

6. Vasiliev S.A., Vinogradov V.L., Gemdzhyan E.G., Orel E.B., Shevelev A.A., Margolin O.V. The experience of the outpatient treatment of patients with thrombosis and thrombophilia. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2013; 12: 47–50. (in Russian)
7. Vasiliev S.A., Vinogradov V.L. The role of heredity in the development of thrombosis. *Thrombosis, hemostasis and rheology. Russian journal. (Tromboz, gemostaz i reologiya)*. 2007; 3: 3–14. (in Russian)
8. Buller H.R., Sohne M., Middeldorp S. Treatment of venous thromboembolism. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3(8): 1554–60.
9. Wells P.S. Integrated strategies for the diagnosis of venous thromboembolism. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5(Suppl. 1): 41–50.
10. Bernakevich A.I., Vasiliev S.A., Eskin N.A. Hemostatic system in patients undergoing hip replacement. *Bulletin of traumatology and orthopedics. Russian Journal. (Vestnik travmatologii i ortopedii)*. 2009; 1: 37–9. (in Russian)
11. Vasiliev S.A., Gorodetskiy V.M., Kalinin N.N. Plasmapheresis in the treatment of hypercoagulable syndrome in hematogenous thrombophilia. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2002; 7: 61–4. (in Russian)
12. Vorobiev A.I., Gorodetskiy V.M., Vasiliev S.A. Acute massive blood loss, and disseminated intravascular coagulation. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 1999; 7: 5–12. (in Russian)
13. Schellong S.M. Distal DVT: worth diagnosing? Yes. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2007; 5(Suppl. 1): 51–4.
14. Ilyushenko S.V., Tregubov A.A., Orel E.B., Rudakova V.E., Berkovskiy A.L., Sergeeva E.V., et al. Recurrent venous thrombosis in primary hyperparathyroidism – thrombophilia option? (description of a clinical case). *Thrombosis, hemostasis and rheology. Russian journal. (Tromboz, gemostaz i reologiya)*. 2004; 4: 78. (in Russian)
15. Zykov V.P., Komarova I.B., Vasiliev S.A., Ushakova L.V., Chuchin M.Yu., Netesova E.V. Prothrombotic disorders in children with ischemic stroke. *Journal of neurology and psychiatry. S. S. Korsakov. Issue "Stroke". Russian Journal (Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova, vypusk Insult)*. 2009; 109(12): 18–24. (in Russian)
16. Vinogradov V.L., Orel E.B., Vasiliev S.A. Hyperhomocysteinemia as a factor of thrombotic risk (discussion). *Thrombosis, hemostasis and rheology. Russian journal. (Tromboz, gemostaz i reologiya)*. 2009; 3: 13–20. (in Russian)
17. Tabeeva G.R., Vasiliev S.A., Azimova Yu.E. Migraine associated with polymorphism of the genes of blood coagulation system. *Neurological journal. Russian journal (Nevrologicheskii zhurnal)*. 2007; 6: 25–9. (in Russian)
18. Colman R.W., Marder V.J., Clowes A.W., George J.N., Goldhaber S.Z., eds. Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. Philadelphia; 2006.
19. Khan S., Dickerman J.D. Hereditary thrombophilia. *Thromb. J.* 2006; 12(4): 15–38.
20. Lee R.I., White P.D. A clinical study of the coagulation time of blood. *Am. J. Med. Sci.* 1913; 145(4): 494–503.
21. Vasiliev S.A., Vorobiev A.I., Gorodetskiy V.M. Protocol of the diagnosis and treatment of acute DIC. *Problems of Hematology. Russian Journal (Problemy gematologii)*. 1999; 3: 40–3. (in Russian)
22. Krechetova A.V., Galstyan G.M., Vasiliev S.A., Orel E.B., Saridi E.Yu., Gemdzhyan E.G., et al. Assessment of severity of sepsis patients in the dynamics of the ratio of fibrinolytic and anticoagulant activity of blood plasma. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2009; 6: 23–8. (in Russian)
23. Vasiliev S.A., Vorobiev A.I., Gorodetskiy V.M. Therapy of acute disseminated intravascular coagulation. *Materia Medica. Russian Journal.* 1997; 1: 29–38. (in Russian)
24. Mazurov A.V., Pevzner D.V., Vlasik T.N., Ruda M.Ya. Antiplatelet effects of glycoprotein IIb–IIIa antagonist Monafam. *Russian physiological journal (Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal)*. 2004; 90(5): 586–99. (in Russian)
25. Mazurov A.V., Pevzner D.V., Staroverov I.I., Samko A.N., Antonova O.A., Ivanov V.A., et al. Results of clinical trials of the new antagonist of glycoprotein IIb–IIIa, Monafam at high risk coronary angioplasty. *Cardiology. Russian Journal.* 2005; 45(5): 4–12. (in Russian)
26. Vasiliev S.A., Vinogradov V.L., Gemdzhyan E.G. The problem of hemorrhagic syndrome in the treatment of vitamin K antagonists. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2012; 7: 89–94. (in Russian)
27. Kalinina I.I., Stakhina O.V., Ryzhko V.V., Tsvetaeva N.V., Vasiliev S.A., Petrova V.I. Moshkovits's disease, a chronic relapsing course. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2008; 7: 65–7. (in Russian)
28. Vasiliev S.A., Tsvetaeva N.V. Thrombotic thrombocytopenic purpura. In: Vorobiev A.I., ed. Rational pharmacotherapy of diseases of the blood system. Manual for practitioners. Moscow: Litterra; 2009: 485–90. (in Russian)
29. Voronkova E.V., Lukina E.A., Tsvetaeva N.V., Levina A.A., Sakhibov Ya.D., Vasiliev S.A. Antiphospholipid syndrome in a patient with refractory thrombocytopenic purpura and chronic viral hepatitis (review of the literature and description of clinical observations). *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2008; 53(4): 49–54. (in Russian)
30. Denorme F., Langhauser F., Desender L., Vandembulcke A., Rottensteiner H., Plaimauer B., et al. ADAMTS13-mediated thrombolysis of t-PA-resistant occlusions in ischemic stroke in mice. *Blood.* 2016; 127(19): 2337–45. doi: 10.1182/blood-2015-08-662650.

