

## АПОПТОЗ И НЕЙТРОФИЛЫ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТОК С Ph-ХРОМОСОМОЙ *ex vivo*

© 2013 г. Н. И. Гринева\*, Т. В. Ахлынина, А. М. Тимофеев, Л. П. Герасимова, Д. А. Шмаров,  
Н. М. Найденова, Т. Е. Манакова, Т. Г. Сарычева, Л. Г. Ковалева

Гематологический научный центр Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва 125167

Поступила в редакцию 22.10.2013 г.

Принята в печать 22.01.2013 г.

Пролиферация и дифференцировка *ex vivo* миелоидных клеток человека, содержащих Ph-хромосому, при чередовании этапов пролиферации и созревания регулируется последовательным блокированием и индукцией апоптоза с участием нейтрофилов и экспрессии генов *bcr/abl*, *bax* и *bcl2*. Регуляция апоптоза основных типов Ph<sup>+</sup> клеток, встречающихся при хроническом миелолейкозе (ХМЛ), зависит от последовательности чередования этапов пролиферации Ph<sup>+</sup> клеток (1) и созревания нейтрофилов (2) и реализуется двумя путями. Первый путь — поочередное блокирование и индукция апоптоза при начальном созревании и последующей пролиферации (чередование 2/1/2), ранее не описан. Накопление нейтрофилов блокирует апоптоз. По мере истощения нейтрофилов индуцируется апоптоз. Его блокирование ведет к ускорению пролиферации с новым накоплением нейтрофилов и регулярной гибелью нейтрофилов и индукцией апоптоза. Этот путь оптимизирует эффективность пролиферации (индексы P/D) равномерным чередованием созревания и пролиферации, обеспечивая завершение цикла пролиферации и дифференцировки. Второй путь регуляции апоптоза заключается в чередовании, начинающемся с этапа пролиферации (чередование по схеме 1/2/1 при пониженном содержании нейтрофилов), приводит к устойчивому уменьшению максимальных уровней апоптоза в 3–8 раз по сравнению с чередованием 2/1/2. Устойчивое блокирование апоптоза наблюдается в клетках с длительным этапом пролиферации и с длительным этапом созревания, в которых накапливаются бласты и миелоциты с повышенной экспрессией генов *bcr/abl* и экспрессией *bcl2* > *bax*. Устойчивое блокирование апоптоза наблюдается при прогрессии ХМЛ и в линиях Ph<sup>+</sup> клеток. Первый путь регуляции апоптоза реализуется в клетках хронической фазы ХМЛ. Культивирование Ph<sup>+</sup> клеток от индивидуальных больных ХМЛ *ex vivo* может способствовать более точной диагностике стадий ХМЛ и оптимизации схемы лечения этого заболевания.

**Ключевые слова:** апоптоз, дифференцировка, миелоидные клетки, пролиферация, хронический миелолейкоз, экспрессия *ex vivo*, Ph<sup>+</sup> гранулоциты, Ph-хромосома.

**APOPTOSIS AND NEUTROPHILS ON THE REGULATION OF PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION *EX VIVO* OF MYELOID CELLS WITH PH-CHROMOSOME, by N. I. Grineva\*, T. V. Akhlynina, A. M. Timofeev, L. P. Gerasimova, D. A. Schmarov, N. M. Nydenova, T. E. Manakova, N. G. Sarycheva, L. G. Kovaleva** (Research Center for Hematology, Ministry of Health, Moscow 125167 Russia; \*e-mail: nigrin27@mail.ru). Human myeloid cells with Ph chromosome (Ph<sup>+</sup> cells) from chronic myeloid leukemia (CML) in the course of proliferation and differentiation *ex vivo* are regulated under alternation of cell proliferation and neutrophil maturation stages by consecutive blocking and inducing apoptosis with of neutrophils participation as well *bcr/abl*, *bax* and *bcl2* genes expression. Apoptosis regulation of three main Ph<sup>+</sup> cells types from CML patients depends on alternation sequences of proliferation (1) and maturation (2) cell stages and realized by two ways. The first one is performed by consecutive blocking and inducing apoptosis under 2/1/2 stage alternation. The way is not described early. Neutrophils accumulation correlates with apoptosis blocking. Apoptosis level enhances under neutrophils exhausted. Apoptosis blockage allows cells to proliferate and, thus, to form new portion of neutrophils with consecutive regular their death as well a consequent alternation of apoptosis blocking and inducing. This way regulates proliferation efficiency indexes P/D that reflect Ph<sup>+</sup> cells proliferating potential and performs cycle completion for proliferation and differentiation. The second way of apoptosis regulation starts from proliferation stage and performs for 1/2/1 alternations under diminished content of neutrophils and a little increase under next maturation. It leads to resistant depressed apoptosis levels that, at maximal points, are 3–8 times lower

Принятые сокращения: ПДК — пролиферация и дифференцировка клеток; ХМЛ — хронический миелолейкоз; Ph<sup>+</sup> клетки — миелоидные гемопоэтические (кроветворные) клетки, содержащие филадельфийскую хромосому; P-клетки — незрелые пролиферирующие клетки; D-клетки — нейтрофилы, условно зрелые клетки; P/D — индекс эффективности пролиферации.

\* Эл. почта: nigrin27@mail.ru

than those under alternation 2/1/2. Resistant apoptosis blocking is observed in the Ph<sup>+</sup> cells with prolong proliferation or maturation stages, when blasts and myelocytes are accumulated under enhanced *bcr/abl* and *bcl2 > bax* gene expression and remain under next maturation. Stable apoptosis blocking is accompanied by increasing amounts of blasts and myelocytes and enhancing *bcr/abl* and *bcl 2 > bax* expression. This is observed under CML progression. Ph<sup>+</sup> cells cultivation may be useful for more distinct diagnostics of CML phases of individual CML patients and optimization of the treatment.

**Keywords:** Apoptosis, chronic myeloid leukemia, differentiation, expression *ex vivo*, myeloid cells, proliferation, Ph-chromosome, Ph<sup>+</sup> granulocytes.

**DOI:** 10.7868/S0026898413040046

## ВВЕДЕНИЕ

При хроническом миелолейкозе (ХМЛ) в гемопоэтических клетках содержится филадельфийская (Ph) хромосома, образующаяся в результате хромосомной транслокации *t(9;22)(q34;q11)* в стволовой полипотентной клетке. В составе Ph-хромосомы возникает химерный онкоген *bcr/abl*, кодирующий онкобелок тирозинкиназу, которая определяет опухолевые свойства клеток и патогенез Ph<sup>+</sup> ХМЛ и других Ph<sup>+</sup> лейкозов [1–12].

Экспрессия онкогена активирует пролиферацию и блокирует апоптоз в линиях Ph<sup>+</sup> клеток [13–20]. В то же время Ph<sup>+</sup> клетки, выделенные от больных ХМЛ, способны завершать пролиферацию и дифференцировку [1–3, 10–12].

В пролиферации и дифференцировке клеток (ПДК) участвуют многочисленные гены, регулирующие клеточный цикл, апоптоз и деление клеток [6–9, 20–27]. Недавно показано, что ПДК при ХМЛ *ex vivo* регулируется неоднократным чередованием этапов пролиферации и созревания [28–31].

Пролиферация и дифференцировка миелоидных клеток гранулоцитарного отдела кроветворения протекает с образованием 8 субпопуляций, из них 5 пролиферируют одновременно с дифференцировкой. Это клетки-предшественники: бласты (КОЕ-МГ, КОЕ-Г, миелобласты), промиелоциты и миелоциты (Р-клетки – пролиферирующие, делящиеся, “незрелые”) и их потомки – созревающие без деления нейтрофилы (D-клетки, или условно зрелые – метамиелоциты, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы) [10–12, 32–35].

Кинетические кривые, как известно, отражают скорости происходящих процессов при ПДК. Согласно [28–31], соотношение скоростей накопления (образования и последующих превращений) незрелых Р-клеток и D-нейтрофилов отражает индекс эффективности пролиферации, Р/D, который есть мера пролиферативного потенциала Ph<sup>+</sup> клеток. Значение Р/D – величина переменная. Р/D ≤ 1 – при созревании и изменяется от 1 до 20 при пролиферации. При этом нейтрофилы, пред-

положительно, участвуют в регуляции пролиферации и апоптоза по механизму обратной связи.

Цель данного исследования состояла в изучении кинетики апоптоза и накопления нейтрофилов, а также в выяснении их роли в регуляции ПДК *ex vivo* и пролиферативного потенциала Ph<sup>+</sup> клеток миелоидного отдела кроветворения, гиперпролиферированного при Ph<sup>+</sup> ХМЛ. Исследования такого плана до сих пор не проводились.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** В ходе исследования использованы следующие препараты: гепарин (“Flow”, Англия); лимфопреп (Lymphoprep), среда α-MEM (“MP Biomedical”, США); DEPC, Нерес, Трис, фосфатно-солевой буфер (PBS), эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), цитрат натрия, лаурилсаркозил (“ICN”, США); краситель трипановый синий, L-глутамин и 2-меркаптоэтанол (“Serva”, Германия), Триреагент, гуанидинтиоционат (“Sigma”, США); RQ1 RNase-free DNase, РНКазин, dNTP, BSA, Taq polymerase, буфер для ОТ-ПЦР, обратная транскриптаза MuMLV (“Promega”, США); пенициллин и стрептомицин (ОАО “Биохимик”, Россия).

