

УДК 576.3:616-006.446

Клеточная регуляция пролиферации и дифференцировки *ex vivo* клеток, содержащих Ph хромосому, при хроническом миелолейкозе

Н.И. Гринева*, Т.В. Ахлынина, Л.П. Герасимова, Т.Е. Манакова, Т.Г. Сарычева, Д.А. Шмаров, А.М. Тимофеев, Н.М. Найденова, Л.Ю. Колосова, Т.И. Колошейнова, Л.Г. Ковалева, С.В. Кузнецов, А.В. Воронцова, А.Г. Туркина

Гематологический научный центр Российской академии медицинских наук, Москва, 125167, Новый Зыковский пр-д, 4а

*E-mail: nigrin27@mail.ru

РЕФЕРАТ Обнаружена и изучена регуляция пролиферации и дифференцировки Ph⁺клеток от разных больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) *ex vivo*. Регуляция осуществляется при чередовании эффективных этапов пролиферации и созревания с ингибированием пролиферации Ph⁺клеток накапливающимися нейтрофилами при блокировании апоптоза. Чередование этапов состоит в переключении этапа 1 – эффективной пролиферации на этап 2 – эффективного созревания и протекает по схемам: 1/2–1/2/1 или 2/1–2/1/2/1. Кинетические кривые чередований проходят контрольные точки пересечения кривых, в которых показатели этапов пролиферации и созревания одинаковы. Индексы эффективности P/D равны 1.06 ± 0.23 , они не зависят от времени, порядка чередования и от источников Ph⁺клеток – больных ХМЛ. На этапах пролиферации повышено содержание пролиферирующих клеток, понижено содержание нейтрофилов и индуцирован апоптоз. На этапах созревания, напротив, апоптоз блокирован, повышено содержание нейтрофилов и понижено содержание незрелых. При этом нейтрофилы в повышенной концентрации ингибируют пролиферацию Ph⁺клеток и нарушают свое созревание инверсией порядка созревания нейтрофилов, вероятно, по механизму обратной связи. Различия в регуляции выявляют три типа Ph⁺клеток больных ХМЛ, которые отличаются числом и продолжительностью этапов чередования. Ph⁺клетки 1-го и 2-го типов характеризуются одним длительным этапом эффективной пролиферации или эффективного созревания с индексами эффективности $P/D^1 = 1-20$ или $P/D^2 \leq 1$. Для Ph⁺клеток 3-го типа за тот же период чередование этапов протекает неоднократно с $P/D^1 = 1-4$ или $P/D^2 \leq 1$. Ph⁺клетки 1-го типа (~ 20 %) выделены от больных в прогрессирующих стадиях ХМЛ, Ph⁺клетки 2-го и 3-го типов (~ 30 и 50 %) – от больных в хронической фазе ХМЛ с положительной реакцией на химиотерапию ХМЛ.

Ключевые слова: регуляция пролиферации и дифференцировки Ph⁺клеток зрелыми нейтрофилами, культивирование гемопоэтических Ph⁺моноклеаров, кинетика пролиферации и дифференцировки Ph⁺клеток *in vitro*, апоптоз Ph⁺клеток, распределение Ph⁺клеток в фазах клеточного цикла, эффективность пролиферации и дифференцировки Ph⁺клеток, инверсия порядка накопления созревающих нейтрофилов, хронический миелолейкоз.

Список сокращений: ПД – пролиферация и дифференцировка; ХМЛ – хронический миелолейкоз; Ph – Филадельфийская хромосома; СЯ, ПЯ, ММ – нейтрофилы сегментоядерные, палочкоядерные и метамиелоциты; Ph⁺клетки – гемопоэтические (кроветворные) клетки, содержащие Филадельфийскую хромосому; ПК – периферическая кровь; КМ – костный мозг; ХФ, ФА, БК – хроническая фаза, фаза акселерации и бластный криз ХМЛ; ЭТС – эмбриональная сыворотка теленка.

ВВЕДЕНИЕ

Лейкозы составляют 1 % всех причин смертности населения и 4–10 % смертности от злокачественных новообразований. Встречаемость лейкозов и лимфом колеблется от 3 до 9 на 100 тыс. населения и сильно зависит от стран и регионов. При неблагоприятной радиационной обстановке и экологии их встречаемость возрастает на полтора порядка. В США лейкозы являются основной причиной смерти детей до 15 лет.

Большинство лейкозов является результатом генетических перестроек: хромосомных аномалий, транслокаций, инверсий, делеций и многочисленных мутаций в процессе болезни [1–3, 6]

Клетки, содержащие Филадельфийскую хромосому (Ph⁺клетки) и экспрессирующие активную тирозинкиназу p210 или p185 (онкобелки, кодируемые геном *bcr/abl*), участвуют в патогенезе хронического миелолейкоза (ХМЛ). Хромосомная транслокация *t(9;22)(q34;q11)* протекает в гемопоэтической (кроветворной) полипотентной стволовой клетке с образованием Ph хромосомы и онкогена *bcr/abl* в ее составе. Деление и дифференцировка этой клетки – моноклональный процесс – ведет к замене нормальных гемопоэтических клеток Ph⁺клетками и способствует возникновению и прогрессии ХМЛ [1– 8, 10, 12].

По диагностике и отношению к терапии течение ХМЛ у разных больных различается. Клеточные и молекуляр-

ные механизмы этих различий у больных ХМЛ не изучены. Представления о течении и прогрессировании ХМЛ *in vivo* составлены усреднением результатов многих анализов многочисленных параметров в отдельные моменты большого числа больных в разных фазах ХМЛ. ХМЛ протекает через хроническую фазу (ХФ), фазу акселерации (ФА) и острую, быстротечную фазу бластного криза (БК) с летальным исходом. В настоящее время в терапии лейкозов применяются высокоспецифичные (таргетные) препараты, блокирующие агрессивную тирозинкиназу p210, – иманитиб и его аналоги. Иманитиб увеличивает 6-летнюю выживаемость у 88 % пациентов. Из них 66 % продолжают принимать препарат, у 14 % ХМЛ продолжает прогрессировать, и 5 % больных прерывают лечение из-за токсичности препаратов. При этом наблюдаются новые мутации *bcr/abl* онкогена, которые ведут к резистентности при терапии и, хотя созданы новые поколения специфичных к тирозинкиназе препаратов, проблема остается, т.к. ни один из них не уничтожает покоящихся лейкозных стволовых клеток. Менее 5 % пациентов в ХФ ХМЛ излечивается, у остальных возникают рефрактерные рецидивы ХМЛ [6]. В связи с этим необходимы новые подходы выбора препаратов, действующих на лейкозные стволовые клетки.

Несмотря на многочисленные исследования гемопоэтических клеток, содержащих Ph хромосому и участвующих в патологии ХМЛ, в культурах и *in vivo* [4, 5, 7–12, 15–20, 23, 27], многое остается неясным в процессах, протекающих в первичных Ph⁺ клетках от больных ХМЛ и при прогрессии ХМЛ. Отсутствует единая концепция биологических и молекулярных процессов при ХМЛ *in vitro* и *in vivo* и их связи между собой. Мало известно о закономерностях пролиферации и дифференцировки (ПД) Ph⁺ клеток даже *in vitro*.

Неоднократно отмечались противоречия в процессах на клетках ХМЛ *ex vivo* по сравнению с клеточными линиями. При ХМЛ гемопоэтических пролиферирующих незрелых клеток образуется меньше, а нейтрофилов, созревающих без деления, больше, чем в норме [13, 14, 20–23, 26]. Стволовые Ph⁺ клетки пролиферируют менее активно, чем стволовые клетки доноров, а более зрелые Ph⁺ клетки накапливаются, наоборот, более активно [20, 23, 24, 27]. На этом основании предполагается, что причиной ХМЛ служит дисбаланс самоподдержания (self-renewal) стволовых клеток и пролиферации миелоидных клеток-предшественников с созреванием их поздних потомков, а не пролиферация Ph⁺ клеток под действием тирозинкиназы p210 *bcr/abl*, как это следует из многих других работ [4–7, 10–12, 15, 16, 19, 24–29, 31].

Отметим, что представления о блокировании апоптоза в Ph⁺ клетках также неоднозначны. Очевидно, что не все особенности клеточной и молекулярной регуляции Ph⁺ клеток при ХМЛ ясны, хотя способность онкогена *bcr/abl*, кодирующего тирозинкиназу p210, определять туморогенные свойства, повышать жизнеспособность клеток, активировать в линиях Ph⁺ клеток пролиферацию и блокировать апоптоз детально изучалась [7, 4, 17, 18, 25–27, 29, 30, 35, 43–45].

В работе [27] исследована роль разных мутантов p210 в клеточной пролиферации, туморогенности и апоптозе Ph⁺ клеток, полученных трансфекцией генно-инженерными

конструкциями с различными мутациями в онкогене *bcr/abl*. Показано, что функции p210 в активации пролиферации клеток и ингибирования апоптоза проявляются отдельно и обязаны разным мутациям в *bcr/abl*, в т.ч. отвечающим за изменения путей сигнальной трансдукции с участием разных СТАТ белков. Предполагается, что соотношение активации пролиферации и блокирования апоптоза и их баланс могут смещаться в разных направлениях и в разной степени в зависимости от мутаций в онкогене *bcr/abl*. Для Ph⁺ клеток от больных ХМЛ такие свойства не изучены по причине отсутствия удобных моделей и подходов, хотя мутации в гене *bcr/abl* активно исследуются и используются для диагностики и выбора терапии при ХМЛ [19, 29, 30–32]. На основании изложенного мы предположили, что кинетика пролиферации и дифференцировки (ПД) Ph⁺ клеток может обнаружить различия в регуляции ПД Ph⁺ клеток индивидуальных больных ХМЛ *ex vivo*.

Целью данной работы являлось изучение механизма ПД *ex vivo* Ph⁺ клеток от индивидуальных больных ХМЛ в суспензионной культуре с помощью разработанного нами ранее кинетического подхода к исследованию ПД Ph⁺ клеток [33, 39]. При этом Ph⁺ клетки от ХМЛ в культуре пролиферируют и дифференцируются аналогично схеме усиленного миелопоэза ХМЛ (кроветворения миелоидного отдела клеток) *in vivo* и для ПД можно определить эффективность ПД, влияние ростовых факторов, экспрессию гена *bcr/abl* и экспрессию дифференцировочных антигенов Ph⁺ клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использованы материалы: гепарин (Flow, Англия); Lymphoprep, среда альфа-MEM (MP Biomedical, США); DEFC, Heres, Трис, PBS, эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС), цитрат Na, лаурилсаркозил (ICN, США); краситель трипановый синий, L-глутамин и 2-меркаптоэтанол (Serva, Германия), пенициллин и стрептомицин (ОАО «Биохимик», Саранск, Россия); Г-КСФ (F.Hoffmann-La Roche Ltd, Франция); PBS (10мМ фосфатный буфер + 0.13 M NaCl + 2.7 mM KCl, pH 7.4) таблетированный, НПЦ «Эко-сервис», Россия.

Исследовали Ph⁺ мононуклеары, выделенные из ПК и КМ от больных ХМЛ в ХФ до лечения и в процессе лечения в ХФ, ФА и БК ХМЛ. При ХМЛ основное содержание мононуклеаров составляют лейкоциты и гранулоциты. Именно они исследовались в работе. Характеристики Ph⁺ клеток и больных ХМЛ, из ПК и КМ которых получены мононуклеары, даны в табл. 1–3. В Ph⁺ клетках определены типы МРНК *bcr/abl*: b3a2, b2a2 или e1a2 с помощью метода RT-PCR (обратной транскрипционной полимеразной цепной реакции) как указано в [33, 35].