Поступила 30.01.16

Принята к печати 17.07.16

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.392-036.11-085-076.5

Савченко В.Г., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Дризе Н.И., Туркина А.Г., Кузьмина Л.А.,  
Сорокина Т.В., Паровичникова Е.Н.

### МОДИФИКАЦИЯ СТРОМАЛЬНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ЛЕЙКОЗАМИ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия

Цель исследования – охарактеризовать культуральные свойства мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) и колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕФ), полученных из костного мозга (КМ) больных острыми лейкозами и хроническим миелолейкозом в дебюте заболевания и после терапевтического воздействия.

**Материал и методы.** ММСК были получены из КМ 74 больных гемобластомами. Оценивали показатели времени до нулевого пассажа, кумулятивной клеточной продукции ММСК, а также концентрации КОЕФ, полученных из КМ больных гемобластомами.

**Результаты.** У больных острыми лейкозами показатель времени до нулевого пассажа статистически значимо повышен в дебюте заболевания, тогда как у больных ХМЛ он сохраняется повышенным и после 3 мес терапии. Показатель суммарной клеточной продукции статистически значимо снижен в группе больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) в дебюте заболевания. Концентрация КОЕФ была статистически значимо снижена в обследованных группах больных в момент диагностики заболевания.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; острый миелоидный лейкоз; острый лимфобластный лейкоз; хронический миелолейкоз; колониеобразующие единицы фибробластов.

**Для цитирования:** Савченко В.Г., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Дризе Н.И., Туркина А.Г., Кузьмина Л.А., Сорокина Т.В., Паровичникова Е.Н. Модификация стромального микроокружения у больных лейкозами до и после терапии. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(3): 122–126. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-122-126

Savchenko V.G., Shipunova I.N., Bigildeev A.E., Drize N.I., Turkina A.G., Kuzmina L.A., Sorokina T.V., Parovichnikova E.N.

## ALTERATIONS OF THE BONE MARROW STROMAL MICROENVIRONMENT IN ADULT PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA BEFORE AND AFTER TREATMENT

National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation

**Aim of the study.** To investigate two types of the bone marrow (BM) stromal precursor cells, mesenchymal stromal cells (MMSCs) and fibroblast colony-forming units (CFU-Fs), in patients with acute myeloid leukemia (AML), acute lymphoblastic leukemia (ALL) and chronic myeloid leukemia (CML) before and after chemotherapy.

**Material and methods.** BM derived MMSCs and CFU-Fs withdrawn from 74 AML, ALL and CML patients before and after chemotherapy were studied.

**Results.** Concentration and culture characteristics of both types of precursors were shown to be altered in patients with acute leukemia and CML.

**Key words:** multipotent mesenchymal stromal cells; acute myeloid leukemia; acute lymphoblastic leukemia; chronic myeloid leukemia; fibroblast colony-forming units.

**For citation:** Savchenko V.G., Shipunova I.N., Bigildeev A.E., Drize N.I., Turkina A.G., Kuzmina L.A., Sorokina T.V., Parovichnikova E.N. Alterations of the bone marrow stromal microenvironment in adult patients with acute leukemia before and after treatment. *Hematology and Transfusiology, Russian Journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2016; 61(3): 122-126. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-122-126

**Funding.** Present study was supported by the Grant of the Russian Foundation of Basic Research No 12-04-00457: "The effect of leukemia cells in the human hematopoietic stromal microenvironment", supervisor: Irina Nikolaevna Shipunova.

**Conflict of interest.** The authors declare no hidden conflicts of interest.

Received 08 May 2016

Accepted 17 July 2016

Для осуществления нормального процесса кроветворения клетки крови погружены в микроокружение, обеспечивающее их всеми факторами, необходимыми для пролиферации, созревания и дифференцировки [1]. Гемопоз является достаточно разграниченным в пространстве процессом, при котором созревание разных типов клеток происходит в специализированных нишах. Выделяют остеобластную (эндостальную) [2] нишу, которая содержит остеобласты и стромальные клетки в непосредственном взаимодействии с костью, и сосудистую (периваскулярную) нишу, состоящую из эндотелиальных клеток в тесном взаимодействии с сосудами [3, 4].

