

ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ КРОВОТВІРНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ПРИ ХРОНІЧНОМУ МІЄЛОЇДНОМУ ЛЕЙКОЗІ ТА ЛЕЙКЕМОЇДНИХ РЕАКЦІЯХ НЕЙТРОФІЛЬНОГО ТИПУ У КУЛЬТУРІ *IN VIVO* ТА *IN VITRO*

Мієлопроліферативні захворювання виникають у результаті непластичної трансформації гемопоетичної стовбурової клітини. На сьогодні накопичено багато даних щодо характеристики трансформованих стовбурових клітин при лейкозах, проте механізми прогресії захворювання та резистентності до лікування все ще вивчені не достатньо. Лейкемоїдні реакції можуть виникнути під час різних патологічних станів та характеризуються схожими до мієлопроліферативних захворювань показниками складу клітинного мозку та периферійної крові, проте ніколи не трансформуються у ту неоплазію, на яку схожі. Надзвичайно актуальною нині залишається і розробка методів розрізнення мієлопроліферативних захворювань (зокрема хронічного мієлоїдного лейкозу – ХМЛ) від лейкемоїдних реакцій. Тому метою цього дослідження було проаналізувати функціональну активність гемопоетичних клітин-попередників при хронічному мієлоїдному лейкозі та лейкемоїдних реакціях нейтрофільного типу різного генезу в культурі клітин *in vivo* та *in vitro*. Отримані дані свідчать про те, що здатність до утворення колоній у клітин-попередників осіб, хворих на ХМЛ, є достовірно вищою від показників при лейкемоїдних реакціях. Результати культуральних досліджень потенційно можуть мати також і диференціально-діагностичне значення.

Ключові слова: гемопоетичні клітини-попередники, хронічний мієлоїдний лейкоз, лейкемоїдні реакції.

Вступ

Дослідження функціонування стовбурових клітин і клітин-попередників посідає чільне місце в гематології, трансфузіології та трансплантології. Це викликано не тільки перспективністю цього напрямку і науковим інтересом, а й практичною необхідністю застосування отриманих даних для диференційної діагностики гематологічних захворювань.

Хронічний мієлоїдний лейкоз (ХМЛ) – це клональне порушення кровотворення, що виникає внаслідок появи генетичних аномалій на рівні гемопоетичної стовбурової клітини. Клональний характер ХМЛ підтверджено завдяки цитогенетичному вивченню колоній клітин кісткового мозку *in vitro* [1].

ХМЛ слід диференціювати від інших гематологічних захворювань, які мають схожу клінічну картину перебігу. До таких належать лейкемоїдні реакції, що не мають клональної природи, проте часто викликають труднощі при диференціальній діагностиці з мієлопроліферативними захворюваннями. Лейкемоїдні реакції (ЛР) – це тимчасові зміни у периферійній крові та органах кровотворення, що нагадують лейкози. Ці порушення у системі крові завжди мають реактивний характер і не трансформуються в ту пухлину, на яку схожі. Вони можуть бути викликані різними

інфекціями, інтоксикаціями, пухлинами, метастазами пухлин у кістковий мозок. Розвиваються лейкемоїдні реакції через стимуляцію клітин-попередників гранулоцитарного ряду цитокінами ІЛ-1, ІЛ-3, ІЛ-5, ТФР- α ; мутацій у клітинах-попередниках при цьому не спостерігається.

Дослідження виконано на базі Центру молекулярних та клітинних досліджень НаУКМА за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень Міністерства освіти і науки України.

Метою роботи був аналіз особливостей функціонування клітин-попередників у нормі та при патологіях кровотворення клональної та неклональної природи у культурах *in vivo* та *in vitro*.

Матеріали та методи

Досліджували кістковий мозок пацієнтів, який отримували шляхом стерильної пункції грудни у хворих, що перебували на стаціонарному лікуванні в гематологічному відділенні № 1 Інституту гематології та трансфузіології АМН України.