**Ph<sup>+</sup> мононуклеары** выделяли из периферической крови и костного мозга больных ХМЛ в хронической фазе, фазе акселерации и бластного криза, как описано ранее [27–31]. При ХМЛ основная часть мононуклеаров представлена миелоидными клетками, которые содержат 90–95% Ph<sup>+</sup>гранулоцитов. Методика получения и характеристика Ph<sup>+</sup>клеток от больных ХМЛ, из периферической крови и костного мозга которых выделены мононуклеары, приведены в работах, опубликованных ранее [27–31]. Ph<sup>+</sup>клетки содержали мРНК *bcr/abl* двух типов: b3a2 или b2a2. Эти типы мРНК *bcr/abl* идентифицировали методом ОТ-ПЦР [32].

Ph<sup>+</sup> мононуклеары получали следующим образом. Во флакон с гепарином (50 ед./мл) вносили 10–15 мл крови из вены или 1–2 мл костного мозга из заднего гребешка подвздошной кости больного (на разных стадиях ХМЛ) и полученную смесь наслаивали на лимфопреп или фиколл с плотностью 1.077. Легкую фракцию Ph<sup>+</sup> клеток

выделяли центрифугированием (30 мин при  $600 \times g$ ), дважды промывали PBS (pH 6.8), затем средой  $\alpha$ -MEM. В 25-см<sup>2</sup> пластиковом матрасе в течение 3 ч культивировали  $(2-8) \times 10^6$  клеток/мл среды  $\alpha$ -MEM, содержащей 10% ЭТС, 2 мМ L-глутамин,  $10^{-4}$  М 2-меркаптоэтанола, 100 ед./мл пенициллина, 50 ед./мл стрептомицина, 25 мМ HEPES·NaOH (pH 7.3). Затем суспензию неадгезированных клеток отбирали и центрифугировали 7 мин при  $600 \times g$ . Клетки дважды промывали PBS и суспендировали в  $\alpha$ -MEM с 10% ЭТС. Суспензию клеток сразу использовали для культивирования и анализа. Фракция лейкоцитов содержала 90–95% гранулоцитов и незначительное количество созревающих нейтрофилов, что характерно для мононуклеаров при ХМЛ. Содержание живых и мертвых клеток анализировали трижды на мазках, окрашенных 0.2%-ным трипановым синим по Романовскому с подсчетом клеток в камере Горяева, как приведено в работах, опубликованных ранее [27–31].

Культивирование Ph<sup>+</sup> мононуклеаров проводили в строго одинаковых условиях. Полученную суспензию мононуклеаров центрифугировали, промывали средой  $\alpha$ -MEM, разбавляли  $\alpha$ -MEM до концентрации  $(0.8-1.4) \times 10^6$  клеток/мл, переносили в 24- или 96-луночные планшеты (по 12 лунок на каждую пробу) и инкубировали при 37°C в условиях абсолютной влажности с 5% содержания CO<sub>2</sub> в течение 2 ч. Затем добавляли ЭТС (до 10%) и культивировали клетки 6–14 сут, отбирая пробы из лунок. Каждую точку анализировали трижды. Ph<sup>+</sup> клетки отмывали от ЭТС центрифугированием в среде  $\alpha$ -MEM, анализировали их морфологию и состав субпопуляций, распределение в фазах клеточного цикла и уровень апоптоза. В отдельном опыте определили, что двухчасовое выдерживание клеток без ЭТС и последующее культивирование с ЭТС замедляет рост клеток в течение приблизительно 6 ч, затем скорость роста клеток восстанавливается и через 12 ч культивирования состав субпопуляций не отличается от полученного без удаления ЭТС.

В пробах оценивали содержание 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 [36], а также определяли содержание каждого вида клеток в каждой пробе и уровень апоптоза. Концентрацию клеток в пробах вычисляли по их содержанию в расчете на  $10^6$  клеток/мл и получали кинетические кривые накопления (образования и расходования) субпопуляций Ph<sup>+</sup> гранулоцитов, а также содержания пролиферирующих Р-клеток (бластов, промиелоцитов и миелоцитов) и нейтрофилов, созревающих без деления, – клеток D (метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов). Кривые отражали скорость на-

копления и образования пролиферирующих Р-клеток и дифференцирующихся D-клеток (их образования и последовательного/параллельного расходования с превращением в следующую субпопуляцию, известную для данной дифференцировки). Ранее нами показано [28], что среднестатистическая ошибка не превышает 11%. В пробах также анализировали уровень апоптоза и распределение клеток по фазам клеточного цикла с помощью цитофлуориметрии. Ph<sup>+</sup> хромосома в клетках больных идентифицирована цитогенетически для 100 митозов или методом FISH в лаборатории кариологии ГНЦ РАМН. В Ph<sup>+</sup> клетках, выделенных от каждого больного, методом ОТ-ПЦР идентифицированы также типы мРНК *bcrl/abl*: b3a2, b2a2 и e1a2 [32].

**Цитофлуориметрический анализ** уровня апоптоза проводили по следующей схеме. Пробы Ph<sup>+</sup> клеток (по 5000 клеток), отобранные в процессе культивирования, центрифугировали 7 мин при 2000 об./мин при 4°C, промывали PBS и по каплям фиксировали охлажденным 70%-ным этанолом в течение 30 мин при 4°C. Перед измерением полученную взвесь промывали PBS, центрифугировали и осадок инкубировали в 0.5 мл PBS, содержащего 5 мкг/мл пропидий иодида и 50 мкг/мл рибонуклеазы А, в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Измерения проводили на 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 позволяет отсекают слипшиеся клетки, конгломераты и клеточный дебрис) в линейном и логарифмическом масштабе и определяли долю клеток, находящихся в апоптозе. К клеткам, вышедшим в апоптоз, относили FL2-Н частицы с гиподиплоидным набором ДНК в пике слева от пика клеток с диплоидным набором ДНК (уменьшение размера клеток не более чем на 2 порядка). Долю гранулоцитов, находящихся в апоптозе, определяли для клеток, анализируемых в гранулоцитарном гейте, где отсутствует клеточный дебрис. Для анализа ДНК-гистограмм использована специальная компьютерная программа обработки данных, в основу которой заложен алгоритм, разработанный для асинхронных пролиферирующих клеточных популяций (SFIT-метод) [37].

Кинетические кривые уровней апоптоза строили на основании данных цитофлуориметрического анализа проб, полученных из образцов культивированных Ph<sup>+</sup> клеток после фиксации спиртом (как указано выше).

Пролиферацию и дифференцировку Ph<sup>+</sup> гранулоцитов и их субпопуляций исследовали следующим образом. Мононуклеары ( $10^6$  клеток), выделенные и отмые от ЭТС, культивировали в

0.8 мл среды  $\alpha$ -MEM, через 2 ч добавляли ЭТС с антибиотиками до конечной концентрации  $0.8 \times 10^6$  клеток/мл и 10% ЭТС. Далее клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub> и насыщающей влажности в течение 1–2 циклов пролиферации и дифференцировки (5–10 сут) в 6–12 лунках для каждого образца. В ходе культивирования отбирали пробы, центрифугировали и для получения кинетических кривых анализировали уровень апоптоза, морфологию субпопуляций в мазках Ph<sup>+</sup> гранулоцитов, вычисляли содержание и концентрацию делящихся Р-клеток и D-клеток, а также рассчитывали значение P/D из кинетических кривых накопления (образования и последующего расходования) Р-клеток и D-нейтрофилов в процессе культивирования [27–31].

Кинетические кривые получали при культивировании суспензии клеток для определения уровня апоптоза, накопления (содержания) как Р-, так и D-клеток, а также их субпопуляций: бластов, промиелоцитов, миелоцитов и метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов. Для этого отбирали пробы и анализировали в них уровень апоптоза, морфологию субпопуляций Ph<sup>+</sup> гранулоцитов на мазках, состав клеток и их содержание на мазках в трех зонах по 100 клеток в каждой, как указано выше. Концентрацию субпопуляций в пробах вычисляли по их содержанию на мазках в пересчете на  $10^6$  клеток/мл суспензии. Отметим, что ранее Ph<sup>+</sup> клетки идентифицировали по экспрессии CD-антигенов, используя для этого набор моноклональных антител [38], причем полученные нами результаты по морфологии хорошо согласуются с опубликованными ранее [28–31]. Содержание мертвых клеток (в  $10^6$  культивируемых клеток) определяли в мазках, используя окрашивание трипановым синим.

О смене чередования этапов созревания (2) и пролиферации (1) и их продолжительности судили по точкам пересечения кинетических кривых накопления нейтрофилов и Р-клеток. Кинетические кривые экспрессии генов *bcr/abl*, *bcl2*, *bax*, *gapdh* и актина строили, основываясь на результатах ОТ-ПЦР тотальной РНК, которую выделяли из  $10^6$  клеток тех же проб, которые использованы в вышеизложенных исследованиях. Подробные методики приведены в работе [27]. Уровни экспрессии генов выражали в условных единицах флуоресценции, *Jt*, фрагментов ПЦР после электрофореза. Структуры праймеров и *Jt/Jgapdh* или *Jt/Жактина* опубликованы ранее [27].