Важнейшим элементом ниши являются мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК). ММСК – стромальные предшественники с мультилинейным потенциалом дифференцировки [5, 6], способные под действием соответствующих индукторов дифференцироваться в костную, хрящевую, жировую и другие ткани [7] и обладающие широкими иммуномодулирующими свойствами [8, 9]. Другим классом стромальных предшественников являются колониобразующие единицы фибробластов (КОЕФ) [10], имеющие мезенхимную природу [11] и традиционно считающиеся более зрелым классом клеток, чем ММСК.

Костно-мозговая строма регулирует кроветворение (и локально в кроветворных нишах, и дистантно, продуцируя цитокины и ростовые факторы) как в норме, так и при различных заболеваниях кроветворной системы [4, 12]. Изменение микроокружения способствует селекции и экспансии лейкозных клеток [13–15]. Показано, что бластные клетки от больных лейкозами имели преимущество в выживаемости при их совместном культивировании со стромой по сравнению с выращиванием в одной среде [16]. Также показано, что при хроническом миелолейкозе (ХМЛ) лейкозные клетки стимулировали пролиферацию остеобластов, которые существенно хуже поддерживали здоровые гемопоэтические стволовые клетки, не теряя при этом способности поддерживать лейкозные клетки.

Данные о наличии морфологических изменений в клетках в разных исследованиях расходятся. В некоторых работах по изучению особенностей стромального микроокружения при развитии гемобластозов не было выявлено различий в морфологических и культуральных характеристиках ММСК у больных лейкозами [17]. Однако

в некоторых из них было показано блокирование пролиферации стромальных предшественников по сравнению с клетками здоровых доноров при совместном культивировании их со здоровыми ММСК, наличие морфологических и функциональных различий (более низкая суммарная клеточная продукция, длительное время до достижения конfluenceности, меньшее возможное число пассажей, а также сниженная способность поддержания кроветворения) [18]. Данные по наличию изменений в способности клеток к дифференцировке также различались.

Существует небольшое количество исследований, посвященных изучению воздействия химиопрепаратов на ММСК [19, 20]. Воздействие цитостатических препаратов приводило к изменению морфологии ММСК и снижению их пролиферативной активности. Для ряда заболеваний показано, что лейкозные клетки изменяли окружающие их стромальные клетки так, что последние повышали их устойчивость к воздействию цитостатическим препаратам [21].

Существует небольшое количество исследований о состоянии КОЕФ при гемобластозах. Некоторые авторы, анализируя образцы костного мозга (КМ) до начала химиотерапии, не находили различий между КОЕФ здоровых доноров и больных [11], тогда как другие показывали снижение, вплоть до полного исчезновения, концентрации КОЕФ в КМ больных острыми лейкозами [22].

Таким образом, предыдущие исследования демонстрировали противоречивые результаты из-за небольшого числа образцов, а зачастую отсутствия образцов либо до лечения, либо в процессе терапии. В этой связи выполнение этого исследования представляется особенно актуальным.

Целью настоящего исследования явилось изучение культуральных характеристик ММСК и КОЕФ, полученных из КМ больных острыми лейкозами и ХМЛ в дебюте заболевания и после терапевтического воздействия.

### Материал и методы

Работа носила проспективный клинико-лабораторный характер и выполнена в научно-клиническом отделе высокодозной химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга и научно-консультативном отделении химиотерапии миелопродиферативных заболеваний ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России. Лабораторная часть работы осуществлялась на базе лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России. Исследование проб КМ проводили на момент диагностики заболевания и на +30-й день для больных острыми лейкозами и на +3-й месяц для больных ХМЛ. Из проб КМ выделяли ядродержащие клетки, которые культивировали в питательной среде с последующей оценкой культуральных характеристик ММСК. Одновременно клетки КМ культивировали для определения концентрации КОЕФ.

В исследование были включены 74 больных (33 мужчины и 41 женщина) в возрасте от 17 до 75 лет (медиана возраста 35 лет) с впервые выявленными гемобластозами, из них 33 больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), 21 – острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), 20 – хроническим миелолейкозом (ХМЛ). При распределении пациентов по классификации ВОЗ [23] у 19 из 33 больных ОМЛ выявлен нормальный кариотип, у 2 – транслокация t(8;21), у 1 – t(15;17), у 1 – inv(16)(p13q22), у 9 – иные мутации (трисомия 8, делеция 9, 7, t(3;5) и др.), 1 больному цитогенетическое исследование не проводили. Из 21 больного ОЛЛ у 10

### Для корреспонденции

Сорокина Тамара Викторовна, врач отделения высокодозной химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России», 125167, г. Москва, Россия. E-mail: tamarasorokina0@yandex.ru.

### For correspondence

Sorokina Tamara V., MD, Doctor of the Department of High-Dose Chemotherapy, Depressions of Hemopoiesis, and Bone Marrow Transplantation of the National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: tamarasorokina0@yandex.ru.

### Information about authors

Savchenko V.G., <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>; Shipunova I.N., <http://orcid.org/0000-0003-1189-0283>; Bigildeev A.E., <http://orcid.org/0000-0003-0215-9085>; Drize N.I., <http://orcid.org/0000-0002-7150-0403>; Turkina A.G., <http://orcid.org/0000-0001-9947-2371>; Kuzmina L.A., <http://orcid.org/0000-0001-6201-6276>; Sorokina T.V., <http://orcid.org/0000-0002-5665-7074>; Parovichnikova E.N., <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>.