Було проведено 135 досліджень біологічного матеріалу *in vitro* та 108 *in vivo* від 27 пацієнтів, з яких 16 – чоловіки, 11 – жінки. Вік пацієнтів коливався від 15 до 53 років, 22 з них хворіли на ХМЛ та 5 мали лейкемоїдні реакції.

Отриманий кістковий мозок культивували *in vivo* шляхом поміщення дифузійних камер із суспензією кісткового мозку у черевну порожнину мишей-самців лінії СВА. Культивування клітин кісткового мозку *in vitro* проводили із використанням гранулоцитарного фактора росту (GM-CSF) концентрацією 50 нг/мл (*Sigma*, USA).

З метою отримання фракції клітин, багатої на моноклеари, отриману раніше суспензію осаджували методом центрифугування протягом 30 хв за 1500 об./хв у градієнті щільності *His-topaque-1077* (*Sigma*, USA). Кількість клітин у суспензії кісткового мозку підраховували меланжерним методом у камері Горяєва із використанням мікроскопа *Zeiss* при збільшенні $\times 400$. Підрахунок кількості живих та мертвих клітин виконували із застосуванням розчину трипанового синього.

Культивування клітин *in vitro* проводили у 24-луночковому планшеті із використанням середовища RPMI-1640 (*Invitrogen*, USA), 20% телячої ембріональної сироватки (*Sigma*, USA), ростового фактора GM-CSF, агару, антибіотиків пеніциліну та стрептоміцину у концентрації 50 Од/мл (*Sigma*, USA) та суспензії клітин кісткового мозку. Використовували бактоагар (*Difco*, USA) із кінцевою концентрацією 0,33 %. Суспензію клітин кісткового мозку додавали таким чином, щоб кінцева їх концентрація відповідала заданій (5×10^5 моноклеарів/мл). Планшет поміщали у CO₂-інкубатор за умов вологості 100 %, концентрації CO₂ 5 % та температури 37 °C.

Культивування клітин *in vivo* проводили у дифузійних камерах. У кожену камеру поміщали 1×10^5 клітин із додаванням середовища RPMI-1640, 10 % телячої ембріональної сироватки, агару та антибіотиків пеніциліну і стрептоміцину у концентрації 50 Од/мл. Використовувався бактоагар *Difco* з кінцевою концентрацією 0,33 %. Культуральну суспензію із клітинами-попередниками вводили шприцом крізь отвір у боковій стінці камери.

Реципієнтами камер були миші-самці лінії СВА віком 6–8 тижнів, масою 15–18 г, яким попередньо вводили циклофосфамід з розрахунку 200 мг на 1 кг маси тіла, що сприяло підвищенню колонієстимулювальної активності і супресії імунологічної реактивності тварини. У кожену мишу поміщали по 2 дифузійні камери. Введення камер проводили попередньо наркотизованим мишам, як анестетик використовували *Sagatal* з розрахунку 20 мг на 1 кг маси тіла. Лінію розрізу зашивали пошарово шовковою ниткою.

Обрахунок результатів проводили через 13 днів із використанням інвертованого мікроскопа *Olimpus* зі збільшенням $\times 100$. При цьому мишей забивали шляхом дислокації шийних хребців,

камери виймали та поміщали у стерильну чашку Петрі.

Колонією вважали скупчення понад 40 клітин. Клітинні агрегати із 20–40 клітин вважали великим кластером. Ефективність колонієутворення (ЕКУ) та кількість колонієтворних одиниць (КУО) вираховували як кількість колоній на 1×10^5 мієлокаріоцитів, під кількістю кластеротвірних одиниць (КЛУО) мали на увазі число кластерів на 1×10^5 мієлокаріоцитів. Проліферативний потенціал визначали як відношення кількості колоній до кількості кластерів.

Для морфологічної та цитохімічної оцінки клітин, які складають клон, агар переносили на скло та розділяли тонкими голками. Колонії індивідуально виділяли із шару бактоагару за допомогою мікропіпетки варіабельного обсягу та ресуспендували у середовищі RPMI-1640. Препарати виготовляли на центрифугі *Cytospin-3* (*Shandon*, UK) протягом однієї хвилини за 500 об./хв, підсушували на повітрі та забарвлювали за методом Папенгейма [2].

