

КИНЕТИКА ПРОЛИФЕРАЦИИ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ АПОПТОЗ, *bcr/abl*⁺ Ph⁺-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ

© Т. В. Ахлынина, Л. П. Герасимова, Г. П. Саркисян, Т. В. Боровкова, Е. А. Духовенская, Т. Е. Манакова, Н. М. Найденова, А. М. Тимофеев, Н. И. Гринева¹

Гематологический научный центр РАМН, Москва;

¹электронный адрес: ngrineva@blood.ru

Хромосомная транслокация t(9,22) в кроветворных стволовых клетках человека ведет к образованию *bcr/abl*⁺Ph⁺-клеток, способных к дифференцировке с заметным подавлением апоптоза. Ph⁺-хромосома и онкоген *bcr/abl* являются маркерами хронического миелолейкоза. При прогрессии хронического миелолейкоза (ХМЛ) в результате дополнительных мутаций или активации пролиферации Ph⁺-клеток, возникающих при транслокации и способных к самоподдержанию, накапливаются злокачественные бласты — *bcr/abl*⁺ Ph⁺-клетки с блоком дифференцировки. Механизмы реально протекающих при ХМЛ превращений не известны. С целью найти клеточную модель и разработать подход к изучению закономерностей функционирования дифференцирующихся D-Ph⁺-клеток и их превращения в злокачественные *bcr/abl*⁺ Ph⁺-клетки с блоком дифференцировки (лейкозные бласты) изучена кинетика пролиферации, дифференцировки, гибели клеток и транскрипции генов, регулирующих апоптоз, в суспензионной культуре Ph⁺-моноклеаров, выделенных из периферической крови больного ХМЛ до начала лечения. Установлено, что дифференцировка D-Ph⁺-клеток в 14-суточной культуре протекает по известной схеме усиленного миелопоэза, характерного для хронического миелолейкоза. В культуре до ¾ накопления и расходования всех Ph⁺-моноклеаров составляют клетки миелоидного ростка кроветворения, до 95 % которых представляют дифференцирующиеся гранулоциты. Пролиферация и дифференцировка протекают с многократным накоплением Ph⁺-клеток, с их значительной гибелью и новым этапом пролиферации в конце культивирования. Максимальную концентрацию дифференцирующихся гранулоцитов составляют миелоциты, соотношение скоростей накопления и расходования которых свидетельствует о замедлении их превращения в метамиелоциты на следующей стадии дифференцировки. Кинетика культивирования характеризует гибель клеток на отдельных стадиях дифференцировки: гибель пролиферирующих клеток, миелоцитов и зрелых клеток. Кинетика индекса *P/D* (отношения числа незрелых Ph⁺-гранулоцитов, дифференцирующихся с делением к дифференцирующимся без деления метамиелоцитам и зрелым нейтрофилам) выявляет активную пролиферацию в начале культивирования и, что неожиданно, новый этап ее активации в конце культивирования в присутствии факторов роста. Максимум транскрипции антиапоптотических генов *bcr/abl* и *mdm2* совпадает с пиком пролиферации Ph⁺-гранулоцитов в начале и активацией пролиферации в конце культивирования. Пролиферация и дифференцировка Ph⁺-гранулоцитов заметно ускоряются в присутствии факторов роста; в конце культивирования при значительном падении концентрации D-Ph⁺-клеток пролиферация вновь активируется. Кинетика культивирования Ph⁺-клеток является весьма информативным подходом для изучения непрерывной регуляции клеточных и молекулярных процессов при ХМЛ *in vitro* и позволяет более полно судить о процессе кроветворения.

Ключевые слова: гемопоэтические Ph⁺-клетки, кинетика пролиферации, дифференцировки и апоптоза *in vitro*, транскрипция генов *bcr/abl*, *bcl2*, *mdm2* и *p53* при культивировании Ph⁺-клеток.

Принятые сокращения: СКК — стволовые кроветворные клетки, ЛСК — лейкозные стволовые клетки, ПААГ — полиакриламидный гель, ПК — периферическая кровь, ХМЛ — хронический миелолейкоз, ХФ — хроническая фаза ХМЛ, ЭТС — эмбриональная сыворотка телят, Ph⁺ — Филадельфийская хромосома.

Реципрокная хромосомная транслокация t(9,22) в стволовых кроветворных клетках (СКК) человека ведет к образованию клеток *bcr/abl*⁺ Ph⁺, способных к дифференцировке с заметным подавлением апоптоза (D-Ph⁺-клетки). Ph⁺-хромосома и онкоген *bcr/abl* являются маркерами ХМЛ. При прогрессии ХМЛ в результате дополнительных мутаций или активации пролиферации возникающих при транслокации долго молчащих клеток накапливаются злокачественные лейкозные бласты —

лейкозные стволовые клетки (ЛСК) *bcr/abl*⁺ Ph⁺ с блоком дифференцировки и способностью к самоподдержанию. Механизмы реально протекающих при ХМЛ превращений неизвестны.

Согласно современным представлениям о возникновении и прогрессии лейкозов, формирование злокачественного этапа болезни происходит в результате образования и функционирования лейкозных стволовых клеток (ЛСК). Образование этих клеток может протекать при

хромосомных транслокациях в зависимости от характера их транслокации, последующих мутаций или специфических изменений генной регуляции в клетках. В зависимости от вида хромосомной транслокации лейкозный клон возникает либо сразу из стволовой кроветворной клетки (СКК), либо поэтапно. В последнем случае вначале возникают трансформированные клетки, сохраняющие способность к полипотентному кроветворению, D-Ph⁺-клетки, которые затем мутируют в ЛСК (Holyoake et al., 2002; Passegué et al., 2003; Guzman, Jordan, 2004; Jamieson et al., 2004). Этот путь реализуется при развитии ХФ ХМЛ. Экспрессия онкогена *bcr/abl* активируется, наблюдаются ингибирование апоптоза и нарушение регуляции пролиферации и дифференцировки кроветворных клеток (Bedi et al., 1994, 1995; Lotem, Sachs, 1996; Melo, 1996; Era, Witte, 2000; Jaiswal et al., 2003).

Превращение D-Ph⁺-клеток в клон ЛСК протекает в результате специфических мутаций и (или) изменений генной регуляции не только в стволовых клетках, но и в их специализированных потомках: полипотентных, коммитированных предшественниках и, возможно, даже в созревающих клетках (Jamieson et al., 2004). При этом ЛСК, подобно СКК, способны к медленному самоподдержанию с сохранением значительной доли клеток в G₀-фазе клеточного цикла и к аресту апоптоза, но с потерей способности к дифференцировке (Passegué et al., 2003; Guzman, Jordan, 2004; Jamieson et al., 2004).

Особенности D-Ph⁺-клеток в ХФ ХМЛ определяет онкоген *bcr/abl*, образовавшийся в составе Ph⁺-хромосомы в процессе хромосомной транслокации, и его продукт онкобелок p210 — весьма активная тирозинкиназа, лишенная негативной регуляции (Melo, 1996; Era, Witte, 2000). Тирозинкиназа p210 фосфорилирует различные факторы транскрипции и СТАТ-белки (Signal Transducers and Activators of Transcription) и, активируя транскрипцию целого ряда генов, изменяет многие пути сигнальной трансдукции и в итоге — генную регуляцию клеток (Shuai et al., 1996; Niwa et al., 1998; De Groot et al., 1999; Deininger et al., 2000; Gesbert, Griffin, 2000; Sillaber et al., 2000; Jaiswal et al., 2003).

Многообразие действия p210 создает особые сложности в исследовании накопления мутаций в D-Ph⁺-клетках при их превращении в ЛСК. В настоящее время неизвестно, каким образом и какие клетки-предшественники или их потомки и на каком этапе развития ХМЛ превращаются в ЛСК (Sanchez-Garsia, Grutz, 1995; Goetz et al., 2001; Holyoake et al., 2001, 2002; Passegué et al., 2003; Guzman, Jordan, 2004; Jamieson et al., 2004). Неизвестно, присутствуют ли ЛСК уже в ХФ ХМЛ, или их медленное накопление сменяется агрессивной пролиферацией в фазе акселерации и бластного криза, или, как это принято считать, ЛСК возникают только в фазе акселерации и бластного криза уже при ярко выраженной нестабильности генома (Melo, 1996; Passegué et al., 2003).

Весьма успешные современные исследования генной регуляции обсуждаемых процессов проведены методами трансфекции клеточных линий, стволовых клеток мышей и потомков этих клеток генетическими конструкциями, экспрессирующими заданные гены. Выявлены многие гены, участвующие в регуляции СКК и ЛСК (Bedi et al., 1994; Holyoake et al., 2001, 2002; Passegué et al., 2003; Guzman, Jordan, 2004; Jamieson et al., 2004). Такой подход, однако, не позволяет исследовать последовательные превращения D-Ph⁺-клеток в ЛСК, например при лейкозах, из-за отсутствия адекватных клеточных моделей.

С целью найти клеточную модель и разработать подход к изучению закономерностей функционирования D-Ph⁺-клеток и их превращения в ЛСК (*bcr/abl*⁺ Ph⁺-клетки с блоком дифференцировки) в данной работе изучена кинетика пролиферации, дифференцировки, гибели клеток и транскрипции генов, регулирующих апоптоз, в суспензионной культуре Ph⁺-моноклеаров, выделенных из однократной пробы ПК от больного в хронической фазе (ХФ) ХМЛ до начала лечения. Представляется, что этот подход позволит имитировать непрерывность наблюдения за развитием болезни на отдельных ее этапах и использовать его в качестве достаточно простого и динамичного метода анализа потенциала Ph⁺-клеток каждого больного ХМЛ.

