

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>.

Большинство клеток стромы костного мозга (КМ) происходят от мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК). Эти клетки являются важнейшим компонентом костно-мозговой ниши и обеспечивают жизнедеятельность гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) [1, 2]. Регуляторная активность ММСК направлена на большое количество эффекторных клеток, таких как клетки врожденного и приобретенного иммунитета, включая Т- и В-лимфоциты, NK-клетки, дендритные клетки и нейтрофилы [3]. Все исследования указывают на исключительную роль ММСК в процессах поддержания как нормального, так и патологического кроветворения. Показано наличие физических контактов между остеобластами и ГСК через молекулы адгезии, включая каттерины и интегрины [4, 5]. После их связывания происходит активация сигнальных путей, что приводит к запуску механизмов пролиферации, адгезии и миграции [6]. Однако не только прямые межклеточные взаимодействия с клетками стромы опосредует выживаемость лейкозных клеток, но и выделяемые ММСК факторы роста, цитокины и хемокины [6]. В ряде экспериментов предпринимались попытки выращивания линий человеческих бластных клеток от больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) с использованием линий стромальных клеток и ростовых факторов, и было выдвинуто предположение, что ММСК обеспечивают преимущество в выживании лейкозных стволовых клеток (ЛСК) и могут использоваться в культурах ЛСК даже без добавления ростовых факторов [7, 8].

Факторы роста могут также способствовать выживаемости бластных клеток в КМ. Концентрация фактора роста эндотелия сосудов VEGF [9] может играть прогностическую роль при развитии ОМЛ [10], а повышение концентрации ангиопоэтина-2 коррелирует с плохим ответом на терапию [11]. В ряде исследований показаны проонкогенные эффекты $TGF\beta 1$, стимулирующего пролиферацию клеток ОМЛ. У больных острыми лейкозами продемонстрировано повышение концентрации FGF [12], а также IGF1 и SDF1 [13] по сравнению с группой контроля, состоящей из здоровых доноров.

Лейкозные клетки могут использовать механизмы регуляции роста и развития ГСК. Эксперименты на мышах показали, что как нормальные, так и ЛСК предпочтительно локализируются в нишах, богатых SDF1. Однако, когда они трансплантировались одновременно, ЛСК «выигрывали» у ГСК в конкуренции за локализацию в нише [14], из-за чего последние были вынуждены размещаться в менее предпочтительных нишах КМ. Данные этого исследования показали, что наличие лейкозных клеток разрывает нормальные пути межклеточной передачи сигнала, приводя к необратимым изменениям здоровых гемопоэтических предшественников [14].

Предполагают, что отличия ММСК больных лейкозами от ММСК доноров можно объяснить как селекцией злокачественными клетками той субпопуляции ММСК *in vivo*, что будет способствовать росту лейкозных клеток, так и генетическими аномалиями, возникающими в самих ММСК [15]. Профиль экспрессии генов в ММСК больных МДС и ОМЛ отличается от аналогичных показателей у здоровых доноров [16]. В большинстве работ описано снижение уровня экспрессии стромального фактора *SDF1* в ММСК больных острыми лейкозами, повышение экспрессии *TGF\beta 1* и *HGF* в дебюте заболевания, а также уровня *BMP4* в ходе терапии. Данные многочисленных исследований [14, 17, 18] продемонстрировали, что снижение экспрессии гена остеокальцина (*BGLAP*), наблюдаемое в ММСК больных лейкозами, приводит к угнетению остеогенеза, уменьшению числа остеобластов и снижению объема костной ткани. В ММСК больных лейкозами было выявлено повышение уровня экспрессии гена *IL-6*, продукт которого способен подавлять цитотоксичность NK-клеток в отношении бластных клеток, а также повышение уровня экспрессии *JAG1* [19], *ANG1* и *SPP1* [20] в ММСК больных ОМЛ. Их увеличенная экспрессия может стимулировать переход лейкозных клеток в состояние покоя, обуславливая развитие резистентности к проводимой химиотерапии и возникновение последующих рецидивов [21].

Все различия в экспрессии генов в ММСК являются скорее следствием, нежели причиной заболевания, что подтверждается восстановлением их уровней в случае достижения полной ремиссии при проводимой химиотерапии [22]. Изучение эффектов цитостатических препаратов на состояние микроокружения осложняется тем, что в большинстве случаев используются их сочетания для усиления оказываемого эффекта. Многие химиопрепараты изменяют способность ГСК к «хоумингу» путем нарушения эндотелиального барьера и увеличения секреции цитокинов и хемокинов, влияющих на миграцию и репопуляцию ГСК. Стромальные клетки защищают лейкозные клетки от влияния цитостатических препаратов [23]. Показан защитный механизм ММСК от воздействия L-аспарагиназы: при совместном культивировании клеток острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) с клетками стромы последние защищали клетки ОЛЛ от аспарагиназы-

обусловленного апоптоза путем избыточной экспрессии аспарагин-синтетазы. Эти эксперименты указывают на важнейшую роль микроокружения в развитии гемобластозов, однако как именно ММСК регулируют процесс лейкогенеза, до сих пор остается неясным [24–27].

Цель исследования – характеристика уровней экспрессии генов в ММСК, полученных из костного мозга больных острыми лейкозами в дебюте заболевания и на фоне проводимого цитостатического воздействия.

Материал и методы

Работа носила проспективный клинико-лабораторный характер. В исследование были включены 54 больных (22 мужчины и 32 женщины) в возрасте от 17 до 75 лет (медиана возраста 35 лет) с впервые выявленными гемобластомами, из них 33 больных ОМЛ, 21 – ОЛЛ. Всех больных наблюдали в ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России с мая 2013 по февраль 2016 г. Исследование проб КМ проводили на момент диагностики заболевания, на +30-й день, +100-й день, +180-й день терапии. Из проб КМ выделяли ядросодержащие клетки, которые затем культивировали в питательной среде. Из клеток первого пассажа выделяли РНК и оценивали уровень экспрессии 22 генов (*IL-6*, *IL-8*, *IL-1b*, *IL-1\beta R1*, *JAG1*, *SPP1*, *BGLAP*, *FGF2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *TGF\beta 1*, *TGF\beta 2*, *SDF1*, *VEGF*, *IGF*, *CSF*, *ANG1*, *VCAM*, *ICAM*, *SOX9*, *LIF*, *PPARG*) методом полимеразной цепной реакции с предшествующей обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

В качестве контроля в работе были использованы образцы костного мозга 95 здоровых доноров, 46 мужчин и 49 женщин в возрасте от 13 лет до 61 года (медиана возраста 33 года). Все образцы получены во время асфузии КМ в отделении трансплантации костного мозга.

Для получения культуры ММСК сначала выделяли ядросодержащие клетки в градиенте плотности метилцеллюлозы. Клетки ресуспендировали в среде α MEM, подсчитывали в камере Горяева при окраске генциановым фиолетовым и помещали во флаконы для культивирования в концентрации 3×10^6 клеток в среду с содержанием 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). При пассажах клетки отделяли от пластика раствором трипсина, подсчитывали и рассаживали в концентрации 1×10^5 клеток с их инкубацией. На первом пассаже после высаживания клеток из оставшихся выделяли РНК.

Для выделения РНК из клеток их промывали ЭДТА, добавляли денатурирующий раствор и замораживали. В дальнейшем к пробам добавляли 2 М NaAc и перемешивали, затем в каждую пробирку добавляли последовательно кислый фенол, хлороформ и центрифугировали на скорости 10 000 об/мин при температуре 4 °C в течение 20 мин. Верхнюю фазу переносили в RNA-free пробирку, добавляли равный объем изопропанола и оставляли при температуре -20 °C.