Таблица 1

## Клинические характеристики больных

Диагноз	Число больных	Медиана возраста, годы	Бластные клетки в КМ в дебюте заболевания, %	Статус больных к моменту исследования
ОМЛ	33	39,2	67,65 ± 3,9	26 живы 7 умерли
ОЛЛ	21	29,4	86,13 ± 1,19	19 живы 2 умерли
ХМЛ	20	44,6		20 живы

зафиксирован В-клеточный вариант заболевания, у 11 – Т-клеточный вариант ОЛЛ. Основные характеристики больных представлены в табл. 1.

Лечение больных проводили в условиях ФГБУ ГНЦ Минздрава России в соответствии с нозологической формой заболевания. Больным острым лейкозом была начата терапия в соответствии с вариантом заболевания: больным ОМЛ была начата терапия по протоколу ОМЛ 01.10 – больному с t (15; 17) по протоколу AIDA, больным ОЛЛ – по протоколу ОЛЛ-2009 [8]. Больным ХМЛ проводили терапию иматинибом, тем, кто не достиг ответа, производили смену на препараты других поколений ингибиторов тирозинкиназы (ИТК). Забор образцов осуществляли в контрольные точки путем аспирации 6 мл КМ при пункции КМ. Образцы КМ помещали в пенициллиновые флаконы с гепарином и доставляли в лабораторию.

В качестве группы контроля в работе использовали образцы КМ 83 здоровых доноров (40 мужчин и 43 женщины) в возрасте от 18 до 56 лет (медиана возраста 30,5 года). Все образцы КМ были получены во время эксфузии донорского КМ для выполнения трансплантации аллогенного костного мозга в отделении высокодозной химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга ФГБУ ГНЦ Минздрава России после подписания донорами информированного согласия.

Для выделения ядросодержащих клеток к 6 мл КМ добавляли равный объем среды αMEM с 0,2% раствором метилцеллюлозы ("Sigma") и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. В течение инкубации большая часть эритроцитов и гранулоцитов преципитировала, а мононуклеарные клетки оставались в жидкой фазе. Затем верхнюю жидкую фазу отбирали и центрифугировали в течение 10 мин при скорости 1200 об/мин и 24 000 g (Beckman GPR) при температуре 4 °C. Клетки осадка ресуспендировали в среде αMEM. Клетки подсчитывали в камере Горяева при окраске генциановым фиолетовым и помещали в концентрации  $3 \times 10^6$  клеток в среду для культивирования, состоящую из среды αMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 1% раствора L-глутамин (ICN), 0,5% раствора пенициллина (Ферейн) на флакон для культивирования с площадью поверхности дна 25 см<sup>2</sup> (Costar), и инкубировали в условиях гипоксии с 5% CO<sub>2</sub> и 5% O<sub>2</sub> при температуре 37 °C в трехгазовом инкубаторе (Sanyo). После формирования монослоя клетки промывали версеном, 0,02% раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты в физиологическом растворе ("Sigma"), а затем обрабатывали 0,25% раствором трипсина и помещали в концентрации  $4 \times 10^3$  клеток на 1 см<sup>2</sup> поверхности дна флакона (нулевой пассаж P0) с последующей их инкубацией; остаток клеток замораживали в среде с добавлением равного объема ЭТС + ДМСО (диметилсульфоксид).

Количество снятых со дна флакона клеток определяли в камере Горяева, жизнеспособность клеток определяли по отсутствию окраски трипановым синим. На 2-м пассаже (P1) после высаживания клеток из оставшихся выделяли РНК. На 3-м пассаже (P2) после снятия и подсчета отделяли 100 000 клеток для последующей оценки их способности к поддержанию кроветворения, остаток клеток замораживали.

Для культивирования КОЕф мононуклеарные клетки выделяли и подсчитывали по методу, описанному выше для ММСК. После подсчета ядерные клетки помещали в количестве от 0,5 до  $1 \times 10^6$  клеток на флакон T25 в среде αMEM с 20% ЭТС, культивировали в течение 2 нед в условиях гипоксии с 5% CO<sub>2</sub> и 5% O<sub>2</sub> при температуре 37 °C в трехгазовом инкубаторе (Sanyo), а затем окрашивали 0,1% раствором кристаллического фиолетового на 20% метаноле. Окрашенные колонии подсчитывали под инвертированным микроскопом.

Все значения предоставлены как средняя величина ± ошибка среднего. Статистическую значимость различий определяли по t-критерию Стьюдента в программе Microsoft Excel.

## Результаты

Первое исследование у всех больных проводили на момент диагностики, т.е. образцы КМ были получены в развернутой стадии заболевания. Доля бластных клеток в КМ у больных ОМЛ в момент диагностики заболевания составляла 22–86,6% (медиана 64%). После 1-го курса индукции исследование проведено у 26 больных. У больных, у которых не была достигнута ремиссия, проводили смену химиотерапии на альтернативные курсы (НАМ, малые дозы цитарабина – МДЦ, МДЦ + этопозид).