Ph⁺ мононуклеары из ПК и КМ получали, отбирая 10–15 мл крови из вены или 1–2 мл КМ из заднего гребешка подвздошной кости больного на разных стадиях ХМЛ, во флакон с гепарином (50 ед/мл), наслаивали на Лимфо-преп или фиколл с плотностью 1.077 г/см³. Легкую фракцию Ph⁺ клеток выделяли центрифугированием (30 мин при 1500 об/мин), дважды промывали буфером PBS, pH 6.8, затем α-MEM средой, суспендировали в α-MEM среде и использовали для анализа и культивирования. Фракция содержала клетки-предшественники (бласты), лимфоциты, гранулоциты и моноциты, а также некоторое количество созревающих нейтрофилов, что характерно для монону-

клеаров ХМЛ. Содержание живых и мертвых клеток анализировали трижды на мазках, окрашенных 0.2 %-ным трипановым синим по Романовскому, с подсчетом клеток в камере Горяева.

Культивирование Ph⁺клеток проводили аналогично [33]. 2–8 · 10⁶ клеток/мл культивировали в суспензии с α-МЕМ средой, содержащей 10–20 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 10⁻⁴ М 2-меркаптоэтанол, 100 ед/мл пенициллина и 50 ед/мл стрептомицина, 25 мМ HEPES-NaOH), pH 7.2–7.4 в 25 см² пластиковом матрасе 2–3 ч, затем неадгезированные клетки центрифугировали 7 мин при 1500 об/мин разбавляли до концентрации [0.8–1.4 · 10⁶] клеток/мл той же средой, переносили в 24- или 96-ячеечные платы по 12 ячеек на каждую пробу и инкубировали при 37 °С в условиях абсолютной влажности и 5 %-ного содержания CO₂ в течение 2 ч без ЭТС. Затем добавляли ЭТС до 10–20 %, и клетки культивировали 6–14 сут, отбирая пробы отдельными ячейками. Ph⁺клетки в пробах отмывали от ЭТС центрифугированием в среде альфа-МЕМ и анализировали их морфологию и состав субпопуляций, распределение в фазах клеточного цикла и апоптоз. Отдельно определили, что 2-часовое выдерживание клеток без ЭТС и последующее культивирование с ЭТС замедляет рост клеток в течение ~ 6 ч. Далее скорость роста клеток восстанавливается, и через 12 ч культивирования состав субпопуляций не отличается от полученного без удаления ЭТС.

В отбираемых пробах анализировали число живых и погибших клеток, морфологический состав клеток на мазках в трех зонах по 100 клеток в каждой по методу Романовского и идентифицировали морфологию клеток по Абрамову [34], определяя содержание каждого вида клеток в каждой пробе. Концентрацию клеток в пробах вычисляли по их содержанию в расчете на 10⁶ клеток/мл и получали кинетические кривые накопления и расходования субпопуляций Ph⁺лейкоцитов, гранулоцитов, а также суммы пролиферирующих клеток Р (бластов, промиелоцитов и миелоцитов) и суммы нейтрофилов, созревающих без деления, клеток D – метамиелоцитов (ММ), палочкоядерных (ПЯ) и сегментоядерных (СЯ) нейтрофилов. Кривые отражали скорость образования одного вида дифференцирующихся клеток (накопления) с последовательным или параллельным его превращением (расходованием) в следующую субпопуляцию, известную для данной дифференцировки. Средняя ошибка составляла ± 5–11 %. В пробах также анализировали апоптоз и распределение клеток по фазам клеточного цикла с помощью цитофлуориметрии.

Ph хромосома в клетках ПК и КМ от больших идентифицирована цитогенетически для 100 митозов или методом FISH в лаборатории кариологии ГНЦ РАМН.

Цитофлуориметрический анализ кинетических кривых апоптоза и распределения Ph⁺клеток в фазах клеточного цикла при культивировании Ph⁺клеток.

Пробы Ph⁺клеток (по 5000 клеток) после выделения из КМ и ПК в градиенте плотности фикола и пробы, отобранные в процессе культивирования, центрифугировали 7 мин при 2000 об/мин и 4 °С, промывали буфером PBS и по каплям фиксировали охлажденным 70 %-ным этанолом в течение 30 мин при 4 °С. Перед измерением полученную взвесь промывали PBS, центрифугировали и осадок ин-

кубировали в 0.5 мл PBS, содержащего 5 мкг/мл пропи-дий иодида и 50 мкг/мл рибонуклеазы А, в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте [36, 37]. Измерения проводили в проточном флуориметре EPICS-XL. Клетки гранулоцитарного гейта анализировали с помощью прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния и одновременно регистрировали флуоресценцию FL2 пика по амплитуде и площади импульса (это позволяло отсекалть слившиеся клетки, конгломераты и обрывки клеток) в линейном и логарифмическом масштабе и определяли клетки в апоптозе. К клеткам, вышедшим в апоптоз, относили FL2-Н частицы с гиподиплоидным набором ДНК, располагающиеся в виде пика влево от пика клеток с диплоидным набором ДНК (уменьшение размера клеток не более 2 порядков). Долю гранулоцитов, находящихся в апоптозе, определяли для клеток, анализируемых в гранулоцитарном гейте, где отсутствуют обрывки клеток. В тех же пробах Ph⁺клеток получали ДНК-гистограммы и в них анализировали распределение клеток по фазам клеточного цикла (S, G2/M, G1/0). Для анализа ДНК-гистограмм использована разработанная нами ранее специальная программа компьютерной обработки данных. В основу был положен алгоритм, разработанный для асинхронных пролиферирующих клеточных популяций (SFIT-метод) [38].

Кинетические кривые пролиферации Ph⁺лейкоцитов (кривые роста популяции Ph⁺клеток и их гибели) получали согласно доле живых и мертвых клеток, определяемых, как указано выше, и отнесенных к 10⁶ клеток/мл. О скорости пролиферации лейкоцитов и гранулоцитов судили по кинетическим кривым их накопления и расходования при культивировании, а также по сумме их субпопуляций, определяемых по морфологии. Кинетические кривые показывали, что параллельно образованию/накоплению клеток соответствующей морфологии протекает превращение их в следующую субпопуляцию. Расходование СЯ нейтрофилов указывало на их гибель.

Кинетические кривые дифференцировки Ph⁺лейкоцитов и их субпопуляций: миелоидных клеток, лимфоцитов, гранулоцитов и субпопуляций гранулоцитов: бластов, промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов строили, вычисляя концентрацию соответствующих клеток в пробах и умножением их доли, определяемой по морфологии на мазках, на число клеток × 10⁶/мл. Морфологию на мазках определяли, как указано выше. Состав клеток на мазках анализировали в трех зонах по 100 клеток в каждой. Отметим, что кроме морфологии Ph⁺клетки от ХМЛ № 1.1 и 2.6 идентифицировали по экспрессии антигенов CD с набором моноклональных антител, как указано в работе [39], где приведены результаты идентификации клеток и кинетики по экспрессии антигенов, согласующиеся с данными морфологии [33, 39].

Кинетические кривые индекса эффективности Р/Д гранулоцитов при культивировании Ph⁺лейкоцитов определяли как отношение скоростей накопления и расходования суммы пролиферирующих клеток, Р [незрелые] (бласты, промиелоциты, миелоциты), и суммы нейтрофилов, созревающих без деления, D [условно зрелые], получаемые из кинетических кривых Р и D клеток, как указано выше.

Индекс эффективности P/D определяли как соотношение скоростей накопления клеток P , пролиферирующих с дифференцировкой (скорость пролиферации), и клеток D , дифференцирующихся без деления (скорость созревания), эквивалентное соотношению концентрации клеток P и D на том основании, что $V_P/V_D = K_P [P] t / K_D [D] t = K_P / K_D \cdot [P] / [D]$, где V_P и V_D – скорости накопления клеток P и D , K_P и K_D – константы скоростей, $[P]$ и $[D]$ – концентрации клеток. $K_P / K_D = K$ – константа удельной эффективности ПД.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения различий ПД в культуре Ph^+ клеток, выделенных из КМ и ПК больных в разных фазах ХМЛ, были получены кинетические кривые ПД 34 образцов Ph^+ моноклеаров, выделенных из КМ и ПК 23 больных ХМЛ, при культивировании в строго одинаковых условиях. Ph^+ моноклеары КМ и ПК содержат кроветворные клетки, способные при ПД в культуре к самоподдержанию (self-renewal – клонированию) и к ПД в течение 2–3 циклов ПД с образованием полного набора Ph^+ клеток [33, 39].

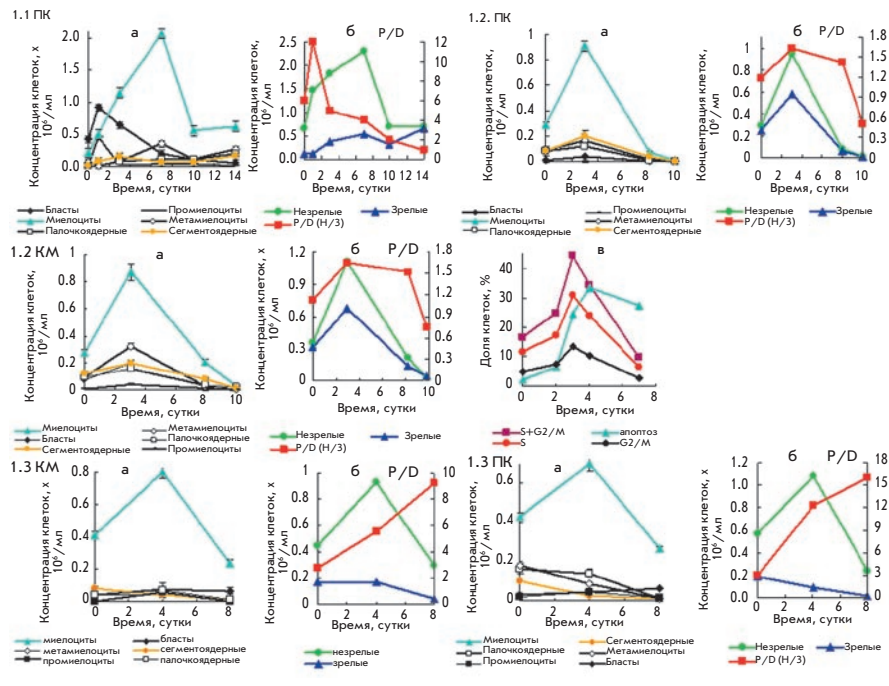


Рис. 1. Кинетические кривые образования и превращения субпопуляций Ph^+ клеток 1-го типа в составе моноклеаров, выделенных из клеток костного мозга (КМ) и/или периферической крови ПК больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ), в суспензионной культуре: а – дифференцировка гранулоцитов с образованием субпопуляций пролиферирующих миелоидных клеток-предшественников (бластов), промиелоцитов, миелоцитов и созревающих без деления нейтрофилов: метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов; б – накопление и расходование пролиферирующих незрелых Ph^+ клеток – клеток P (суммы пролиферирующих миелоидных клеток-предшественников (бластов), промиелоцитов, миелоцитов) и созревающих без деления нейтрофилов – клеток D (суммы метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов), а также изменения индекса эффективности P/D как соотношения скорости пролиферации клеток P и скорости созревания клеток D ; в – кривые апоптоза и распределения Ph^+ гранулоцитов по фазам клеточного цикла при культивировании; **1.1 ПК** – Ph^+ клетки ПК от ХМЛ № 1.1, хроническая фаза (ХФ) до лечения с быстрой прогрессией ХФ ХМЛ в бластный криз; **1.2 ПК** и **1.2 КМ** – Ph^+ клетки от ХФ ХМЛ № 1.2; **1.3 КМ** и **1.3 ПК** – Ph^+ клетки в момент отбора пробы от ХМЛ в фазе акселерации (ФА) в процессе лечения и далее с быстрой прогрессией в бластный криз. Характеристика образцов и показатели пролиферации и дифференцировки Ph^+ клеток 1-го типа приведены в табл. 1

Основную часть Ph^+ моноклеаров при ХМЛ составляют лейкоциты [1, 7], и поэтому в составе моноклеаров именно их рассматривали и анализировали в качестве Ph^+ клеток. Субпопуляции лейкоцитов включают миелоидные клетки, гранулоциты, лимфоциты, моноциты; субпопуляции гранулоцитов содержат миелоидные клетки-предшественники (бласты), промиелоциты, миелоциты и нейтрофилы включают: метамиелоциты (ММ), палочкоядерные (ПЯ) и сегментоядерные (СЯ).