Материал и методика

Олигонуклеотидные праймеры и смесь гексамеров синтезированы и очищены с помощью ПААГ или HPLC фирмой «Синтол» (Москва). ИЛЗ получали в составе кондиционированной среды (10 % по объему) от клеточной линии U5637 (Morioka et al., 1990).

Использованные материалы: гепарин (Flow, Англия); Lymphoprep, среда альфа-МЕМ (MP Biomedical, США); DEPC, Непес, Трис, PBS, эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), цитрат Na и лаурилсаркозил (ICN, США); краситель трипановый синий, L-глутамин и 2-меркаптоэтанол (Serva, Германия); пенициллин и стрептомицин (ОАО, Россия); Г-КСФ (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Франция); Триреагент и гуанидинтиоционат (Sigma, США); RQ1 RNase-free DNase, РНКазин, дНТФ, BSA, Taq polymerase, буфер для ОТ, дНТФ и обратная транскриптаза MuMLV (Promega, США).

Ph⁺*bcr/abl*⁺-клетки из ПК получали, отбирая 10—15 мл крови из вены больного ХМЛ в хронической фазе до лечения, помещали во флакон с гепарином (50 ед./мл) и выделяли фракцию Ph⁺-моноклеаров в среде с плотностью 1.077 г/см³ (Lymphoprep, MP Biomedical). Больной из ГНЦ РАМН, у которого в клетках ПК была цитогенетически идентифицирована Ph⁺-хромосома в 95 % митозов. В Ph⁺-моноклеарах нами был идентифицирован транскрипт мРНК *bcr/abl* b3a2-типа методом RT-PCR (длина амплификата 378 пар оснований; см. ниже). В мазках, окрашенных «гимза» и по методу Романовского, проанализированы морфологически идентифицируемые клетки (Абрамов, 1985) и определен их состав (табл. 1).

Таблица 1

Состав *bcr/abl*⁺ Ph⁺-моноклеаров, выделенных из периферической крови больного ХМЛ в хронической фазе до лечения

| Клетки | Содержание, % |
|--------------------|---------------|
| Бласты | 39 |
| Промиелоциты | 1 |
| Миелоциты | 20 |
| Метамиелоциты | 6 |
| Палочкоядерные | 2 |
| Сегментоядерные | 2 |
| Лимфоциты | 27 |
| Эритроидные клетки | 3 |
| Моноциты | 0 |
| Макрофаги | 0 |

Т а б л и ц а 2

Последовательности олигонуклеотидных праймеров для PCR

| мРНК | Внешние праймеры для PCR, отжиг при 56 °С, первый раунд | Внутренние праймеры для PCR, отжиг при 60 °С, второй раунд | Длина фрагмента, п.о. |
|----------------|---|--|-----------------------|
| <i>bcr/abl</i> | TGGATGAACTGGAGGCAG CACAGGCGTGATGTAGTTG | GGAGCTGCAGATGCTGACCAAC GCTTCACACCATTCCCCATT | 378 (b3a2) |
| <i>bcr</i> | TGGATGAACTGGAGGCAG CAGTTTGGCTCAGCTGTGTCCC | GGAGCTGCAGATGCTGACCAAC CAGTGGCTGAGTGGACGATGAC | 134 |
| <i>mdm2</i> | ATGTGCAATACCAACATGTC TAGGGGAAATAAGTTAGCAC | CAAGAACTCTCAGATGAAGATG TTGATGGCTGAGAATAGTCTTC | 399 |
| <i>p53</i> | TGACACGCTTCCCTGGATTG GGAACAAGAAGTGGAGGATG | ACGTACTCCCCTGCCCTCAA GTCTTCCAGTGTGATGATGG | 404 |
| <i>gapdh</i> | GCTTGTCAATCAATGGAAATC CACGATACCAAAGTTGTCATG | — | 314 |
| <i>bcl2</i> | — | GCCTGCAGCTTTGTTTCATGGTACATC TGTGGAAGTGTACGGCCCCAGCATGGC | 234 |

Примечание. В качестве внутреннего стандарта при RT-PCR использована анализируемая мРНК в нулевой точке, выделенная из клеток до их синхронизации удалением сыворотки. п.о. — пары оснований. (b3a2) — тип мРНК *bcr/abl*, образующейся в исследуемых клетках ПК при сплайсинге пре-мРНК *bcr/abl*.

Мононуклеары Ph⁺ *bcr/abl*⁺ культивировали в суспензии в среде альфа-МЕМ (MP Biomedical), содержащей 20 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; ICN), 2 mM L-глутамин (Serva), 0.1 mM 2-меркаптоэтанол (Serva), 100 ед. пенициллина и 50 ед. стрептомицина и 25 mM Непес (рН 7.2—7.4), обозначая условиями культивирования без ростовых факторов. Для культивирования с факторами роста к той же среде добавляли 100 нг/мл Г-КСФ (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) и ИЛЗ в составе кондиционированной среды (10 % по объему) от клеточной линии U5637 (Morioka et al., 1990). Ph⁺-клетки (1.1 · 10⁶ клеток в 1 мл) инкубировали в 24-ячеечных платах по 12 ячеек на каждую пробу в течение 14 сут при 37 °С в условиях абсолютной влажности и 5 %-ного содержания CO₂. По ходу культивирования в пробах определяли число живых и мертвых клеток, в полученных мазках определяли морфологию клеток и их состав, из каждой пробы (10⁶ клеток) выделяли суммарную РНК (Chomczynski, Sacchi, 1987) и с помощью RT-PCR анализировали уровни пяти мРНК, участвующих в регуляции апоптоза.

Кинетические кривые роста и гибели клеток получали согласно изменениям по ходу культивирования концентрации живых и мертвых клеток, которую вычисляли по доле клеток с помощью камеры Горяева после обработки 0.2%-ным раствором трипанового синего в условиях, соответствующих нормам стандартизации результатов (Луговская и др., 2005), и отнесли на 10⁶ клеток.

Кинетические кривые дифференцировки гранулоцитов и лимфоцитов определяли по изменению концентрации различающихся по морфологии клеток по их составу на мазках, определяемых, как указано выше. В состав бластов включены миелобласты и их неотличимые предшественники, а также предшественники лимфоцитов. Однако кинетически их удается характеризовать как различные типы клеток.

Кинетику изменений индекса *P/D* при культивировании Ph⁺-гранулоцитов определяли как отношение концентраций суммы пролиферирующих клеток (бласты, промиелоциты и миелоциты), *P*, к сумме дифференцирующихся без деления и зрелых нейтрофилов (метами-

елоциты, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы), *D*. Все результаты оценивали на 10⁶ клеток.

Суммарные РНК выделяли лизисом каждой пробы в 10⁶ клеток гуанидинизоцианатом по методу Чомцински и Саччи (Chomczynski, Sacchi, 1987) с небольшими модификациями. Суспензию клеток (10⁶/мл) центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин. К осадку добавляли 0.5 мл лизирующего буферного раствора (4 M гуанидинтиоцианат, 25 mM цитрат Na, рН 7.0, 0.5%-ный лаурилсаркозил и 0.1 M 2-меркаптоэтанол), тщательно перемешивали, инкубировали 10 мин и добавляли 0.5 мл триреагента (10 мл лизирующего буфера, 1 мл 2M ацетата Na, рН 4.0 и 10 мл фенола, насыщенного буферным раствором, рН 4.2). После добавления 0.3 мл хлороформа, встряхивания на вортексе и 10 мин выдерживания смесь центрифугировали 10 мин при 12 000 g. РНК из верхней водной фазы осаждали равным объемом изопропанола, выдерживали 1 ч при -70 °С и центрифугировали 10 мин при 12 000 g. Полученный осадок промывали 80%-ным этанолом и хранили при -70 °С.

Обработка проб ДНКазой. Из осадка каждой пробы суммарной РНК удаляли остатки этанола подсушиванием на воздухе, растворяли в 20 мкл стерильной воды (обработанной DEPC) и к раствору добавляли 30 мкл смеси: буферный раствор для DNase I (40 mM трис-HCl, рН 8.0, 10 mM MgSO₄ и 1 mM CaCl₂), RNasin (12 уд.), RQ1 RNase-free DNase (10 ед.) и вода (до 30 мкл), перемешивали и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 0.2 мл триреагента (указано выше). Далее суммарную РНК, свободную от ДНК, выделяли, как описано выше.

Обратная транскрипция. кДНК получали при отжиге пробы суммарной РНК, выделенной из 10⁵—10⁶ клеток, с 50 нг случайных по последовательности гексамеров в 8 мкл воды при 70 °С в течение 10 мин, затем инкубировали 1 ч при 37 °С в объеме 25 мкл, содержащем буферный раствор для обратной транскрипции (Promega), по 2.5 мкМ каждого из дНТФ, 20 ед. RNasin (Promega) и 20 ед. обратной транскриптазы MuMLV (Promega). Раствор кДНК использовали для PCR при минимальном хранении при -70 °С. RT-PCR проводили для анализа

транскрипции генов *bcr/abl*, *bcl2*, *mdm2*, *bcr*, *p53* и *gapdh* со специфическими праймерами для каждого гена в 1 или 2 раунда (табл. 2).

