGF1*), была повышена в дебюте заболевания и постепенно нормализовалась при длительном лечении за исключением *NES*, уровень экспрессии которого достоверно уменьшался по сравнению с таковым у доноров.

Таким образом, у больных ХМЛ профиль экспрессии генов изменен в дебюте заболевания и только частично нормализуется даже при длительной терапии.

Анализ ММСК у больных в зависимости от достижения ГМО

При анализе ММСК у больных в дебюте заболевания в зависимости от дальнейшего достижения ими ГМО были обнаружены закономерности. У больных, не достигших ГМО в течение 4-х лет, была меньше концентрация КОЕФ в костном мозге, суммарная клеточная продукция за 4 пассажа также была меньше, а время до P0 увеличено (табл. 5). Все эти изменения не достоверны, однако прослеживалась тенденция, указывающая на более значительное повреждение стромальных клеток-предшественниц у группы больных, не достигших ГМО. В ММСК больных, достигших ГМО, относительный уровень экспрессии 3-х генов, отвечающих за регуляцию кроветворных клеток, был в 2 раза ниже, чем в ММСК больных, не достигших ГМО (табл. 5).

Таким образом, в работе выявлены существенные различия в стромальных клетках-предшественниках больных в зависимости от их ответа на лечение ИТК и достижения ГМО.

Таблица 3. Изменение относительного уровня экспрессии некоторых генов в КОЕФ больных ХМЛ

Table 3. Changes in the REL of some genes in CFU-F in CML patients

Группы Groups	BGLAP	SPPI	PPARG	SOX9	FGFR1	FGFR2	VEGF	FGF2	BMP4
Доноры (n = 60) Donors (n = 60)	1,0 ± 0,2	6,3 ± 2,1	1,7 ± 0,5	0,1 ± 0,03	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,2	1,1 ± 0,3	5,3 ± 2,1	0,3 ± 0,1
ХМЛ дебют (n = 18) Primary CML patients (n = 18)	2,9 ± 0,3*	16,6 ± 3,8*	6,9 ± 1,7*	1,3 ± 0,4*	0,7 ± 0,04	0,4 ± 0,2	0,95 ± 0,1	7,3 ± 2,5	1,1 ± 0,3*

Примечание. * — $p < 0,05$ при сравнении с соответствующей группой доноров при помощи t-критерия Стьюдента для независимых выборок.

Note. * — $p < 0.05$ when compared with the corresponding donor group using the Student's t-test for independent samples.

Таблица 4. Относительный уровень экспрессии некоторых генов в ММСК больных ХМЛ до начала и в процессе лечения
Table 4. Relative expression level of some genes in the MMSCs of CML patients prior to and during TKI treatment