Доля бластных клеток в КМ у больных ОЛЛ в момент диагностики заболевания составляла от 68–97% (медиана 88%). После 1-го курса индукции (на +30-й день от начала терапии) исследование выполнено у 19 больных. Продолжили участие в исследовании 19 из 20 больных ХМЛ после 3 мес терапии иматинибом. Больным, у которых не был достигнут большой молекулярный ответ на терапию иматинибом, впоследствии производили смену на препараты других поколений ИТК.

Все ММСК, полученные из образцов КМ больных гемобластомами, морфологически не различались от таковых, полученных от здоровых доноров. При анализе с помощью фазового контраста все они имели типичную веретеновидную фибробластоподобную форму и демонстрировали способность к формированию колоний на пластике. Скорость и темпы роста ММСК различались в отдельных образцах, однако в подавляющем большинстве случаев удавалось добиться конfluenceности на нулевом пассаже (P0). В ряде случаев, если клетки формировали плотные многослойные колонии, их пассировали, не дожидаясь конfluenceности. Все культуры формировали конfluenceнтный монослой на последующих пассажах.

Культуральные характеристики ММСК изучали в течение 3 пассажей и сравнивали с таковыми у ММСК здоровых доноров. Оценивали время, необходимое для достижения конfluenceнтного монослоя (время до P0), и суммарное количество клеток (кумулятивная клеточная продукция) за 3 пассажа.

Время до нулевого пассажа (P0) соответствовало временному промежутку от первичной посадки клеток до момента формирования ими конfluenceнтного монослоя и последующего их пассажа. Время достижения конfluenceнтности у здоровых доноров составило  $13,7 \pm 0,3$  дня. У больных ОМЛ в момент диагностики заболевания время до P0 варьировало от 12 до 24 дней (в среднем  $17,6 \pm 0,6$  дня), что статистически значимо превышало таковое у доноров ( $p < 0,05$ ). Было показано, что доля бластных клеток в КМ не коррелировала с культуральными характеристиками ММСК (табл. 2).

У больных ОМЛ после 1-го курса индукции (на 30-й день от начала терапии) время до P0 составило от 9 до 25 дней, в среднем  $15,5 \pm 0,9$  дня, что статистически значимо не отличалось от группы контроля. На этом этапе 42% больных ОМЛ находились вне ремиссии заболевания, в связи с чем культуральные характеристики для больных, находящихся в ремиссии и вне ее, были изучены отдельно. Было показано, что у больных, у которых была и не была достигнута ремиссия заболевания, время до P0 после 1-го курса индукции составило от 11 до 25 ( $15,8 \pm 1,5$ ) дней и от 9 до 21 ( $15,3 \pm 1,5$ ) дня соответственно, что статистически значимо не отличалось от доноров.

У больных ОЛЛ в момент диагностики заболевания время до P0 варьировало от 13 до 34 дней (в среднем  $19,8 \pm 1,4$  дня), что на 40% превышало таковое в группе контроля ( $p < 0,05$ ). После 1-го курса индукции (на 30-й день от начала терапии) время до P0 составило от 10 до 25, в среднем  $14,1 \pm 0,9$  дня, что статистически значимо не различалось с группой здоровых доноров.

У больных ХМЛ в момент диагностики заболевания время до P0 у больных ХМЛ варьировало от 14 до 28 дней (в среднем  $17,7 \pm 0,8$  дней), что на 30% превышало таковое в группе контроля ( $p < 0,05$ ). После 3 мес от начала терапии ИТК значение этого показателя варьировало от 12 до 28 дней (в среднем  $16,7 \pm 0,8$  дня), что на 20% превышало таковое у доноров ( $p < 0,05$ ).

Показатель суммарной клеточной продукции отражает общее количество клеток, собранных за три пассажа. Только у больных ОМЛ показатель суммарной клеточной продукции был статистически

значимо ниже, чем в группе доноров, составляя  $4,8 \pm 0,7 \times 10^6$  клеток (от 0 до  $15 \times 10^6$  клеток). После 1-го курса индукции он варьировал от 0 до  $36 \times 10^6$  клеток (в среднем  $7,9 \pm 1,4 \times 10^6$  клеток), не отличаясь от группы доноров. При отдельной оценке групп больных, достигших и не достигших к моменту исследования (после 1-го курса индукции) ремиссии заболевания, не найдено статистически значимых различий: у больных в ремиссии показатель составил от 0 до  $10,6 \times 10^6$  клеток, в среднем  $5,7 \pm 1 \times 10^6$  клеток; у больных вне ремиссии – от 0,5 до  $36 \times 10^6$  клеток, в среднем  $10,5 \pm 3,4 \times 10^6$  клеток.

Значения времени до нулевого пассажа ММСК у больных острым лейкозом в зависимости от доли бластных клеток в КМ

Показатель времени до P0	Бластные клетки в КМ, %						
	20–40	41–60	61–75	76–100	76–85	86–95	96–100
У больных ОМЛ, дни	18,3 ± 1,4	20 ± 1,1	17,1 ± 1,1	16,1 ± 1,0			
У больных ОЛЛ, дни	–	–	–	20,3 ± 2,3	19,3 ± 2,8	20,3 ± 2,6	

Таблица 2

У больных ОЛЛ данный показатель статистически значимо не отличался от группы доноров (от 0 до  $17,3 \times 10^6$  клеток, в среднем  $5,2 \pm 1,4 \times 10^6$  клеток). После 1-го курса индукции у больных, достигших ремиссии заболевания, показатель суммарной клеточной продукции варьировался от 0 до  $23,17 \times 10^6$  клеток, в среднем  $8,5 \pm 2 \times 10^6$  клеток, статистически значимо не различаясь от такового в группе доноров. На этой точке ремиссия не достигнута только у 3 больных, но анализировать такую немногочисленную группу с использованием *t*-критерия Стьюдента не представляется возможным. Поэтому для анализа различий в этих группах применяли 95% доверительный интервал (ДИ), построенный для значений в группе больных в ремиссии.