Для построения комплементарной ДНК (кДНК) РНК осаждали, промывали этанолом и растворяли в 100 мкл воды. После этого к РНК добавляли смесь Т13-праймеров и инкубировали в амплификаторе. Затем проводили ревертазную реакцию, для чего добавляли буфер для ревертазы, дНТФ, Рназин, ревертазу и воду. После инкубации добавляли 75 мкл воды и использовали в качестве раствора к ДНК соответствующего образца.

В ММСК оценивали уровень экспрессии генов, отвечающих за:

• способность к самоподдержанию (*FGFR1*, *FGFR2*);

• пролиферацию (*FGF2*);

• морфогенез (*BMP4*, *SOX9*, *SPP1*, *BGLAP*, *PPARG*, *VEGF*);

• регуляцию кроветворения (*JAG1*, *TGF\beta 2*, *TGF\beta 1*, *CSF*, *ANG1*);

• иммунный ответ (*IL-1\beta*, *IL-1R*, *IL-6*, *IL-8*).

В качестве контроля во всех проводимых исследованиях использовали данные, полученные по группе здоровых доноров.

Наличие интересующего гена определяли с помощью специфических праймеров и зондов. В качестве красителя использовали карбокси-X-родамин (ROX) для генов «домашнего хозяйства» и карбоксифлюоресцеин (FAM) для исследуемых генов. В качестве газетель флюоресценции для флюорофора ROX использовали RTQ2, для флюорофора FAM – RTQ1. Все ПЦР проводили на приборе StepOnePlus (Life technologies). Для каждого образца выполняли по 3 пробы. После определения C_t вычисляли среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации.

Для статистического анализа сравниваемые группы больных и здоровых доноров были сбалансированы по основным демографическим показателям (полу и возрасту) и значимым клиническим признакам. Ввиду того, что распределение в исследуемых выборках не является нормальным, а в большей части случаев относится к лог-нормальному, при анализе мы использовали непараметрический критерий Вилкоксона. Результаты считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$ [28].

Результаты обработаны с помощью программ Statistical Analysis System (SAS 9.3). Графическое пояснение представлено в виде диаграмм разброса (бокс-плоты) данных логарифмов значений с минимумом и максимумом для каждого значения, 1–3-м квартилями (Q_{25} – Q_{75}), значениями среднего и медианы.

Таблица 1

Число больных, обследованных на разных этапах

Больные	0 точка	1-я точка	2-я точка	3-я точка
ОМЛ	33	26 (78,8%)	25 (76%)	24 (73%)
ОЛЛ	21	19 (90%)	19 (90%)	19 (90%)

Таблица 2

Относительный уровень экспрессии генов, изучавшихся в работе,
у больных гемобластозами на разных точках

Ген	Относительный уровень экспрессии генов							
	ОМЛ	ОЛЛ	ОМЛ	ОЛЛ	ОМЛ	ОЛЛ	ОМЛ	ОЛЛ
	дебют заболевания		+30 дней терапии		+100 дней терапии		+180 дней терапии	
<i>IL-6</i>	83,95	193,19	99,83**	101,09**	108,92**	92,91**	50,86**	80,50**
<i>IL-8</i>	8,01	6,25	6,55	3,40*	2,24**	1,67**	1,78**	4,69
<i>IL-1β</i>	27,09	3,98	8,66	3,88	6,55	4,42	2,97	17,70*
<i>IL-1R1</i>	3,10*	3,73	1,04*	1,37**	1,00*	1,66	0,58**	1,84
<i>CSF</i>	3,57**	2,56**	0,96	0,53	0,55	0,74	0,31	0,52
<i>FGF2</i>	3,86*	4,00	3,32**	2,00**	2,96**	2,71**	1,78**	6,18
<i>FGFR1</i>	0,96**	0,71	0,21**	0,23**	0,22**	0,28**	0,15**	0,33**
<i>FGFR2</i>	1,59	1,21	0,27**	0,32**	0,31**	0,48**	0,19**	0,39**
<i>VEGF</i>	1,49**	1,19**	0,31**	0,14**	0,13**	0,13**	0,07**	0,26**
<i>VCAM</i>	2,36	5,18	1,35	0,66**	0,74**	0,94**	0,56**	0,87**
<i>JAG1</i>	5,33**	3,69**	1,86	1,06**	0,95**	1,96	0,79**	1,06**
<i>Sdf1</i>	1,06	1,09	0,18**	0,08**	0,06**	0,09**	0,04**	0,06**
<i>BGLAP</i>	0,65**	2,98	1,55	1,92	1,52	2,99	1,48	1,87
<i>SPPI</i>	0,65	0,17*	0,11**	0,03**	0,05	0,08*	0,06*	0,09
<i>SOX9</i>	1,14**	0,98**	0,16**	0,22**	0,29**	0,24**	0,14**	0,15**
<i>PPARG</i>	1,45**	1,26	0,39	0,41	0,52	0,42	0,82	0,47
<i>TGFβ1</i>	1,10	0,80	0,23**	0,09**	0,12**	0,13**	0,07**	0,13**
<i>TGFβ2</i>	4,37	2,35**	1,41**	0,65**	1,38**	0,46**	0,99**	1,88**
<i>IGF1</i>	1,22*	1,20	1,54	0,58	0,33*	0,35	0,21**	0,47*
<i>ICAM1</i>	0,55	0,19**	0,08**	0,06**	0,05**	0,04**	0,03**	0,04**
<i>LIF</i>	9,06**	8,64**	2,68	3,59	2,62	5,07**	2,57	3,98

Примечание. Статистически значимые различия с донорами: * – 0,05 < p < 0,1; ** – p < 0,05.

Результаты

Нулевая точка исследования для всех пациентов приходится на момент диагностики, то есть образцы КМ были получены в развернутой стадии заболевания. После 1-го курса индукции в живых остались 26 (78,8%) из 33 больных (табл. 1). К моменту 2-й точки (+100 дней от начала терапии) в живых остались 25 (76%) больных, из них ремиссия была достигнута у 22 человек. У больных, не достигших ремиссии, проводили смену химиотерапии на альтернативные курсы (НАМ, малые дозы цитарабина – МДЦ). К моменту 3-й точки (+180 дней от начала терапии) в живых остались 24 (73%) больных, из них ремиссия была у 20 человек.

К 1-й точке (+30 дней от начала терапии) в живых остались 19 (90%) из 21 больных ОЛЛ, из них у 16 была достигнута ремиссия. К моменту 2-й точки (+100 дней от начала терапии) ремиссия была достигнута у 18 из 19 больных. К моменту 3-й точки

(+180 дней от начала терапии) все 19 больных находились в ремиссии.

Результаты анализа генов представлены в зависимости от функции продуктов их экспрессии (табл. 2).

Экспрессия генов, ответственных за поддержание иммунного ответа

В дебюте заболевания во всех группах отмечалось почти десятикратное повышение экспрессии гена *IL-6*, уровни которого оставались повышенными и далее в ходе терапии. Также в момент диагностики у больных острыми лейкозами было продемонстрировано повышение уровня экспрессии гена *IL-8*, который в дальнейшем снижался (рис. 1). У больных ОМЛ его уровень снижался с 8 ± 3 в дебюте заболевания до $1,8 \pm 0,9$ к моменту исследования перед поддерживающей терапией (p < 0,05). На нулевой точке отмечалось повышение экспрессии гена *IL-1β1*, а также гена его рецептора – *IL-1R1* (рис. 2).