Характеристика Ph^+ клеток и их источников – больных ХМЛ даны в табл. 1–3. В пробах клеток по ходу культивирования получены кинетические кривые роста популяции Ph^+ лейкоцитов и их гибели в культуре, их пролиферации, а также кривые дифференцировки субпопуляций Ph^+ гранулоцитов: бластов, промиелоцитов, миелоцитов и нейтрофилов: ММ, ПЯ и СЯ. В тех же пробах получены также кривые апоптоза и распределения Ph^+ клеток в фазах клеточного цикла (рис. 1–4). В опытах наблюдалось повышенное содержание гранулоцитов, характерное для ХМЛ [1, 6, 14]. Характер полученных кривых указывает на скорость образования (накопления) данного вида клеток и их последовательно-параллельные превращения (расходование) с образованием следующей субпопуляции и в конце гибель клеток. Полученные кривые, таким образом, отражают основные процессы дифференцировки (рис. 1–4 и табл. 1–3). Дифференцировка лейкоцитов соответствует известным для ХМЛ данным [1–3, 21, 22, 40–42].

Кроме скорости дифференцировки отдельных субпопуляций (рис. 1–4 а) рассматривались кривые скоростей пролиферации и созревания. В первом случае это кривые накопления клеток P , дифференцирующихся одновременно с делением и включающих бласты – предшественники миелоидных клеток, промиелоциты, миелоциты. Во втором случае это кривые накопления нейтрофилов, клеток D , созревающих (дифференцирующихся) без деления и включающих ММ, ПЯ и СЯ клетки (рис. 1–4 б).

Таблица 1. Пролиферация и дифференцировка Ph⁺клеток 1-го и 2-го типов в культуре

№ п/п	Образцы мононуклеаров, выделенных из ПК или КМ больных ХМЛ			Показатели пролиферации и дифференцировки					
	№ образца ПК или КМ ХМЛ	Диагноз, лечение до отбора пробы	Тип <i>bcr/abl</i> РНК. Лейкоциты · 10 ⁹ / л, % бластов	P/D, [нз]/[з]	Продолжительность этапа P/D, сут	[СЯ]/[Миелоциты]	СЯ · 10 ⁶ клеток/мл, мах/на сут	Нейтрофилы · 10 ⁶ клеток/мл мах/на сут	Апоптоз (гибель), % /на сут
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

1-й тип Ph⁺клеток, P/D¹ ≥ 1. Эффективная пролиферация (скорость накопления незрелых Ph⁺клеток больше скорости созревания нейтрофилов). Концентрация [нз] > [з].

1	1.1 ПК	ХФ	b3a2 L115; 3 %;	12-4 4-1	14	0.14- 0.0 -0.27	0.17	0.53/ 7 -0.32 -0,65/ 14	(28/ 7 50/ 14)
2 3	1.2 КМ ПК	ХФ, ГОМ*	b3a2 L 72 бласты 3 %	1.2-1.6 2.4-1	8 8	0.41 0.5	0.2 0.2 / 3	0.67 0.58 / 3	33 / 4 (30/ 9)
4 5	1.3 КМ ПК	ФА ПХТ**	b2a2 бласты 17 %	3-9 1-13	> 8	0.1-0.54 0.1-0.31	0.13 / 8	0.17/ 0-4	(14/ 8)
6	1.4 ПК	БК лимфоидного типа, ПХТ**	b2a2 бласты 30 %	> 20- 2	> 6	0.0	0/ 0-6	0.4 / 6	(47/ 6)
7	1.5 ПК	ХФ, ГОМ*	b3a2 L 175 Бласты 5 %	1.2-2.5	< 8	0.14-0.53	0.08 / 4	0.32-0.2 / 4, 8	(21 / 7)

2-й тип Ph⁺клеток, P/D² ≤ 1. Эффективное созревание (скорость накопления нейтрофилов (зрелых) больше скорости накопления незрелых Ph⁺клеток. Концентрация [з] > [нз].

1	2.1 ПК	ХФ→ БК ГОМ*	b3a2, L 188-145, 2 %	0.3-0.8	> 6	1.0-1.62 -0.4	0.47/ 2	1.2/ 2	40/1 4/ 3 55/6
2	2.2 КМ	ХФ ГОМ* 4сут	b3a2	0.8-1.5	> 5	0.8-0.4-1.0	0.5 / 2	0.7/1 0.6/5	(4/1 11/ 5)
3	2.3 ПК	ХФ	b3a2	0.4-1.0	~ 6	0.4-0.8	0.25/3	0.7/3	(2/3 19/7)
4	2.4 ПК	ХФ, 2-я группа риска, ***	b3a2, L 165, бласты 2 %	0.3-1.2	~ 7	0.73/4 2.4/ 8	0.86/8	2.4/4 1.3/8	(2/4 33/11)
5	2.5 ПК	ХФ	b2a2	0.1-1.1- 1.6	~ 7	1.4/5	0.7/5	1.13/5	(3/2 2/5 17/7)
6 7	2.6 ПК КМ	ХФ	b3a2	0.2-1.0 0.3-1.0	> 9	8/6 24/11	0.41/6	0.7/6 0.1/11	(2/6 24/11)
8 9	2.7 КМ ПК	ХФ	b2a2	1.5 1.5	~ 4-6	- -	- -	1.1/3 1.3/7	(15/1 2/2-7 2/ 3 12/8)

Лечение до отбора пробы: *гидроксимочевина; **полихимиотерапия; *** реаферон.

ПК, КМ – периферическая кровь, костный мозг – источник мононуклеаров. ХФ, ФА и БК – хроническая фаза, фаза акселерации и бластный криз – фазы развития ХМЛ.

ТИПЫ Ph⁺ КЛЕТОК ОТ БОЛЬНЫХ ХМЛ

При миелопоэзе (ПД миелоидного отдела кроветворения) вначале пролиферируют с одновременной дифференцировкой гемопоэтически клетки-предшественники и их незрелые потомки. Затем по мере ПД без деления созревают нейтрофилы [3, 40, 41]. В данной работе получены и исследованы кинетические кривые ПД *ex vivo* 34 образца Ph⁺клеток из костного мозга (КМ) и периферической крови (ПК) 23 больных ХМЛ. Кривые демонстрируют заметные различия в ПД Ph⁺клеток от индивидуальных больных ХМЛ.

Кинетические кривые отражают скорость двух ключевых процессов, составляющих ПД: пролиферацию с одновременной дифференцировкой и дифференцировку без деления клеток (созревание нейтрофилов). При этом соотношение скоростей пролиферации (накопления клеток P) и созревания (клеток D) отражает эффективность пролиферации Ph⁺клеток относительно созревания нейтрофилов и выражается индексом P/D, который является мерой эффективности ПД. Как видно, скорость пролиферации может быть выше или ниже скорости созревания, и, следовательно, ПД протекает с преимуществом пролиферации

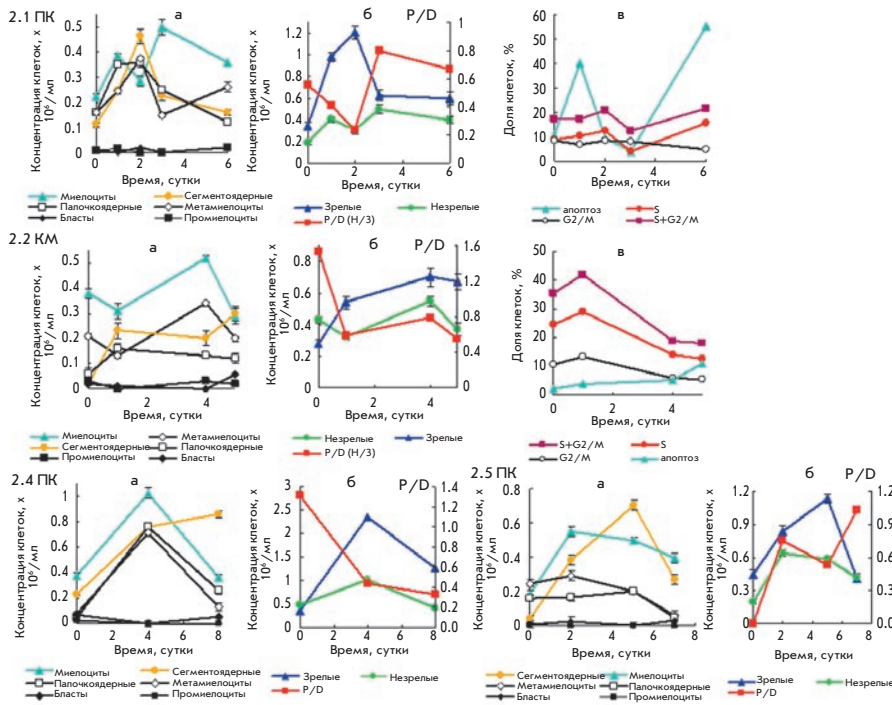


Рис. 2. Кинетические кривые образования и превращения субпопуляций Rh⁺ клеток 2-го типа в составе мононуклеаров, выделенных из клеток КМ и/или ПК больных ХМЛ, в суспензионной культуре. Обозначения **2.1 ПК, 2.2 КМ, 2.4 ПК и 2.5 ПК** – образцы Rh⁺ клеток от ХФ ХМЛ № 2.1, 2.2, 2.4 и 2.5 соответственно. При длительном наблюдении больных прогрессии ХМЛ не отмечено. Характеристика образцов и показатели пролиферации и дифференцировки Rh⁺ клеток 2-го типа приведены в табл. 1

(эффективная пролиферация) или с преимуществом созревания (эффективное созревание). Индексы эффективности в первом случае $P/D^1 \geq 1$, во втором случае индексы эффективности $P/D^2 \leq 1$ (рис. 1–4, табл. 1–3).

У ~ 20 % больных ХМЛ при ПД длительно протекает исключительно эффективная пролиферация. Это Rh⁺ клетки 1-го типа, их $P/D^1 = 1–20$ (рис. 1, б, табл. 1). При ПД Rh⁺ клеток от других больных протекает только эффективное созревание с $P/D^2 \leq 1$. Это Rh⁺ клетки 2-го типа, их обнаружено ~ 30 % (рис. 2, б, табл. 1). По ходу ПД индексы P/D этих клеток изменяются в границах своих P/D. На рис. 1, 2 и табл. 1 видно, что по продолжительности ПД Rh⁺ клеток 1-го и 2-го типа (7–14 сут) сопоставима с 1–2 циклами дифференцировки клона гемопоэтических клеток [3, 40, 41].

Однако ПД Rh⁺ клеток от большинства больных протекает с неоднократным чередованием эффективной пролиферации и эффективного созревания. Другими словами, чередование этапов либо с преимуществом скорости пролиферации и повышенным индексом P/D $P/D^1 \geq 1–4$, либо с преимуществом созревания и с низким индексом $P/D \leq 1$ (рис. 3, б, 4, б и табл. 2 и 3). Эти Rh⁺ клетки составляют 3-й тип. Чередования эффективной пролиферации (1-й этап) и эффективного созревания нейтрофилов (2-й этап) видны по пересечениям кинетических кривых накопления пролиферирующих клеток (незрелых) и созревающих нейтрофилов (зрелых) (рис. 3 и 4, б, табл. 3). При ПД Rh⁺ клеток 3-го типа встречаются одно-, двух- и трехкратные чередования этапов, которые сменяют друг друга по схемам: 1/2–1/2/1 или 2/1–2/1/2/1 с частотой чередования от 0.2–6 сут (табл. 2 и 3). При чередовании этапов ПД по схеме 1/2–1/2/1 скорости и, следовательно, концентрации клеток изменяются в ряду [нз] > [з] → [з] > [нз] → [нз] > [з] (рис. 3: 3.1–3.4, б). При чередовании этапов по схеме 2/1–2/1/2

скорости и концентрации изменяются в ряду: [з] > [нз] → [нз] > [з] → [з] > [нз] (рис. 4: 3.10–3.12, б). ПД Rh⁺ клеток 1-го и 2-го типов можно рассматривать как частные случаи пролонгированных этапов чередования пролиферации и созревания ПД Rh⁺ клеток 3-го типа.