Для обработки кинетических кривых апоптоза и ПДК применяли полиномиальную аппроксимацию шестой степени (на том основании, что кривые имеют волновой характер с несколькими максимумами и минимумами и не подчиняются логарифмической и экспоненциальной зависимости), используя обычные компьютерные про-

граммы для введения трендов полиномиальной аппроксимации. При этом пользовались следующими возможностями и ограничениями полиномиальной аппроксимации. Количество обобщаемых данных оптимально равно степени аппроксимации: степени минус единица. Аппроксимацию принимали достоверной на основании точности экспериментальных данных  $\pm 10\%$ , как указано ранее [28–31]. При аппроксимации значение  $R^2$  находится в интервале 0.84–1.0. Особое значение в характеристике кинетических кривых имеют точки первого периода роста (в наших экспериментах это 5–8 точек в течение первых 6–10 сут).

Отбор проб через сутки при культивировании *ex vivo* сопоставим с ожидаемым временем развития клеточного цикла для животных клеток *in vivo* (приблизительно 1 сут).

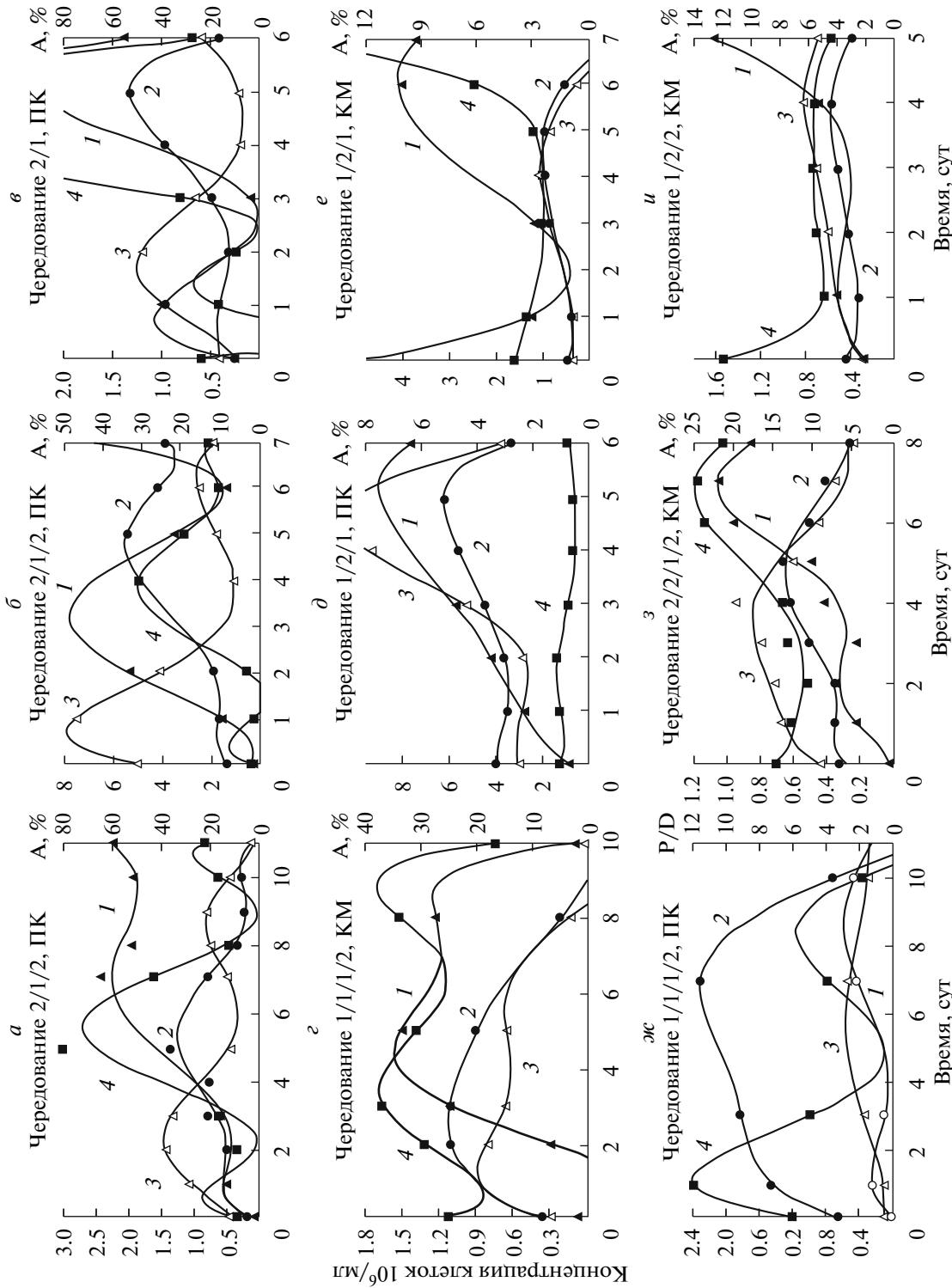
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кинетические кривые уровней апоптоза и накопления пролиферирующих Ph<sup>+</sup> гранулоцитов – клеток Р и D – получены при культивировании мононуклеаров, выделенных из костного мозга и периферической крови отдельных больных ХМЛ. Все исследуемые параметры оценивали в пробе, содержащей  $10^6$  клеток/мл. В этой синхронности анализа всех параметров из каждой пробы – особая ценность полученных кинетических кривых, одновременно отражающих закономерности апоптоза, пролиферации и дифференцировки Р- и D-клеток, индексов P/D (рис. 1), накопления субпопуляций Ph<sup>+</sup> клеток (рис. 2), их скоростей накопления относительно контролей (рис. 3), а также экспрессии генов *bcr/abl*, *bcl2*, *bax* в сравнении с экспрессией генов *gapdh* и актина (рис. 4).

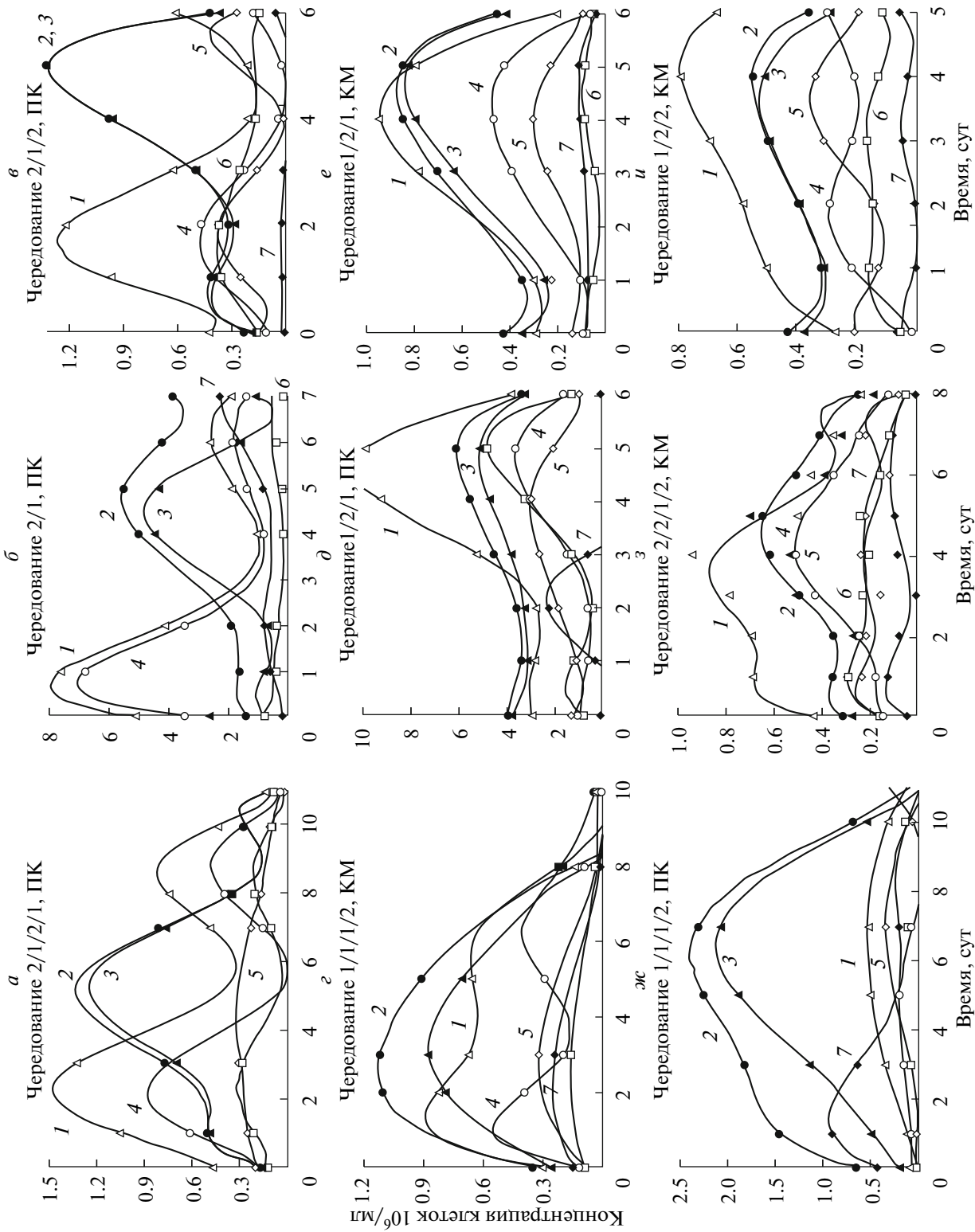
### *Апоптоз в регуляции пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup> клеток ex vivo*

Как видно из рис. 1, в ходе культивирования *ex vivo* уровни апоптоза, значения P/D, кривые накопления различны для пролиферирующих Ph<sup>+</sup> клеток и созревающих нейтрофилов. Уровень апоптоза при пролиферации и дифференцировке Ph<sup>+</sup> гранулоцитов при культивировании основных типов клеток изменяется с последовательностью чередования этапов пролиферации (1) и созревания (2) по схемам 2/1/2 (рис. 1а–в) и 1/2/1 (рис. 1г–и).