Экспрессия генов, ответственных за регуляцию кроветворения

На нулевой точке также показана повышенная экспрессия гена колониестимулирующего фактора (КСФ), которая нормализовалась в ходе терапии (рис. 3). У больных ОМЛ уровень его экспрессии на момент диагностики снижался с $3,6 \pm 0,77$ заболевания до $0,3 \pm 0,03$ перед началом поддерживающей терапии (p < 0,05).

В дебюте заболевания была продемонстрирована повышенная экспрессия гена *JAG1* ($5,3 \pm 0,53$ у больных ОМЛ, $3,7 \pm 0,6$ у больных ОЛЛ; p < 0,05), уровень которой снижался в ходе терапии (до $0,8 \pm 0,1$ у больных ОМЛ, $1,06 \pm 0,12$ у больных ОЛЛ к моменту перед началом поддерживающей терапии; p < 0,05) (рис. 4). У больных ОМЛ уровень его экспрессии снижался с более чем 300% до 50% от нормы.

В процессе терапии показано снижение повышенной экспрессии гена *SPPI*, однако различия не были статистически значимыми.

В дебюте заболевания в группе больных острыми лейкозами наблюдался нормальный уровень экспрессии гена *SDF1*, который далее снижался. У больных ОМЛ перед началом поддерживающей терапии его экспрессия выявлена на уровне $0,04 \pm 0,004$, а у больных ОЛЛ – $0,06 \pm 0,01$ (p < 0,05), что составило 4 и 6% от группы здоровых доноров соответственно.

Показана повышенная экспрессия гена *LIF* ($9,1 \pm 1,2$ у больных ОМЛ и $8,6 \pm 1,6$ у больных ОЛЛ, p < 0,05), что превышало показатель у здоровых доноров более чем в 4 раза. Уровень его экспрессии снижался в ходе терапии (рис. 5).

На протяжении цитостатического воздействия отмечалось снижение уровней экспрессии генов семейства *TGFβ* (рис. 6). У больных ОМЛ уже к моменту исследования после 1-го курса индукции уровень экспрессии гена *TGFβ1* составлял $0,2 \pm 0,04$, что соответствовало 20% от уровня аналогичного показателя у здоровых доноров, хотя на момент диагностики заболевания уровень его экспрессии превышал таковой у доноров. На последующих точках уровень экспрессии продолжал снижаться до $0,1 \pm 0,01$ у больных ОМЛ и $0,13 \pm 0,02$ у больных ОЛЛ. Аналогичная ситуация наблюдалась и при изучении динамики изменения уровня экспрессии гена *TGFβ2*.

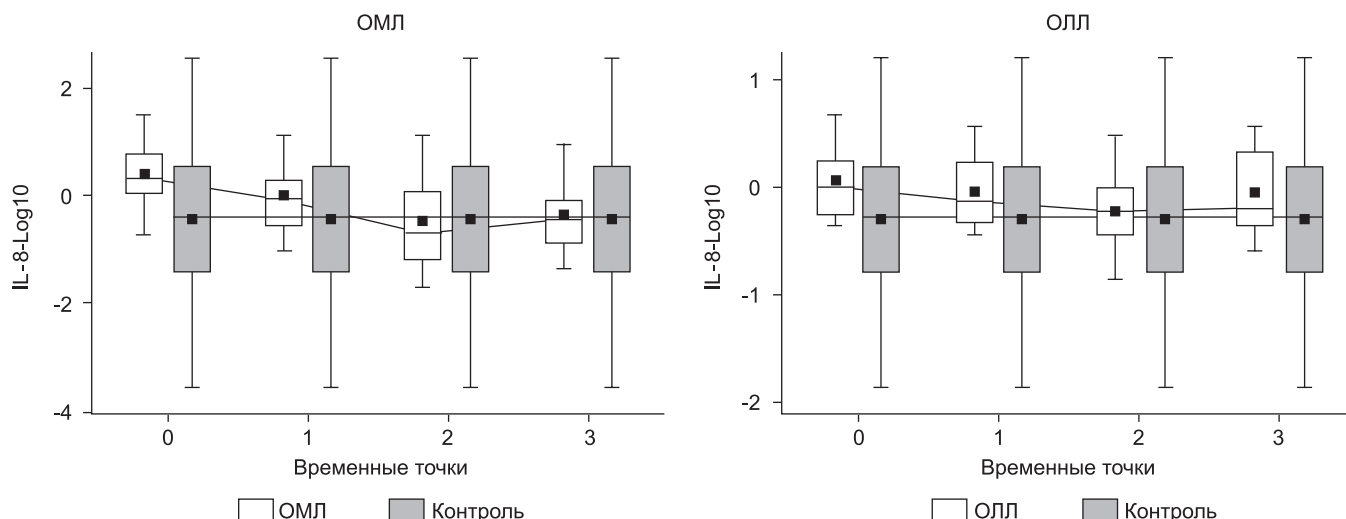


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии гена *IL-8* в ММФ у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

Экспрессия генов, ответственных за способность ММСК к самоподдержанию, миграции и дифференцировке

В дебюте заболевания отмечалось снижение уровня экспрессии гена фактора роста фибробластов *FGF2*, который нормализовался в дальнейшем, а также генов рецепторов к нему – *FGFR1* и *FGFR2* (рис. 7). У больных ОМЛ уровень экспрессии гена *FGFR1* на момент диагностики заболевания составил $1 \pm 0,08$, а на точке после консолидации – $0,2 \pm 0,03$, перед поддерживающей терапией – $0,1 \pm 0,01$, в группе больных ОЛЛ – $0,3 \pm 0,06$ ($p < 0,05$). При изучении ди-

намики изменения уровней *FGFR2* наблюдались те же закономерности.

В дебюте была продемонстрирована повышенная экспрессия гена *VCAM*, которая снижалась в ходе терапии. При исследовании на последней точке его уровень у больных ОМЛ составлял $0,6 \pm 0,1$, у больных ОЛЛ – $0,9 \pm 0,1$ ($p < 0,05$) – 10 и 50% от данного показателя у здоровых доноров соответственно.

В ходе работы продемонстрировано уменьшение уровня экспрессии гена *ICAM* до $0,03 \pm 0,004$ у больных ОМЛ и $0,04 \pm 0,01$