Підрахунок кількості колоній та індивідуальне їх виділення з метою створення препаратів у випадку системи культивування клітин кісткового мозку *in vitro* проводили аналогічно до описаного вище.

Для статистичної обробки результатів використовували програму MS Excel. Для визначення статистичної достовірності показників використовували критерій Стьюдента. Різницю вважали достовірною на рівні значущості 5 % ($p \leq 0,05$).

Результати та обговорення

Дослідження морфологічних та цитокінетичних характеристик мієлопроліферативних захворювань є на сьогодні надзвичайно важливим. Частота їх залишається високою, а механізми виникнення та розвитку вивченими недостатньо [3]. Відрізнити патології кровотворення, які мають клональну природу, від гематологічних захворювань, що не є клональними, часто доволі складно через схожість показників периферійної крові та кісткового мозку при обох цих станах [4]. Тому надзвичайно актуальним при гематологічних патологіях залишається вивчення клітин-попередників гемопоєзу, оскільки саме на їх рівні відбувається генетичні порушення, що призводять до розвитку клональних захворювань.

Дані закордонних та вітчизняних авторів щодо результатів культивування клітин кісткового мозку при хронічному мієлолейкозі неоднозначні. Описано випадки, коли кількість колонієтворних одиниць (КУО) при культивуванні клітин кісткового мозку пацієнтів, що страждають на це захворювання, збільшувалась у 200 000 разів

[5]. За даними інших авторів, колонієутворення при ХМЛ є дещо інтенсивнішим, або залишається на нормальному рівні [6].

З метою виявлення особливостей колоніє- та кластероутворення в культурі проводили кількісний облік та аналіз морфологічного складу клітинних агрегатів, що утворились в напіврідкому середовищі в результаті 13-добового культивування клітин кісткового мозку хворих на хронічний мієлоїдний лейкоз у культурах *in vivo* та *in vitro*. Вираховували середнє значення КУО та КлУО, отримані в результаті культивування одного зразка матеріалу паралельно у 4 дифузійних камерах *in vivo* та у 5 культурах *in vitro* з додаванням GM-CSF.

Аналіз особливостей росту гемопоетичних клітин хворих на хронічний мієлолейкоз показав, що у всіх випадках культивування спостерігалось інтенсивне утворення колоній, кількість яких у декілька разів перевищувала колонієутворення у пацієнтів із лейкемоїдними реакціями. Значення кількості колоній варіювало у межах від 97 до 140 на 1×10^5 мієлокаріоцитів.

Кількість кластерів до 13-го дня культивування знижувалась та коливалась від 48 до 79 на 1×10^5 мієлокаріоцитів, чи від 140,3 до 246,48 на 1 мкл кісткового мозку. Середні значення КУО-ГМ та КлУО на 1×10^5 , КУО-ГМ на 1 мкл наведено у табл. 1.

Таблиця 1. Результати культивування клітин кісткового мозку у пацієнтів з різними станами кровотворення

Показник	Хронічний мієлолейкоз	Лейкемоїдні реакції	Гематологічно здорові пацієнти
	M±m,n=198	M±m,n=45	M±m
КУО-ГМ на 1×10^5	124,9±15,43*	33,54±2,29	35,12±7,5*
КлУО на 1×10^5	64,82±8,64	67,86±4,37	75,13±4,55
КУО-ГМ на 1 мкл	330,44±58,91*	34,57±5,68	37,93±6,54*
КлУО на 1 мкл	172,22±35,87*	68,23±9,18	86,39±8,35*
Проліферативний потенціал	1,95±0,26*	0,5±0,09	0,47±0,11*

* Дані достовірно відрізняються, $p < 0,05$.

Проліферативний потенціал також був вищий у пацієнтів, хворих на хронічний мієлолейкоз, порівняно із нормою, що є показником клональної природи цього захворювання та наявності мутації на рівні ранньої клітини-попередника.