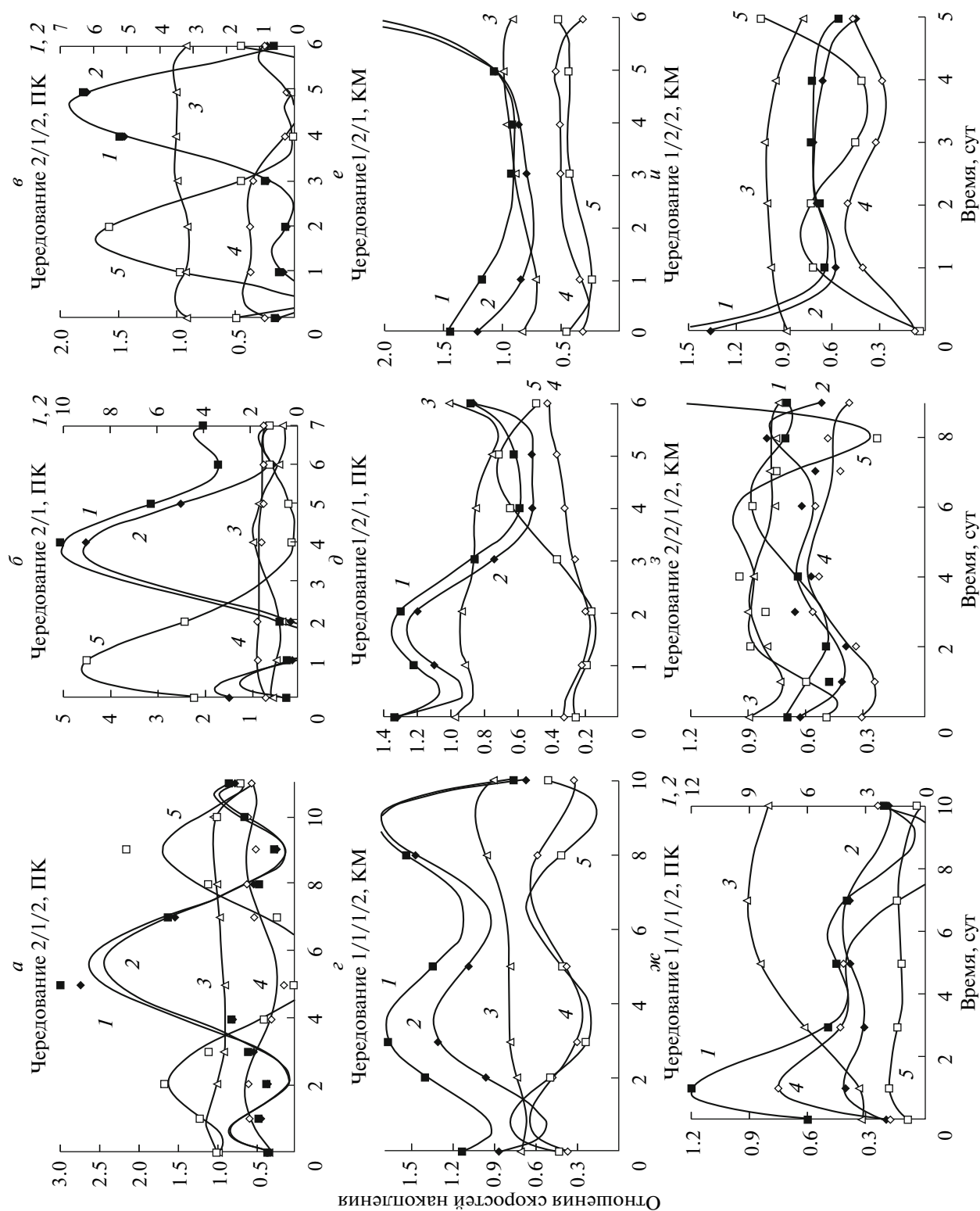
При чередовании этапов созревания и пролиферации по схеме 2/1/2 уровень апоптоза изменяется значительно, причем на кривой видны два максимума (в области 10–20% и 50–80%, т.е. на 1–2 и 3–5 сут) с соответствующими минимумами на 2–3 и 6–7 сут. При активном апоптозе с изменением его блокирования на индукцию, в соответствии с чередованием созревания и пролифе-



**Рис. 1.** Изменение скоростей апоптоза и ПДК пролиферирующих и созревающих  $Rh^+$  клеток при культивировании  $Rh^+$  мононуклеаров, выделенных из костного мозга (КМ) и периферической крови (ПК) индивидуальных больных ХМЛ, в суспензионной культуре. Кинетические кривые уровней апоптоза (1), накопления (образования и превращения) незрелых (делящихся) клеток (2) и созревающих нейтрофилов (3), а также индексов эффективности пролиферации P/D (4), соответствующих пролиферативному потенциалу  $Rh^+$  клеток. Значения P/D рассчитаны как отношение накопления пролиферирующих незрелых  $Rh^+$  клеток к накоплению нейтрофилов для трех основных типов  $Rh^+$  клеток ХМЛ. а–в – Тип 3  $Rh^+$  клеток с чередованием этапов созревания (2) и пролиферации (1) по схеме 2/1/2, что характерно для хронической фазы ХМЛ. г–ж – Тип 1 клеток с чередованием этапов пролиферации (1) и созревания (2) по схеме 1/2/1 и 1/1/1/2, что характерно для бластного криза и фазы акселерации ХМЛ (кривая ж/ отражает содержание мертвых клеток, определенное по окрашиванию трипановым синим). з, и – Тип 2 клеток с чередованием этапов созревания (2) и пролиферации (1) по схеме 2/2/1 и 1/2/2 – подобен ХМЛ в хронической фазе. А% – уровень апоптоза, выраженный в %.



**Рис. 2.** Пролiferация и дифференцировка субпопуляций  $Rh^+$  гранулоцитов ХМЛ *ex vivo*. Кинетические кривые: 1 – зрелые нейтрофилы (D-клетки); 2 – незрелые пролиферирующие клетки (P-клетки); 3 – миелоциты; 4 – сегментоядерные нейтрофилы; 5 – метамиелоциты; 6 – палочкоядерные нейтрофилы; 7 – бласты + промиелоциты. Условия и обозначения схем чередования соответствуют тем, что приведены на рис. 1.



**Рис. 3.** Относительные эффективные скорости накопления субпопуляций  $Rh^+$  клеток. 1 – Индекс P/D; 2 – величина  $K_{ЭС}$  (коэффициент соотношения эффективных скоростей) M/D (отношение содержания миелоцитов к нейтрофилам) показывает относительную скорость превращения миелоцитов в созревающие неделяющиеся нейтрофилы; 3 – величина  $K_{ЭС}$  M/P (отношения содержания миелоцитов к P-клеткам) отражает долю миелоцитов, превращающихся в делящиеся клетки; 4 – величина  $K_{ЭС}$  S/D (отношение содержания сегментоядерных нейтрофилов, наиболее активно выходящих в апоптоз в культуре, к нейтрофилам) показывает относительную скорость апоптоза нейтрофилов; 5 – величина  $K_{ЭС}$  S/M (отношение содержания сегментоядерных нейтрофилов к миелоцитам) характеризует вклад сегментоядерных нейтрофилов в апоптоз нейтрофилов и показывает, как гибель миелоцитов зависит от S.