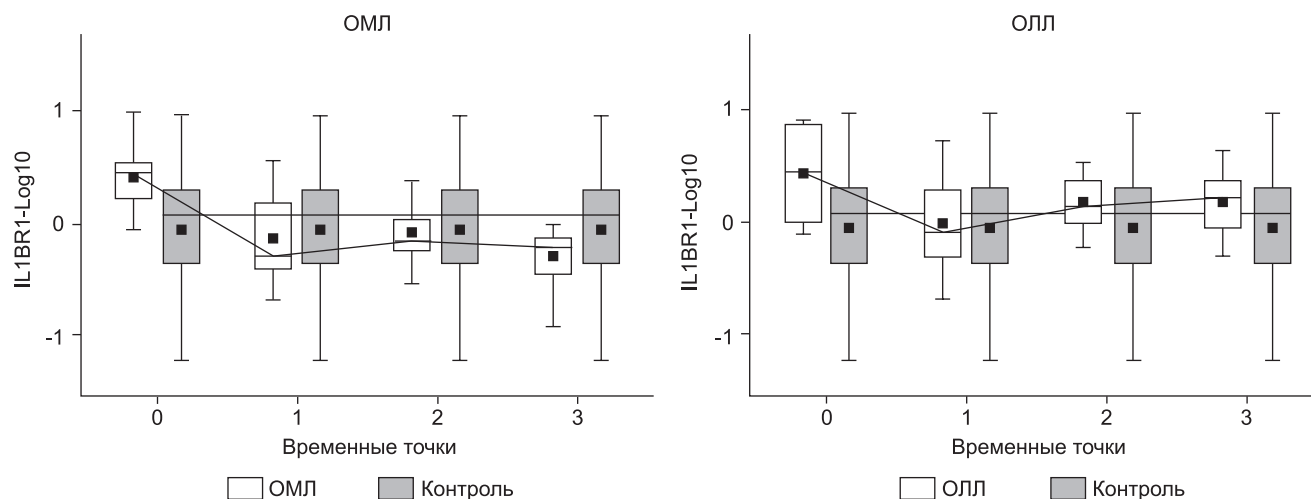


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии гена *IL-1BRI* в ММСК у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

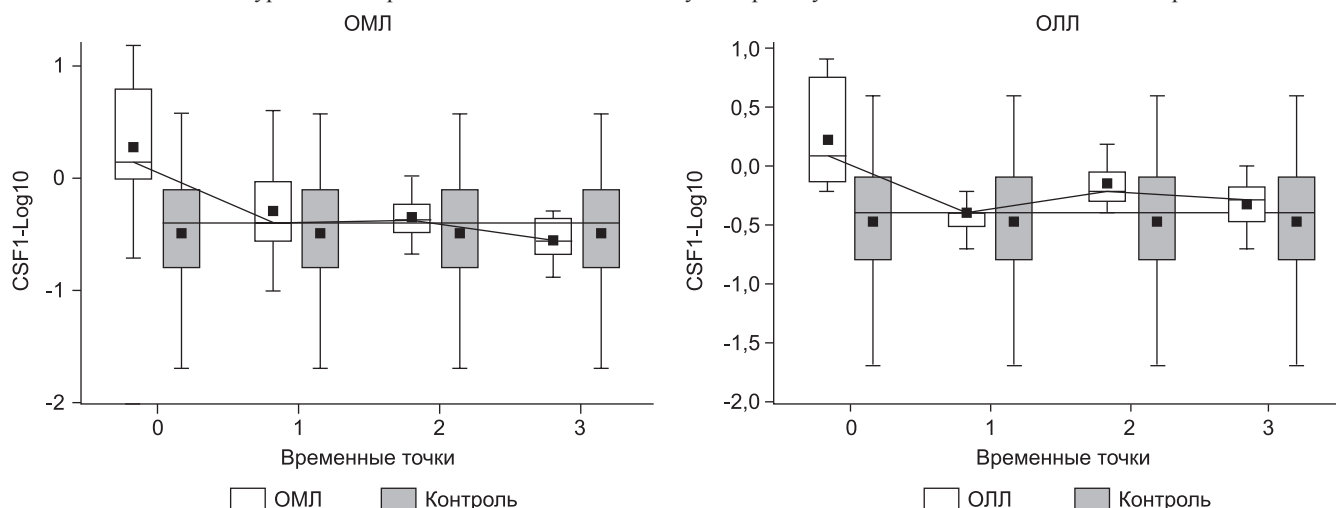


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии гена *CSF1* в ММСК у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

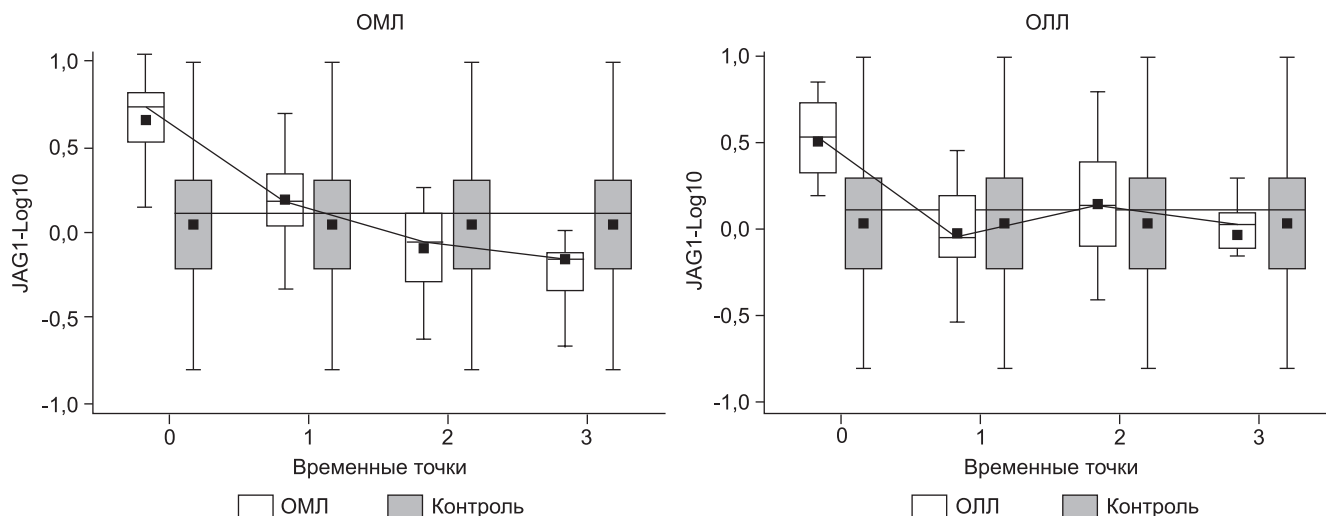


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии гена *JAG1* в ММСК у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

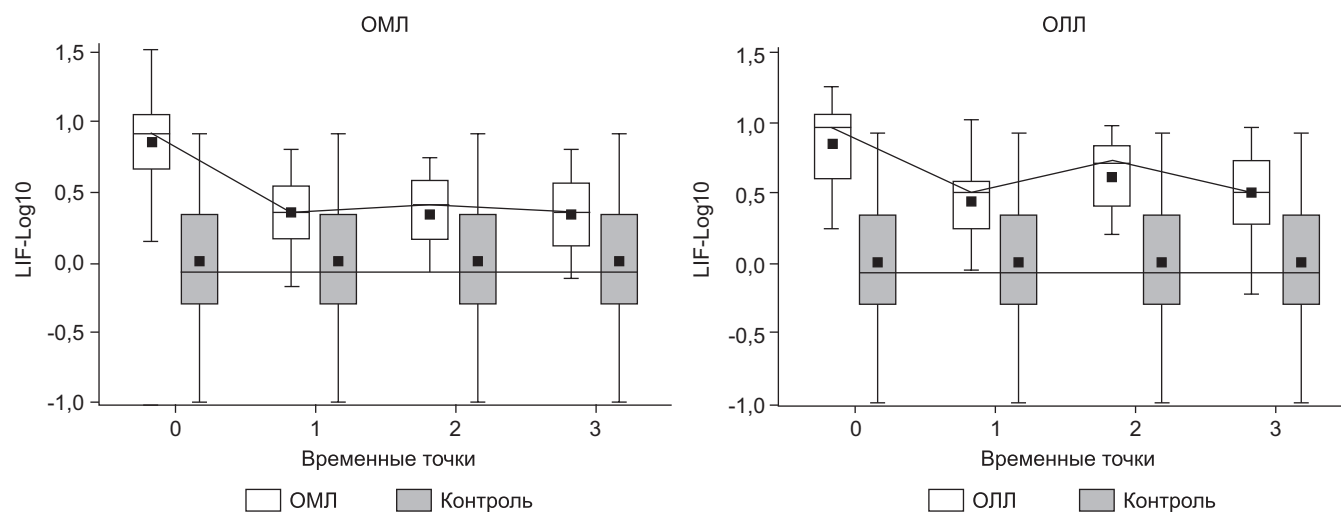


Рис. 5. Относительный уровень экспрессии гена *LIF* в ММСК у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