PCR. Каждую PCR проводили в 25 мкл раствора, содержащего буфер для PCR: 50 мМ Трис-НСI, pH 8,9, 16 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 мкМ ЭДТА, 0,14 мг/мл BSA, 2—5 мкл раствора кДНК, 200 мкМ каждого из дНТФ, 2,5 ед. Taq polymerase (Promega) и 75 нг каждого праймера; проводили 30 циклов. Каждый цикл PCR состоял из 1 мин денатурации при 94 °С, 1 мин отжига при 56 °С для 1-го раунда и при 60 °С для 2-го, 3 мин синтеза при 72 °С. Отжиг проб кДНК для *bcr*, *p53*, *mdm2* и *bcr/abl* проводили при 56 °С для внешних праймеров и при 60 °С для внутренних (табл. 2). В качестве внутреннего стандарта использовали мРНК, соответствующую анализируемой до синхронизации клеток удалением сыворотки ЭТС на 2 ч (проба мРНК в нулевой точке), так как обычно применяемый в качестве внешнего стандарта уровень мРНК *gapdh* в гемопоэтических клетках изменяется (Bustin, 2000).

Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 6%-ном ПААГ, гели окрашивали этидиум бромидом (1 мкг/мл) и идентифицировали при электрофорезе по длинам фрагментов (амплификатов) PCR (табл. 2). Интенсивность флуоресценции (*Jt*) полос амплификатов PCR определяли компьютерной денситометрией с помощью программы Scion Image, учитывая эквивалентные объемы, взятые на RT-PCR и на электрофорез.

Относительный уровень мРНК оценивали по *Jt* полос соответствующих фрагментов/амплификатов кДНК, полученных на электрофореграммах после RT-PCR, по отношению к интенсивности флуоресценции в нулевой точке J_0 (Jt/J_0 , %), принимая за внутренний PCR-стандарт амплификат, соответствующий исследуемой кДНК/мРНК в начальный момент культивирования. Такой стандарт полностью устраняет различия в образовании кДНК на случайных гексамерах и случайных колебаний в количестве выделяемых двух разных мРНК, применяемых в качестве стандартов, из-за эффектов пространственной структуры разных амплифицируемых участков одной и той же анализируемой мРНК. Jt/J_0 получали в строго одинаковых условиях, объемах, разбавлениях, количестве циклов PCR. J_0 определяли на линейном участке ее зависимости от количества амплификатов, наносимых на гель, для чего для каждой мРНК строили калибровочные кривые из 3—4 проб в 2, 4, 6 и 8 мкл PCR смеси в начальной точке. В качестве внутреннего стандарта использовали анализируемую мРНК в нулевой точке, выделенную из клеток до их синхронизации удалением сыворотки на 2 ч. При получении калибровочных кривых измерения повторяли 3—4 раза, остальные — 2 раза.

Кинетические кривые изменения уровней мРНК при культивировании оценивали по изменению флуоресценции *Jt* и по относительным величинам Jt/J_0 (в %) полос RT-PCR-амплификатов после их разделения в электрофорезе и определения интенсивности флуоресценции полос амплификатов, как указано выше. Значения Jt/J_0 (в %) рассматривали как меру изменения относительных уровней мРНК.

Результаты

Кинетику клеточной пролиферации и дифференцировки изучали при 14-суточном культивировании Ph^+ -мононуклеаров, выделенных из ПК больного в хронической

фазе ХМЛ до лечения. Исследуемые мононуклеары содержали мРНК b3a2 *bcr/abl*, уровень которой изменялся по ходу культивирования. Исходные мононуклеары были представлены клетками-предшественниками, миелоидными и лимфоидными клетками, среди которых, кроме того, присутствовали клетки гранулоцитарного, моноцитарного и лимфоидного ростков кроветворения, в том числе созревающие клетки (табл. 1), что хорошо известно для клеток от больных ХМЛ.

При культивировании Ph^+ -мононуклеаров анализировали кинетику роста и гибели клеток, изменения морфологического состава клеток и уровней мРНК генов, регулирующих апоптоз (*bcr/abl*, *bcl2*, *mdm2* и *p53*), с добавлением или без добавления факторов роста кроветворных клеток ИЛЗ и Г-КСФ. Активирующее внимание указанных факторов на кроветворение известно (Натан, Зифф, 1994; Владимирская, Румянцев, 2000; Розмарин, Шульман, 2000; Чертков, Дризе, 2001; Воробьев, 2002). На рис. 1 видно, что концентрационная кривая суммарного роста Ph^+ -мононуклеаров соответствует кинетике активного накопления и расходования дифференцирующихся клеток миелоидного ростка кроветворения. Последние составляют не менее $\frac{3}{4}$ общего количества клеток и на 90—95 % представлены гранулоцитами, что согласуется с характером миелопоэза при ХМЛ (Котельников и др., 1982; Козинец, Котельников, 1983; Bedi et al., 1994, 1995; Melo, 1996; Розмарин, Шульман, 2000; Era, Witte, 2000; Чертков, Дризе, 2001; Воробьев, 2002).

Концентрация Ph^+ -гранулоцитов возрастает к 7-м сут культивирования в 3—5 раз. К 10-м сут она падает в такой же степени за счет активной гибели — очевидно, апоптоза зрелых клеток (Герасимова, 2002). Концентрация клеток в культуре достигает максимального значения за 7 сут культивирования в основном за счет накопления миелоцитов и метамиелоцитов, достигающих к этому времени максимума. При дальнейшем культивировании концентрация клеток миелоидного ряда существенно уменьшается, очевидно в результате дифференцировки и увеличения гибели созревающих гранулоцитов. В итоге концентрация всех живых мононуклеаров и клеток миелоидного ряда падает через 10—14 сут культивирования в 2—5 раз (в отсутствие факторов роста), а после 10 сут ее падение тормозится или концентрация клеток даже увеличивается, хотя при этом заметно увеличивается гибель клеток (рис. 1, 2). В присутствии факторов роста максимальная концентрация гранулоцитов падает на порядок.

На рис. 1 видны также накопление и расходование лимфоцитов, представленных в Ph^+ -мононуклеарах ПК, с максимумом в 1-е и на 3-и сут культивирования (соответственно в присутствии дополнительных факторов и без них). Это указывает на ожидаемую гетерогенность фракции лимфоцитов, в которой blasts — клетки-предшественники — морфологически неразличимы (Луговская и др., 2005). Наблюдаемая кривая накопления и расходования лимфоцитов (рис. 1), вполне очевидно, определяется дифференцировкой лимфоцитов с участием blastов на раннем этапе культивирования.

Добавление цитокинов ИЛЗ и Г-КСФ мало влияет на характер кинетической кривой скорости накопления и расходования мононуклеаров. Однако кривые миелоидных клеток, гранулоцитов, лимфоцитов и погибающих клеток свидетельствуют о понижении концентрации соответствующих клеток под действием цитокинов, сдвиге максимума кривых накопления лимфоцитов в начале культивирования (с 3-х на 1-е сут) и понижения концентрации

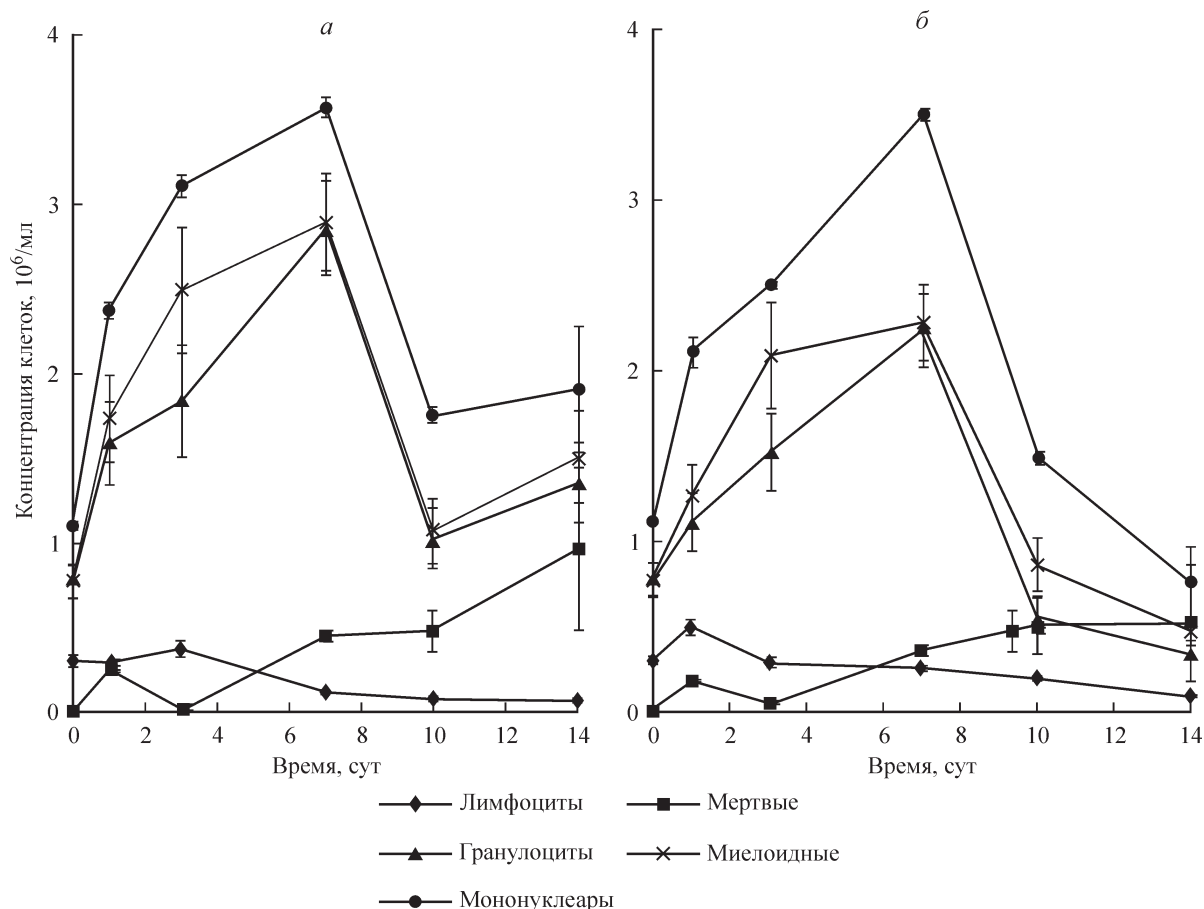


Рис. 1. Кинетические кривые роста и гибели Rh^+ -мононуклеаров, миелоидных клеток, гранулоцитов и лимфоцитов при культивировании Rh^+ -мононуклеаров из периферической крови (ПК) больного в хронической фазе (ХФ) ХМЛ без факторов роста (а) и в присутствии факторов роста (б).