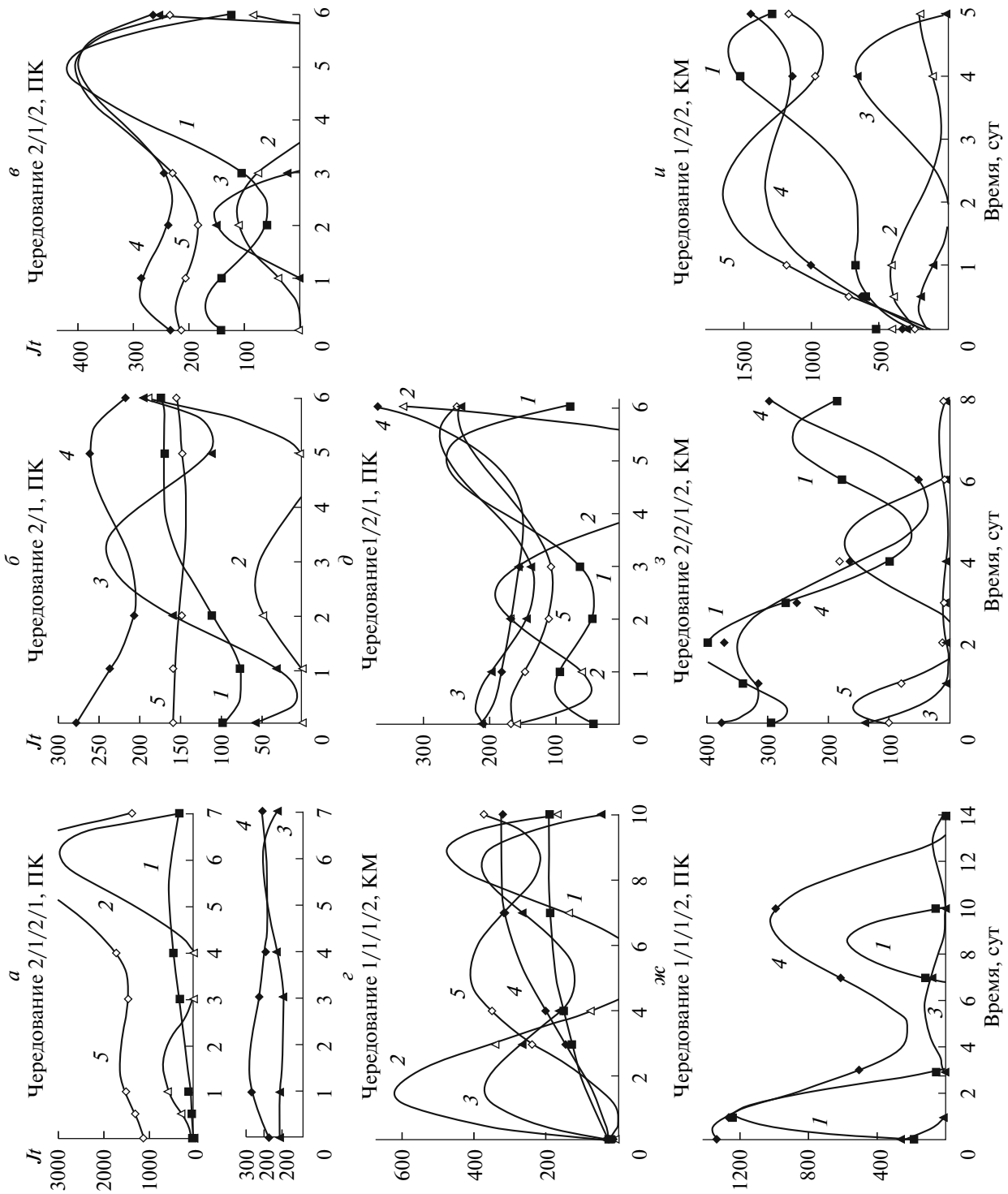


Рис. 4. Кинетические кривые экспрессии генов *bcl/abl* (1), *bax* (2), *bcl2* (3), *gadd45* (4) и актина (5). Условия и обозначения схем чередования приведены на рисунке 1 (а-д, ж-з).



рации 2/1/2, происходит полное завершение цикла ПДК (рис. 2). Это видно по уменьшению концентрации всех субпопуляций на порядок перед новым циклом ПДК, при котором начинает увеличиваться значение P/D и концентрация клеток. При чередованиях 2/1/2 блокирование апоптоза синхронно росту содержания нейтрофилов и падению индекса P/D. Максимальное блокирование апоптоза для чередования 2/1/2 наблюдается при максимальном уровне накопления нейтрофилов и минимальном значении P/D. Достигая минимума, уровень апоптоза увеличивается с уменьшением концентрации нейтрофилов и ростом концентрации пролиферирующих Ph<sup>+</sup> гранулоцитов. Блокирование апоптоза приводит к накоплению пролиферирующих клеток, а индукция апоптоза — к уменьшению содержания нейтрофилов и к активации пролиферации Ph<sup>+</sup> гранулоцитов.

Усиление индукции апоптоза изменяется практически синхронно росту значений P/D. Наблюдаемое чередование блокирования и индукции апоптоза в общем соответствует чередованию этапов созревания нейтрофилов и пролиферации Ph<sup>+</sup> гранулоцитов. Уровень апоптоза на этапах пролиферации существенно выше, чем на этапах созревания. Блокирование апоптоза усиливается с увеличением накопления нейтрофилов, тогда как на этапе пролиферации увеличивается индукция апоптоза (рис. 1а–в). При чередовании по схеме 2/1/2 (тип 3 Ph<sup>+</sup> клеток получен от больных с хронической фазой ХМЛ) уровень апоптоза может значительно варьировать: от 20% до 90% — при изменении концентрации нейтрофилов от  $0.1 \times 10^6$  до  $1.5 \times 10^6$ /мл и P/D от 0.2 до 2.0 (рис. 1 и 2).

Схемы чередования 2/1/2/1 наблюдаются у клеток типа 3 ХМЛ, а клеткам типа 1 и 2, в том числе Ph<sup>+</sup> клеткам фазы акселерации и бластного криза ХМЛ, присуще чередование этапов пролиферации и созревания по схеме 1/2/1 [5–7] — причем уровень их апоптоза на максимумах понижен соответственно до 7, 12, 10 и 20% (рис. 1 д–ж) по сравнению с 50–90% для клеток с чередованием 2/1/2 (рис. 1а–в). Следует заметить, что понижение содержания нейтрофилов на этапе пролиферации, т.е. на этапе созревания, мало влияет на уровень апоптоза (рис. 1г–и). Это находит объяснение в изменении концентраций нейтрофилов и экспрессии генов *bax* и *bcl2* (см. ниже). На рис. 1ж и 2ж представлены кривые пролиферации и созревания Ph<sup>+</sup> гранулоцитов с длительной пролиферацией от больных с бластным кризом ХМЛ и содержанием бластов ~30%. Индексы P/D этих Ph<sup>+</sup> гранулоцитов >12.

При ХМЛ встречаются и Ph<sup>+</sup> клетки типа 2 с длительными этапами созревания с чередованием 2/2/2/1 или 1/2/2/2, у которых также значительно блокирован апоптоз. Их пролиферация

реализуется кратковременно с низким индексом P/D (0.6–0.8). Уровень апоптоза таких клеток на этапе созревания падает до 4–10%, а на этапе пролиферации не превышает в максимумах 12–20% (рис. 1з, у).

На рис. 1а–в и 4а–в видно, что при ПДК типа 3 Ph<sup>+</sup> клеток подавление уровней апоптоза с накоплением нейтрофилов соответствует низкой экспрессии генов *bax* и *bcl2*, а повышение их экспрессии согласуется с усилением апоптоза и уменьшением накопления нейтрофилов при небольших изменениях экспрессии онкогена *bcr/abl*. В Ph<sup>+</sup> клетках типа 1 и 2 устойчивое блокирование апоптоза сопровождается повышенной экспрессией генов *bcl2* > *bax* и онкогена *bcr/abl* (рис. 1д–и и рис. 4д–у). Отсутствие экспрессии *bax* при заметной экспрессии *bcl2* в случаях, представленных на рисунках 1ж–з и 4ж–з, указывает на участие экспрессии *bcl2* > *bax* в блокировании апоптоза при чередовании этапов по схемам 1/2/1, 1/1/1/2 и 2/2/2/1 и предполагает зависимость экспрессии онкогена *bcr/abl* от уровня апоптоза и экспрессии *bcl2* > *bax*.

На рисунках 1г и 4г приведены кривые уровней экспрессии генов, соответствующие ПДК Ph<sup>+</sup> клеток с длительным этапом пролиферации (схема 1/1/1/2) и индексами P/D 0.6–0.8. Видно, что на 1–4 сут при экспрессии *bax* > *bcl2* уровень апоптоза увеличивается до 33%. Затем на 4–6 сут, при экспрессии *bcl2* > *bax*, уровень апоптоза несколько снижается, а на 7–10 сут при экспрессии *bax* > *bcl2* и исчезновении нейтрофилов снова увеличивается до 27%. Это позволяет предположить, что уровень апоптоза регулируется как экспрессией генов *bax* и *bcl2*, так и нейтрофилами. Нельзя исключить возможность, что исследуемые клетки представляют собой смесь клеток типов 1 и 3.

Таким образом, в клетках типа 3 блокирование и индукция апоптоза активно участвует в регуляции ПДК с завершением полного цикла ПДК и оптимизацией индекса P/D и пролиферативного потенциала. В Ph<sup>+</sup> клетках типа 1 и 2 с чередованием 1/2/1, 1/1/1/2 и 2/2/1/2 уровень апоптоза снижен в 3–8 раз.