Значения суммарной клеточной продукции у 2 из 3 больных, находившихся на этом этапе вне ремиссии, выходили за пределы 95% ДИ ( $0,5$  и  $0,9 \times 10^6$  клеток при границах ДИ от  $7,4$  до  $9,6 \times 10^6$  клеток). Значительно хуже росли ММСК больных, страдающих пре-В-вариантом ОЛЛ (суммарная клеточная продукция в дебюте заболевания у данной группы больных составила  $3,4 \pm 2,3 \times 10^6$  клеток, после 1-го курса индукции –  $4,8 \pm 2,8 \times 10^6$  клеток, однако эти различия не были статистически значимыми). У больных ХМЛ показатели суммарной клеточной продукции также статистически значимо не различались от таковых в группе доноров, варьируя в дебюте заболевания от 0 до 30 (в среднем  $7,5 \pm 1,6 \times 10^6$  клеток, после 3 мес терапии ИТК – от  $0,7$  до  $16,9 \times 10^6$  клеток (в среднем  $7,1 \pm 1,1 \times 10^6$  клеток). Концентрация КОЕф отражается в количестве колоний клеток КОЕф, выросших за 2 недели. Было показано, что они также повреждаются у больных гематологическими заболеваниями. Концентрация их в КМ больных гемобластомами статистически значимо снижена по сравнению с таковой у доноров. Концентрация КОЕф в КМ больных ОМЛ в дебюте заболевания составила от 0 до 133 (в среднем  $11,5 \pm 4,6 \times 10^6$  клеток КМ, что оказалось на 50% ниже таковой у доноров ( $p = 0,02$ ). Показатели после 1-го курса индукции от 0 до  $75 \times 10^6$  клеток КМ (в среднем  $27,7 \pm 4,4 \times 10^6$  клеток КМ) статистически значимо не различались от группы здоровых доноров. У больных ОЛЛ показатель концентрации КОЕф статистически значимо различался от показателя группы здоровых доноров также только в дебюте заболевания, будучи ниже его и составляя от 0 до 60 (в среднем  $8,3 \pm 3,6 \times 10^6$  клеток КМ ( $p = 0,001$ ). Показатели после 1-го курса индукции (от 0 до 140, в среднем  $30,3 \pm 8,2 \times 10^6$  клеток КМ) статистически значимо не отличались от группы здоровых доноров. У больных ХМЛ на момент диагностики заболевания концентрация КОЕф составляла от 0 до 65 (в среднем  $15,8 \pm 4,2 \times 10^6$  клеток КМ что оказалось на 40% ниже таковой у доноров ( $p = 0,07$ ). Значение этого показателя после 3 мес терапии ИТК статистически значимо не отличалось от группы доноров – от 0 до  $68 \times 10^6$  клеток КМ, в среднем  $21,2 \pm 4,4 \times 10^6$  клеток КМ.

### Обсуждение

В ходе исследования нами были получены культуры ММСК из образцов КМ, взятых до и после лечения у больных онкогематологическими заболеваниями. Морфологически они не отличались от таковых, полученных от здоровых доноров. При оценке культуральных характеристик были выявлены некоторые различия.

Так как показателем времени до нулевого пассажа косвенно свидетельствует о числе предшественников стромальных клеток в КМ, представляется вероятным, что на момент диагностики у больных острыми лейкозами статистически значимое его удлинение свидетельствует об уменьшении количества ММСК в связи с тотальной опухолевой пролиферацией и экспансией бластных клеток, подавляющих нормальное кроветворение. После проведенной терапии количество предшественников восстанавливается до нормальных значений, что связано с эффективностью химиотерапии и уменьшением числа бластных клеток в КМ. Статистически значимое удлинение времени до нулевого пассажа на контрольных точках в сроки после курса консолидации ремиссии и перед поддерживающей терапией, вероятно, обусловлено воздействием цитостатических препаратов. В группе больных ХМЛ статистически значимое удлинение этого показателя на всех точках отражает длительную персистенцию заболевания и опухолевого клона под постоянным терапевтическим воздействием. Показатель суммарной клеточной продукции отражает общее количество клеток, выросших за 3 пассажа. Он был статистически значимо снижен в дебюте заболевания в группе больных ОМЛ, отражая нарушение пролиферативных способностей ММСК у этих больных на момент диагностики заболевания. Концентрация КОЕф в группе больных острыми лейкозами статистически значимо отличалась от таковой у здоровых доноров только в момент диагностики заболевания. Тогда как при ХМЛ концентрация предшественников фибробластов уменьшалась в ходе лечения, отражая прогрессирующее поражение стромы на фоне замедленной по сравнению с острыми лейкозами элиминацией опухолевого клона.