а — альфа-МЕМ-среда + 20% ЭБС; б — то же с факторами роста (ИЛ3 в виде 10% по объему кондиционированной среды; Morioka et al., 1990) и 100 нг/мл Г-КСФ.

всех клеток в конце культивирования (10—14-е сут). Различия в скорости гибели клеток при этом заметны только на 14-е сут — концентрация погибших клеток выше в отсутствие факторов. Одним из объяснений понижения концентрации клеток служит ускорение расходования клеток.

Рис. 1 и 2 показывают, что количество погибающих клеток растет в зависимости от образующихся по ходу культивирования клеток: максимум в 1-е и на 7-е сут и активная гибель далее. При этом видна зависимость гибели от факторов: до 7 сут клетки гибнут активнее в отсутствие факторов, а позже, наоборот, факторы заметно активируют гибель клеток. Отметим, что гибель Rh^+ -клеток ПК в данных условиях протекает по механизму p53-зависимого апоптоза (Герасимова и др., 2002). Последний был идентифицирован по олигонуклеосомной фрагментации ДНК при культивировании клеток в аналогичных условиях и позже подтвержден цитофлуориметрическим определением доли клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК с помощью пропидий иодида.

На рис. 3 приведены кинетические кривые пролиферации и дифференцировки и влияния на эти процессы факторов роста. Последовательно пролиферируют и дифференцируются Rh^+ -гранулоциты с образованием бластов, промиелоцитов с максимумом на 1-е сут и миелоцитов с максимумом на 7-е сут и далее метамиелоцитов

и зрелых нейтрофилов. Максимальную концентрацию Rh^+ -клеток данного больного определяет соотношение

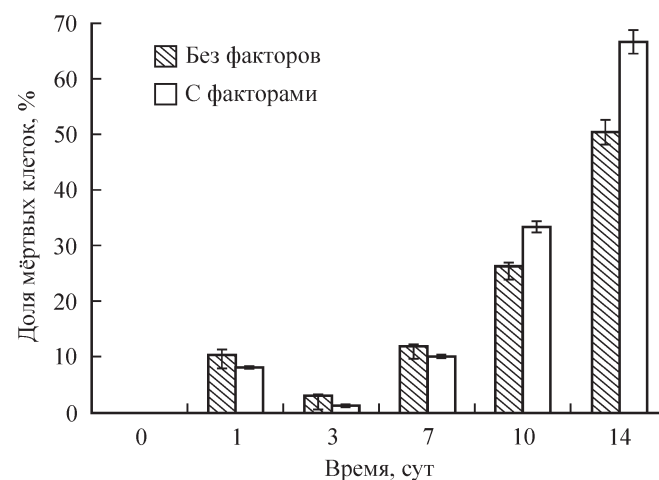


Рис. 2. Гибель Rh^+ -клеток в суспензионной культуре при культивировании Rh^+ -мононуклеаров в отсутствие и в присутствии факторов роста.

Без факторов роста: альфа-МЕМ-среда + 20% ЭБС; с факторами роста: альфа-МЕМ-среда + 20% ЭБС + ИЛ3 в виде 10% по объему кондиционированной среды.

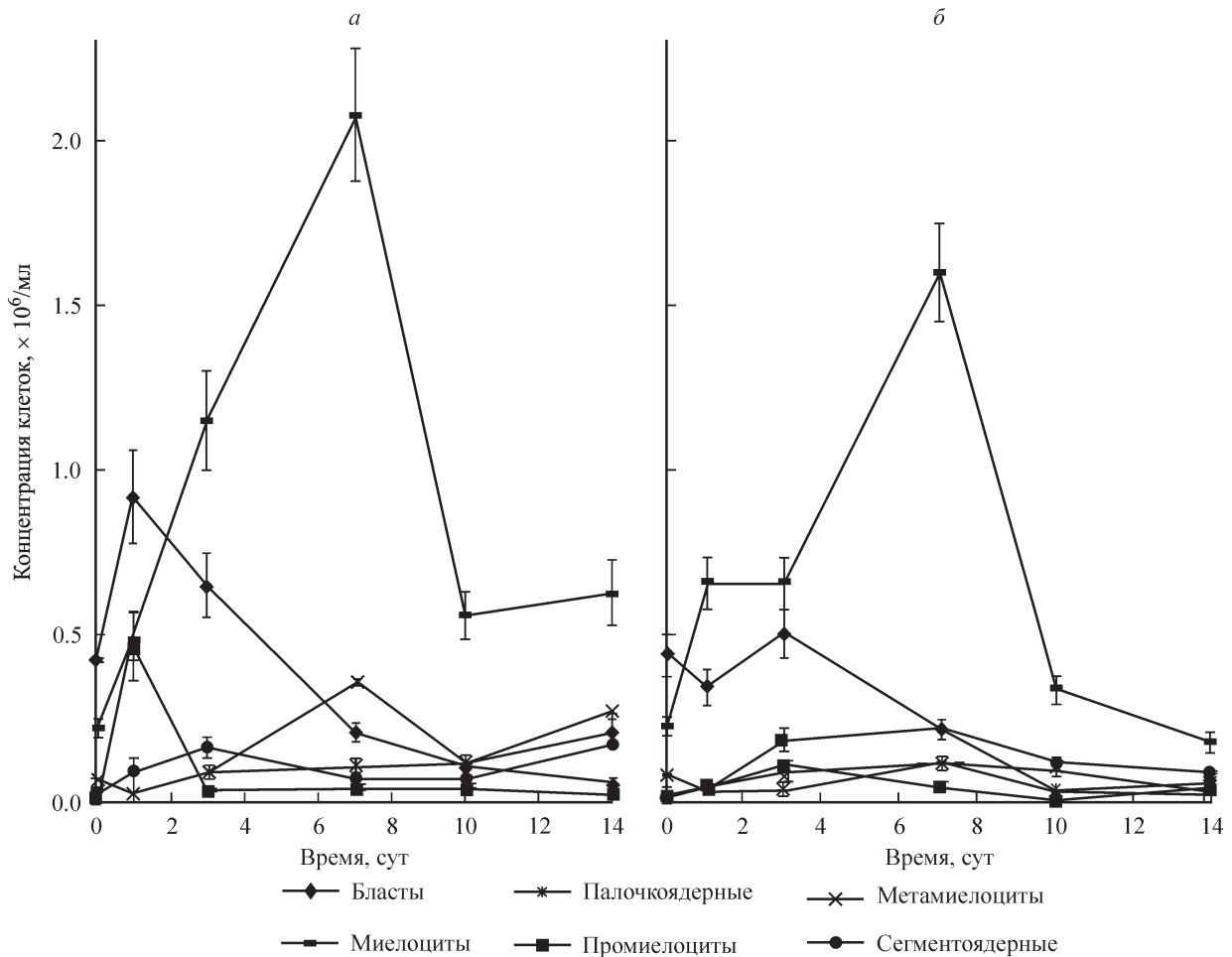


Рис. 3. Кинетические кривые дифференцировки Ph^+ -гранулоцитов при культивировании Ph^+ -моноклеаров без факторов роста (а) и в присутствии факторов роста (б) (накопления и расходования Ph^+ -гранулоцитов по данным анализа морфологии клеток).

Значения а и б те же, что и в подписи к рис. 1.

скорости накопления и расходования миелоцитов. При этом четко прослеживаются механизм гранулоцитопоза и влияние на него добавления факторов роста. Видно, что факторы ускоряют дифференцировку, особенно созревающих клеток, и как следствие усиливают гибель зрелых клеток. Основную массу клеток составляют миелоциты. Через 10 сут культивирования концентрация миелоцитов резко падает и далее к 14-м сут уменьшается в присутствии дополнительных факторов на порядок, а без них она мало меняется или несколько возрастает. Это указывает на торможение дифференцировки гибели клеток при недостатке факторов и на повышенную скорость созревания нейтрофилов, образования зрелых клеток и их гибели в присутствии факторов роста.