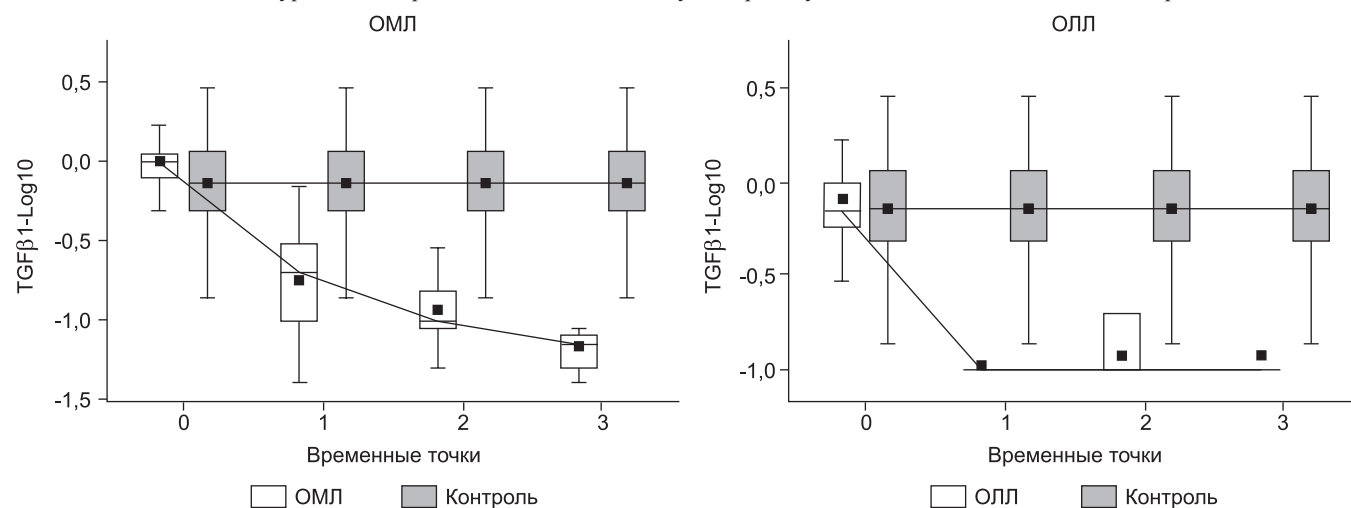


Рис. 6. Относительный уровень экспрессии гена *TGFβ1* в ММСК у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

($p < 0,05$) у больных ОЛЛ (10% от группы здоровых доноров) перед поддерживающей терапией. Уровень его экспрессии был нормальным в дебюте заболевания в обеих группах больных (рис. 8).

Во всех группах больных на нулевой точке наблюдался повышенный уровень экспрессии гена инсулиноподобного фактора роста *IGF1*. На последующих точках наблюдалось статистически значимое снижение уровня его экспрессии (рис. 9). На точке перед поддерживающей терапией его уровень у больных ОМЛ составил $0,2 \pm 0,05$ ($p < 0,05$), что соответствует 10% от уровня экспрессии у здоровых доноров.

Экспрессия генов, ответственных за морфогенез ММСК

Было показано значительное снижение уровня экспрессии гена *BGLAP* в дебюте заболевания во всех группах больных. У больных ОМЛ – до $0,7 \pm 0,2$ ($p < 0,05$), т.е. до 20% от уровня аналогичного показателя у здоровых доноров, и увеличение его уровня в ходе терапии (рис. 10). На всех точках во всех группах пациентов выявлено стойкое снижение экспрессии гена *SOX9*, уровень которого снижался с $1,1 \pm 0,14$ у больных ОМЛ и $1 \pm 0,2$ у больных ОЛЛ до $0,1 \pm 0,01$ и $0,15 \pm 0,01$ ($p < 0,05$) соответственно.