### **Нейтрофилы в регуляции пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup> клеток *ex vivo***

На рисунках 2а–и представлены кинетические кривые пролиферации и дифференцировки субпопуляций основных типов Ph<sup>+</sup> клеток. Видны точки пересечения кривых при разной последовательности этапов чередования пролиферации и созревания. Оптимальная регуляция созревания и пролиферации происходит чередованием этапов по схеме 2/1/2 с блокированием и индукцией апоптоза синхронно с созреванием нейтрофилов и пролиферацией Ph<sup>+</sup> клеток (рис. 1а–в и рис. 2а–в),

что способствуют снижению индекса  $P/D$  и пролиферативного потенциала. Это происходит при увеличении уровней экспрессии *bcr/abl* в 2–3 раза от созревания к пролиферации и сопровождается накоплением миелоцитов (рис. 2а–в); при этом на максимумах накопления нейтрофилов при созревании наблюдается накопление сегментоядерных клеток, которые быстро выходят в апоптоз. На максимумах пролиферации при весьма низкой концентрации бластов основное содержание составляют миелоциты, которые в ходе культивирования снова превращаются в нейтрофилы с синхронным блокированием апоптоза, а затем ведут к его индукции. Оптимальной регуляции ПДК при чередовании 2/1/2/1, вероятно, способствует быстрое превращение миелоцитов в нейтрофилы, которые не экспрессируют *bcr/abl* [32] и гибнут, повышая уровень апоптоза (рис. 1а–в и рис. 2а–в).

Нейтрофилы в этой регуляции служат посредниками. Их роль, очевидно, связана с блокированием апоптоза. При накоплении нейтрофилы блокируют апоптоз, активируют пролиферацию с аккумуляцией незрелых и миелоцитов. По мере созревания миелоциты превращаются в нейтрофилы, содержание которых растет, что снова подавляет апоптоз. Регулярное повторение чередования этапов созревания и пролиферации 2/1/2 определяет регуляцию ПДК, последовательно повышая и понижая индекс  $P/D$  и, следовательно, пролиферативный потенциал клеток.

На рисунках 1а–в и 2а–в видно, что этапы созревания и пролиферации протекают параллельно, но с повышенной скоростью то созревания, то пролиферации. Здесь максимум скорости накопления нейтрофилов соответствует минимуму скорости накопления делящихся клеток при созревании, и обратная картина наблюдается при пролиферации; при этом скорости созревания и пролиферации поочередно увеличиваются или уменьшаются относительно друг друга. В точках пересечения кривых скорости накопления незрелых клеток и нейтрофилов одинаковы, а соотношение их скоростей и, следовательно, индексы  $P/D$  равны единице; при этом их максимумы и минимумы соответственно чередуются, что определяет волновой процесс регуляции пролиферации и дифференцировки трех основных типов клеток от больных ХМЛ [28–31]. Особенность ПДК по схеме 2/1/2 состоит в повышенном накоплении нейтрофилов на этапах созревания и сегментоядерных клеток в популяции нейтрофилов, которое значительно выше на этапах созревания клеток типа 3 (рис. 2а–в).

При чередовании 1/2/1 и 1/1/1/2 содержание нейтрофилов и сегментоядерных нейтрофилов понижено, особенно на этапах пролиферации (рис. 2г–ж). Видно, что в делящихся  $Ph^+$  гранулоцитах при чередовании 1/2/1, 1/1/1/2 увеличено

содержание бластов и миелоцитов. Так, на 7–9 сут миелоцитов оказывается в 5–10 раз больше, чем нейтрофилов. Особенно мало сегментоядерных нейтрофилов в периферической крови при длительной пролиферации с  $P/D \geq 5$ ; при этом содержание сегментоядерных нейтрофилов в 2–3 раза меньше общего числа всех нейтрофилов.

К шестым суткам состав незрелых клеток на 80–90% представлен миелоцитами, которые не превращаются в нейтрофилы (в метамиелоциты и далее), а просто гибнут (но не более 5–20%, рис. 2д–е). Это означает, что блокирование апоптоза приводит к накоплению бластов и миелоцитов, которые сохраняются длительно, до 10 сут, не превращаясь в нейтрофилы, тогда как превращение миелоцитов в нейтрофилы для клеток с чередованием этапов по схеме 2/1/2/1 равномерно повторяется (рис. 2а–в).

При чередовании 1/2/1, 1/1/1/2 (рис. 2г–ж) миелоциты накапливаются и гибнут, минуя превращение в нейтрофилы при переходе к следующему циклу ПДК. В этих миелоцитах блокируется не только их пролиферация, но, предположительно, останавливается и/или затягивается их созревание до нейтрофилов. Это свойство, по-видимому, может быть результатом высокой экспрессии онкогена *bcr/abl* в бластах и миелоцитах [7, 27].

Если чередование этапов ПДК (2/1/2/1) проходит через противопоставление максимумов и минимумов скоростей на кривых созревания нейтрофилов и пролиферации  $Ph^+$  клеток, то при чередовании 1/2/1 скорости накопления незрелых клеток и нейтрофилов изменяются практически параллельно: при каждом чередовании этапов их минимумы, как и их максимумы, совпадают, т.е. асинхронность минимальных и максимальных накоплений незрелых и зрелых клеток при чередовании этапов (рис. 1а–в) замещается синхронными совпадением минимумов с минимумами или максимумов с максимумами накопления этих клеток (рис. 1г–ж). При длительных этапах пролиферации всегда с большей скоростью происходит накопление незрелых клеток. Наблюдаемое блокирование и индукция апоптоза практически соответствуют чередованию этапов созревания нейтрофилов и пролиферации  $Ph^+$  клеток.

В регуляции 1/2/1 или 1/1/2 содержание нейтрофилов понижено, особенно на этапе пролиферации; апоптоз устойчиво блокирован, что приводит к накоплению бластов и миелоцитов. Уровни экспрессии *bcr/abl* увеличиваются в 4–6 раз (рис. 4д–ж). Подавление апоптоза при чередовании этапов 1/2/1, очевидно, соответствует стадиям фазы акселерации и бластного криза ХМЛ [10–12, 28–32]. В  $Ph^+$  клетках бластного криза ХМЛ и раньше обнаруживали блокирование апоптоза [1–5, 8, 9, 11, 13–20].

При чередовании по схеме 1/2/1 в образующихся бластах и миелоцитах экспрессия гена *bcr/abl* повышается в 4–6 раз (рис. 4з–ж), что согласуется с известными данными [7, 27, 32].

Соотношения скоростей накопления ряда субпопуляций Ph<sup>+</sup> клеток при разных чередованиях пролиферации и созревания (рис. 3) анализировали по изменению коэффициентов соотношений их эффективных скоростей ( $K_{ЭС}$ ). Выбор субпопуляций, для которых определяли отношения скоростей, проведен по следующим параметрам: 1) величина  $K_{ЭС} P/D$  (незрелых делящихся Р-клеток относительно нейтрофилов, созревающих без деления, т.е. зрелых D-клеток) показывает меру пролиферативного потенциала Ph<sup>+</sup> клеток и равно индексу эффективности P/D; 2) величина  $K_{ЭС} M/D$  (миелоцитов к нейтрофилам) показывает относительную скорость превращения миелоцитов в созревающие неделяющиеся нейтрофилы; 3) величина  $K_{ЭС} M/P$  (миелоцитов относительно незрелых клеток) отражает долю миелоцитов, превращающихся в делящиеся клетки; 4) величина  $K_{ЭС} S/D$  – накопление сегментоядерных (S, т.е. нейтрофилов, наиболее активно выходящих в апоптоз в культуре) по отношению к общему накоплению нейтрофилов – показывает относительную скорость апоптоза нейтрофилов; 5) величина  $K_{ЭС} S/M$  – накопление S по отношению к миелоцитам – характеризует вклад сегментоядерных клеток в апоптоз нейтрофилов и показывает, как гибель миелоцитов зависит от сегментоядерных нейтрофилов. Благодаря асимметричному делению, миелоциты, однажды поделившись, далее частично без деления превращаются в нейтрофилы (последовательно в метамиелоциты, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы) [33–35].

На рис. 3а–в представлены соотношения скоростей накопления разных субпопуляций при регуляции ПДК с чередованием созревания и пролиферации по схеме 2/1/2/1, из которых видно увеличение вплоть до 7 раз индекса P/D и  $K_{ЭС} M/P$  на этапе пролиферации и их уменьшение на 1 порядок при созревании; причем зависимость  $K_{ЭС} M/P$  сохраняет линейность на всем интервале. В то же время зависимость  $K_{ЭС} S/M$  от чередования пролиферации и созревания зеркально противоположна той, которая наблюдается для P/D и M/P. При этом максимумы  $K_{ЭС} S/M$  соответствуют минимумам P/D и M/D, и наоборот. Это подтверждает участие сегментоядерных и всех других нейтрофилов (D-клеток) в апоптозе при линейной зависимости сегментоядерных от накопления нейтрофилов. Полученные результаты свидетельствуют о практически равномерном уменьшении и последующем росте индекса P/D, о низком содержании бластов в пуле делящихся клеток и лишь небольших колебаниях  $K_{ЭС} S/D$

(эффективной скорости выхода в апоптоз сегментоядерных относительно всех нейтрофилов). Таким образом, рассчитанные значения всех  $K_{ЭС}$  свидетельствуют о наличии устойчивой системы оптимального регулирования пролиферативного потенциала клеток с чередованием этапов по схеме 2/1/2 и соответствующих условий апоптоза и ПДК *ex vivo* при завершении полного цикла ПДК Ph<sup>+</sup>клеток (рис. 3а–в).