Из совокупности данных, представленных на рис. 1—3, видно, что в течение 14 сут культивирования зависимость превращений D-Ph^+ -клеток от факторов роста несколько меняется; без дополнительных факторов роста клетки накапливаются в большей концентрации и медленнее дифференцируются. При этом без факторов роста в большей степени и быстрее накапливаются бласты, промиелоциты, миелоциты и метамиелоциты (рис. 3). Заметно медленнее выходят в апоптоз и зрелые клетки (рис. 1—3). Поскольку при дифференцировке все клетки последовательно проходят все стадии, различия в их накоплении и расходовании

при одной и той же исходной концентрации связаны в основном с разными соотношениями скоростей этих процессов в присутствии факторов роста. Так, за быстрой дифференцировкой бластов с их последующим медленным расходом на превращение в продукт следующего этапа дифференцировки следуют быстрое накопление и расходование промиелоцитов, сравнительно длительное накопление миелоцитов и их весьма медленное превращение в метамиелоциты. При этом наблюдается более быстрое расходование последних на следующую стадию созревания и гибель клеток (рис. 3), особенно в присутствии факторов роста. Введение дополнительных факторов роста демонстрирует уменьшение концентрации всех дифференцирующихся клеток, скорее всего благодаря ускорению расходования клеток, т. е. в результате увеличения скорости каждой последующей стадии дифференцировки, что в итоге ускоряет образование зрелых гранулоцитов и их гибель (рис. 2, б). Ранее показано, что в данных условиях Ph^+ -клетки ПК гибнут по механизму $p53$ -зависимого апоптоза (Герасимова и др., 2002).

На рис. 3, а, б видны различия в действии факторов роста на клетки, различающиеся по стадиям дифференцировки. Так, бласты накапливаются и расходуются в среде с факторами быстрее (максимум в 1-е сут, рис. 3, б), чем без факторов (максимум на 3-и сут; рис. 3, а). Миело-

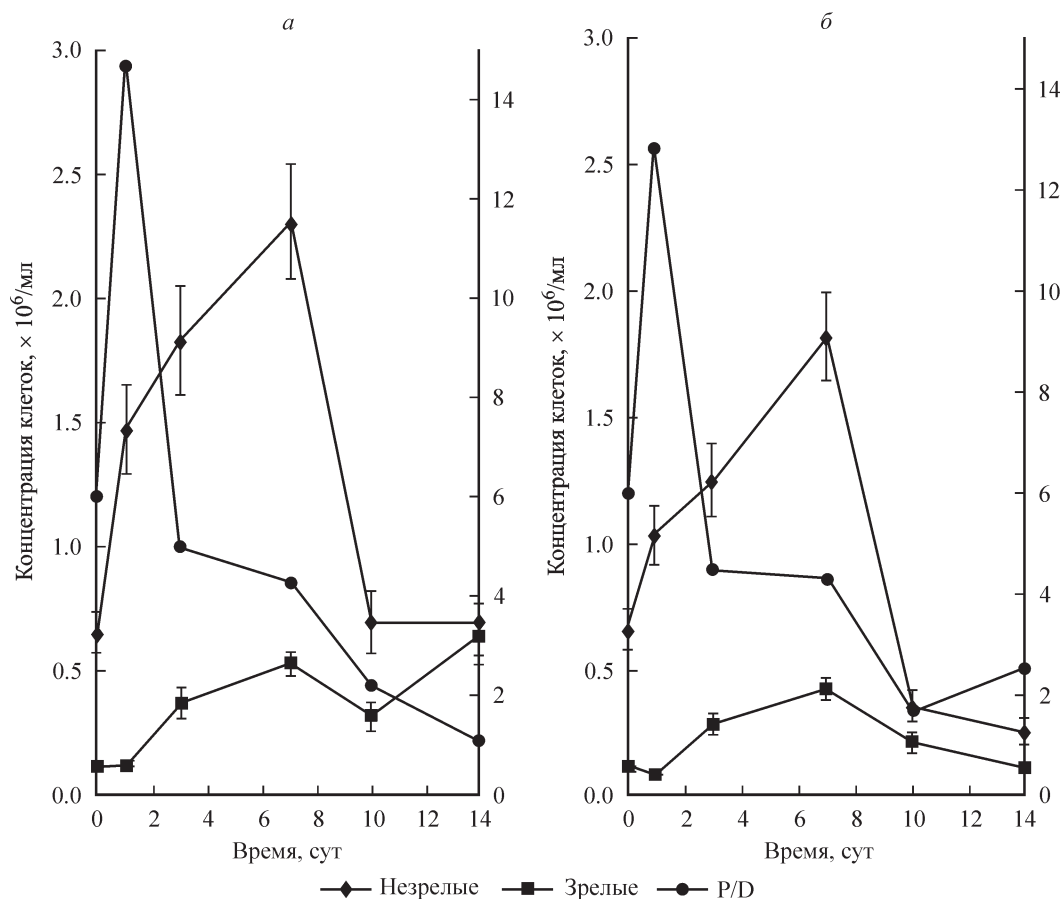


Рис. 4. Кинетика изменения индекса P/D при культивировании Rh^+ -моноклеаров без факторов роста (а) и в присутствии факторов роста (б).

Вторая ордината P/D выражает отношение пролиферирующих и дифференцирующихся в процессе деления гранулоцитов (незрелых, P) к гранулоцитам, дифференцирующимся без деления (созревающим и зрелым нейтрофилам, D). Значения а и б те же, что и в подписи к рис. 1.

циты и их потомки (в присутствии факторов роста и без них) дифференцируются, накапливаясь и расходуясь все время с 1-х по 10-е сут культивирования, максимальной концентрации миелоциты достигают к 7-м сут (рис. 3). Это указывает на высокую скорость образования миелоцитов и весьма низкую скорость их превращения в метамиелоциты, лимитирующую процесс дифференцировки. Тем временем промиелоциты в присутствии факторов практически не накапливаются, что означает более высокую скорость их дифференцировки в миелоциты по сравнению со скоростью их образования из миелобластов.

Наблюдаемое влияние факторов роста на гибель клеток (рис. 1—3) выявляет гибель около 10 % клеток при максимальном накоплении бластов через 1—3 сут и гибель 12 % клеток при максимальном накоплении миелоцитов на 7-е сут. В стадии накопления зрелых клеток (от 10 до 14 сут культивирования) доля гибнущих клеток достигает 30—70 % т. е. наблюдается значительная активация гибели факторами роста. Другие миелоидные клетки — моноциты и макрофаги, образующиеся в незначительных количествах, — также активируются факторами роста с максимумом накопления на 3-и и 10-е сут (результаты не приведены).

Полученные результаты показывают, что в культуре Rh^+ -моноклеары из ПК при ХМЛ пролиферируют и дифференцируются в соответствии со схемой миелопоэза и гранулоцитопоэза при ХМЛ *in vivo* (Котельников и др.,

1982; Козинец, Котельников, 1983; Melo, 1996; Розмарин, Шульман, 2000; Чертков, Дризе, 2001; Воробьев, 2002).

При гемопоэзе соотношение количества клеток пролиферирующих (незрелых клонирующихся и дифференцирующихся с делением) к условно зрелым (дифференцирующимся и созревающим без деления) определяют как индекс созревания (Воробьев, 2002). На рис. 4 приведены кинетические кривые накопления и расходования незрелых делящихся Rh^+ -гранулоцитов (бластов, промиелоцитов и миелоцитов), P , к созревающим без деления метамиелоцитам и зрелым палочкоядерным и сегментоядерным нейтрофилам, D , а также изменения их отношения, P/D , при культивировании Rh^+ -клеток. Видно, что за 1-е сут индекс P/D растет, затем падает — сначала резко, затем медленнее. При этом пик максимальных значений индекса совпадает с пиком дифференцировки бластов и промиелоцитов, а уменьшение P/D на 3-и и 7-е сут соответствует максимуму накопления миелоцитов (рис. 3). Видно (рис. 4), что пик P/D соответствует активной пролиферации клеток в начале культивирования, которая включает в себя накопление клеток-предшественников миелоцитов (бластов и промиелоцитов), быстро завершающееся через 3—4 сут. При этом пик активной дифференцировки лимфобластов совпадает с пиком P/D для гранулоцитов (рис. 1). Кроме того, максимумы наблюдаемого незначительного по величине накопления моноцитов и макрофагов в присутствии факторов также смещаются от 1-х к