В момент пересечения кривых эффективной пролиферации и эффективного созревания происходит смена этапов чередования, скоростей накопления Rh⁺ клеток и других показателей ПД. В точках пересечения скорости пролиферации и созревания одинаковы, как и их индексы эффективности. При этом $P/D = 1.06 \pm 0.23$, и это значение не зависит от схемы, времени и последовательности чередования, а также от концентрации клеток (табл. 2 и 3). Точки пересечения можно назвать равновесными или критическими. Другие характеристики этапов пересечения, которые можно ожидать совпадающими, такие как концентрации незрелых клеток, зрелых нейтрофилов ($0.4–0.7 \cdot 10^6/\text{мл}$) и СЯ ($0.1–0.4 \cdot 10^6/\text{мл}$), также имеют близкие значения (табл. 3). Однако заметные колебания ($1.53–0.1 \cdot 10^6/\text{мл}$ для КМ 3.5, ПК 3.10, 3.11 и КМ 3.12 в табл. 3) предполагают зависимость от концентрации.

В течение чередований характеристики этапов, напротив, постоянно меняются (табл. 2). Показатели увеличиваются или понижаются, проходят минимумы и максимумы. Эти события на этапах, как правило, происходят асинхронно друг другу (рис. 1–4 и табл. 2). Характер изменения индексов P/D зависит от этапа чередования. Они растут или уменьшаются в своих пределах: $P/D^1 = 1–4$, $P/D^2 \leq 1$. Исключение составили клетки из КМ № 3.3, P/D¹ которых уменьшается от 11 до 1, что занимает 3 сут до момента равновесия и перехода к этапу созревания. На этапе созревания P/D² колеблется от 0.1–1 до нового этапа пролиферации, где индексы P/D¹ > 1. Это означает, что соотно-

Таблица 2. Показатели чередования этапов эффективной пролиферации и эффективного созревания при пролиферации и дифференцировке Ph⁺клеток 3-го типа в культуре

№ п/п и № рис.	№ ХМЛ (*)	Показатели этапа пролиферации Мах или интервал (сут)				Показатели этапа созревания Min, мах или интервал (сут)				[СЯ]/ [миелоци- тов]	Апоптоз (гибель), %
		P/D ¹	10 ⁶ клеток/мл			P/D ² Min	Мах, 10 ⁶ клеток/мл				
			[нз]	[з]	[СЯ]		[нз]	[з]	[СЯ]		

Чередование этапов по схемам 1/2 или 1/2/1 с изменением скоростей накопления и концентраций [нз] > [з] → [з] > [нз] → [нз] > [з]

1, Рис. 3	3.1 КМ (1/2/1)	1.4-1.1 1,2-2,3	0.35-0.5 0.64- 0.5	0.29-0.5 0.63-0.2	0.1-0.25 0.3 -0.1	0.9 (на 3-е сут)	0,71 (на 3-е сут)	0.8 (на 3-е сут)	0.4 (на 3-е сут)	0.5-0.2	5-12
2, Рис. 3	3.2** ПК (1/2)	1.3-1.2	0.4	0.30	0.05	0.85	0.4-0.3	0.53	0.16	0.5 -0.25	< 5
3 4 Рис. 3	3.3 КМ ПК (1/2)	11- 2 1.32-1.5	0.6-0.46 0.5-0.8	0.02-0.5 0.4-0.5	0.01-0.4 0.14 -0.25	0.1 1.0-0.2	0.5-0.1 0.5- 0.1	0.6 (3 сут) 0.6 (7 сут)	0.4-0.2 0.3-0.2	0.1-2.5 0.1-1-2.5	(7 на 11-е сут)
5 Рис. 3	3.4 КМ (1/2/1)	1.2 1.53	0.4-0.8- 0.5-1.1	0.34	0.17	0.52-0.34	0.57-0.34	1.1	0.7	0.4-1.3-2	(18 на 5-е сут)
6	3.5 КМ (1/2)	3.43-1.0	1.95	1.65	0.03-0.37	1.0-0.3	1.53-0.4	1.53-1.21	0.37-0.5	0.19- 0.25-2.0	(30 на 11-е сут)
7	3.6 КМ (1/2)	1.61	0.61	0.52	0.24	0.28	0.13-0.56	0.52 -0.4-0.6	0.24	0.13 -0.5-1.0	(22 на 11-е сут)
8 9	3.7 КМ (1/2) ПК (1/2/1)	2.5-1.4 2.2-1.2 1.2-1.4	0.65-0.60 0.51-0.54 0.38-0.32	0.55 0.5 -0.54 0.4-0.2	0.3 0.05-0.19 0.15-0.07	0.7-0.4 0.78	0.55 0.57-0.38	0.83 0,73	0.53 0.27	0.1-0.5	(30 -35 на 10-11-е сут)
10	3.8 КМ (1/2)	3.9-1.5	0.53-0.35	0.14-0.35	0.02-0.22	1.5-0.5	0.35-0.23	0.35-0.44	0.2-0.4	0.04-0.3	(45 на 7-е сут)

Чередование этапов по схемам 2/1 или 2/1/2 с изменением скоростей накопления и концентраций [з] > [нз] → [нз] > [з] → [з] > [нз]

11, Рис. 4	3.10* ПК (2/1)↔	1.4 -3.1-2.0	0.3-0.6 -0.4	0.3-0.2	0.17-0.25	0.2-0.5	0.13-0.3	0.5-0.8-0.3	0.35-0.7	8.5-0.3	34-22 на 2-5-е сут
12, Рис. 4	3.11 ПК (2/1/2)↔	1.15-1.63	0.8-0.6	0.6-0.8-0.1	0.43-0.3	0.33-1.15 0.75-0.8	0.2-0.8, 0.6-0.8-0.1	0.5-1.3-0.8, 0.8-0.1	0.16-0.75-0.4, 0.39-0.06	1.2-0.2	35 на 1-е сут, 63 на 4-е сут
13, Рис. 4	3.12 КМ (2/1/2/1/2) ↔	1.0-1.32 1.0	0.7-0.78 0.24	0.6 0.24	0.14-0.35 0.12	0.5-0.7-1.0 1.0-0.8-1.0	0.6-0.7 0.6 0.2	0.4-0.95 0.6	0.14-0.5 0.34 0.1	0.9-0.2	7, 22 на 6, 11-е сут
14	3.13 ПК (2/1) ↔	1.7-2.5	0.39	0.4-0.2	0.2-0.1	0.45-1.7	0.42	0.9-0.4	0.3-0.2	0.9-1-9	(48 на 8-е сут)
15	3.14 КМ (2/1) ↔	1.0-1.34	0.6-0.5	0.4	0.4 - 0.2	1.1-0.7	0.4-1.0	0.4-1.37	0.12-0.92	0.3-1.0	(45 на 5-е сут)

Примечания: *схема чередования; **фаза акселерации; КМ – костный мозг, ПК – периферическая кровь; скобки [] обозначают концентрацию клеток; дефис – интервал значений на кинетической кривой. Стрелка ↔ указывает, что для чередования 2/1 и 2/1/2/1 данные приведены вначале для 1-го этапа и далее для этапа 2 в соответствии с подзаголовками таблицы.

шение скоростей пролиферации и созревания – их индексы эффективности P/D и концентрации пролиферирующих и созревающих клеток, особенно СЯ, являются весьма значимыми показателями ПД Ph⁺клеток.

Анализ кинетики образования субпопуляций гранулоцитов, кинетики апоптоза и распределения Ph⁺клеток в фазах клеточного цикла в сочетании с различиями в ин-

дексе эффективности P/D и в скоростях этапов ПД: пролиферации и созревания Ph⁺клеток приводит к следующим результатам.

ПД Ph⁺клеток 1-го типа протекает в условиях длительной эффективной пролиферации с индексами P/D > 1-2 – 20 и долей Ph⁺клеток в S+G2/M фазах клеточного цикла ≥ 20-45 % со скоростью пролиферации большей, чем

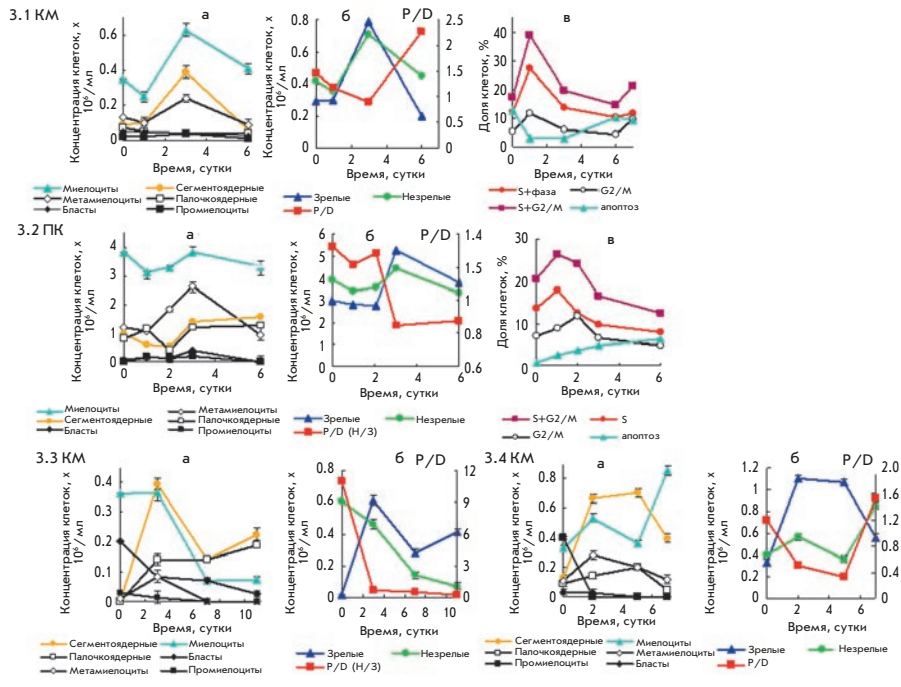


Рис. 3. Кинетические кривые дифференцировки в культуре Ph⁺клеток 3-го типа в составе мононуклеаров с чередованием эффективной пролиферации и эффективного созревания по схеме 1/2 и 1/2/1. Обозначения а, б и в даны на рис. 1. Обозначения 3.1 KM, 3.2 ПК, 3.3 KM, 3.4 KM и 3.4 KM соответствуют номерам образцов Ph⁺клеток от больных в ХФ ХМЛ. Характеристика образцов и показатели пролиферации и дифференцировки Ph⁺клеток 3-го типа приведены в табл. 2 и 3

скорость созревания (рис. 1.2, 1.3 а, б, в). ПД ведет к повышенному накоплению миелоцитов, промиелоцитов и/или бластов и низкому накоплению нейтрофилов (рис. 1, а, б: 1.1-1.3 и № 1.4 в табл. 1) при активном апоптозе (рис. 1, в). Чем ниже содержание нейтрофилов, созревающих без деления, тем выше индекс P/D (рис. 1: 1.1-1.3, б) и тем серьезнее прогрессия ХМЛ (табл. 1). Эти Ph⁺клетки выделены из КМ или ПК от больных ХМЛ в фазах ФА, БК и ХФ с активной прогрессией ХМЛ и составляют пятую часть исследованных проб Ph⁺клеток.

ПД Ph⁺клеток 2-го типа длительно протекает при эффективном созревании с низкой эффективностью P/D ≤ 1 при скорости созревания нейтрофилов выше скорости пролиферации в условиях блокирования апоптоза (рис. 2, табл. 1). ПД Ph⁺клеток 2-го типа ведет к значительному накоплению нейтрофилов, которые ингибируют пролиферацию Ph⁺клеток и миелоцитов. Блокирование апоптоза при созревании нейтрофилов происходит асинхронно накоплению миелоцитов и индукции апоптоза. Падение индекса P/D сопровождается накоплением СЯ, а рост P/D – расходом СЯ (рис. 2, а, б, в, и № 2.1 – 2.7 в табл. 1). Видно, что концентрация нейтрофилов существенно выше, чем пролиферирующих Ph⁺клеток.