При чередовании 1/2/1 и при длительных этапах пролиферации чередование этапов ПДК сохраняется (рис. 3г–ж), однако в этом случае максимальные значения P/D в 2–3 раза ниже, чем при чередовании 2/1/2; при этом значения  $K_{ЭС} M/D$  ниже P/D, что отражает повышенное содержание бластов в пуле делящихся клеток и заметное отклонение от горизонтали  $K_{ЭС} M/P$  соответственно. При чередовании 1/2/1 изменение  $K_{ЭС} S/M$  и S/D схоже, их минимумы на этапе пролиферации противопоставлены максимумам  $K_{ЭС} P/D$  и M/D, как при чередовании 2/1/2, но имеют меньшие значения и меньшие различия. На этапе созревания максимумы их  $K_{ЭС}$ , наоборот, сближаются с минимумами  $K_{ЭС} P/D$  и M/D, что предполагает снижение вклада нейтрофилов и сегментоядерных клеток в апоптоз. Кроме того, увеличивается продолжительность цикла ПДК с 6–7 до 10–11 сут, уменьшается значение  $K_{ЭС} M/D$  (скорость превращения миелоцитов в нейтрофилы, особенно в сегментоядерные) и накапливаются миелоциты. На этапе созревания величина  $K_{ЭС} S/D$  хотя и увеличивается (рис. 3д), но на апоптоз (рис. 1д) и накопление миелоцитов это не влияет (рис. 2д).

Тот факт, что значения  $K_{ЭС} M/D$  в 2–3 раза превышают величины P/D (рис. 3ж), по-видимому, свидетельствует о том, что выход миелоцитов через нейтрофилы в апоптоз существенно блокирован и сопровождается значительным уменьшением  $K_{ЭС} S/D$  и P/D (рис. 2ж). Это может быть обусловлено высокой экспрессией онкогена *bcr/abl* (рис. 4ж) и продуцированием миелоцитами факторов, блокирующих их превращение в нейтрофилы, а также непосредственным апоптозом миелоцитов. Миелоциты накапливаются, а нейтрофилы и сегментоядерные клетки гибнут с прежней скоростью – это приводит к уменьшению отношения  $K_{ЭС} S/M$  и практически не изменяет  $K_{ЭС} S/D$  (рис. 3г–ж), что согласуется с низкой экспрессией *bax* и *bcl2* или ее отсутствием (рис. 4г–ж). Однако это не объясняет падения индексов P/D и  $K_{ЭС} M/D$  при созревании, которые в этом случае должны бы расти.

Усиленная экспрессия онкогена *bcr/abl* в миелоцитах, возможно, препятствует превращению миелоцитов в нейтрофилы (рис. 4г–у). Кроме того, в нейтрофилах экспрессия *bcr/abl* в несколько раз ниже, чем в миелоцитах [27], а в нейтрофилах,

выделенных на сортере, экспрессия *bcr/abl* вообще не регистрируется [7].

Отметим, что величина  $K_{эс} S/D$  мало изменяется при чередовании 2/1/2 (рис. 3а–в, д, е), а значения  $K_{эс} S/M$  почти одинаковы на всем протяжении цикла, т.е. соотношение S/M не изменяется в этом случае (рис. 3е, ж).

По изменению значений  $K_{эс}$  можно судить о подавлении пролиферации при длительных этапах созревания, что сопровождается повышенным накоплением нейтрофилов и чередованием 1/2/2/2 и 2/2/1/2 (рис. 3з, и), при которых также существенно блокирован апоптоз (рис. 1з, и). В этом случае значения P/D и  $K_{эс} M/D$  становятся ниже  $K_{эс} M/P$ , S/M и S/D, не превышая величины 0.8 даже на максимумах, что в 5–10 раз ниже, чем при чередованиях 1/2/1, 1/1/1/2 и 2/1/2. (рис. 3з–и).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что *ex vivo* блокирование и индукция апоптоза миелоидных клеток, содержащих Ph-хромосому при ХМЛ, происходит при последовательном чередовании этапов созревания и пролиферации ПДК, в регуляции которых участвуют пролиферирующие  $Ph^+$  гранулоциты и нейтрофилы, созревающие без деления. Эти процессы определяет экспрессия генов, регулирующих апоптоз, клеточный цикл и ПДК и, в частности, экспрессия генов *bcr/abl*, *bax* и *bcl2* (рис. 4) [7, 27]. Экспрессию этих генов оценивали в пробах, взятых в данной работе. Впервые показано значение экспрессии *bcr/abl*, *bax* и *bcl2* в регуляции ПДК и апоптоза при чередовании пролиферации и созревания  $Ph^+$  клеток ХМЛ.

При чередовании созревания (2) и пролиферации (1) по схеме 2/1/2 блокирование и индукция апоптоза регулируются с участием нейтрофилов. В этих условиях поддерживается оптимальное соотношение скоростей пролиферации и созревания, что определяется индексом эффективности P/D, отражающим пролиферативный потенциал  $Ph^+$  гранулоцитов. С чередованием 2/1/2 этапов созревания и пролиферации совершается полный цикл ПДК. Клетки с чередованием этапов 2/1/2 относятся к наиболее распространенному третьему типу  $Ph^+$  клеток ХМЛ и характерны для хронической фазы заболевания. По нашим данным тип 3 клеток встречается приблизительно в 50% случаев ХМЛ. В клетках с чередованием этапов созревания нейтрофилов и пролиферации 2/1/2 поддерживается, вероятно, оптимальная регуляция пролиферации и созревания. При накоплении нейтрофилов индекс P/D снижается, последующая индукция апоптоза (с подавлением этапа созревания и накопления нейтрофилов), наоборот, способствует активации этапа пролифера-

ции, накоплению пролиферирующих клеток и, следовательно, росту значений P/D. Наблюдаемый нами вид апоптоза при чередовании ПДК по схеме 2/1/2 *ex vivo* не был описан ранее, как и зависимость регуляции ПДК от последовательности чередования этапов. Полученные результаты предполагают, что  $Ph^+$  клетки способны полностью завершать пролиферацию и дифференцировку, очевидно, аналогично миелопоэзу кроветворных клеток в норме. Способность клеток завершать цикл ПДК *in vivo* у больных ХМЛ в хронической фазе также известна [1–5, 10, 11]. Подобный механизм регуляции апоптоза, пролиферации и дифференцировки с участием нейтрофилов, возможно, имеет место и при нормальном кроветворении.

В  $Ph^+$  клетках с чередованием этапов 1/2/1 апоптоз существенно и длительно блокирован. Это свойство  $Ph^+$  клеток типа 1 и 2 с повышенной экспрессией *bcr/abl*, которые выделены от больных ХМЛ в фазах акселерации и бластного криза (при прогрессии ХМЛ) [21–24]. В клетках таких больных ХМЛ и ранее наблюдали блокирование апоптоза *in vivo* [1–5, 8, 9, 11, 16, 18]. Клетки-предшественники бластов из образцов больных ХМЛ в фазе бластного криза считаются лейкозными стволовыми клетками [5, 9]. Блокирование апоптоза характерно также для клеточных линий  $Ph^+$  клеток [13–18].  $Ph^+$  клетки с чередованием пролиферации и созревания 1/2/1 отличаются от таковых с чередованием 2/1/2 устойчивым блокированием апоптоза, высоким содержанием бластов, высокой экспрессией генов *bcr/abl* и *bcl2* > *bax*, а также низким содержанием или отсутствием нейтрофилов.

Полученные нами результаты согласуются с данными о повышенной экспрессии гена *bcr/abl* для выделенных на сортере миелобластов и миелоцитов и об отсутствии такой экспрессии в нейтрофилах, содержащих этот ген [7]. Известно также, что *bcr/abl*-опосредованное ингибирование апоптоза задерживает G2/M переход из-за повреждения ДНК [14]. Кроме того, для нейтрофилов обнаружен особый путь апоптоза – через образование экстраклеточных структур хроматина с участием нейтрофилов [39]. Механизм резистентности  $Ph^+$  клеток к множеству противоопухолевых агентов также связан с блокированием апоптоза [14].

Апоптоз и нейтрофилы способствует включению и выключению активной пролиферации и снижению пролиферативного потенциала. Анализ кинетических кривых ПДК по четырем параметрам (уровням апоптоза, пролиферации и созревания нейтрофилов *ex vivo*, а также их индексов P/D) позволяет определить роль индукции и блокирования апоптоза в сочетании с чередованием пролиферации клеток и созревания нейтро-

филов в регуляции ПДК. Культивирование Ph<sup>+</sup> клеток *ex vivo* выявляет различия в апоптозе и экспрессии *bcr/abl*, что можно использовать в диагностике фаз ХМЛ и в выборе терапии ХМЛ. Определение схемы чередования пролиферации и созревания в культуре может послужить основой диагностики типов клеток индивидуальных больных ХМЛ, особенно для выявления фазы снижения способности клеток к апоптозу, что приводит к бластному кризу ХМЛ.

### ВЫВОДЫ

1. Пролиферация и дифференцировка Ph<sup>+</sup> клеток *ex vivo* при чередовании этапов пролиферации и созревания регулируется последовательным блокированием и индукцией апоптоза с участием нейтрофилов и экспрессии генов *bcr/abl*, *bax* и *bcl2*.