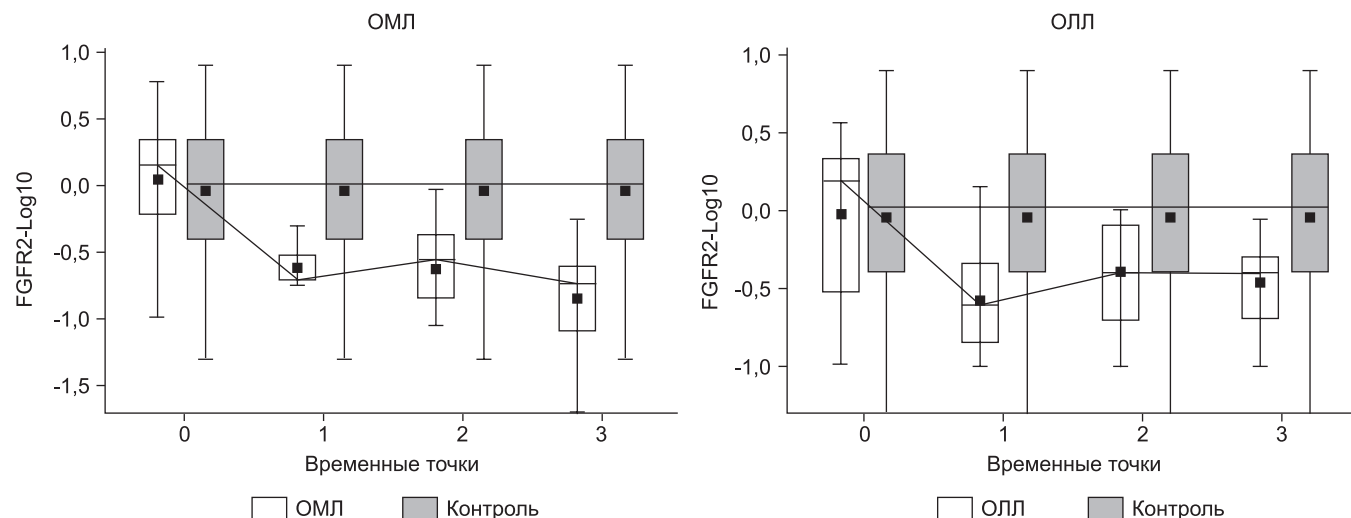
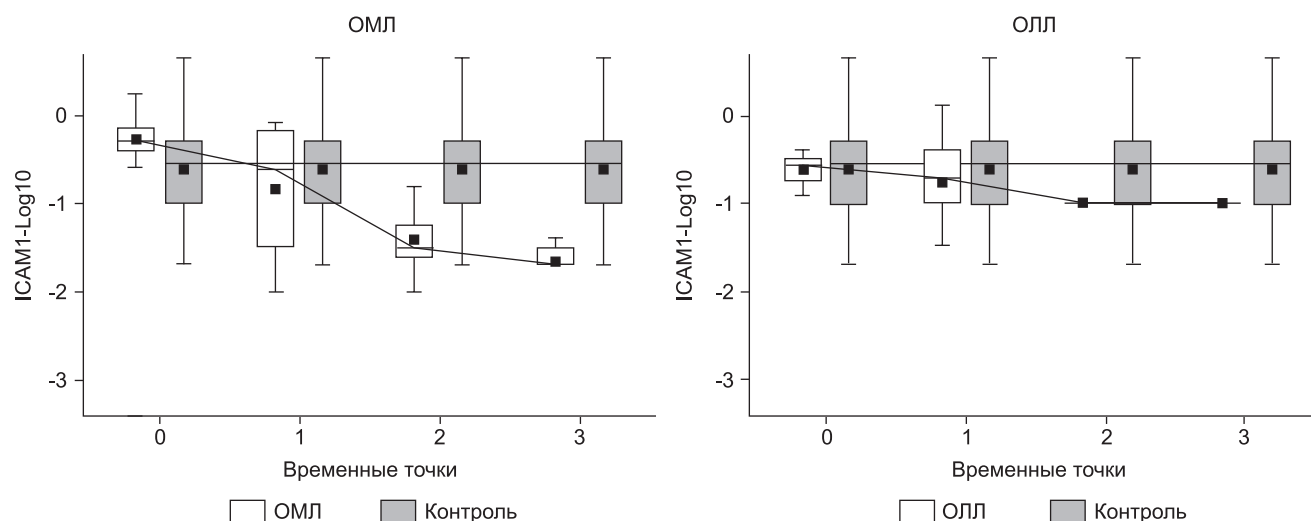
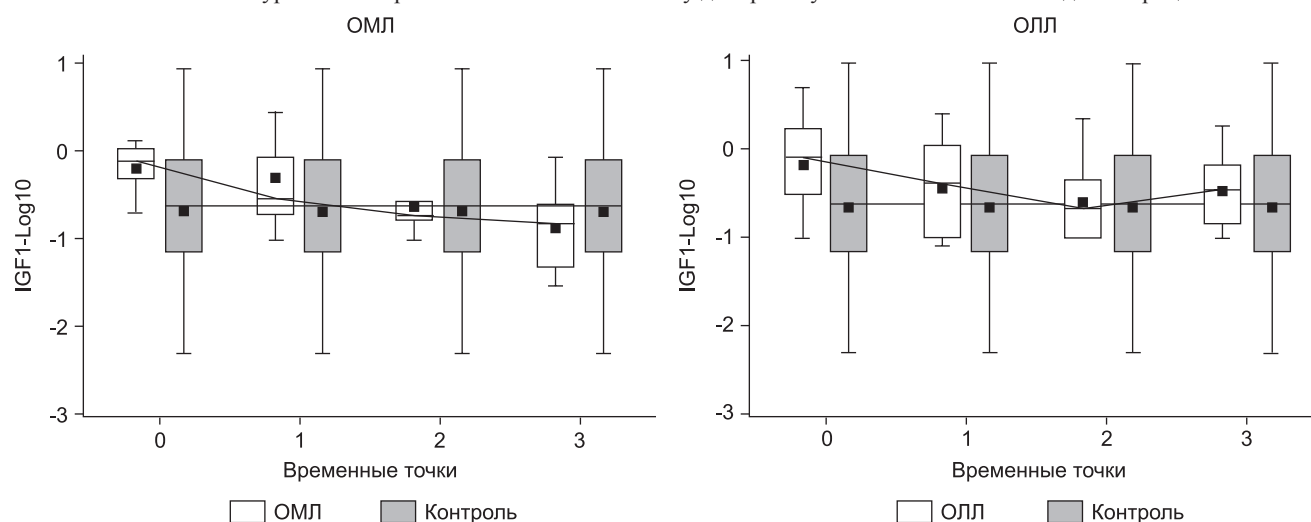


Рис. 7. Относительный уровень экспрессии гена *FGFR2* в ММСК у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

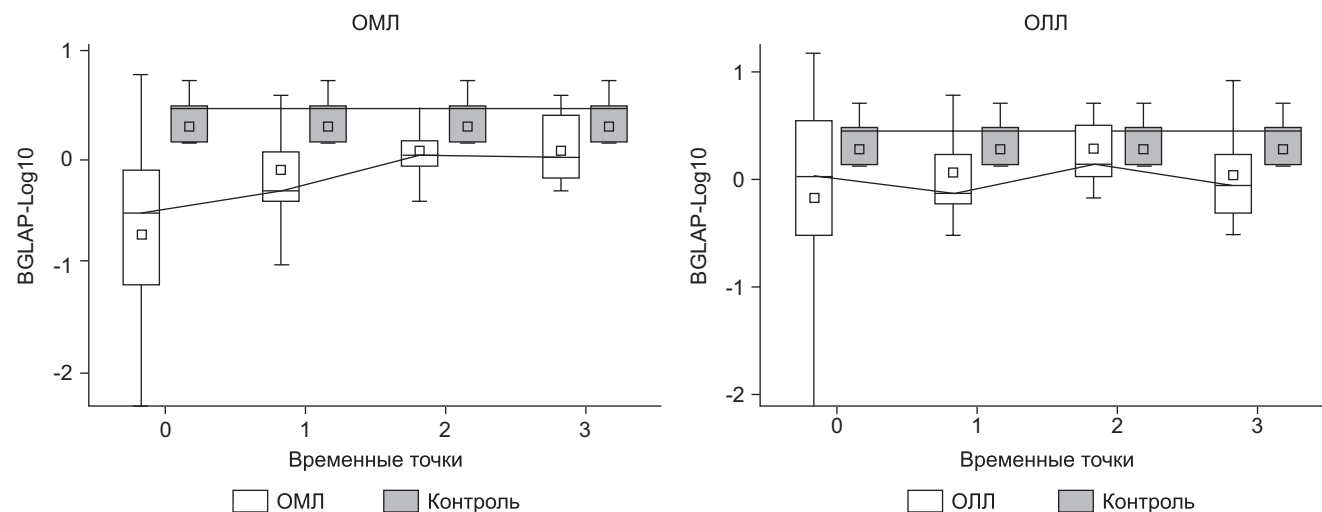
Рис. 8. Относительный уровень экспрессии гена *ICAM* в ММСК у доноров и у больных ОМЛ и ХМЛ до и в процессе лечения.Рис. 9. Относительный уровень экспрессии гена *IGF1* в ММСК у доноров и у больных гемобластомами до и в процессе лечения.

Анализ экспрессии генов в ММСК больных лейкозами в зависимости от статуса заболевания

В группе больных ОМЛ после первого курса индукции 42% больных находились вне ремиссии заболевания, при этом у подгрупп больных в ремиссии заболевания и вне ее имелись различия. У больных вне ремиссии ОМЛ наблюдалось повышение уровня экспрессии генов *CSF*, *IGF* и *JAG1*, а также снижение уровней генов *SPPI*, *BGLAP* и *SOX9* по сравнению с группой в ремиссии. К моменту

исследования после курса консолидации эти различия сохранялись. Такие же закономерности наблюдались при ретроспективном анализе тех же групп в момент диагностики заболевания.

В группе больных ОЛЛ к моменту 1-й точки ремиссия не была достигнута только у 3 больных, в связи с чем оценивать такую немногочисленную группу с использованием *t*-критерия Стьюдента не представляется возможным. Поэтому для анализа различий в этих группах применяли 95% доверительный интервал (ДИ), построен-

Рис. 10. Относительный уровень экспрессии гена *BGLAP* в ММСК у доноров и у больных гемобластомами до и в процессе лечения.