Важная характеристика пролиферации – распределение клеток по фазам клеточного цикла. Кинетические кривые распределения Ph⁺гранулоцитов 2-го типа в фазах S и G2/M показывают, что их изменения по ходу ПД зависят от источника Ph⁺клеток – больного ХМЛ. На рис. 2.1, 2.2, в видно, что доля пролиферирующих Ph⁺клеток в фазах S+G2/M ≤ 20–40 %, а в G2/M фазах ~ 15 %. Другой показатель пролиферации – отношение S/(G2+M) равно 1.2. Максимальная доля клеток в S+G2/M фазе на 1 сут составляет 43 %, а в S фазе ~ 30 % и затем быстро понижается до 12 %. Индекс P/D при этом 0.6–0.8 (рис. 2.2, б). Доля про-

лиферирующих клеток 2-го типа (рис. 2.2, в) близка доле Ph⁺клеток 1-го типа (рис. 1.2, в). Однако продолжительность существования повышенной доли клеток в фазах S+G2/M у Ph⁺клеток 2-го типа короче, чем при пролиферации Ph⁺клеток 1-го типа, где доля пролиферирующих клеток ≥ 43 % поддерживается почти 6 сут с отношением S/(G2+M) ~ 2.4–2.7 и эффективностью P/D 1.2–1.6. Для ПД Ph⁺клеток 2-го типа это означает преимущество скорости созревания над пролиферацией. При культивировании доля пролиферирующих злокачественных клеток линии K562 (производной от бластного криза ХМЛ), в фазах S+G2/M достигает 44 ± 3 % и мало изменяется в течение 7 сут. Отношение S/(G2+M) при этом достигает 4.4. По сравнению с этими величинами ПД Ph⁺клеток 2-го типа характеризуется пониженной долей клеток в фазах клеточного цикла S+ G2/M (< 20 – 40 %) при укороченной продолжительности пролиферации (< 3 сут) и низким индексом эффективности P/D ≤ 1 (рис. 2.1 и 2.2, б, в).

Кинетические кривые дифференцировки Ph⁺лейкоцитов 2-го типа показывают до 80 % содержания гранулоцитов, а миелоциты в субпопуляциях Ph⁺лейкоцитов составляют не более 25 %. Содержание зрелых нейтрофилов, особенно СЯ, при этом достигает ~ 40 % (рис. 2.1-2.5, б и № 2.1-2.6 в табл. 1). В процессе ПД СЯ и все нейтрофилы активно накапливаются и мало расходуются. Максимальная концентрация СЯ временами в 2 раза больше, чем миелоцитов (рис. 2.1–2.5, а, б, в и табл. 1), что указывает на роль зрелых клеток, особенно СЯ, в регуляции ПД Ph⁺клеток 2-го типа.

В совокупности обнаруживается, что популяция Ph⁺лейкоцитов этого типа увеличивается в 2–4 раза при низких индексах эффективности P/D и скорости пролиферации ниже скорости созревания. При этом накапливаются нейтрофилы, особенно СЯ, падает содержание миелоцитов при пониженном апоптозе. В совокупности

Таблица 3. Характеристика пересечений при чередовании этапов пролиферации и созревания Ph⁺клеток 3-го типа в культуре

№ п/п (№ Рис.)	№ больного ХМЛ	Схема чередования этапов	Точки пересечения кривых скоростей накопления пролиферирующих [незрелых] (1-й этап) и созревающих клеток [зрелых] (2-й этап)			Концентрация клеток в точках пересечения, 10 ⁶ клеток /мл на этапах					
			Время пересечения, сут	Продолжительность (сут) этапов		Индексы P/D в точках пересечения №					
				1	2	1	2	3	1	2	Сегментоядерных (СЯ) 1 2
1 (3)	3.1 КМ	1/2/1	2; 3.5	2	1.5; 2.5	1.1; 1.2; -	0.5; 0.65		0.24; 0.34		
2 (3)	3.2 ПК	1/2	2.5; -	2.5	> 4.5	1.06; - -	0.4; -		0.1; -		
3 (3) 4	3.3 КМ ПК	1/2	2.5; -	2.5; 5.5;	8.5; 5.5	~ 2; 1.0; - -	0.49; 0.53; -		0.26; 0.38; -		
		1/2	5.5; -	5.5; 5.5							
5 (3)	3.4 КМ	1/2/1	0.2; 6	~ 0.2;	5.8	1.15; 12; -	0.37; 0.8		0.17; 0.58		
6	3.5 КМ	1/2	5; -	5;	3	1.0; - -	1.53; -		0.37; -		
7	3.6 КМ	1/2	4.5; -	4.5;	3.5	1.06; - -	0.53; -		0.24; -		
8 9	3.7 КМ ПК	1/2	2.5; -	2.5;	8.5	1.5; - -	0.53; -		0.4; -		
		1/2/1	2.5; 8.5	2.5;	8.5	1.2; 1.25 -	0.54; 0.4		0.17; 0.15		
10	3.8 КМ	1/2	5; -	5;	> 2	1.5; - -	0.35; -		0.15; -		
11	3.10 ПК ↔	2/1	3; -	4	3	1.4; - -	0.33; -		0.3; -		
12 Рис. 7	3.11 ПК ↔	2/1/2/1	5.5; 7.5; 11	2;	5.5; 3.5	1.15 1.15 0.80	0.75; 0.6		0.43; 0.3		
				0;				0.1		0.06	
13	3.12 КМ ↔	2/1/2/1/2	4.5; 6; 0; 8	1.5; 0;	4.5; 2.5; 1	1.05; 1.0; 1.0	0.62; 0.24;	0.72; 0.24	0.13; 0.11;	0.35; 0.34	
14	3.13 ПК ↔	2/1	4.0; - -	1;	4	1.7; - -	0.4		0.2		
15	3.14 КМ ↔	2/1	4.0; - -	1;	4	1.0; - -	0.6		0.4		

Примечания: КМ – костный мозг, ПК – периферическая кровь; Стрелка ↔ указывает, что для чередования 2/1 и 2/1/2/1 данные приведены вначале для 1-го этапа и далее для этапа 2 в соответствии с подзаголовками таблицы. Среднее значение индекса эффективности P/D при пересечении кривых скоростей этапов пролиферации и созревания на 1-м и 2-м этапах чередования 1.06 ± 0.23 (21.7 %).

это означает, что нейтрофилы, накапливаясь в избытке при блокировании апоптоза, ингибируют пролиферацию клеток, из которых сами образуются, а также тормозят дифференцировку самих нейтрофилов в ряду СЯ, ПЯ и ММ, вероятно, по механизму обратной связи.

Соотношение [СЯ]/[М] (обычно малая величина) при ПД клеток 2-го типа увеличивается, становится более единицы и демонстрирует накопление СЯ нейтрофилов, синхронное уменьшению накопления миелоцитов. Обращает внимание максимальное накопление нейтрофилов на 2-е или 4-е сут (рис. 2.2.1 и 2.4, а, б), которое соответствует минимальному накоплению миелоцитов и низкому индексу P/D. На рис. 2.1–2.5, а, б, виден рост индекса P/D при уменьшении концентрации созревающих без деления нейтрофилов на четыре сутки ПД.

Количество Ph⁺клеток 2-го типа составляет треть исследованных образцов, все они выделены от больных ХМЛ в хронической фазе (ХФ). Клиническое наблюдение за больными ХМЛ с 2-м типом ПД показывает повышенную продолжительность их жизни при успешной терапии.

ПД Ph⁺клеток 3-го типа происходит при неоднократном чередовании эффективной пролиферации (1-й этап) с эффективным созреванием (2-й этап) и изменениями индексов эффективности P/D¹ > 1 на P/D² ≤ 1 (табл. 2 и 3). На 1-х этапах чередования накопление миелоцитов в условиях индукции апоптоза больше накопления созревающих нейтрофилов. На 2-х этапах чередования апоптоз блокируется, нейтрофилы накапливаются в повышенной концен-

трации и ингибируют пролиферацию Ph⁺ клеток (рис. 3, 4, табл. 2 и 3). При этом, кроме того, наблюдается инверсия порядка накопления нейтрофилов, как и при ПД Ph⁺ клеток 2-го типа (рис. 2–4, а, б, в), что рассматривается ниже.

Переход к следующему этапу чередования 1 по схемам 1/2/1 и 2/1/2 сопровождается индукцией апоптоза, истощением СЯ и накоплением пролиферации незрелых Ph⁺клеток. Таким образом, при прохождении контрольного пересечения кривых скоростей пролиферации и созревания происходит смена этапов чередования и изменение эффективной пролиферации на эффективное созревание, или наоборот, характеристики и показатели ранее пройденного такого же этапа чередования восстанавливаются.

Индексы эффективности P/D зависят от этапа чередования (ПД), что обсуждалось выше (табл. 2 и 3).

Первый этап чередования ведет к росту индекса эффективности P/D¹ > 1, следующее чередование – к низкому индексу P/D² < 1. В итоге попеременное чередование высокоэффективной пролиферации Ph⁺клеток с низкоэффективным созреванием нейтрофилов приводит к умеренному росту и падению эффективности ПД Ph⁺клеток (табл. 3 и рис. 3 и 4). Таким путем поддерживается умеренная эффективность ПД в целом. Этому механизму чередования соответствуют попеременное изменение параметров ПД Ph⁺клеток 3-го типа (табл. 2 и 3). Совокупность этих результатов означает участие СЯ и других созревающих нейтрофилов в регуляции ПД Ph⁺клеток 3-го типа с ингибированием пролиферации Ph⁺клеток на этапе эффектив-

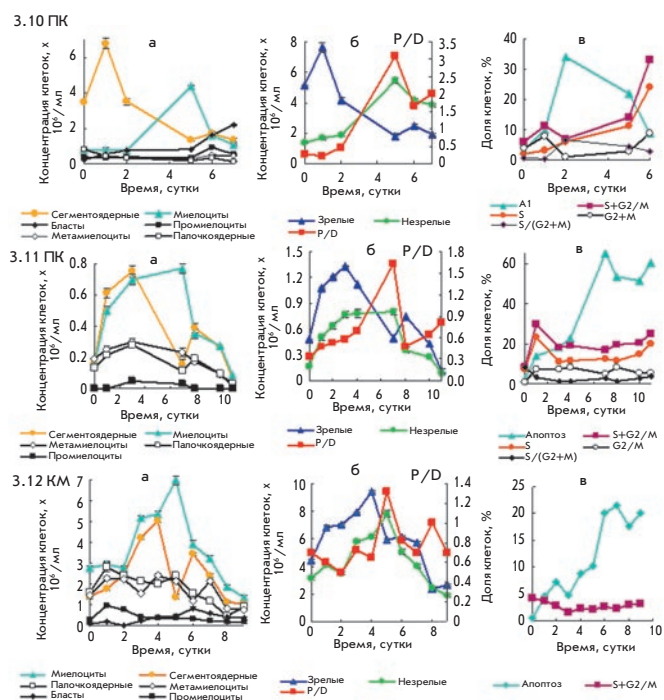


Рис. 4. Кинетические кривые образования и превращения субпопуляций Rh^+ клеток 3-го типа с чередованием эффективной пролиферации и эффективного созревания дифференцировки по схеме 2/1 и 2/1/2 в составе мононуклеаров, выделенных из клеток КМ и/или ПК больных ХФ ХМЛ. Обозначения а, б и в даны на рис. 1. Rh^+ клетки 3.10 ПК, 3.11 ПК и 3.12 КМ – от больных в ХФ ХМЛ № 3.10, 3.11 и 3.12

ного созревания. При ПД Rh^+ клеток 2-го типа наблюдается такая же регуляция, как на этапе эффективного созревания Rh^+ клеток 3-го типа.