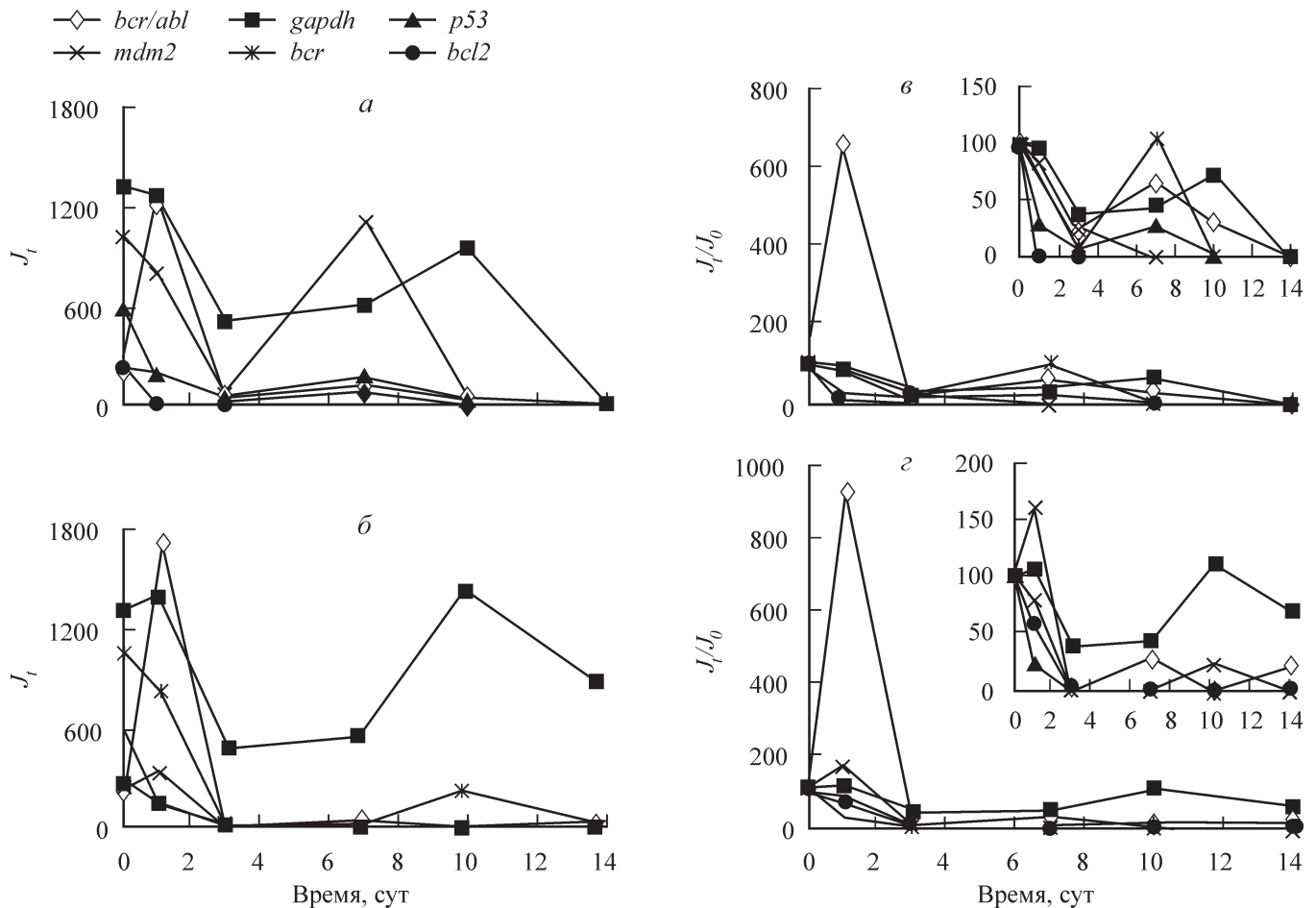


Рис. 5. Кинетические кривые интенсивности флуоресценции J_t (а, б) и относительных величин J_t/J_0 , % (в, г), полос амплификатов после электрофореза для кРНК *bcr/abl*, *bcl2*, *mdm2*, *p53*, *bcr* и *gapdh*, полученных при RT-PCR суммарных РНК из проб Ph⁺-моноклеаров в процессе культивирования без факторов роста (а, в) и с факторами роста (б, г).

По осям абсцисс — время культивирования, сут; по осям ординат — J_t (а, б) и J_t/J_0 , % (в, г); J_t (а, б) — интенсивность флуоресценции полос амплификатов кДНК после электрофореза; J_t/J_0 , % (в, г) — уровни амплификатов, кДНК / мРНК, J_t , относительно этих величин в начальный момент времени культивирования J_0 в строго одинаковых условиях (см. раздел «Материалы и методики»). J_t/J_0 (в, г на врезках сверху) приведены в более крупном масштабе, за исключением J_t/J_0 *bcr/abl* для 1-х и 2-х сут культивирования.

3-м сут (результат не показан). Таким образом, падение P/D характеризует смену преимущества пролиферации на преимущество дифференцировки клеток с уменьшением числа делений.

Отметим, что P/D растет при культивировании от 10 до 14 сут в среде с факторами роста после предыдущего падения, указывая на новую активацию пролиферации (рис. 4, б), которая наблюдается при резком падении концентрации клеток на порядок в том же интервале времени культивирования (рис. 3). Изменения P/D (рис. 4) во времени показывают, что соотношение числа дифференцирующихся клеток с делением к клеткам, дифференцирующимся без деления при 0, 3 и 7, 10 и 14 сут культивирования, составляет 6:15:5:4:2:1 без факторов и 6:13:4:4:2:3 с факторами соответственно. Это согласуется с известной способностью клеток-предшественников одновременно к клонированию и дифференцировке (Котельников и др., 1982; Козинец, Котельников, 1983; Чертков, Дризе, 2001; Holyoake et al., 2001, 2002; Passegué et al., 2003; Guzman, Jordan, 2004; Jamieson et al., 2004). Так, переходу от миелоцитов к метамиелоцитам на 7—10-е сут культивирования на рис. 4 соответствует изменение P/D на 2 акта деления, что согласуется с первым делением — превращени-

ем в метамиелоцит (Котельников и др., 1982; Козинец, Котельников, 1983).

На рис. 5 представлены кинетические кривые изменения флуоресценции J_t полос амплификатов кДНК и их относительных значений (J_t/J_0) для мРНК *bcr/abl*, *bcl2*, *mdm2*, *p53*, *bcr* и *gapdh* после электрофореза, полученных при RT-PCR суммарной РНК Ph⁺-моноклеаров из проб клеток, отбираемых в процессе культивирования. Гены *bcr/abl*, *bcl2* и *mdm2*, как известно, блокируют апоптоз (Bedi et al., 1995; Melo, 1996), который в Ph⁺-клетках ХМЛ опосредован геном *p53* (Герасимова и др., 2002). Видно, что значения J_t и J_t/J_0 полос амплификатов почти всех мРНК меняются по ходу культивирования, в том числе для мРНК *gapdh*, применяемого обычно в качестве внутреннего стандарта. Изменения уровня транскрипции *gapdh* в гемопоэтических клетках известны (Bustin, 2000). Поэтому в данной работе анализировали кинетические изменения относительных уровней флуоресценции полос амплификатов J_t/J_0 после электрофореза (рис. 5, в, г), получаемых сравнением флуоресценции J_t каждого амплификата относительно флуоресценции RT-PCR амплификата той же мРНК в начальный момент культивирования (исходное значение J_0) в строго одинаковых условиях

концентраций, объемов, разбавлений проб для RT, PCR и электрофореза (см. также раздел «Материал и методика»). Т. е. в качестве внутреннего стандарта использовали исходный уровень мРНК и по относительным уровням амплификатов (J_t/J_0) судили об относительных уровнях соответствующих мРНК и, следовательно, об изменениях транскрипции генов.

Видно (рис. 5, в, з), что пик активной транскрипции *bcr/abl* и *mdm2* совпадает с пиком активации пролиферации клеток на первом этапе в 1-е сут культивирования (рис. 4). Транскрипция гена *bcr/abl* в этот момент увеличивается в 6.5 и 8.5 раза относительно нулевого уровня транскрипции (рис. 5, в, з). Для сравнения разных изменений транскрипции генов в процессе культивирования результаты приведены в двух масштабах. На рис. 5, в, з (врезка) видно, что транскрипция исследуемых генов в процессе культивирования меняется и зависит от факторов роста по-разному, что требует отдельного исследования. Антиапоптотические гены *bcr/abl*, *bcl2* и *mdm2* активны в 1—3-и сут. После 3-х сут транскрипция *bcl2* и *mdm2* практически незаметна, уровень *p53* понижается до 25 %; к 7-м сут несколько увеличиваются уровни мРНК *p53*, *bcr/abl* и *bcr*, достигая 25, 50 и 100 % от исходных соответственно. При действии факторов роста кроме максимальной транскрипции *bcr/abl* в 1-е сут наблюдается максимум транскрипции на 7-е, а на 14-е сут культивирования заметен небольшой рост транскрипции *bcr/abl* (рис. 5, з, врезка). Это согласуется с максимальной пролиферацией бластов, дифференцировкой миелоцитов (максимум на 7-е сут; рис. 3) и новым этапом пролиферации Ph⁺-клеток с новым ростом индекса *P/D* (рис. 4) соответственно. В отсутствие факторов роста на рис. 5, в (врезка) видны только 1-й и 2-й максимумы транскрипции *bcr/abl*. Эти результаты представляют интерес в связи с данными (Buckle et al., 2000) об активации экспрессии *bcr/abl* при пролиферации примитивных гемопоэтических клеток. Отметим также свидетельства значеня экспрессии *bcr/abl* в самоподдерживающихся ЛСК через активацию СТАТ3-фактора, являющегося маркером клеток, способных к самоподдержанию (Corro et al., 2003).

Таким образом, результаты исследования кинетики клеточных функций при культивировании Ph⁺-моноклеаров из ПК, полученных при первичном диагнозе ХМЛ, позволяют заключить, что дифференцировка Ph⁺-клеток в культуре протекает по известной схеме усиленного миелопоэза, характерного для хронического миелолейкоза *in vivo*. В культуре 3/4 всех Ph⁺-моноклеаров составляют клетки миелоидного ростка кроветворения, до 95 % которых представляют дифференцирующиеся гранулоциты. Пролиферация и дифференцировка протекают с максимальным накоплением миелоцитов. Кинетика культивирования выявляет также гибель клеток на отдельных стадиях дифференцировки: гибель пролиферирующих клеток, миелоцитов и зрелых клеток в конце дифференцировки. Кинетика индекса *P/D* — отношения числа незрелых Ph⁺-гранулоцитов, дифференцирующихся с делением (бласты, промиелоциты и миелоциты), к дифференцирующимся без деления метамиелоцитам и зрелым нейтрофилам — выявляет характер пролиферации: активную пролиферацию в начале культивирования и новый этап пролиферации в конце при значительном падении концентрации D-Ph⁺-клеток и в присутствии факторов роста. Максимум транскрипции антиапоптотических генов *bcr/abl* и *mdm2* совпадает с пиком пролиферации Ph⁺-гранулоцитов в начале и актива-

цией пролиферации в конце культивирования. Пролиферация, дифференцировка и апоптоз Ph⁺-гранулоцитов, в том числе новый этап пролиферации в конце культивирования, заметно ускоряются факторами роста.