ный для значений в группе больных в ремиссии. Было показано, что у больных вне ремиссии заболевания уровни экспрессии генов *IL-6*, *FGF2*, *VCAM* были выше, чем у больных в ремиссии заболевания.

Анализ экспрессии генов в ММСК больных лейкозами в зависимости от протокола терапии

Учитывая разный состав цитостатических препаратов, а также их дозы, проанализированы уровни экспрессии генов в зависимости от лечения. Всем больным ОМЛ после установления диагноза начата терапия по протоколу ОМЛ 01.10. Таким образом, все больные на точках 0 и 1 не различались по этому критерию. После оценки эффективности на 1-й точке несколькими больным терапия была заменена на терапию малыми дозами цитарабина (МДЦ). На 2-й точке в этой группе больных уровни экспрессии некоторых генов выходили за границы ДИ. Показано, что у больных, получавших лечение МДЦ, была повышена экспрессия генов *IL-6*, *VCAM*, *TGFβ1*.

Обсуждение

Спектр эффектов, оказываемых продуктами экспрессии изучаемых генов, широк и разнообразен, поэтому в рамках данного исследования мы останавливались только на тех, что могут играть роль в патогенезе гемобластозов. Например, интерлейкин-6 является провоспалительным цитокином и обладает мощным иммуносупрессивным действием, подавляя цитотоксичность НК-клеток в отношении бластных клеток. После связывания гемопоэтических клеток с ЛСК интерлейкин-6 приводит к остановке клеточного цикла в ЛСК и переходу их в состояние покоя. Возможно, повышенная экспрессия гена *IL-6* в дебюте заболевания отражает создание более благоприятных условий для лейкозных клеток. Интерлейкин-8 стимулирует пролиферацию бластных клеток, а также ангиогенный потенциал ММСК через увеличение содержания VEGF. Таким образом, повышенный уровень интерлейкина-8 на момент диагностики также способствует лейкоэмической экспансии, а снижение уровня его экспрессии свидетельствует об эффективности терапии. Интерлейкин-1β является провоспалительным цитокином, который стимулирует пролиферацию бластных клеток, что также может говорить о создании более благоприятных условий для лейкозных клеток.

КСФ помимо стимуляции пролиферации и дифференцировки нейтрофилов оказывает влияние и на лейкозные клетки. Повышение уровня его экспрессии в дебюте может свидетельствовать о создании благоприятных условий для лейкозных клеток, а его нормализация в ходе лечения – о восстановлении сигнальных путей в клетках стромального микроокружения. В ММСК больных острыми лейкозами была выявлена повышенная экспрессия *JAG1*. Так как *JAG1* оказывает антиапоптотический эффект на лейкозные клетки, то значимое снижение его экспрессии на последующих точках может свидетельствовать об эффективности терапии. Продукт экспрессии *SPP1* (остеопонтин) регулирует число ГСК в КМ и является важным фактором активации остеокластов. Повышенная его экспрессия в дебюте может свидетельствовать об усилении остеокластогенеза и повышении резорбции кости в дебюте заболевания. Продукт экспрессии гена *LIF* в своем действии сходен с *IL-6* и ингибирует процессы дифференцировки клеток. Таким образом, снижение уровня его экспрессии может говорить об эффективности проводимой терапии.

В ходе исследования изучались уровни экспрессии генов ростовых факторов. Например, белки семейства трансформирующего ростового фактора (TGFβ) действуют как антипролиферативные факторы для ГСК, ингибируя пролиферацию клеток. Кроме того, TGFβ вовлечен в сигнальный путь SMAD, который является пусковым механизмом апоптоза. Таким образом, уменьшение его экспрессии ослабляет антипролиферативные эффекты TGF, восстанавливая механизмы нормальной регуляции клеток в ходе терапии. Фактор роста фибробластов FGF2 обладает широким спектром митогенной активности и стимулирует пролиферацию стромальных клеток. Нормализация уровня его экспрессии в ходе терапии отражает ее эффективность и восстановление микроокружения. Были показаны стимулирующие эффекты инсулиноподобного фактора роста IGF, в том числе на бластные клетки. Кроме того, доказано повышение уровня IGF1 с возрастом, коррелирующее с развитием миелодисплазии. Снижение уровня его экспрессии отражает эффективность терапии.

В ходе терапии также показано снижение уровней экспрессии генов молекул клеточной адгезии. Высокая экспрессия гена *VCAM* способствует экстравазации лейкозных клеток через стенку сосуда, усиливает ангиогенез, а также способствует выживаемости лейкозных клеток, взаимодействуя с VLA-4. Другая молекула адгезии (ICAM) регулирует миграцию клеток, а также адипогенную дифференцировку ММСК. Кроме того, ICAM проявляет иммуномодулирующую активность за счет подавления дифференцировки Th17-клеток.

В работе изучали гены маркеров остеогенеза. *BGLAP* является маркером позднего остеогенеза, поэтому сниженный уровень экспрессии его гена отражает ингибирование дифференцировки ММСК, а сниженная экспрессия *SOX9* отражает ингибирование ходрогенной дифференцировки ММСК при развитии лейкоза.

У больных, находящихся вне ремиссии ОМЛ, наблюдалось повышение уровня экспрессии генов, ответственных за регуляцию кроветворения, таких как *CSF*, *IGF* и *JAG1*, которые обладают способностью к стимуляции пролиферации лейкозных клеток. Также у больных вне ремиссии ОМЛ были выявлены сниженные по сравнению с группой в ремиссии уровни генов, продукты экспрессии которых являются маркерами дифференцировки ММСК – *SPP1*, *BGLAP* и *SOX9*. В группе больных ОЛЛ вне ремиссии заболевания уровни экспрессии генов *IL-6* и *VCAM* были выше, чем у больных в ремиссии заболевания. Таким образом, при анализе групп больных в ремиссии заболевания и вне ее были подтверждены вышеописанные закономерности о большем поражении стромы у больных в развернутой стадии гемобластозов.

У больных, получавших лечение МДЦ, была повышена экспрессия генов *IL-6*, *VCAM*, *TGFβ1*, ингибирующих пролиферацию и дифференцировку ММСК, что может свидетельствовать о большем поражении стромы у больных, получающих лечение по этому протоколу, несмотря на относительно меньшую его гематологическую токсичность.

Выводы

Показано, что ММСК из КМ больных ОМЛ и ОЛЛ морфологически не различаются от таковых, полученных у здоровых доноров.

При оценке экспрессии генов в ММСК продемонстрировано повышение в дебюте заболевания уровней экспрессии генов, продукты которых способствуют пролиферации лейкозных клеток (*IL-6*, *IL-8*, *IL-1β*, *CSF*, *JAG1*, *SPP1*, *SDF1*) и ингибируют пролиферацию и миграцию стромальных клеток (*ICAM*, *VCAM*). В ходе терапии уровни экспрессии этих генов снижаются. В ходе лечения гемобластозов повышаются уровни экспрессии генов, продукты которых отвечают за пролиферацию, миграцию и дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, что отражает восстановление стромального микроокружения в процессе терапии (*IL-1R1*, *PDGERa*, *IGF*, *FGFR1*, *FGFR2*, *BGLAP*).