Гены Genes	Доноры Donors		Срок терапии больных ХМЛ Treatment duration of CML patients			
	(M = 42 года) (n = 60) (M = 42 years) (n = 60)	(M = 49 лет) (n = 43) (M = 49 years) (n = 43)	дебют заболевания (n = 18) onset of the disease	1 год (n = 18) 1 year	меньше 8 лет (n = 32) less than 8 years	больше 8 лет (n = 23) more than 8 years
IL6	14,3 ± 2,2	13,6 ± 2,5	34,9 ± 4,7*	27,8 ± 6,2	23,9 ± 13,2	28,1 ± 5,6
LIF	0,67 ± 0,09	0,55 ± 0,09	9,46 ± 1,81*	5,12 ± 0,75*	2,36 ± 0,67*●○	3,39 ± 1,43 ○
CSF1	1,0 ± 0,12	1,3 ± 0,14	0,8 ± 0,13	0,59 ± 0,11	0,2 ± 0,03●○	0,14 ± 0,04●○
FGF2	6,01 ± 0,56	5,74 ± 0,55	11,3 ± 1,53*	8,1 ± 2,16	14,17 ± 7,67	5,9 ± 0,58 ○
FGFR1	0,76 ± 0,04	0,81 ± 0,06	1,1 ± 0,14*	0,7 ± 0,07	0,5 ± 0,06●○	0,3 ± 0,04●○
FGFR2	2,14 ± 0,16	2,08 ± 0,2	3,95 ± 0,62*	2,61 ± 0,47	2,7 ± 0,4	1,9 ± 0,4
PDGFRA	1,64 ± 0,19	1,98 ± 0,23	8,11 ± 1,21*	4,55 ± 0,63*	2,25 ± 0,26●○	1,48 ± 0,25●○
PDGFRB	0,82 ± 0,05	0,82 ± 0,06	0,94 ± 0,16	0,65 ± 0,12	0,35 ± 0,08*○	0,19 ± 0,06*●○
VEGF	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,43 ± 0,09*	0,17 ± 0,03●○	0,2 ± 0,04●
BMP4	0,99 ± 0,1	1,04 ± 0,14	1,92 ± 0,3*	3,78 ± 0,95*	0,91 ± 0,17●○	1,39 ± 0,15●○
BMP2	1,0 ± 0,17	0,96 ± 0,26	0,01 ± 0,0*	0,02 ± 0,00*	0,03 ± 0,01*	0,02 ± 0,00*
SPP1	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,15 ± 0,09	0,28 ± 0,16	0,88 ± 0,56	0,53 ± 0,21
SOX9	1,06 ± 0,12	1,2 ± 0,16	3,51 ± 0,57*	3,03 ± 0,38*	0,53 ± 0,11*●○	0,54 ± 0,14*●○
PPARG	1,36 ± 0,19	1,37 ± 0,12	3,48 ± 0,9*	3,84 ± 1,07*	2,86 ± 0,95	1,46 ± 0,19
ICAM1	1,06 ± 0,14	1,11 ± 0,17	0,86 ± 0,21	0,43 ± 0,12*	0,29 ± 0,07 ○	0,33 ± 0,06 ○
MCAM	5,96 ± 0,82	5,91 ± 1,05	2,25 ± 0,44*	0,89 ± 0,11	2,76 ± 0,56*●	2,2 ± 0,45*●
MMP2	3,66 ± 0,21	3,56 ± 0,29	4,01 ± 0,47	4,93 ± 0,57	2,2 ± 0,15*●○	1,94 ± 0,2*●○
NES	0,86 ± 0,09	0,99 ± 0,11	1,8 ± 0,51	1,38 ± 0,28	0,44 ± 0,07*●○	0,34 ± 0,04*●○
IGF1	0,69 ± 0,11	0,8 ± 0,14	2,94 ± 0,85*	1,59 ± 0,41*	0,77 ± 0,25 ○	0,85 ± 0,24 ○
JAG1	2,56 ± 0,23	2,64 ± 0,3	5,1 ± 0,55*	3,77 ± 1,22	3,43 ± 0,4 ○	3,54 ± 0,45 ○
SDF1	1,07 ± 0,20	1,06 ± 0,2	2,8 ± 0,55	1,7 ± 0,3	1,8 ± 0,15 ○	1,02 ± 0,09 ●○

Примечание. * — обозначает $p < 0,05$ при сравнении с соответствующей группой доноров при помощи *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок, ● — обозначает $p < 0,05$ при сравнении с 1 годом терапии ИТК при помощи *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок, ○ — обозначает $p < 0,05$ при сравнении с дебютом заболевания при помощи *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок.

Note. * — denotes $p < 0.05$ when compared with the corresponding donor group using the Student's *t*-test for independent samples, ● — denotes $p < 0.05$ when 1 year TKIs therapy compared long-term treatment with group using the Student's *t*-test for independent samples, ○ — denotes $p < 0.05$ when onset of the disease compared with long-term treatment using the Student's *t*-test for independent samples.

Обсуждение

Известно, что не только строма костного мозга определяет кроветворение, но и качество кроветворения влияет на стромальные клетки [23, 24]. Как опухолевые клетки, так и ИТК могут оказывать влияние на строма больных ХМЛ. Было показано [25], что ММСК больных ХМЛ в дебюте заболевания и в течение года лечения ИТК лучше поддерживают кроветворные клетки-предшественники, чем ММСК доноров и больных острыми лейкозами.