Таким образом, наше исследование демонстрирует, что ММСК больных ОМЛ, ОЛЛ и ХМЛ морфологически не отличаются от таковых, полученных от здоровых доноров. Однако выявленные функциональные различия являются весьма значимыми. У больных острыми лейкозами показатель времени до нулевого пассажа статистически значимо выше по сравнению с группой здоровых доноров в дебюте заболевания ( $17,6 \pm 0,6$  дня для больных ОМЛ,  $19,8 \pm 1,4$  дней для больных ОЛЛ;  $p < 0,05$ ). В группе больных ХМЛ значение этого показателя достоверно удлинено по сравнению с группой здоровых доноров как в дебюте заболевания ( $17,7 \pm 0,8$  дней;  $p < 0,05$ ), так и после 3 мес терапии ( $16,7 \pm 0,8$  дней;  $p < 0,05$ ). Показатель суммарной клеточной продукции в группе больных острым миелобластным лейкозом в дебюте заболевания статистически значимо снижен по сравнению с группой здоровых доноров ( $4,8 \pm 0,7 \times 10^6$  клеток;  $p < 0,05$ ). Концентрация КОЕф в группах больных острыми лейкозами и ХМЛ статистически значимо снижена по сравнению с группой здоровых доноров в момент диагностики заболевания:  $11,5 \pm 4,6 \times 10^6$  клеток КМ для больных ОМЛ,  $8,3 \pm 3,6 \times 10^6$  клеток КМ для больных ОЛЛ,  $15,8 \pm 4,2 \times 10^6$  клеток КМ для больных ХМЛ;  $p < 0,05$ .

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 12-04-00457 «Влияние лейкозных клеток на кроветворное стромальное микроокружение человека», руководитель Шипунова Ирина Николаевна.  
**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W., Weber J.M., Olson D.P., Knight M.C., et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003; 425(6960): 841–6.
- Nilsson S.K., Johnston H.M., Coverdale J.A. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*. 2001; 97(8): 2293–9.
- Morrison S.J., Spradling A.C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008; 132(4): 598–611.
- Lane S.W., Scadden D.T., Gilliland D.G. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*. 2009; 114(6): 1150–7.
- Sacchetti B., Funari A., Michienzi S., Di Cesare S., Piersanti S., Saggio I., et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007; 131(2): 324–36.
- Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970; 3(4): 393–403.
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284(5411): 143–7.
- Frenette P.S., Pinho S., Lucas D., Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu. Rev. Immunol*. 2013; 31: 285–316. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095919.
- Méndez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F., Mazloom A.R., MacArthur B.D., Lira S.A., et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010; 466(7308): 829–34.
- Friedenstein A.J. Precursor cells of mechanocytes. *Int. Rev. Cytol*. 1976; 47: 327–59.
- Castro-Malaspina H., Gay R.E., Resnick G., Kapoor N., Meyers P., Chiarieri D., et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980; 56(2): 289–301.
- Konopleva M.Y., Jordan C.T. Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. *J. Clin. Oncol*. 2011; 29(5): 591–9.
- Boyerinas B., Zafrir M., Yesilkalan A.E., Price T.T., Hyjek E.M., Sipkins D.A. Adhesion to osteopontin in the bone marrow niche regulates lymphoblastic leukemia cell dormancy. *Blood*. 2013; 121(24): 4821–31.
- Ben-Batalla I., Schulte A., Wroblewski M., Erdmann R., Heuser M., Waizenegger J.S., et al. Axl, a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia mediates paracrine crosstalk of leukemia cells with bone marrow stroma. *Blood*. 2013; 122(14): 2443–52.
- Batula V.L., Chen Y., Cabreira Mda G., Ruvolo V., Wang Z., Ma W., et al. Connective tissue growth factor regulates adipocyte differentiation of mesenchymal stromal cells and facilitates leukemia bone marrow engraftment. *Blood*. 2013; 122(3): 357–66. doi: 10.1182/blood-2012-06-437988.
- Ito S., Barrett A.J., Dutra A., Pak E., Miner S., Keyvanfar K., et al. Long term maintenance of myeloid leukemia stem cells cultured with unrelated human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res*. 2015; 14(1): 95–104. doi: 10.1016/j.scr.2014.11.007.
- Chandran P., Le Y., Li Y., Sabloff M., Mehic J., Rosu-Myles M., Allan D.S. Mesenchymal stromal cells from patients with acute myeloid leukemia have altered capacity to expand differentiated hematopoietic progenitors. *Leuk. Res*. 2015; 39(4): 486–93. doi: 10.1016/j.leukres.2015.01.013.
- Geyh S., Rodriguez-Paredes M., Jager P., Khandanpour C., Cadeddu R.P., Gutekunst J., et al. Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016; 30(3): 683–91. doi: 10.1038/leu.2015.325.