Обнаружено, что у больных вне ремиссии заболевания ингибирование стромы глубже по сравнению с больными, достигшими ремиссии заболевания. У больных на фоне длительного низкодозного цитостатического воздействия обнаруживается снижение уровней экспрессии генов, отвечающих за дифференцировку стромальных клеток, по сравнению с больными, получающими импульсную высокодозную химиотерапию.

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

1. Krampera M., Pizzolo G., Aprili G., Franchini M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*. 2006; 39(4): 678–83.
2. Caplan A. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 1991; 9(5): 641–50.
3. 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.
4. Bruns L., Cadeddu R.P., Brueckmann I., Frobel J., Geyh S., Bust S., et al. Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2012; 120(13): 2620–30.
5. Suragani R.N., Cadena S.M., Cawley S.M., Sako D., Mitchell D., Li R., et al. Transforming growth factor-β superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis. *Nat. Med.* 2014; 20(4): 408–14. doi: 10.1038/nm.3512.
6. Chertkov J.L., Gurevitch O.A., Udaltov G.A. Role of bone marrow stroma in hemopoietic stem cell regulation. *Exp. Hematol.* 1980; 8(6): 770–8.
7. Eppert K., Takenaka K., Lechman E.R., Waldron L., Nilsson B., van Galen P., et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat. Med.* 2011; 17(9): 1086–93.
8. Gentles A.J., Plevritis S.K., Majeti R., Alizadeh A.A. Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA*. 2010; 304(24): 2706–15.
9. Fiedler W., Graeven U., Ergün S., Verago S., Kilic N., Stockschrader M., et al. Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood*. 1997; 89(6): 1870–5.
10. Aguayo A., Estey E., Kantarjian H., Mansouri T., Gidel C., Keating M., et al. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 1999; 94(11): 3717–21.

11. Loges S., Heil G., Bruweleit M., Schoder V., Butzal M., Fischer U., et al. Analysis of concerted expression of angiogenic growth factors in acute myeloid leukemia: expression of angiopoietin-2 represents an independent prognostic factor for overall survival. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(6): 1109–17.
12. Perez-Atayde A.R., Sallan S.E., Tedrow U., Connors S., Allred E., Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am. J. Pathol.* 1997; 150(3): 815–21.
13. Mirshahi P., Rafii A., Vincent L., Berthaut A., Varin R., Kalantar G., et al. Vasculogenic mimicry of acute leukemic bone marrow stromal cells. *Leukemia.* 2009; 23(6): 1039–48.
14. Colmone A., Amorim M., Pontier A.L., Wang S., Jablonski E., Sipkins D.A. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science.* 2008; 322(5909): 1861–5.
15. Corre J., Mahtouk K., Attal M., Gadelorge M., Huynh A., Fleury-Cappellesso S., et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia.* 2007; 21(5): 1079–88.
16. Roela R.A., Carraro D.M., Brentani H.P., Kaiano J.H., Simao D.F., Guarniero R., et al. Gene stage-specific expression in the micro-environment of pediatric myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 2007; 31(5): 579–89.
17. Frisch B.J., Ashton J.M., Xing L., Becker M.W., Jordan C.T., Calvi L.M. Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia. *Blood.* 2012; 119(2): 540–50. doi: 10.1182/blood-2011-04-348151.
18. Krevvata M., Silva B.C., Manavalan J.S., Galan-Diez M., Kode A., Matthews B.G., et al. Inhibition of leukemia cell engraftment and disease progression in mice by osteoblasts. *Blood.* 2014; 124(18): 2834–46.
19. Geyh S., Rodríguez-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.
20. Hanoun M., Zhang D., Mizoguchi T., Pinho S., Pierce H., Kunisaki Y., et al. Acute myelogenous leukemia-induced sympathetic neuropathy promotes malignancy in an altered hematopoietic stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2014; 15(3): 365–75.
21. Huan J., Hornick N.L., Shurtleff M.J., Skinner A.M., Goloviznina N.A., Roberts C.T., et al. RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes. *Cancer Res.* 2013; 73(2): 918–29.
22. Calkoen F.G., Vervat C., Eising E., Vijfhuizen L.S., 't Hoen P.B., van den Heuvel-Eibrink M.M., et al. Gene-expression and in vitro function of mesenchymal stromal cells are affected in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica.* 2015; 100(11): 1434–41. doi: 10.3324/haematol.2015.126938.
23. Mudry R.E., Fortney J.E., York T., Hall B.M., Gibson L.F. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood.* 2000; 96(5): 1926–32.
24. Ayala F., Dewar R., Kieran M., Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia.* 2009; 23(12): 2233–41.
25. Blau O. Bone marrow stromal cells in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 2014; 19: 171–80.
26. Konopleva M., Zhao S., Hu W., Jiang S., Snell V., Weidner D., et al. The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells. *Br. J. Haematol.* 2002; 118(2): 521–34.
27. Konopleva M., Konoplev S., Hu W., Zaritskey A.Y., Afanasiev B.V., Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia.* 2002; 16(9): 1713–24.

Поступила 10.05.16

Принята к печати 17.07.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.419-085.361.4-013.3-076.5:577.2.08

Баторов Е.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Сергеевичева В.В., Сизикова С.А., Баторова Д.С.,
Ушакова Г.Ю., Гилевич А.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ CD4⁺ Т-КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МОЛЕКУЛУ CD31, У БОЛЬНЫХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
630099, г. Новосибирск, Россия

Цель работы – исследование динамики восстановления CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток и ранее не описанной субпопуляции CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток у больных лимфопролиферативными заболеваниями после высокодозной химиотерапии с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК). В исследование вошли 87 больных. Методом проточной цитометрии оценивали количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ и CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток перед ауто-ТГСК, на день выхода из лейкопении, через 6 и 12 мес после ТГСК. Относительное количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток значимо повышено у больных по сравнению со здоровыми лицами и восстанавливается после ауто-ТГСК до исходных показателей ко дню выхода из лейкопении. Посттрансплантационная лучевая терапия на область средостения приводит к значимому снижению количества CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток и удлиняет период их восстановления. Облучение мягких тканей не приводит к значимому снижению этой субпопуляции клеток. При изучении восстановления CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток методом проточной цитометрии нужно исключать из исследования CD31⁺ Т-клетки памяти.

К л ю ч е в ы е с л о в а: тимопоэз; CD31; трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; восстановление лимфоцитов.

Для цитирования: Баторов Е.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Сергеевичева В.В., Сизикова С.А., Баторова Д.С., Ушакова Г.Ю., Гилевич А.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Восстановление CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих молекулу CD31, у больных лимфопролиферативными заболеваниями после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(3): 133–137. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-133-137

Batorov E.V., Tikhonova M.A., Kryuchkova I.V., Sergeevicheva V.V., Sizikova S.A., Batorova D.S.,
Ushakova G.Yu., Gilevich A.V., Ostaniin A.A., Chernykh E.R.

RECOVERY OF CD4⁺ CD31⁺ T-CELL IN PATIENTS WITH LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS FOLLOWING HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

We have evaluated the dynamics of post-transplant recovery of CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T cells and CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-cells in patients with lymphoproliferative diseases after high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation (auto-HSCT). 87 patients were included in the study. The content of circulating CD4⁺CD31⁺ naïve and memory T-cells has been assessed with the use of flow cytometry before auto-HSCT, at the day of engraftment, and in 6 and 12 months. Relative amount of CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-cells in patients was elevated in comparison with healthy controls, restored rapidly following auto-HSCT and reached initially high level at the day of engraftment. Post-transplant mediastinal radiotherapy significantly reduced counts of CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