Чередование этапов эффективных пролиферации и созревания по схеме 1/2, начинаясь с 1-го этапа (рис. 3.6, табл. 2), по характеристикам согласуется с 1-м типом ПД Rh^+ клеток. Содержание миелоцитов и пролиферирующих клеток в фазах клеточного цикла S+G2/M > 30–45 % на 1–2-е сут (рис. 3) повышается, а содержание нейтрофилов СЯ повышается, индекс P/D² падает ≤ 1, содержание миелоцитов уменьшается. Доля Rh^+ клеток в фазах клеточного цикла S+G2/M оказывается ≤ 25 %. К моменту становления следующего 1-го этапа – этапа пролиферации к 7-м сут доля клеток в S+G2/M фазах снова растет (рис. 3, в) и остальные показатели 1-го этапа восстанавливаются. По показателям чередование 1-го и 2-го этапов аналогичны ПД Rh^+ клеток 1-го и 2-го типов соответственно, но ограничены меньшей продолжительностью. В сумме клетки на 1-м этапе пребывают в течение 4–5 сут - в 3 раза дольше, чем на 2-м этапе (табл. 3).

Второму этапу чередования ПД 3-го типа Rh^+ клеток – созреванию Rh^+ клеток соответствуют значения P/D² ≤ 1, высокая концентрация СЯ и минимальная концентрация миелоцитов (рис. 4, а, б, в, и № 3.10–3.14 в табл. 2). С индукцией апоптоза и уменьшением концентрации СЯ снова

начинается рост P/D¹ и накопление миелоцитов. Максимумы P/D¹ и накопления миелоцитов совпадают с минимумом концентрации СЯ на пятые сутки. Накопление зрелых нейтрофилов ведет к падению P/D¹ и уменьшению концентрации миелоцитов и становлению этапа эффективного созревания. Это согласуется с характеристикой ПД Rh^+ клеток 2-го типа и клеток других больных с 3-м типом дифференцировки по схеме 2/1/2 (рис. 4, а, б, в; данные других образцов Rh^+ клеток в табл. 2).

Ингибирование апоптоза и пролиферации миелоцитов клетками СЯ видно на рис. 3 и 4, а, б, в, и др. в табл. 2. При этом чем активнее пролиферация Rh^+ клеток и активнее апоптоз, тем выше индекс P/D¹ (например, рис. 3, а, б, в, и табл. 2).

Особенность ПД Rh^+ клеток по схеме 2/1/2, которая начинается с этапа 2, состоит в быстром и значительном накоплении СЯ в начале дифференцировки и значительном блокировании апоптоза, подавлении пролиферации Rh^+ клеток и торможении дифференцировки. Апоптоз и гибель клеток с максимумом на 2–5-е сут составляет ~ 35 % (рис. 4, а-в), что по времени соответствует расходованию и гибели СЯ. Вначале максимум роста клеток на этапе созревания связан с накоплением и расходованием СЯ; второй максимум пролиферации Rh^+ клеток наблюдается уже при переходе к пролиферации по мере гибели СЯ (рис. 4: 3.10, в).

Доля клеток в фазах клеточного цикла для чередования 2/1 и 2/1/2 также связана с накоплением СЯ, которое соответствует пониженной доле клеток в S+G2/M фазах. Так, на рис. 4, а-в видны максимумы на 1-е сут ~ 10 % (рис. 4: 3.10 КМ), ~ 25 % (3.11 ПК) и менее 5 % (3.12 КМ). На 2–10-е сут доля пула заметно уменьшается. При очередном непродолжительном этапе пролиферации на 10–11-е сут доля пула незначительно увеличивается одновременно с ростом индекса P/D¹. Вместе с падением P/D² это означает ингибирование пролиферации Rh^+ клеток нейтрофилами, и тем большее, чем чаще наблюдается чередование этапов созревания с большей продолжительностью.

На рис. 4: 3.12, а-в, при чередовании 2/1/2/1 видно значительное ингибирование пролиферации с P/D² = 0.1–0.9. За 11 сут при чередованиях 2/1/2/1 доля клеток в фазах клеточного цикла S+G2/M оказывается ниже 5 %. При низкой пролиферации на этапе эффективного созревания апоптоз ниже 10 %; его доля на 6–11-е сут растет лишь до 20 %, и то при переходе к 1-му этапу. Суммарное пребывание Rh^+ клеток в условиях эффективного созревания клеток № 3.12 в три раза дольше, чем на 1-м этапе. Это приводит к самому значительному ингибированию пролиферации и апоптоза из исследованных Rh^+ клеток 3-го типа. На рис. 4: 3.11, а, б, в максимум апоптоза соответствует минимуму накопления СЯ, максимуму накопления миелоцитов и росту индекса P/D¹.

Третий тип пролиферации и дифференцировки обнаружен у ~ 50 % исследованных Rh^+ клеток (все от больных в хронической фазе ХМЛ). Из них 2/3 составляют Rh^+ клетки с чередованием этапов 1/2 и 1/2/1.

Блокирование апоптоза, накопление сегментоядерных нейтрофилов (СЯ) и ингибирование пролиферации Rh^+ клеток 2-го и 3-го типа нейтрофилами на этапе эффективного созревания. Последовательность дифференцировки клеток, созревающих без деления, по определению

представлена превращениями в ряду $M \rightarrow MM \rightarrow ПЯ \rightarrow СЯ$ с выходом СЯ в апоптоз. Накопление созревающих нейтрофилов падает в ряду $СЯ > ПЯ > MM$ [3]. В культуре при отсутствии возможности транспорта СЯ в другие ткани СЯ должны погибнуть по механизму апоптоза, и значительное накопление СЯ означает блокирование апоптоза.

При созревании Ph^+ клеток 2-го типа и на 2 этапах чередования ПД Ph^+ клеток 3-го типа обнаруживаются подавление апоптоза, повышение концентрации созревающих нейтрофилов, ингибирование накопления миелоцитов и понижение доли пролиферирующих клеток в фазах $S+G2/M$ клеточного цикла и/или уменьшение их пребывания в этих фазах. Эти события объясняют ингибирование пролиферации нейтрофилами на стадии созревания в условиях блокирования апоптоза. Отметим, что обычно индукция апоптоза наблюдается при истощении в среде цитокинов [16–18, 25, 26, 29, 43–45]. При ПД Ph^+ клеток на этапах созревания апоптоз блокируется без введения цитокинов в среду.

При концентрации СЯ $\sim 2 \cdot 3 \cdot 10^5$ клеток/мл и повышенном пуле клеток в $S+G2/M$ фазах наблюдается весьма низкий апоптоз ($< 5-10\%$); на 5-е сут он едва достигает 10% (рис. 2.2, а, в). Гибель клеток в других случаях, определяемая окрашиванием трипановым синим, также ингибирована. В случаях клеток 2.2–2.4 КМ и 2.6 ПК апоптоз не превышает $10-20\%$ (табл. 1). В случае рис. 2.1, а, в, на 1-е сут пролиферации апоптоз достигает максимума в 40% и 60% на 6-е сут при синхронном увеличении накопления миелоцитов. Это означает, что ингибирование накопления миелоцитов зависит не прямо от блокирования апоптоза, а опосредовано нейтрофилами, накапливающимися вследствие ареста апоптоза.

При ПД 2-го типа Ph^+ клеток СЯ нейтрофилы даже способны накапливаться отдельным пиком с максимумом на 2-6-е сут (при $[СЯ] > 0.2-0.3 \cdot 10^6$ /мл), что видно на рис. 2.1, 2.5 и 2.4, а, б. Этому соответствует низкий апоптоз и минимум накопления миелоцитов (рис. 2.1, б, в). При этом кривая накопления миелоцитов прерывается на время значительного накопления СЯ (максимум на 2-е сут), а индекс P/D , как следствие, понижается. Пролиферация миелоцитов подавлена до тех пор, пока не снизится концентрация СЯ в результате апоптоза. После гибели значительной части СЯ закономерность накопления популяции миелоцитов восстанавливается, а индекс P/D увеличивается (рис. 2.1, б), но остается ≤ 1 . На рис. 2.1, а, б, в максимум накопления СЯ на 1-е и 5-е сут также соответствует минимуму накопления миелоцитов, уменьшению P/D и активации гибели клеток в этот период. Аналогичное накопление СЯ (на 2–5-е сут) подавляет накопление миелоцитов и понижает P/D , что видно на рис. 2.5, а, б. Гибель СЯ на 5-е сут восстанавливает рост концентрации миелоцитов и значение P/D . На рис. 2.2, а, б также видно, что максимум накопления СЯ соответствует минимуму накопления миелоцитов, т.е. максимальному ингибированию накопления миелоцитов. При этом максимумы накопления миелоцитов и активность апоптоза на рис. 2.1, а, б, в синхронны. При ПД Ph^+ клеток 3-го типа на этапах эффективного созревания видны те же закономерности.

Итак, низкая эффективность ПД Ph^+ клеток 2-го и 3-го типа на стадиях эффективного созревания в условиях блокирования апоптоза ведет к значительному накопле-

нию нейтрофилов, к уменьшению скорости пролиферации по сравнению со скоростью созревания и к ингибированию пролиферации Ph^+ клеток. Ингибирование пролиферации Ph^+ клеток нейтрофилами происходит при чередовании на всех этапах эффективного созревания и означает участие нейтрофилов в регуляции ПД Ph^+ клеток.

В регуляции ПД Ph^+ клеток 2-го и 3-го типа можно выделить ряд взаимозависимых процессов, синхронно и асинхронно протекающих. Так, ингибирование апоптоза с накоплением нейтрофилов, созревающих без деления, происходит асинхронно накоплению миелоцитов, индукции апоптоза и росту эффективности. Накопление миелоцитов синхронно индукции апоптоза, активации пролиферации и росту эффективности P/D .

Инверсия порядка (последовательности) накопления созревающих нейтрофилов. Нейтрофилы, созревающие без деления (клетки D), по определению дифференцируются в ряду: $M \rightarrow MM \rightarrow ПЯ \rightarrow СЯ$ с выходом СЯ в апоптоз [3, 40, 41, 45]. При одинаковых скоростях их дифференцировки можно ожидать тот же порядок накопления этих субпопуляций. В отдельных случаях ПД – при ПД Ph^+ клеток 1-го типа и на этапах эффективной пролиферации Ph^+ клеток 3-го типа – такой порядок соблюдается.

При чередовании на этапах созревания Ph^+ клеток 2-го и 3-го типов значения максимумов накопления нейтрофилов на кинетических кривых указывают на изменение порядка их накопления (рис. 2, 3 и 4, а 3.10–3.14; табл. 1–3). Это означает, что скорость накопления СЯ, ПЯ и ММ изменяется неравномерно и порядок их накопления при ПД инвертирует. Накопление миелоцитов в области пиков нейтрофилов при этом понижается. Более того, порядок накопления нейтрофилов из одних и тех же Ph^+ клеток инвертирует в процессе их созревания, а при переходе к пролиферации восстанавливается.

На рис. 2, а видно, что изменения порядка с увеличением или уменьшением скоростей накопления нейтрофилов происходят часто. Это показывают пересечения кривых накопления отдельных нейтрофилов с изменением их направления. Так, ряд $M > ПЯ > MM \sim СЯ$, видимый на 1-е сут, последовательно инвертирует в $СЯ > MM \sim ПЯ > M$ на 2-е сут, в $M > ПЯ \sim СЯ > MM$ на 3-е сут и в ряд $M > MM > СЯ > ПЯ$ на 6-е сут. На этом рисунке одинаковые скорости накопления нейтрофилов позже пересечения кривых на 4.5-е сут приводят почти к обычному порядку накопления нейтрофилов – $M \gg MM > СЯ \geq ПЯ$. На рис. 2:2.1, б видны: обычный порядок накопления – $M > MM > ПЯ > СЯ$ в нулевой момент культивирования, но инверсия этого порядка приводит к $M > СЯ > ПЯ \sim MM$ на 1-е сут, затем к $M \gg MM > СЯ > ПЯ$ на 4-е сут и позже к накоплению СЯ при убыли М, ММ и ПЯ. На рис. 2:2.4, а почти равные скорости накопления 3-х нейтрофилов на 4-е сут ($M > ПЯ \sim СЯ \sim MM$), на 8-е сут приводят к $СЯ \gg M > ПЯ > MM$. На рис. 2:2.5, а порядок накопления $M > СЯ > MM > ПЯ$ на 2-е сут переходит в $СЯ > M \gg MM \sim ПЯ$ на 5-е сут.