Обсуждение

Сложные механизмы кроветворения включают в себя пролиферацию, многоэтапную дифференцировку с делением клеток, созреванием клеток без деления и активным апоптозом зрелых клеток (Натан, Зифф, 1994; Владимирская, Румянцев, 2000; Чертков, Дризе, 2001; Holyoake et al., 2002; Passegué et al., 2003; Guzman, Jordan, 2004; Jamieson et al., 2004). Все эти процессы регулируются многочисленными генами и гемопоэтическими факторами роста — цитокинами (Lotem, Sachs, 1996; Holyoake et al., 2001; Passegué et al., 2003; Guzman, 2004; Jamieson et al., 2004). Имеются данные о том, что D-Ph⁺-клетки при ХМЛ, в которых экспрессируется p210^{bcr/abl} тирозинкиназа, будучи трансформированными, мало зависят от факторов роста (Lotem, Sachs, 1996; Melo, 1996; Jaiswal et al., 2003). Можно ожидать, что такие клетки становятся факторнезависимыми в результате превращения в злокачественные лейкозные клетки, неспособные к дифференцировке. В Ph⁺-клетках благодаря экспрессии тирозинкиназы p210^{bcr/abl} многие белки фосфорилируются, в том числе факторы транскрипции и СТАТ-белки (Signal Transducers and Activators of Transcription). Фосфорилированные СТАТ-белки димеризуются, затем транспортируются в клеточное ядро и, взаимодействуя с респонсивными элементами ДНК, активируют транскрипцию многих генов, часто иных, чем в Ph⁺-клетках. В итоге изменяются многие пути сигнальной трансдукции (Shuai et al., 1996; Niwa et al., 1998; De Groot et al., 1999; Gesbert, Griffin, 2000; Sil-laber et al., 2000; Passegué et al., 2003; Guzman, Jordan, 2004; Jamieson et al., 2004). Это ведет к изменению зависимости от факторов роста, подавлению кроветворения одними факторами роста и активации его под действием других, а также, вероятно, к превращению клеток в не зависящие от факторов роста.

Результаты данной работы показывают в первую очередь значительные перспективы использования краткосрочного культивирования Ph⁺-клеток для изучения закономерностей функционирования D-Ph⁺-клеток и превращения этих клеток в злокачественные лейкозные Ph⁺-клоны с помощью анализа кинетики клеточных функций и транскрипции генов, регулирующих исследуемые процессы в культуре. В частности, в данной работе при применении такого подхода оценены закономерности пролиферации, дифференцировки и отчасти гибели клеток и транскрипции антиапоптотических генов при 14-суточном культивировании D-Ph⁺-клеток, а также исследовано влияние факторов роста (ИЛЗ и Г-КСФ) на разные стадии описываемых процессов. При этом обнаружены весьма тонкие особенности закономерностей и новые явления в дифференцировке, пролиферации и транскрипции генов D-Ph⁺-клеток. Например, выявлен новый этап пролиферации клеток в конце культивирования после уменьшения концентрации D-Ph⁺-клеток на порядок (рис. 4, б), установлено, что активность транскрипции антиапоптотических генов связана с пролиферирующими клетками и зависит от стадии дифференцировки (рис. 3—5). Кроме того, скорости отдельных этапов дифференцировки с факторами роста и без них (в том числе скорости накоп-

ления и расходования клеток одного вида) меняются асинхронно (рис. 3, а, б); уменьшение скорости расходования (скорости следующей стадии дифференцировки) ведет к увеличению концентрации, в данном случае миелоцитов. Из этого следует, что не только торможение апоптоза, но и изменение скоростей отдельных стадий дифференцировки и даже скоростей накопления или расходования продукта одного вида дифференцировки может приводить к накоплению отдельных типов D-Ph⁺-клеток, и не обязательно на стадии зрелых клеток.

Полученные результаты также показывают (рис. 3 а), что к 10-м сут культивирования без факторов роста дифференцировка и гибель клеток как будто завершаются, а к 14-м сут концентрация клеток начинает расти (в том числе бластов, миелоцитов, метамиелоцитов и зрелых гранулоцитов). Это явление может быть связано с недостатком факторов роста и разным замедлением разных стадий дифференцировки.

Неожиданная активация роста клеток после 10 сут культивирования с факторами роста может быть следствием активации пролиферации ЛСК, ранее находившихся в G₀-фазе клеточного цикла. Известно, что ЛСК сами способны вызывать аутокринную секрецию цитокинов и тем активировать пролиферацию CD34⁺-клеток ХМЛ, находившихся в G₀-фазе клеточного цикла и определяющих их способность к самоподдержанию (Holoake et al., 2001).

Отметим, что кинетические данные выявляют неточности морфологических определений. Сравнение кинетических кривых дифференцировки бластов с факторами и без них (рис. 3, а, б) позволяет предполагать, что эти кривые отражают дифференцировку по меньшей мере смеси двух типов клеток — бластов с максимумом накопления в 1-е и на 3-и сут культивирования. Кривая на рис. 3, а (без факторов роста), по-видимому, суммирует накопление и расходование миелобластов в результате дифференцировки, а кривая на рис. 3, б с факторами роста демонстрирует деление клеток с максимумом на 3-и сут (только или преимущественно). К этому времени клетки с максимальным накоплением в 1-е сут, вероятно, успевают поделиться. Кривая накопления и расходования лимфоцитов (рис. 1) демонстрирует более быстрое накопление клеток в присутствии факторов (максимум в 1-е сут), чем без факторов с максимумом на 3-и сут, что указывает на дифференцировку присутствующих в виде примеси предшественников, морфологически неотличимых от лимфоцитов.

Интересно, что обнаруженная активная экспрессия онкогена *bcr/abl* при одновременной активной пролиферации и дифференцировке бластов в течение 1—3 сут и его небольшая экспрессия при накоплении миелоцитов с 3-х по 7-е сут (рис. 5) не способствовали появлению независимости клеток на этой стадии от факторов. Это может указывать на то, что активная пролиферация в начале культивирования присуща D-Ph⁺-клеткам, а не ЛСК.

Неожиданным и наиболее интересным результатом исследования представляется выявление в конце культивирования (10—14-е сут) нового этапа пролиферации клеток (вероятно, недифференцирующихся Ph⁺-клеток), протекающего при значительном уменьшении концентрации D-Ph⁺-клеток и в присутствии факторов роста (рис. 4, б). Эти пролиферирующие клетки, вероятно, являются лейкозными бластами — Ph⁺-клетками с блоком дифференцировки. Они не проявляют свойств быстрой и активной пролиферации, обнаруживающейся в начале культивиро-

вания (1—3-и сут) и сопровождающейся дифференцировкой с ее быстрым ростом и падением индекса *P/D* (рис. 4, а, б). Пролиферация клеток в конце культивирования (на 10—14-е сут) за тот же период протекает с медленным увеличением *P/D*, не сопровождается ростом концентрации незрелых гранулоцитов и нуждается в присутствии факторов роста (рис. 4, б). Этому этапу пролиферации предшествует уменьшение концентрации D-Ph⁺-клеток на порядок (рис. 1, б; 3, б). Их концентрация в отсутствие факторов падает в 4 раза (рис. 3, а); на рис. 4, а роста *P/D* не наблюдается. Можно предполагать, что значительное уменьшение концентрации D-Ph⁺-клеток стимулирует пролиферацию покоящихся клеток (например, клеток в G₀-фазе клеточного цикла). Такими клетками могут быть Ph⁻ СКК или Ph⁺ ЛСК, которые способны к самоподдержанию (Holoake et al., 2001, 2002; Passeur et al., 2003; Guzman, Jordan, 2004; Jamieson et al., 2004).

Совокупность данных о зависимости дифференцировки и гибели исследуемых Ph⁺-моноклеаров от факторов роста свидетельствует о том, что они представлены в основном D-Ph⁺-клетками. Если в начале культивирования в них содержатся пролиферирующие злокачественные клетки с блоком дифференцировки, то их по крайней мере на 2 порядка меньше, чем D-Ph⁺-клеток. За 14 сут культивирования они не могли бы успеть мутировать в ЛСК. Идентификация клеток нового этапа пролиферации и представляется непростой задачей специального исследования.

Кинетические исследования краткосрочного культивирования Ph⁺-клеток в суспензионной культуре являются весьма информативным подходом для изучения непрерывной регуляции клеточных и молекулярных процессов при хроническом миелолейкозе *in vitro* и скрытого дифференцировочного потенциала Ph⁺-клеток, что позволяет более полно судить о процессе кроветворения при ХМЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-08372-офи).

Список литературы

- Абрамов М. Г. 1985. Гематологический атлас. М.: Медицина. 344 с.
- Владимирская Е. Б. 2001. Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста. В кн.: Биологические основы противоопухолевой терапии. М.: Изд-во Агат-мед. 5—32.
- Владимирская Е. Б., Румянцев А. Г. 2000. Роль ростовых факторов в регуляции кроветворения. Гематология и трансфузиология. 45 (6) : 6—8.
- Воробьев А. И. 2002. Руководство по гематологии. М.: Ньюдиамед. 1 : 280 с.
- Герасимова Л. П., Манакова Т. Е., Ахлынина Т. В., Боровкова Т. В., Духовенская Е. А., Крутов А. А., Зборовский С. С., Мисюрин А. В., Саркисян Г. П., Бульчева Т. И., Найденова Н. М., Тимофеев А. М., Бахмисова Л. В., Туркина А. Г., Хорошко Н. Д., Зарытова В. Ф., Левина А. С., Гринева Н. И. 2002. Экспрессия онкогена BCR/ABL и p53-индуцированный апоптоз в суспензионных культурах гемопоэтических Ph⁺-клеток при хроническом миелолейкозе. Рос. биотерапевтич. журн. 1 (4) : 29—38.
- Козинец Г. И., Котельников В. М. 1983. Кинетика гемопоэза и ее клиническое значение. Советская медицина. 4 : 73—77.