В агарових культурах *in vivo* та *in vitro* було досліджено кістковий мозок 5 пацієнтів, картина крові яких нагадувала хронічний мієлолейкоз із зсувом у лейкограмі до мієлоцитів та промієлоцитів. У 4 випадках було діагностовано лейкемоїдну реакцію нейтрофільного типу, а в одному –

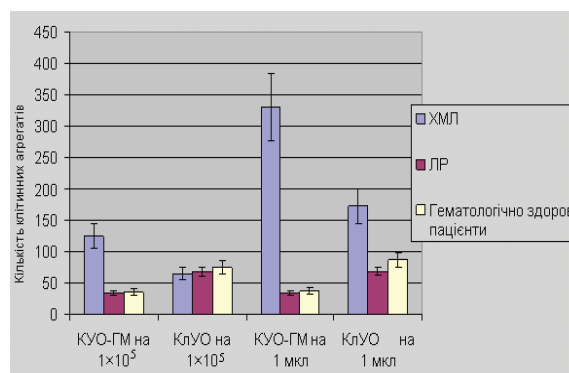


Рис. 1. Результати культивування клітин кісткового мозку пацієнтів із гематологічними захворюваннями

еозинофільного типу. Двоє з пацієнтів були хворими на туберкульоз легень у фазі інфільтрації та розпаду, один – на рак легень та один – на хворобу Вергольфа, у одного хворого лейкемоїдна реакція була пов'язана з прийомом сульфаніламідів.

Результати клонування клітин кісткового мозку цієї групи хворих у агарових культурах коливались в межах від 29 до 38 колоній на 1×10^5 мієлокаріоцитів, що свідчило про нормальну ефективність колонієутворення.

Середні значення ЕКУ дорівнювали $33,54 \pm 2,29$, КлУО – $67,86 \pm 4,37$ на 1×10^5 мієлокаріоцитів чи відповідно $34,57 \pm 5,68$ та $68,23 \pm 9,18$ на 1 мкл кісткового мозку. Середнє значення ефективності колонієутворення (рис. 1) не відрізнялось від відповідного показника у гематологічно здорових пацієнтів ($p < 0,05$). Відмічено певне зростання кількості кластеротвірних одиниць у культурах порівняно із нормальними показниками. Деякі автори [7] пояснюють це підвищенням активності більш комітованих клітин-попередників, що викликано їх стимулюванням відповідними ростовими факторами.

З метою виявлення особливостей кровотворення при хронічному мієлолейкозі, а також при лейкемоїдних реакціях різного генезу, вивчали морфологію клітин, що склали клітинні агрегати у агарових культурах *in vitro* та *in vivo*. Було досліджено препарати, виготовлені із використанням цитоцентрифуги та забарвлені за Папенгеймом.

Аналіз отриманих даних свідчив про те, що колонії містили клітини гранулоцитарного ряду на різних стадіях дозрівання: метамієлоцити, паличкоядерні, сегментоядерні нейтрофіли, а також мононуклеари [8]. У колоніях, утворених в результаті культивування клітин-попередників хворих на хронічний мієлолейкоз, виявлялись баластні клітини. На 13-ту добу культивування колонії на 90 % склались із нейтрофільних гранулоцитів на різних стадіях дозрівання.

Таким чином, при дослідженні зразків кісткового мозку, отриманих від пацієнтів, хворих

на хронічний мієлолейкоз, було виявлено достовірне підвищення рівня колонієутворення та проліферативного потенціалу, порівняно із результатами дослідження кісткового мозку пацієнтів із лейкемоїдними реакціями (рис. 1). При дослідженні морфологічного скла-

ду клітин з клітинних агрегатів було виявлено значне підвищення рівня незрілих клітин-попередників. Загалом отримані нами результати підтверджують літературні дані щодо моноклонової природи хронічного мієлолейкозу [9].