Целью настоящей работы было изучение стромальных клеток-предшественниц у больных ХМЛ в дебюте заболевания и по мере лечения ИТК. Известно, что стромальные и мезенхимальные клетки у этих больных не затронуты опухолевым клоном [26]. Исследование

концентрации КОЕф, основных характеристик ММСК, паттерна экспрессии некоторых генов, участвующих в дифференцировке стромальных клеток и поддержании кроветворения, определяют изменения в стромальных предшественниках. В работе показано, что концентрация КОЕф и суммарная клеточная продукция ММСК не отличаются от таковых у доноров в дебюте заболевания. Через год после начала лечения концентрация КОЕф в костном мозге больных уменьшалась в 4 раза, а суммарная клеточная продукция ММСК уменьшалась в 2 раза, что указывает на повреждающее влияние ИТК на стромальные предшественники. Далее, по мере длительного лечения, концентрация КОЕф и пролиферативный потенциал

Таблица 5. Характеристики ММСК у больных в зависимости от достижения ими ГМО
Table 5. Characteristics of MMSCs in patients at the onset of the disease depending on the DMR achievement

Достижение ГМО DMR		
	+	-
Количество больных Number of patients	5	8
Длительность терапии ИТК в момент анализа Time of TKI treatment at the moment of analysis	17,3 ± 3,2	50,2 ± 1,6
Концентрация КОЕф в костном мозге на 10 ⁶ клеток CFU-F concentration per 10 ⁶ bone marrow cell	29,5 ± 5,0	10,6 ± 3,6
Суммарная продукция ММСК, ×10 ⁶ Cumulative MMSCs production for 4 passages, ×10 ⁶	14,5 ± 2,0	5,3 ± 1,7
Время до РО, дней Time to PO, days	15,6 ± 0,2	18,9 ± 1,4
Достоверные отличия в REL генов в ММСК* Significant differences in REL in MMSCs	<i>Jag1</i>	3,6 ± 0,1*
	<i>TGFb1</i>	0,6 ± 0,3*
	<i>LIF</i>	4,6 ± 1,9*

Примечание. * — обозначает $p < 0,05$ при сравнении групп больных достигших ГМО и не достигших при помощи *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок.

Note. * — indicates $p < 0.05$ when compared MMSCs from patients with DMR with the patients without DMR using the Student's *t*-test for independent samples.

ММСК восстанавливались. Вероятно, стромальные клетки постепенно адаптируются к ингибированию тирозиновых киназ. Анализ *REL* генов, участвующих в мезенхимальной дифференцировке КОЕф, выявил достоверное увеличение экспрессии генов-маркеров костной (*BGLAP* и *SPPI*), хрящевой (*SOX9*) и жировой (*PPARG*) дифференцировок. КОЕф больных в дебюте заболевания оказались более дифференцированными, чем у доноров. При этом в дебюте заболевания уменьшалась концентрация ММСК, что совпадает с данными других авторов [27, 28]. Опухолевые клетки адаптируют ниши костного мозга и, вероятно, индуцируют образование новых кроветворных территорий для опухолевых стволовых клеток. После длительного лечения у больных восстанавливаются количественные показатели стромальных клеток-предшественниц. В ММСК больных изменен профиль экспрессии некоторых генов. В дебюте заболевания в ММСК больных достоверно повышена экспрессия генов, участвующих в регуляции кроветворения, — *IL6*, *LIF*, *CSF1*, *IGF1*, *JAG1* и *SDF1*; ростовых факторов для ММСК — *FGF2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *PDGFRA*, *BMP4* генов, участвующих в дифференцировке ММСК — *SOX9*, *PPARG*. Повышение экспрессии *SDF1* — гена цитокина, отвечающего за попадание кроветворных клеток в строму костного мозга, *JAG1* — гена белка, регулирующего пролиферацию и дифференцировку стволовых кроветворных клеток, указывает на повышенную способность ММСК поддерживать кроветворение, что подтверждается данными об улучшении способности ММСК больных поддерживать кроветворные клетки предшественницы доноров [25]. При этом экспрессия генов молекул адгезии также связанных с хомингом СКК (*ICAM1* и *ICAM1*) снижена в ММСК больных

и не восстанавливается до уровня ММСК доноров по мере лечения. В работе D. Aggoune и соавт. [9] была показана повышенная экспрессия других генов, относящихся к статусу «стволовости» ММСК — *NANOG*, *FOXO3* по сравнению с ММСК доноров. К этим генам в нашей работе можно добавить *LIF* и *IGF1*. По мере лечения, в зависимости от его длительности, экспрессия всех этих генов уменьшалась и в некоторых случаях достигала таковой в ММСК доноров. Восстановление ростовых характеристик ММСК после длительного лечения можно объяснить частичной нормализацией экспрессии *FGF2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *PDGFRA*, *BMP4* и генов, относящихся к дифференцировке, — *SOX9*, *PPARG*. Очевидно, что изменения в экспрессии генов не однозначны и затрагивают различные свойства ММСК. Суммарно можно заключить, что концентрация КОЕф и основные характеристики ММСК восстанавливаются после многих лет терапии ИТК. Вероятно, ИТК не оказывают фатального влияния на ростовые характеристики клеток-предшественниц стромального микроокружения.