Совокупность этих результатов означает, что изменения порядка накопления, т.е. скоростей накопления нейтрофилов в сумме и относительно друг друга (или относительно миелоцитов), происходят достаточно часто по ходу кинетических кривых накопления нейтрофилов. Восстановление обычного порядка накопления нейтрофилов соответствует

повышению содержания миелоцитов и индекса эффективности P/D и тем способствует переходу к эффективной пролиферации. Изменение скорости и инверсия порядка накопления нейтрофилов, будучи синхронными уменьшению индексов эффективности P/D (рис. 1 и 4, г; 2, 3 и 4, б), указывают на непосредственное участие нейтрофилов в регуляции ПД Ph⁺клеток 2-го типа с ингибированием их пролиферации.

На этапе созревания Ph⁺ клеток 3-го типа при чередовании по схемам 1/2, 1/2/1 на рис. 3, а инверсия последовательностей накопления видна при изменении рядов М > ММ > СЯ > ПЯ в М > СЯ > ММ > ПЯ и затем снова в М > ММ > СЯ ~ ПЯ. При чередованиях по схеме 2/1 и 2/1/2 инверсия порядка накопления нейтрофилов заметна на рис. 4, а. При этом концентрации нейтрофилов уменьшаются в ряду [СЯ] >> [М] > [ПЯ] > [ММ], как и индекс P/D (рис. 4, б).

Итак, при созревании в максимуме накопления нейтрофилов наблюдается инверсия порядка накопления нейтрофилов, которая способна восстанавливать исходный порядок их накопления при переходе к этапу эффективной пролиферации. Степень инверсии и восстановления порядка накопления нейтрофилов зависит от продолжительности этапов созревания и пролиферации. Инверсия порядка накопления М, ММ, ПЯ и СЯ оказывается еще одним интересным свойством ПД Ph⁺клеток 2-го и 3-го типов в культуре. Первыми изменяют скорость и степень накопления СЯ нейтрофилы, затем следуют ПЯ и ММ нейтрофилы.

Нейтрофилы при эффективном созревании накапливаются в значительных концентрациях в результате блокирования апоптоза (рис. 2) и участвуют в регулировании ПД Ph⁺клеток 2-го и 3-го типов не только ингибированием пролиферации Ph⁺клеток, но и торможением дифференцировки самих нейтрофилов. Торможение дифференцировки нейтрофилов Ph⁺клеток 2-го и 3-го типов выявляется при инверсии первоначального порядка накопления нейтрофилов с повышением их концентрации (рис. 2, 3 и 4, а также в табл. 1–3). Инверсия первоначального порядка накопления нейтрофилов ведет к постепенному изменению последовательности накопления нейтрофилов М > ММ > ПЯ > СЯ в последовательность СЯ > ПЯ > ММ > М и к росту их концентрации в том же порядке, вероятно, по механизму обратной связи. Наблюдаемая инверсия порядка накопления и рост концентрации нейтрофилов являются, очевидно, следствием поэтапного торможения дифференцировки последовательно каждого нейтрофила по цепочке обратной связи и ведут последовательно к их накоплению по ходу дифференцировки ПЯ и ММ и, тем самым, к торможению (нарушению регуляции) созревания самих нейтрофилов. Иными словами, накопление СЯ ингибирует созревание ПЯ, а ПЯ в свою очередь угнетает созревание ММ. В конце концов, тормозится вся цепь созревания нейтрофилов, что повышает их концентрацию. При этом нейтрофилы угнетают пролиферацию Ph⁺ клеток и подавляют эффективность ПД. В следующий период по достижении «критической» концентрации нейтрофилов индуцируется апоптоз. Это освобождает нейтрофилы от прессы обратной связи, восстанавливает первоначальный порядок накопления нейтрофилов, их концентрация уменьшается и регуляция созревания нейтрофилов восстанавливается,

что сопровождается ростом индекса эффективности P/D и переходом к эффективной пролиферации Ph⁺клеток.

Роль чередования пролиферации и созревания. Чередование активной пролиферации и созревания с ингибированием пролиферации, происходящих с разной эффективностью и с преимуществом скорости то пролиферации, то созревания нейтрофилов, имеет периодичный или волновой характер. Их параметры проходят через максимумы и минимумы синхронных и асинхронных процессов. Активация пролиферации и накопление миелоцитов синхронны индукции апоптоза, росту эффективности P/D¹ > 1, но асинхронны накоплению нейтрофилов, ингибированию ими пролиферации, инверсии порядка созревания нейтрофилов и изменению индекса эффективности P/D² в пределах ≤ 1 (рис. 2–4, табл. 1–3).

Отметим, что в регуляции ПД Ph⁺клеток можно выделить ряд взаимозависимых процессов, синхронно и асинхронно протекающих. Так, ингибирование апоптоза с накоплением нейтрофилов, созревающих без деления, происходит асинхронно накоплению миелоцитов и индукции апоптоза. Накопление миелоцитов синхронно индукции апоптоза, активации пролиферации с ростом индекса P/D и восстановлению регуляции созревания и пролиферации.

В точках пересечения чередований параметры ПД выравниваются. При ПД Ph⁺клеток 1-го и 2-го типов наблюдается «необратимая» регуляция ПД данного цикла дифференцировки. Изменения свойств Ph⁺клеток 3-го типа обратимы: при чередовании этапов ПД свойства, ингибируемые на предыдущем этапе чередования, способны восстановиться. Возможно, Ph⁺клетки 3-го типа по регуляции ПД ближе к норме, чем Ph⁺клетки 1-го и 2-го типов. Все три типа Ph⁺клеток, очевидно, зависят от наследуемых особенностей гена *bcr/abl* у разных больных ХМЛ. Отметим, что регуляция ПД Ph⁺клеток внутри трех обнаруженных типов Ph⁺клеток от разных больных ХМЛ различается по количественным характеристикам эффективности P/D, ингибирования апоптоза, накопления СЯ и степени ингибирования пролиферации Ph⁺клеток. При ПД Ph⁺ клеток 1-го и 2-го типов индексы эффективности P/D изменяются в своих границах: P/D¹ > 1 или P/D² ≤ 1 соответственно (рис. 1 и 2, табл. 1). Это указывает на некоторую степень регуляции ПД Ph⁺клеток в пределах P/D¹ > 1 или P/D² без изменения исходного преимущества скорости либо пролиферации, либо созревания.

Различия в регуляции ПД связаны со свойствами Ph⁺клеток от разных больных ХМЛ в разных фазах ХМЛ. Очевидно, что эффективность ПД определяют предшественники миелоидных клеток, содержащиеся в Ph⁺моноклеарах и наследующие мутации в гене *bcr/abl* и тирозинкиназе p210 от разных больных ХМЛ. Мутации, которые способны в линиях Ph⁺клеток определять туморогенность, жизнеспособность клеток, активность пролиферации и блокирование апоптоза, исследованы в работах [7, 17, 18, 25, 27, 29, 30].

Чередование пролиферации и созревания Ph⁺клеток *ex vivo* с повышением и понижением эффективности ПД участвует в регуляции и поддержании оптимального режима ПД Ph⁺клеток. Чередование попеременно включает при блокировании апоптоза ингибирование пролиферации созревающими нейтрофилами, особенно СЯ, являющимися

потомками тех же пролиферирующих Ph⁺клеток. Клеточная регуляция СЯ нейтрофилами, очевидно, опосредует генную регуляцию с участием гена *bcr/abl*. Эти результаты хорошо согласуются с данными о раздельной трансформирующей и антиапоптотической активности различных мутантов тирозинкиназы p210^{*bcr/abl*} в клеточных линиях, происходящих благодаря изменению путей сигнальной трансдукции с участием тирозинкиназы p210 [8, 9, 15, 17, 18, 20, 27, 30, 31].

В итоге попеременное чередование эффективной пролиферации и эффективного созревания со сменой повышенных индексов эффективности на весьма низкие приводит к уменьшению общей эффективности ПД Ph⁺клеток 2-го и 3-го типов и таким путем поддерживает умеренный, возможно оптимальный, режим ПД. На этапах созревания регуляция ПД опосредуется ростом содержания нейтрофилов, особенно СЯ, ингибированием пролиферации с уменьшением индексов эффективности и нарушением порядка созревания нейтрофилов Ph⁺клеток 2-го и 3-го типов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаруженная регуляция ПД Ph⁺клеток *ex vivo* выявляет клеточные аспекты генной регуляции ПД. Клеточная регуляция, как следует из данной работы, опосредуется чередованием пролиферации Ph⁺клеток с их созреванием и осуществляется ингибированием пролиферации созревающими без деления нейтрофилами – потомками тех же пролиферирующих Ph⁺клеток-предшественников в условиях блокирования апоптоза.

Ранее в литературе клеточная регуляция ПД гемопоэтических клеток и такой ее механизм не рассматривались [4–7, 9–12, 15, 16, 21–23, 27, 30]. Сведения о клеточной регуляции ПД Ph⁺клеток нейтрофилами, созревающими без деления, и о регуляции чередованием этапов с высокой и низкой эффективностью ПД до наших исследований отсутствовали. Нет также данных об относительных скоростях пролиферации и созревания, эффективности этих этапов ПД и ее количественном выражении в виде индекса P/D. Соотношение содержания пролиферирующих гемопоэтических клеток и созревающих нейтрофилов в отдельных пробах ПК ранее обозначалось индексом созревания [2].

Пролиферации миелоидных клеток-предшественников, начального звена регуляции ПД Ph⁺клеток, изучались многими исследователями [4, 5, 7, 8, 10–12, 15, 16, 20, 23–25, 26]. Она определяется пролиферативным потенциалом и концентрацией CD34 миелоидных клеток-предшественников. Активация пролиферации Ph⁺клеток зависит от экспрессии онкогена *bcr/abl*, его мутаций и большей скорости выхода полипотентных стволовых Ph⁺клеток из G₀ в G₁ фазу клеточного цикла по сравнению с клетками без Ph хромосомы [20, 23, 24]. Регуляция пролиферации – первого звена механизма ПД Ph⁺клеток охарактеризована в некоторой степени и в настоящей работе с помощью кинетического подхода к исследованию ПД. Это видно из параметров ПД Ph⁺клеток 1-го типа и чередований с эффективной пролиферацией ПД Ph⁺клеток 3-го типа. В работах [33, 39] показано участие CD34⁺миелоидных клеток-предшественников и экспрессии онкогена *bcr/abl* Ph⁺клеток из ПК ХМЛ № 1.1, исследованного здесь в регуляции ПД Ph⁺клеток

1-го типа. При этом максимально высокие уровни экспрессии антигена CD34 и экспрессии онкогена *bcr/abl* совпадают с высокой эффективностью в начале ПД Ph⁺клеток.

В работе [28] при исследовании субпопуляций Ph⁺клеток от больных в ХФ ХМЛ, выделенных цитофлуориметрически на сортере, показана прямая зависимость пролиферации миелоидных Ph⁺клеток-предшественников в ХФ ХМЛ от экспрессии *bcr/abl* онкогена. Авторы установили уменьшение пролиферирующей доли Ph⁺клеток в фазах S+G2/M клеточного цикла для субпопуляций Ph⁺клеток в 4 раза для миелоцитов и в 7 раз для ПЯ + СЯ нейтрофилов по сравнению с CD34⁺клетками. Прямая линейная корреляция доли Ph⁺клеток в фазах S+G2/M клеточного цикла и экспрессии *bcr/abl* наблюдалась для CD34 клеток, миелобластов и промиелоцитов. Но далее по ходу дифференцировки корреляция инвертировалась. Это означало, что активное накопление пула пролиферирующих Ph⁺клеток в S+G2/M фазах в начале пролиферации прямо пропорционально увеличению экспрессии *bcr/abl* гена, а при ПД от миелоцитов к ПЯ и СЯ и приобретает обратно пропорциональную зависимость. Кинетика в этой работе не изучалась. Использовались данные для каждого из 9 больных в ХФ ХМЛ. Наши результаты хорошо объясняют инверсию этой корреляции в работе [28] изменением механизма пролиферации Ph⁺клеток из-за ингибирования пролиферации Ph⁺клеток нейтрофилами, в избытке накапливающимися из-за блокирования апоптоза.