1. Домрачева Е. В. Роль цитогенетических исследований при лечении ХМЛ ингибиторами тирозинкиназ / Е. В. Домрачева, Е. А. Асеева // Гематология и трансфузиология. – 2007. – Т. 52, № 2. – С. 25–28.
2. Білько Н. М. Методи експериментальної гематології / Н. М. Білько. – К. : Видавничий дім «Києво-Могилянська академія», 2006. – 66 с.
3. Третьяк Н. М. Гематология / Н. М. Третьяк. – К. : Зовнішня торгівля, 2005. – 240 с.
4. Романова А. Ф. Катионные белки и фагоцитарная активность эозинофилов у больных с хроническим миелолейкозом и лейкемоидными реакциями эозинофильного типа / А. Ф. Романова, И. С. Дягиль // Врачебное дело. – 1988. – № 11. – С. 60–61.
5. Bhatia R. Chronic myelogenous leukemia primitive hematopoietic progenitors demonstrate increased sensitivity to growth factor-induced proliferation and maturation / R. Bhatia, H. A. Munthe, A. D. Williams // Experimental Hematology. – 2000. – Vol. 28, № 12. – P. 1401–1412.
6. Ferrero D. Growth advantage of chronic myeloid leukemia CFU-GM in vitro / D. Ferrero, C. Foli, F. Giaretta // Leukemia. – 2001. – №. 15. – P. 422–429.
7. Tefferi A. How to interpret and pursue an abnormal complete blood cell count in adults / A. Tefferi, C. A. Hanson, D. J. Inwards // Mayo Clinic Proceedings. – 2005. – Vol. 80, № 7. – P. 923–936.
8. Диагностика лейкозов. Атлас и практическое руководство / Под ред. Д. Ф. Глузмана. – К. : «Морион», 2000. – 224 с.
9. Nissen-Druey C. Human Hematopoietic Colonies in Health and Disease / C. Nissen-Druey, A. Tichelli, S. Meyer-Monard // Acta haematologica. – 2005. – Vol. 113, № 1. – P. 72–92.

N. Bilko, I. Dyagil, M. Diachenko, D. Bilko, I. Borbulyak

FUNCTIONING OF HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS IN CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA AND NEUTROFILIC TYPE LEUKEMOID REACTIONS IN THE IN VIVO AND IN VITRO CELL CULTURE

Myeloproliferative diseases arise as a result of neoplastic transformation of a hematopoietic stem cell. To date, a lot of data collected about different characteristics of malignant stem cells in leukemia, but the mechanisms of disease progression and treatment resistance remain unstudied. Leukemoid reactions can occur during different pathological states and are characterized by similar cellular rates in bone marrow and blood as myeloproliferative diseases, but they are not malignant and never progress into the illness they imitate. New methods development for distinguishing myeloproliferative diseases (including Chronic Myelogenous Leukemia – CML) from leukemoid reactions is also extremely relevant today. Therefore, the aim of investigation was to analyze functional activity of blood progenitor cells in CML and neutrofilic type leukemoid reactions of different genesis with application culture models in vitro and in vivo. Colony forming capacity of hemopoietic progenitors of persons with CML is significantly higher compare to leukemoid reaction. Obtained results can be suggested to have diagnostical significance.

Keywords: *hematopoietic progenitor cells, chronic myeloid leukemia, leukemoid reactions.*

УДК 612.616.2

Бараш О. О., Зукін В. Д., Білько Н. М.

ОСОБЛИВОСТІ БУДОВИ ЧОЛОВІЧИХ СТАТЕВИХ КЛІТИН І РЕЗУЛЬТАТИВНІСТЬ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ

Причиною безпліддя подружньої пари у майже половині всіх випадків є чоловічий фактор. Лікування пар з чоловічим непліддям є складним і комплексним питанням сучасної репродуктології. Для покращення ефективності лікування таких пацієнтів було розроблено метод IMSI (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection), що дозволяє проводити морфологічний відбір сперматозоїдів для запліднення in vitro на збільшенні до ×6300.

© *Бараш О. О., Зукін В. Д., Білько Н. М., 2010*