Было показано, что ЛСК и СКК по-разному регулируются стромальным микроокружением костного мозга [29], однако по большинству характеристик эти клетки совпадают [30]. Анализ ММСК в 2-х группах больных в дебюте заболевания, достигших ГМО менее чем за 1,5 года и не достигших ГМО более чем за 4 года, выявил существенные изменения в экспрессии генов, участвующих в регуляции СКК. В ММСК группы больных, достигших ГМО, *REL LIF* был в 2 раза ниже, чем в общей группе, и в 3 раза ниже, чем в группе больных, не достигших ГМО, а *REL JAG1* и *TGFb1* был в 2 раза ниже. Очевидно, что ЛСК лучше поддерживаются ММСК с более высоким уровнем экс-

прессии этих регуляторных генов. Такие ЛСК более успешно выживают под действием ИТК, что не дает возможности получить ГМО у этих больных.

У больных увеличение количества ЛСК связано с изменением регуляции в сигнальном пути BMP (костного морфогенетического белка), которое сохраняется у больных, резистентных к терапии ИТК [31, 32]. Сигналы BMP контролируют стволовые клетки в нишах. Белки семейства BMP (BMP2 и BMP4) важны как для нормального кроветворения, так и при опухолевой трансформации. Факторы семейства BMP, первоначально описанные при формировании кости, оказались связанными с биологией большого числа органов и систем, от эмбриональных до взрослых тканей, и участвуют в пролиферации, дифференцировке и апоптозе стволовых клеток. Клетки опухолевого микроокружения —

основные источники растворимых BMP. И наоборот, ЛСК отображают измененные рецепторы и сигнальные элементы BMP [33, 34]. Показано, что BMP 4 вовлечен в развитие резистентности к ИТК [35]. Разницы в экспрессии *BMP2* и *BMP4* в этих двух группах больных обнаружено не было. Однако в ММСК больных в дебюте заболевания *BMP2* достоверно ниже, чем у доноров, а *BMP4* — выше и в ММСК, и в КОЕф. Через год после начала лечения экспрессия обоих генов либо еще больше снижается, либо увеличивается.

Таким образом, важность стромального микроокружения для функционирования и сохранения ЛСК у больных ХМЛ не вызывает сомнений. Исследование стромальных клеток-предшественниц у этих больных в дебюте заболевания может иметь прогностическое значение.

Литература

1. Taichman R.S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005; 105: 2631–9.
2. Kumar S., Geiger H. HSC Niche Biology and HSC Expansion ex vivo. *Trends Mol. Med.* 2017; 23: 799–819.
3. Morrison S.J., Scadden D.T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014; 505: 327–34.
4. Chen Q., Yuan Y., Chen T. Morphology, differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cells from acute myeloid leukemia patients. *Mol. Med. Rep.* 2014; 9: 293–8.
5. Shipounova I.N., Petrova T.V., Svinareva D.A. et al. Alterations in hematopoietic microenvironment in patients with aplastic anemia. *Clin. Transl. Sci.* 2009; 2: 67–74.
6. Shipounova I.N., Petinati N.A., Bigildeev A.E. et al. Alterations of the bone marrow stromal microenvironment in adult patients with acute myeloid and lymphoblastic leukemias before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk. Lymphoma*. 2017; 58: 408–17.
7. Zhao Z.-G., Liang Y., Li K. et al. Phenotypic and functional comparison of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of normal adults and patients with hematologic malignant diseases. *Stem. Cells Dev.* 2007; 16: 637–48.
8. Estrada-González P.K., Gómez-Ceja L., Montesinos J.J. et al. Decreased frequency, but normal functional integrity of mesenchymal stromal cells derived from untreated and Imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Leuk. Res.* 2014; 38: 594–600.
9. Aggoun D., Sorel N., Bonnet M.-L. et al. Bone marrow mesenchymal stromal cell (MSC) gene profiling in chronic myeloid leukemia (CML) patients at diagnosis and in deep molecular response induced by tyrosine kinase inhibitors (TKIs). *Leuk. Res.* 2017; 60: 94–102.
10. Arrigoni E., Del Re M., Galimberti S. et al. Concise Review: Chronic Myeloid Leukemia: Stem Cell Niche and Response to Pharmacologic Treatment. *Stem. Cells Transl. Med.* 2018; 7: 305–14.
11. Guzman M.L., Swiderski C.F., Howard D.S., et al. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2002; 99 (25): 16220–5.
12. Horne G., Jackson L., Helgason V., Holyoake T. Stem Cell Guardians — Old and New Perspectives in LSC Biology. *Curr. Drug Targets*. 2017; 18: 405–13.
13. Rea D., Mahon F.-X. How I manage relapse of chronic myeloid leukaemia after stopping tyrosine kinase inhibitor therapy. *Br. J. Haematol.* 2018; 180: 24–32.