19. Prata Kde L., Orellana M.D., De Santis G.C., Kashima S., Fontes A.M., Carrara Rde C., et al. Effects of high-dose chemotherapy on bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells isolated from lymphoma patients. *Exp. Hematol.* 2010; 38(4): 292–300.e4. doi: 10.1016/j.exphem.2010.01.006.
20. Nifontova I., Svinareva D., Petrova T., Drize N. Sensitivity of mesenchymal stem cells and their progeny to medicines used for the treatment of hematoproliferative diseases. *Acta Haematol.* 2008; 119(2): 98–103.
21. Kurtova A.V., Balakrishnan K., Chen R., Ding W., Schnabl S., Quiroga M.P., et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood.* 2009; 114(20): 4441–50.
22. Nagao T., Hugo C.M. Characteristics and functions of fibroblast colony forming cells in human bone marrow. *Rinsho Ketsueki. Japanese J. Clin. Hematol.* 1983; 24(11): 1455–63.
23. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M.J., Le Beau M.M., et al. The 2016 revision to the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016; 127(20): 2391–405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.

Поступила 08.05.16  
Принята к печати 17.07.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.392-036.11-085-018.46:575.08

Сорокина Т.В., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Дризе Н.И., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.

## ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ В ПРОЦЕССЕ ТЕРАПИИ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия

Цель исследования – охарактеризовать уровень экспрессии генов в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках (ММСК), полученных из костного мозга больных острым лейкозом в дебюте заболевания и на фоне проводимого цитостатического воздействия.

**Материал и методы.** ММСК были получены из КМ 54 больных ОЛ. Из клеток была выделена РНК и построена кДНК. Уровень экспрессии генов оценивали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

**Результаты.** Продемонстрировано повышение в дебюте заболевания уровней экспрессии генов, продукты которых способствуют пролиферации и миграции лейкозных клеток (*IL-6, IL-8, IL-1b, CSF, JAG1, ICAM, VCAM*). В ходе терапии они снижались, но повышалась экспрессия генов, продукты которых отвечают за пролиферацию и дифференцировку ММСК (*IL-1R1, PDGERa, IGF, FGFR1, FGFR2, BGLAP*). У больных вне ремиссии заболевания ингибирование стромы глубже.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; острый миелоидный лейкоз; острый лимфобластный лейкоз.

**Для цитирования:** Сорокина Т.В., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Дризе Н.И., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. Изменение уровней экспрессии генов в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках, полученных из костного мозга больных острыми лейкозами в процессе терапии. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(3): 126-133. DOI: 10.18821/0234-5730/2016-61-3-126-133

*Sorokina T.V., Shipunova I.N., Bigildeev A.E., Drize N.I., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.*

## MODIFICATION OF GENE EXPRESSION IN MESENCHYMAL STROMAL CELLS OF THE ACUTE MYELOID LEUKEMIA PATIENTS DURING CHEMOTHERAPY

National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

Aim of the study. To investigate the relevant expression level in multipotent mesenchymal stromal cells (MMCs) derived from the bone marrow (BM) of acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients before and over the course of chemotherapy.

**Material and Methods.** BM derived MMSCs from 33 AML patients and 21 ALL patients were studied before and during chemotherapy. Total RNA was extracted from the MMSCs and the cDNA was synthesized. Gene expression levels were quantified by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) with the use of gene-specific primers.

**Results.** Before chemotherapy, the analysis of the gene expression of MMSCs from acute leukemia patients revealed a significant increase in the relative expression level (REL) of genes (*IL-6, IL-8, IL-1b, CSF, JAG1, ICAM, VCAM*) which regulate leukemic cell proliferation and migration. The REL of genes regulating MMSC proliferation and differentiation (*IL-1R1, PDGERa, IGF, FGFR1, FGFR2, BGLAP*) increased during chemotherapy. The alterations of bone marrow stroma were more pronounced in patients who didn't achieve remission.

**Key words:** multipotent mesenchymal stromal cells; acute myeloid leukemia; acute lymphoblastic leukemia.

**For citation:** Sorokina T.V., Shipunova I.N., Bigildeev A.E., Drize N.I., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. Modification of gene expression in mesenchymal stromal cells of the acute myeloid leukemia patients during chemotherapy. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya).* 2016; 61(3): 126-133. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730/2016-61-3-126-133

**Funding.** Present study was supported by the Grant of the Russian Foundation of Basic Research No 12-04-00457: "The effect of leukemia cells in the human hematopoietic stromal microenvironment", supervisor: Irina Nikolaevna Shipunova.

**Conflict of interest.** The authors declare no hidden conflicts of interest.

Received 08 May 2016

Accepted 17 July 2016

### Для корреспонденции:

Сорокина Тамара Викторовна, врач отделения высокодозной химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России. 125167, г. Москва, Россия. E-mail: tamarasorokina0@yandex.ru.

### For correspondence:

Sorokina Tamara V., MD, Doctor of the Department of High-Dose Chemotherapy, Depressions of Hemopoiesis, and Bone Marrow Transplantation of the National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: tamarasorokina0@yandex.ru.

### Information about authors:

Sorokina T.V., <http://orcid.org/0000-0002-5665-7074>; Shipunova I.N., <http://orcid.org/0000-0003-1189-0283>; Bigildeev A.E., <http://orcid.org/0000-0003-0215-9085>; Drize N.I., <http://orcid.org/0000-0002-7150-0403>; Kuzmina L.A., <http://orcid.org/0000-0001-6201-6276>; Parovichnikova E.N., <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>; Savchenko V.G., <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>.