2. При пролиферации и дифференцировке *ex vivo* миелоидных клеток, содержащих Ph-хромосому при ХМЛ, обнаружено два пути регуляции уровней апоптоза. Первый – поочередное блокирование и индукция апоптоза – реализуется при последовательном чередовании созревания и затем пролиферации (2/1/2). Этот путь оптимизирует эффективность пролиферации (индексы P/D), определяет завершение цикла пролиферации и дифференцировки и реализуется в клетках больных с хронической фазой ХМЛ. Второй путь – устойчивое блокирование апоптоза – начинается с этапа пролиферации при пониженном содержании нейтрофилов и сохраняется при созревании (1/2/1). Он характерен для больных ХМЛ в фазе прогрессии.

3. При последовательном чередовании созревания нейтрофилов и пролиферации Ph<sup>+</sup> клеток (2/1/2) блокирование и индукция апоптоза синхронны этапам созревания и пролиферации. Блокирование апоптоза на этапе созревания нейтрофилов активирует последующую пролиферацию с накоплением делящихся Ph<sup>+</sup> клеток, что отражают высокие значения индексов P/D. Последующее превращение миелоцитов в нейтрофилы с блокированием апоптоза, гибелью нейтрофилов и новой волной индукции апоптоза регулярно тормозит пролиферацию, индексы P/D понижаются и обеспечивают полный цикл пролиферации и дифференцировки.

4. Устойчивое блокирование апоптоза Ph<sup>+</sup> клеток возникает при чередовании, начинающемся с этапа пролиферации при низком содержании нейтрофилов, и сохраняется при последующем созревании (1/2/1). Это наблюдается в клетках с длительным этапом пролиферации и с длительным этапом созревания, в которых накапливаются бласты и миелоциты с повышенной экспрессией генов *bcr/abl* и *bcl2* > *bax*. В таких клетках уро-

вень апоптоза в 3–8 раз ниже, чем при чередовании этапов 2/1/2.

Работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (06-04-08372-офи).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Deininger M.W.N., Goldman J.M. 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. **96**, 3343–3356.
2. Melo J.V. 1996. The diversity of the BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*. **88**, 2375–2384.
3. Jiang X., Eisterer W., Chalandon Y., Porada G., Zanjani E., Eaves A. 2003. New models to investigate mechanisms of disease genesis from primitive BCR-ABL(+) hematopoietic cells. *Ann. NY Acad. Sci.* **996**, 1–9.
4. 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.
5. Jamieson C.H.M., Ailles L.E., Dylla S.J., Muijtjens M., et al. 2004. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast crisis CML. *New Eng. J. Med.* **354**, 657–667
6. Buckle A.M., Mottram R., Pierce A., et al. 2000. The effect of Bcr-Abl protein tyrosine kinase on maturation and proliferation of primitive haematopoietic cells. *Mol. Med.* **6**, 892–902.
7. Primo D., Flores J., Quijano S., Sanchez M.L., et al. 2006. Impact of BCR/ABL gene expression on the proliferative rate of different subpopulations of haematopoietic cells in chronic myeloid leukaemia. *Brit. J. Haematol.* **135**, 43–51.
8. Coppo P., Dusanter-Fourt I., Millot G., et al. 2003. Constitutive and specific activation of STAT3 by BCR-ABL in embryonic stem cells. *Oncogene*. **22**, 4102–4110.
9. Traycoff C.V., Haistead B., Rice S., et al. 1998. Chronic myelogenous leukaemia CD34<sup>+</sup> cells exit G0/G1 phases of cell cycle more rapidly than normal marrow CD34<sup>+</sup> cells. *Brit. J. Haematol.* **102**, 759–767.
10. Абдулкадыров К.М., Бессмельцев С.С., Рукавицын О.А. 1998. Хронический миелолейкоз. С.-Пб.: Специальная литература.
11. Воробьев А.И. 2002. *Руководство по гематологии, т. 1*. М.: Ньюдиамед.
12. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Тупицин Н.Н. 2005. *Иммунотипирование в иммунодиагностике гемобластозов*. М: Триада.
13. Cortez D., Kadlec L., Pendergast A.M. 1995. Structural and signaling requirements for bcr-abl-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **10**, 5531–5541.
14. Bedi A., Barber J.P., Bedi G.C., El-Deiry W.S., et al. 1995. Bcr-abl-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damaged: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood*. **86**, 1148–1158.
15. Selleri C., Maciejewski J.P., Pane F., et al. 1998. Fas-mediated modulation of bcr/abl in chronic myeloge-

- nous leukemia results in differential effects on apoptosis. *Blood*. **92**, 981–989.
16. Stoklosa T., Poplawski T., Koptyra M., et al. 2008. Bcr/abl inhibits mismatch repair to protect from apoptosis and induce point mutations. *Cancer Res.* **68**, 2576–2580.
  17. Adams J.M. 2003. Ways of dying: multiple pathways in apoptosis. *Genes Dev.* **17**, 2481–95.
  18. Van Delft M.F., Huang D.C.S. 2006. How BCL2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res.* **15**, 203–213.
  19. Fletcher J. I., Meusburger S., Hawkins C.J., et al. 2008. Apoptosis is triggered when prosurvival Bcl-2 proteins cannot restrain Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 18081–87.
  20. Amarante-Mendes G.P., Naekyung Kim C., et al. 1998. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood.* **91**, 1700–1705.
  21. Adams J.M. 2003. Ways of dying: multiple pathways in apoptosis. *Genes Dev.* **17**, 2481–95.
  22. Green D.R., Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* **305**, 626–629.
  23. Miyashita T., Kraevsky S., Kraevsky M., et al. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of BCL2 and Bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene.* **9**, 1799–1805.
  24. Gesbert F., Griffin J.D. 2000. Bcr/abl activates transcription of the Bcl-X gene through Stat5. *Blood.* **96**, 2269–2276.
  25. Danial N.N. 2007. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death, *Clin. Cancer Res.* **13**, 7254–7263.
  26. Niwa H., Burdon T., Chambers I., Smith A. 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells via activation of STAT3. *Genes Dev.* **12**, 2048–2060.
  27. Гринева Н.И., Духовенская Е.А., Тимофеев А.М., Ахлынина Т.В., и др. 2012. Экспрессия генов при пролиферации дифференцировке гемопоэтических клеток с Ph-хромосомой *ex vivo*. *Acta Naturae.* **4**, 101–120.
  28. Гринева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., и др. 2009. Клеточная регуляция пролиферации и дифференцировки *ex vivo* клеток, содержащих Ph хромосому при хроническом миелолейкозе. *Acta Naturae.* **1**, 120–133.
  29. Гринева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., и др. 2010. Различия в пролиферации и дифференцировке Ph<sup>+</sup> клеток от индивидуальных больных ХМЛ в суспензионной культуре. 3. Чередование этапов пролиферации и созревания дифференцирующихся Ph<sup>+</sup> клеток. *Росс. Биотерапевт. Ж.* **9**, 61–76.
  30. Гринева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Сарычева Т.Г., и др. 2009. Различия в пролиферации и дифференцировке Ph<sup>+</sup> клеток от разных больных ХМЛ в культуре. Три типа Ph<sup>+</sup> клеток при ХМЛ. Пролиферация и дифференцировка Ph<sup>+</sup> клеток с высокой эффективностью. *Росс. Биотерапевт. Ж.* **8**, 53–68.
  31. Ахлынина Т.В., Гринева Н.И., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., и др. 2010. Различия в пролиферации и дифференцировке Ph<sup>+</sup> клеток от индивидуальных больных ХМЛ в суспензионной культуре. Ph<sup>+</sup> клетки с низкой эффективностью пролиферации и способностью блокировать апоптоз. *Росс. Биотерапевт. Ж.* **9**, 3–12.
  32. Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Саркисян Г.П., Герасимова Л.П., и др. 2007. Кинетика пролиферации, дифференцировки и транскрипции генов, регулирующих апоптоз, BCR/ABL<sup>+</sup>Ph<sup>+</sup> клеток человека в культуре. *Цитология.* **49**, 889–900.
  33. Розмарин А.Д. 2000. Лейкоциты. В кн.: *Патофизиология крови*. Ред. Шиффман Ф.Д. С.-Пб.: ВИНОМ. С. 123–148.
  34. Borregaard N., Cowland J.V. 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* **89**, 3503–3521.
  35. Козинец Г.И., Котельников В.М. 1983. Кинетика гемопоэза и ее клиническое значение. *Советская медицина.* **4**, 3–77.
  36. Абрамов М.Г. 1985. *Гематологический атлас*. М.: Медицина.
  37. Гринева Н.И., Барышников А.Ю., Герасимова Л.П., Боровкова Т.В., и др. 2007. Кинетика экспрессии антигенов в процессе пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup> клеток периферической крови при хроническом миелолейкозе в культуре. *Росс. Биотерапевт. Ж.* **6**, 1–32.
  38. Dean P.N. 1980. A simplified method of DNA distribution analysis. *Cell Tissue Kinet.* **13**, 299–302.
  39. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., et al. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **176**, 231–241.