References

1. Taichman R.S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005; 105: 2631–9.
2. Kumar S., Geiger H. HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo. *Trends Mol. Med.* 2017; 23: 799–819.
3. Morrison S.J., Scadden D.T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014; 505: 327–34.
4. Chen Q., Yuan Y., Chen T. Morphology, differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cells from acute myeloid leukemia patients. *Mol. Med. Rep.* 2014; 9: 293–8.
5. Shipounova I.N., Petrova T.V., Svinareva D.A. et al. Alterations in hematopoietic microenvironment in patients with aplastic anemia. *Clin. Transl. Sci.* 2009; 2: 67–74.
6. Shipounova I.N., Petinati N.A., Bigildeev A.E. et al. Alterations of the bone marrow stromal microenvironment in adult patients with acute myeloid and lymphoblastic leukemias before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk. Lymphoma*. 2017; 58: 408–17.
7. Zhao Z.-G., Liang Y., Li K. et al. Phenotypic and functional comparison of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of normal adults and patients with hematologic malignant diseases. *Stem. Cells Dev.* 2007; 16: 637–48.
8. Estrada-González P.K., Gómez-Ceja L., Montesinos J.J. et al. Decreased frequency, but normal functional integrity of mesenchymal stromal cells derived from untreated and Imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Leuk. Res.* 2014; 38: 594–600.
9. Aggoun D., Sorel N., Bonnet M.-L. et al. Bone marrow mesenchymal stromal cell (MSC) gene profiling in chronic myeloid leukemia (CML) patients at diagnosis and in deep molecular response induced by tyrosine kinase inhibitors (TKIs). *Leuk. Res.* 2017; 60: 94–102.
10. Arrigoni E., Del Re M., Galimberti S. et al. Concise Review: Chronic Myeloid Leukemia: Stem Cell Niche and Response to Pharmacologic Treatment. *Stem. Cells Transl. Med.* 2018; 7: 305–14.
11. Guzman M.L., Swiderski C.F., Howard D.S., et al. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2002; 99 (25): 16220–5.
12. Horne G., Jackson L., Helgason V., Holyoake T. Stem Cell Guardians — Old and New Perspectives in LSC Biology. *Curr. Drug Targets*. 2017; 18: 405–13.
13. Rea D., Mahon F.-X. How I manage relapse of chronic myeloid leukaemia after stopping tyrosine kinase inhibitor therapy. *Br. J. Haematol.* 2018; 180: 24–32.