Совокупность данных работы Primo et al. [28] и результатов настоящей работы свидетельствует о парадоксальном механизме действия *bcr/abl* на Ph⁺клетки. Экспрессия онкогена *bcr/abl* в пролиферирующих миелоидных Ph⁺клетках-предшественниках активирует пролиферацию, но позже созревающие Ph⁺нейтрофилы, наследующие тот же онкоген *bcr/abl*, ингибируют пролиферацию. Иными словами, активирующий пролиферацию эффект экспрессии онкогена *bcr/abl* в Ph⁺клетках ранней дифференцировки подавляется экспрессией того же онкогена в потомках тех же Ph⁺клеток более позднего созревания. Это можно объяснить, например, изменением путей сигнальной трансдукции с участием тирозинкиназы p210 и изменением спектра СТАТ белков, продуцируемых в нейтрофилах и по силе эффекта зависящих от концентрации одного из нейтрофилов.

В ряде работ высказана альтернативная гипотеза возникновения и прогрессии ХМЛ, которая в качестве причины ХМЛ рассматривала не активацию пролиферации Ph⁺клеток из-за неуправляемой экспрессии p210^{*bcr/abl*}, а дисбаланс самоподдержания стволовых клеток и более поздней дифференцировки клеток [20–24, 13–14, 26]. Клеток-предшественников при этом образуется меньше, чем в норме (или не больше), а их потомков оказывается в норме меньше, чем при ХМЛ. Нарушение регуляции созревания Ph⁺клеток в качестве первичного биологического дефекта при ХМЛ рассматривали давно [13, 14, 21, 22, 42]. На примере ПД Ph⁺клеток 2-го и 3-го типов в нашей работе видно, что такой «дисбаланс» осуществляется нейтрофилами, ингибирующими пролиферацию Ph⁺клеток на стадии созревания в условиях блокирования апоптоза. Обнаруженные здесь различия в регуляции ПД с ингибированием пролиферации нейтрофилами в условиях

блокирования апоптоза и чередования пролиферации с созреванием Ph⁺клеток от разных больных ХМЛ, наследующих различные мутации в гене *bcr/abl*, вполне объясняют противоречия, касающиеся «дисбаланса самоподдержания и созревания» Ph⁺клеток.

Возможно, что ингибирование пролиферации нейтрофилами в процессе чередования пролиферации и созревания при блокировании апоптоза также регулирует ПД гемопоэтических клеток в норме. При ХМЛ этот механизм, вероятно, является попыткой Ph⁺клеток защититься от активации пролиферации при экспрессии гена *bcr/abl*, ведущей к прогрессии ХМЛ. Угроза прогрессии ХМЛ видна на примере ПД Ph⁺клеток 1-го типа при индукции апоптоза и отсутствии избытка нейтрофилов.

ВЫВОДЫ

1. Регуляция пролиферации и дифференцировки *ex vivo* Ph⁺клеток от разных больных ХМЛ осуществляется при чередовании эффективной пролиферации с эффективным созреванием. На этапе созревания протекает ингибирование пролиферации Ph⁺клеток накапливающимися нейтрофилами при блокировании апоптоза, что прерывает пролиферацию и поддерживает ПД в оптимальном режиме.

2. Чередование этапов состоит в переключении этапа 1 – этапа эффективной пролиферации, протекающего с большей скоростью пролиферации Ph⁺клеток, чем скорость созревания нейтрофилов, на этап 2 – этап эффективного созревания, при котором блокируется апоптоз и скорость созревания нейтрофилов больше скорости пролиферации Ph⁺клеток. Чередование протекает по схемам: 1/2 – 1/2/1

или 2/1–2/1/2. Этапы чередований проходят контрольные точки пересечения, в которых показатели этапов пролиферации и созревания одинаковы. Индексы эффективности P/D в контрольных точках пересечения равны 1.06 ± 0.23 и не зависят от времени и порядка чередования, а также от источника Ph⁺клеток – больных ХМЛ. На этапах чередования эти показатели постоянно изменяются.

3. На этапах пролиферации повышено содержание пролиферирующих клеток, понижено содержание нейтрофилов, особенно СЯ, и индуцирован апоптоз. На этапах созревания, напротив, апоптоз блокирован, повышено содержание нейтрофилов, особенно СЯ, и понижено содержание незрелых. На этапе эффективного созревания нейтрофилы, накапливаясь в повышенной концентрации, ингибируют пролиферацию незрелых Ph⁺клеток, претерпевают инверсию порядка созревания нейтрофилов и торможение своего созревания, вероятно, по механизму обратной связи.

4. По различиям в регуляции ПД идентифицированы три типа Ph⁺клеток у больных ХМЛ, которые отличаются числом и продолжительностью этапов чередования. Это Ph⁺клетки, ПД которых протекает либо с одним длительным этапом эффективной пролиферации, либо с одним длительным эффективным созреванием, либо с неоднократным чередованием эффективных этапов пролиферации и созревания. Первые соответствуют прогрессирующим фазам ХМЛ, вторые и третьи относятся к хронической фазе ХМЛ с положительной реакцией на химиотерапию ХМЛ. ●

Работа поддержана РФФИ,
(грант 06-04-08372-офи).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абдулкадыров К.М., Бесемельцев С.С., Рукавицын О.А. Хронический миелолейкоз: СПб.: Специальная литература, 1998. 463 с.
- Руководство по гематологии. / Ред. А.И. Воробьев. Т. 1. М.: Ньюдиамед, 2002. 280 с.
- Патофизиология крови. / Ред. Ф.Д. Шиффман. BINOM Publishers. 2000. 446 с.
- Deininger M.W.N., Goldman J.M., Melo J.V. // *Blood*. 2000. V. 96. P. 3343–3356.
- Deininger M.W.N., Vieira S., Mendiola R., et al. // *Cancer research*. 2000. V. 60. P. 2049–2055.
- Медведева Н.В. Хронический миелолейкоз в 50-м ежегодном конгрессе американского гематологического общества. // *Клиническая онкогематология*. 2009. Т. 2. № 1. С. 85–88.
- Melo J.V. // *Blood*. 1996. V. 88. P. 2375–2384.
- Holyoake T.L., Jiang X., Eaves A.C., Eaves C.J. // *Leukemia*. 2002. V. 16. P. 549–558.
- Holyoake T.L., Jiang X., Jorgensen H.G. et al. // *Blood*. 2001. V. 97. P. 720–728.
- Jamieson C.H.M., Ailles L.E., Dylla S.J. et al. // *New England J Medicine*. 2004. V. 351. P. 657–667.
- Jaiswal S., Traver D., Miyamoto T. et al. // *Proc.Nat.Acad.* 2003. *Sci. USA*. V. 100. P. 10002–10007.
- Passagué E., Jamieson C.H.M., Ailles L.E., Weissman I.L. // *Proc.Nat.Acad. Sci.* 2003. *USA*. V. 100. P. 11842–11849.
- Strife A., Lambek C., Wisniewski D. et al. // *Blood*. 1983. V. 62. P. 389–397.
- Strife A., Lambek C., Wisniewski, et al. // *Cancer Res*. 1988. V. 48. P. 1035–1041.
- Era T., Witte O.N. // *Proc. Nat. Acad.* 2000. *Sci. USA*. V. 97. P. 1737–1742.
- Guzman M.L., Jordan C.T. // *Cancer Control*. 2004. V. 11, № 2. P. 97–104.
- Bedi A., Zehnbauber B.A., Barber J. et al. // *Blood*. 1994. V. 83. P. 2038–2044.
- Bedi A., Barber J.P., Bedi G.C. et al. // *Blood*. 1995. V. 86. P. 1148–1158.
- Brandford S., Rudzki Z., Walsh S. et al. // *Blood*. 2002. V. 99. P. 3472–3475.
- Buckle A.M., Mottram R., Pierce A. et al. // *Mol. Med*. 2000. V. 6. P. 892–902.
- Clarkson B., Strife A., Perez A. et al. // *Leukemia & Lymphoma*. 1993. V. 11. P. 81–100.
- Clarkson B., Strife A. // *Leukemia*. 1993. V. 7. P. 1683–1721.
- Coppo P., Bonnet M.L., Dusanter-Fourt I. et al. // *Oncogene*. 2003. V. 22(26). P. 4102–4110.
- Traycoff C.V., Haistead B., Rice S. et al. // *Brit. J. Haematology*. 1998. V. 102. P. 759–767.
- Lotem J., Sachs L. // *Leukemia*. 1996. V. 10. P. 925–9313.
- Lugo T.G., Pendergast A.M., Muller A.J., Witte O.N. // *Science*. 1990. V. 247. P. 1079–1082.
- Cortez D., Kadlec L., Pendergast A.M. // *Mol.cell. biology*. 1995. № 10. P. 5531–5541.
- Primo D., Flores J., Quijano S. et al. // *Brit.J. Haematology*. 2006. V. 135. P. 43–51.
- Amarante-Mendes G.P., Naekyung Kim C., Liu L. et al. // *Blood*. 1998. V. 91. P. 1700–1705.
- Selleri C., Maciejewski J.P., Pane F., et al. // *Blood*. 1998. V. 92. P. 981–989.
- Sherbenou D.W., Hantschel O., Turaga L. et al. // *Leukemia*. 2008. V. 22. P. 1184–1190.
- Stoklosa T., Poplawski T., Koptyra M., et al. // *Cancer Res*. 2008. V. 68. P. 2576–2580.
- Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Саркисян Г.П. и др. // *Цитология*. 2007. Т. 49. С. 889–900.
- Абрамов М.Г. Гематологический атлас. М.: Медицина, 1985. 344 с.
- Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., Ахлынина Т.В. и др. // *Росс. Биотерапевт. журнал*. 2002. Т. 1. № 4. С. 29–38.
- Пинегин Б.В., Ярилин А.А., Симонова А.В. и др. Цитофлуориметрический метод оценки апоптоза активированных лимфоцитов периферической крови человека с помощью пропидиума иодида. // В кн.: *Применение проточной цитофлуориметрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека*. М., МЗ РФ, 2001. С. 48–53.
- Шмаров Д.А., Козинец Г.И. Способы анализа клеточного цикла при помощи проточной цитофлуориметрии. // В кн.: *Лабораторно-клиническое значение проточного цитометрического анализа крови*. М.: Медицинское информационное агентство, 2004. С. 49–65.
- Dean P.N. // *Cell Tissue Kinet.* 1980. V. 13. P. 299–302.
- Гринева Н.И., Барышников А.Ю., Герасимова Л.П. и др. // *Росс. биотерапевт. журнал*. 2007. Т. 6. № 2. С. 21–32.
- Козинец Г.И., Котельников В.М. // *Советская медицина*. 1983. № 4. С. 3–77.
- Котельников В.М., Козинец Г.И., Касаткина В.В., Ковалевская Н.П. Кинетика гранулоцитопоза. // В кн.: *Кинетические аспекты гемопоэза*. Изд-во Томского гос. ун-та, 1982. С. 149–211.
- Golde D.W., Cline M.J. // *New Engl. J. Med*. 1973. V. 288. P. 1083–1086.
- Владимирская Е.Б. Механизмы апоптоза клеток крови. // *Лабораторная медицина*. 2001. № 4. С. 47–54.
- Владимирская Е.Б. Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста. // В кн.: *Биологические основы противоопухолевой терапии*. М.: Агат-Мед, 2001. С. 5–32.
- Dublez L., Eymun B., Sordet O. et al. // *Blood*. 1998. V. 91. P. 2415–2422.
- Goldman J.M., Th'ng K.G., Catovsky D., Galton D.A.D. // *Blood*. 1976. V. 47. P. 381–388.