- Котельников В. М., Козинец Г. И., Касаткина В. В., Ковалевская Н. П. 1982. Кинетика гранулоцитопоэза. В кн.: Кинетические аспекты гемопоэза. Томск: Изд-во Томск. гос. ун-та. 149—211.
- Луговская С. А., Почтарь М. Е., Тупицин Н. Н. 2005. Фенотипирование в диагностике гемобластозов. М.; Тверь: Триада. 10—23.
- Натан Д. Г., Зифф К. А. 1994. Регуляция кроветворения. Гематология и трансфузиология. 39 (2) : 3—10.
- Розмарин А. Д., Шульман А. Н. 2000. Лейкоциты. В кн.: Патология физиология крови. М.: BINOM Publ. 123—148.
- Чертков И. Л., Дризе Н. И. 2001. Взлет и падение гематологии за 3/4 века. Гематология и трансфузиология. 46 (3) : 10—14.
- Шульман А. Н. 2000. Злокачественные опухоли кроветворной ткани. В кн.: Патология физиология крови. М.: BINOM Publ. 335—364.
- Bedi A., Barber J. P., Bedi G. C., el-Deiry W. S., Sidransky D., Vala M. S., Akhtar A. J., Hilton J., Jones R. J. 1995. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in CML. Blood. 86 : 1148—1158.
- Bedi A., Zehnauer B. A., Barber J., Sharkis S., Jones R. 1994. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G₂/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. Blood. 83 : 2038—2044.
- Buckle A. M., Mottram R., Pierce A., Lucas G. S., Russell N., Miyajima A., Whetton A. D. 2000. The effect of Bcr-Abl protein tyrosine kinase on maturation and proliferation of primitive haematopoietic cells. Mol. Med. 6 : 892—902.
- Bustin A. S. 2000. Kinetic quantification of mRNA. J. Mol. Endocrinol. 25 : 169—193.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162 : 156—159.
- Coppo P., Bonnet M. L., Dusanter-Fourt I., Millot G., Nogueira M. M., Dugray A., Mitjavila-Garcia M. T., Le Pesteur D., Guilhot F., Vainchenker W., Sainteny F., Turhan A. G. 2003. Constitutive and specific activation of STAT3 by BCR-ABL in embryonic stem cells. Oncogene. 22 : 4102—4110.
- De Groot J. R., Raaijmakers P. A. M., Lammers J.-W. J., Jove R., Koenderman L. 1999. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. Blood. 94 : 1108—1112.
- Deiningner V. N., Vieira S., Mendiola R., Schultheis B., Goldman J. M., Melo J. V. 2000. BCR/ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. Cancer Res. 60 : 2049—2055.
- Era T., Witte O. N. 2000. Regulated expression of P210 Bcr-Abl during embryonic stem cell differentiation stimulates multipotential progenitor expansion and myeloid cell fate. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 97 : 1737—1742.
- Gesbert F., Griffin J. D. 2000. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. Blood. 96 : 2269—2276.
- Goetz A. W., Kuip H., Maya R., Oren M., Aulitzky W. E. 2001. Requirement for MDM2 in the survival effects of BCR/ABL and interleukin 3 in hematopoietic cells. Cancer Res. 61 : 7635—7641.
- Guzman M. L., Jordan C. T. 2004. Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia. Cancer Control. 11 : 97—104.
- Holyoake T. L., Jiang X., Eaves A. C., Eaves C. J. 2002. Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia. Leukemia. 16 : 549—558.
- Holyoake T. L., Jiang X., Jorgensen H. G., Graham S., Alcorn M. J., Laird C., Eaves A. C., Eaves C. J. 2001. Primitive quiescent leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia spontaneously initiate factor-independent growth *in vitro* in association with up-regulation of expression of interleukin-3. Blood. 97 : 720—728.
- Jaiswal S., Traver D., Miyamoto T., Akashi K., Lagasse E., Weissman I. L. 2003. Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100 : 10 002—10 007.
- Jamieson C. H. M., Ailles L. E., Dylla S. J., Muijtjens M., Jones C., Zehnder J. L., Gottlieb J., Li K., Manz M. G., Keating A., Sawyers C. L., Weissman I. L. 2004. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast crisis CML. New England J. Med. 354 : 657—667.
- Lotem J., Sachs L. 1996. Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. Leukemia. 10 : 925—931.
- Melo J. V., 1996. The diversity of the BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. Blood. 88 : 2375—2384.
- Morioka E., Taniguchi S., Okamura S., Shibuya T., Niho Y. 1990. Purification of a granulocyte colone-stimulating factor from the conditioned medium of a subclone of human bladder carcinoma cell line 5637, HTB90. Res. Exp. Med. 190 : 229—238.
- Niwa H., Burdon T., Chambers I., Smith A. 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells via activation of STAT3. Genes and Development. 12 : 2048—2060.
- Passegué E., Jamieson C. H. M., Ailles L. E., Weissman I. L. 2003. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100 : 11 842—11 849.
- Sanchez-Garcia I., Grutz G. 1995. Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92 : 5287—5291.
- Shuai K., Halpern J., ten Hoeve J., Rao X., Sawyers C. L. 1996. Constitutive activation of STAT5 by the BCR/ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. Oncogene. 13 : 247—254.
- Sillaber C., Gesbert F., Frank D. A., Sattler M., Griffin J. D. 2000. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. Blood. 95 : 2118—2122.

Поступила 16 X 2006

KINETICS OF PROLIFERATION, DIFFERENTIATION AND TRANSCRIPTION
OF GENES REGULATING APOPTOSIS IN CULTURED HUMAN *BCR/ABL*⁺ Ph⁺ CELLS

T. V. Akhlynina, L. P. Gerasimova, G. P. Sarkisyan, T. V. Borovkova, E. A. Dukhovenskaya,
T. E. Manakova, N. M. Naydenova, A. M. Timofeev, N. I. Grineva¹

Research Center for Hematology RAMS, Moscow: ¹e-mail: ngrineva@blood.ru

Ph⁺, *bcr/abl*⁺ cells arise due to (9,22) chromosome translocation and Ph⁺ chromosome formation in hematopoietic stem cells. The cells show appreciable apoptosis suppression but retain their ability to differentiate and mature. Ph chromosome, *bcr/abl* oncogene and Ph⁺, *bcr/abl*⁺ cells themselves are the hallmark of chronic myeloid leukemia. Under leukemia progression differentiating Ph⁺, *bcr/abl*⁺ cells transform into leukemic malignant cells with differentiation block. It is assumed to be a result of subsequent mutations or activation of proliferation of long silent Ph⁺ cells arisen previously in the stem cells because of the translocation. Real mechanism

underlying the cell transformation remains unknown. This work was performed to develop a proper cell model allowing us to study functioning of differentiating Ph^+ , bcr/abl^+ cells and their real transformation into malignant cells with block of differentiation. For this purpose we have investigated kinetics of Ph^+ , bcr/abl^+ cells proliferation, differentiation, cell death and transcription of antiapoptotic genes in cultured 14-day of Ph^+ mononuclear cells isolated from peripheral blood of a patient in chronic phase of chronic myeloid leukemia before treatment. The results obtained revealed that Ph^+ cell differentiation proceeded in accord with characteristic scheme of chronic myeloid leukemia *in vivo*. Myeloid cells of hematopoietic cell lineage amounted to 3/4 of live Ph^+ mononuclear cells undergoing accumulation and subsequent consumption in the course of differentiation. 95 % myeloid cells were differentiating Ph^+ granulocytes. The most deal of differentiating Ph^+ cells was myelocytes. The rate ratio of myelocyte accumulation to its subsequent consumption showed that the rate of transformation into metamyelocytes was significantly decreased at this differentiation stage. Ph^+ cells cultivation curves characterized cell death at different differentiation stages. There were observed the cell death of proliferating Ph^+ cells and Ph^+ myelocytes, and intensive death of mature cells as well. *P/D* index, that is ratio of immature Ph^+ granulocytes differentiated by cell dividing (blasts, promyelocytes and myelocytes) to the cells differentiated without dividing (metamyelocytes and mature neutrofiles), revealed active of proliferation at the beginning of cultivation and unexpected new proliferative activity at the end of cultivation in the presence of growth factor. The peaks of antiapoptotic *bcr/abl* gene transcription activity coincided with the observed active proliferation at the beginning and at the end of cultivation. Cell proliferation, differentiation and apoptosis were noticeably accelerated by growth factor treatment. Thus, the study of the Ph^+ cells cultivation kinetics is rather informative approach to investigation of continuous regulation of cellular and molecular processes *in vitro* in the case of chronic myeloid leukemia and allows more complete consideration of Ph^+ , bcr/abl^+ cells hematopoiesis.

Key words: hematopoietic Ph^+ cells in culture, kinetics of cell proliferation, differentiation and apoptosis *in vitro*, RT-PCR *bcr/abl*, *bcl2*, *mdm2*, *p53* mRNA in the total RNA of the Ph^+ cells under chronic myeloid leukemia.