14. Bhatia R. Novel approaches to therapy in CML. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2017; 2017: 115–20.
15. Bhatia R., McClave P.B., Dewald G.W. et al. Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. *Blood.* 1995; 85: 3636–45.
16. Camacho V., McClearn V., Patel S., Welner R.S. Regulation of normal and leukemic stem cells through cytokine signaling and the microenvironment. *Int. J. Hematol.* 2017; 105: 566–77.
17. Sands W.A., Copland M., Wheadon H. Targeting self-renewal pathways in myeloid malignancies. *Cell Commun. Signal.* 2013; 11: 33.
18. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8: 315–7.
19. Fong T.A., Mosmann T.R. Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J. Immunol.* 1990; 144: 1744–52.
20. Сви́нарева Д.А., Шипунова И.Н., Ольшанская И.В. и др. Основные свойства мезенхимальных стромальных клеток донорского костного мозга: поверхностные маркеры. *Терапевтический архив.* 2010; 82: 52–6.
21. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 2006; 1 (2): 581–5. DOI: 10.1038/nprot.2006.83
22. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 2008; 3: 1101–8.
23. Frisch B.J., Ashton J.M., Xing L. et al. Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia. *Blood.* 2012; 119: 540–50.
24. Lane S.W. Bad to the bone. *Blood.* 2012; 119: 323–5.
25. Sorokina T., Shipounova I., Bigildeev A. et al. The ability of multipotent mesenchymal stromal cells from the bone marrow of patients with leukemia to maintain normal hematopoietic progenitor cells. *Eur. J. Haematol.* 2016; 97: 245–52.
26. Maniatis A.K., Amsel S., Mitus W.J., Coleman N. Chromosome pattern of bone marrow fibroblasts in patients with chronic granulocytic leukaemia. *Nature.* 1969; 222: 1278–9.
27. Dilanni M., Moretti L., Del Papa B. et al. Chronic myeloproliferative disorders: the bone marrow stromal component is not involved in the malignant clone. *Leukemia.* 2007; 21: 377–8.
28. Estrada-González P.K., Gómez-Ceja L. et al. Decreased frequency, but normal functional integrity of mesenchymal stromal cells derived from untreated and Imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Leuk. Res.* 2014; 38: 594–600.
29. Zhang B., Ho Y.W., Huang Q. et al. Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell.* 2012; 21: 577–92.
30. Dick J.E. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood.* 2008; 112: 4793–807.
31. Toofan P., Irvine D., Hopcroft L. et al. The role of the bone morphogenetic proteins in leukaemic stem cell persistence. *Biochem. Soc. Trans.* 2014; 42: 809–15.
32. Gerber J.M., Gucwa J.L., Esopi D. et al. Genome-wide comparison of the transcriptomes of highly enriched normal and chronic myeloid leukemia stem and progenitor cell populations. *Oncotarget.* 2013; 4(5): 715–28.
33. Laperrousaz B., Jeanpierre S., Sagorny K. et al. Primitive CML cell expansion relies on abnormal levels of BMPs provided by the niche and on BMPRIb overexpression. *Blood.* 2013; 122: 3767–77.
34. Zylbersztein F., Flores-Violante M., Voeltzel T. et al. The BMP pathway: A unique tool to decode the origin and progression of leukemia. *Exp. Hematol.* 2018; 61: 36–44.
35. Grockowiak E., Laperrousaz B., Jeanpierre S., et al. Immature CML cells implement a BMP autocrine loop to escape TKI treatment. *Blood.* 130: 2860–71.
14. Bhatia R. Novel approaches to therapy in CML. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2017; 2017: 115–20.
15. Bhatia R., McClave P.B., Dewald G.W. et al. Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. *Blood.* 1995; 85: 3636–45.
16. Camacho V., McClearn V., Patel S., Welner R.S. Regulation of normal and leukemic stem cells through cytokine signaling and the microenvironment. *Int. J. Hematol.* 2017; 105: 566–77.
17. Sands W.A., Copland M., Wheadon H. Targeting self-renewal pathways in myeloid malignancies. *Cell Commun. Signal.* 2013; 11: 33.
18. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8: 315–7.
19. Fong T.A., Mosmann T.R. Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J. Immunol.* 1990; 144: 1744–52.
20. Сви́нарева Д.А., Шипунова И.Н., Ольшанская И.В. et al. The basic properties of mesenchymal stromal cells from the donor bone marrow: superficial markers. *Terapevticheskiy arkhiv.* 2010; 82: 52–6 (In Russian).
21. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 2006; 1 (2): 581–5. DOI: 10.1038/nprot.2006.83
22. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 2008; 3: 1101–8.
23. Frisch B.J., Ashton J.M., Xing L. et al. Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia. *Blood.* 2012; 119: 540–50.
24. Lane S.W. Bad to the bone. *Blood.* 2012; 119: 323–5.
25. Sorokina T., Shipounova I., Bigildeev A. et al. The ability of multipotent mesenchymal stromal cells from the bone marrow of patients with leukemia to maintain normal hematopoietic progenitor cells. *Eur. J. Haematol.* 2016; 97: 245–52.
26. Maniatis A.K., Amsel S., Mitus W.J., Coleman N. Chromosome pattern of bone marrow fibroblasts in patients with chronic granulocytic leukaemia. *Nature.* 1969; 222: 1278–9.
27. Dilanni M., Moretti L., Del Papa B. et al. Chronic myeloproliferative disorders: the bone marrow stromal component is not involved in the malignant clone. *Leukemia.* 2007; 21: 377–8.
28. Estrada-González P.K., Gómez-Ceja L. et al. Decreased frequency, but normal functional integrity of mesenchymal stromal cells derived from untreated and Imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Leuk. Res.* 2014; 38: 594–600.
29. Zhang B., Ho Y.W., Huang Q. et al. Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell.* 2012; 21: 577–92.
30. Dick J.E. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood.* 2008; 112: 4793–807.
31. Toofan P., Irvine D., Hopcroft L. et al. The role of the bone morphogenetic proteins in leukaemic stem cell persistence. *Biochem. Soc. Trans.* 2014; 42: 809–15.
32. Gerber J.M., Gucwa J.L., Esopi D. et al. Genome-wide comparison of the transcriptomes of highly enriched normal and chronic myeloid leukemia stem and progenitor cell populations. *Oncotarget.* 2013; 4(5): 715–28.
33. Laperrousaz B., Jeanpierre S., Sagorny K. et al. Primitive CML cell expansion relies on abnormal levels of BMPs provided by the niche and on BMPRIb overexpression. *Blood.* 2013; 122: 3767–77.
34. Zylbersztein F., Flores-Violante M., Voeltzel T. et al. The BMP pathway: A unique tool to decode the origin and progression of leukemia. *Exp. Hematol.* 2018; 61: 36–44.
35. Grockowiak E., Laperrousaz B., Jeanpierre S., et al. Immature CML cells implement a BMP autocrine loop to escape TKI treatment. *Blood.* 130: 2860–71.

Информация об авторах

Петинати Наталия Арнольдовна*, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: loel@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6591-3183>

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

Бигильдеев Алексей Евгеньевич, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: bigildeev_ae@gmail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0215-9085>

Сац Наталья Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: nsats@yandex.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1559-9381>

Челышева Екатерина Юрьевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник научно-консультативного отделения химиотерапии миелопролиферативных заболеваний ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: denve@bk.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6423-1789>

Шухов Олег Александрович, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отделения, врач-гематолог,
e-mail: shuhov@list.ru, тел.: +7(495)612-16-36
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5393-0816>

Петрова Анна Николаевна, аспирант научно-консультативного отделения химиотерапии миелопролиферативных заболеваний, врач-гематолог ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: ap996@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5730-2593>

Туркина Анна Григорьевна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель научно-консультативного отделения химиотерапии миелопролиферативных заболеваний ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: turkianna@yandex.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9947-2371>

Information about the authors

Natalya A. Petinati*, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory for Physiology of Hematopoiesis, National Research Center for Hematology,
e-mail: loel@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6591-3183>

Irina N. Shipunova, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory for Physiology of Hematopoiesis, National Research Center for Hematology,
e-mail: iranfontova@yandex.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1189-0283>

Alexey E. Bigildeev, Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory for Physiology of Hematopoiesis, National Research Center for Hematology,
e-mail: bigildeev_ae@gmail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0215-9085>

Natalya V. Sats, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory for Physiology of Hematopoiesis, National Research Center for Hematology,
e-mail: nsats@yandex.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1559-9381>

Ekaterina Yu. Chelysheva, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Research and Advisory Department of Chemotherapy of Myeloproliferative Diseases, National Research Center for Hematology,
e-mail: denve@bk.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6423-1789>

Oleg A. Shukhov, Cand. Sci. (Med.), Researcher, Hematologist,
e-mail: shuhov@list.ru, tel.: +7(495)612-16-36
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5393-0816>

Anna N. Petrova, Postgraduate Researcher, Scientific Advisory Department for Chemotherapy of Myeloproliferative Disorders, Hematologist, National Research Center for Hematology,
e-mail: ap996@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5730-2593>

Anna G. Turkina, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Research and Advisory Department of Chemotherapy of Myeloproliferative Diseases, National Research Center for Hematology
e-mail: turkianna@yandex.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9947-2371>

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

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

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 18.06.2019

Принята к печати: 12.09.2019

*** Corresponding author**

Received 18 Jun 2019

Accepted 12 Sep 2019