

УДК 612.119+616.155.392-036.12+616.15-07

Порівняльна оцінка морфофункціональної активності клітин кісткового мозку пацієнтів при хронічній мієлоїдній лейкемії у разі терапії препаратами групи інгібіторів тирозинкіназ першого та другого покоління

I.O. Жалейко¹, Д.І. Білько¹, І.С. Дягіль², Н.М. Білько¹

¹Центр молекулярних та клітинних досліджень

Національного університету «Києво-Могилянська академія», Київ, Україна

²ДУ «Науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ, Україна

Показано ефективність застосування культуральних методів дослідження для моніторингу відповіді пацієнтів на терапію інгібіторами тирозинкіназ першого та другого покоління. Функціональна активність клітин кісткового мозку пацієнтів, які мали оптимальну відповідь на терапію інгібіторами тирозинкіназ, була значно меншою порівняно з пацієнтами, які характеризувалися набутою резистентністю до препаратів, та хворими, у яких ХМЛ було діагностовано вперше. У пацієнтів з оптимальною відповіддю на терапію нілотинібом кількість колоній у напіврідкому агарі *in vitro* була меншою порівняно з пацієнтами, які мали оптимальну відповідь на терапію препаратом іматиніб. При набутті клітинами лейкемічного клону пацієнтів резистентності до терапії інгібіторами тирозинкіназ у клітинних агрегатах спостерігалось переважання ранніх клітин гранулоцито-макрофагального ростка кровотворення, що може слугувати важливим діагностичним і прогностичним фактором для подальшого вибору стратегії лікування.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія; культура клітин *in vitro*; інгібітори тирозинкіназ

Comparative evaluation of bone marrow cells morpho-functional activity in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors of the first and second generation

I.O. Zhaleyko¹, D.I. Bilko¹, I.S. Dyagil², N.M. Bilko¹

¹Centre for Molecular and Cell Research of the National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine

²Scientific Centre of the Radiation Medicine NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The efficiency of using the culture techniques of research for monitoring the patient's response to the treatment by tyrosine kinase inhibitors of the first and second generation is shown. Thus, the functional activity of bone marrow cells in patients having the optimal treatment response to inhibitors of tyrosine kinases was significantly lower compared with patients with the acquired resistance to the drug, and patients who had CML diagnosed for first time. Furthermore, for patients with the optimal response to the nilotinib therapy, numbers of colonies in semi-solid agar *in vitro* was lower, than in patients with the optimal response to imatinib. When the leukaemic cell clone becomes resistant to tyrosine kinase inhibitors, the prevalence of early cells of granulocyte-macrophage hematopoietic stem cells is observed in CFU culture which can be an important prognostic factor for choosing the appropriate treatment strategy.

Keywords: chronic myeloid leukemia; cell culture *in vitro*; tyrosine kinase inhibitors

Вступ

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) – один із найпоширеніших гемобластозів. Захворюваність становить 1 на 100 тис. випадків на рік (Weisberg et al., 2007). Причиною виникнення захворювання є поява реципрокної транслокації t(9;22)(q34;q11) у гемопоетичній стовбуровій клітині. У результаті цього формується дериватна 22-га хромосома з укороченим довгим плечем, яку прийнято називати Філадельфійською (Ph) (Frazer et al., 2007). На ній утворюється онкоген BCR-ABL, котрий кодує онкобілок – BCR-ABL тирозинкіназу, що володіє здатністю до аутофосфорилування, постійно передаючи сигнал на вторинні месенджери сигнальних каскадів, які залучені практично до всіх процесів життєдіяльності клітини (Chen et al., 2010). У хронічній фазі це захворювання зумовлює незалежність лейкемічних клітин від ростових факторів і контактного інгібування, постійну активацію мітогенних сигналів, зниження здатності Ph⁺-клітин до апоптозу (Frazer et al., 2007). У результаті таких перетворень клітини лейкемічного пулу поступово витісняють пул нормальних гемопоетичних клітин пацієнта та, з набуттям додаткових мутацій, зумовлення нестійкості геному, спричинюють прогресування захворювання до фази акселерації та бластного кризу (Vasco et al., 2000).

Наприкінці 1990-х років доктор Нейман і колеги досліджували специфічні інгібітори тирозинкіназ (ІТК), що і сприяло відкриттю інгібіторів BCR-ABL тирозинкінази (Chen, 2010). На початку 2000-х імаїніб – ІТК першого покоління було введено у клінічну практику як препарат, що вибірково блокує проліферацію клітин лейкемічного клону, викликаючи повну елімінацію Ph⁺-клітин у пунктатах кісткового мозку пацієнтів через рік від початку прийому препарату (повна цитогенетична відповідь) (Mughal et al., 2013). Однак пізніше виявилось, що лише у 70–90% випадків пацієнти досягають повної цитогенетичної відповіді (Mukhopadhyay et al., 2012). У решти хворих до препарату з часом формується резистентність. Найпоширенішою причиною стійкості до імаїнібу є мутації в гені BCR-ABL, причина яких – зміна конформації однойменної тирозинкінази, що перешкоджає зв'язуванню препарату з онкобілком (Michael et al., 2000).

Із метою подолання стійкості до імаїнібу розроблено препарати другого покоління, зокрема нілотиніб, який здатен протидіяти більшості мутацій, що є причиною стійкості до імаїнібу (Mughal et al., 2013). Нілотиніб відрізняється від імаїнібу характером взаємодії з BCR-ABL білком (в основному за рахунок ліпофільних взаємодій з тією поверхнею протеїну, де міститься АТФ-кишень, блокуючи її) і вважається у 20 разів потужнішим проти Ph⁺-клітин, що продемонстровано на клітинних лініях *in vitro* (Belle et al., 2012). Терапія нілотинібом викликає швидше та глибше зниження кількості клітин лейкемічного пулу порівняно з імаїнібом (Lanaerts et al., 2011). Однак до нілотиніб, як і до імаїнібу, із часом може виникати резистентність, механізми формування якої до кінця не з'ясовано.

Мета даного дослідження – оцінити морфофункціональні властивості гемопоетичних клітин пацієнтів із різною відповіддю на терапію препаратами ІТК для вияв-

лення особливостей формування стійкості до терапії на рівні стовбурових клітин та їх найближчих попередників.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт дослідження – пунктати кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ, які перебували на амбулаторному лікуванні в ДУ «Національний центр радіаційної медицини» НАМН України. Перед початком дослідження всі хворі давали добровільну інформовану згоду на використання їх матеріалу в експериментах. Залежно від тактики терапії, яку отримували пацієнти, їх поділили на три групи: ті, у яких було вперше діагностовано ХМЛ (n = 5), пацієнти, які як терапію отримували препарат імаїніб (n = 28) та хворі, які як таргетну терапію отримували препарат нілотиніб (n = 19).

Для підтвердження діагнозу та оцінки відповіді на терапію ІТК здійснювали цитогенетичне дослідження клітин кісткового мозку пацієнтів на 12-й місяць від початку терапії, вираховуючи процентний вміст метафаз, що містять Ph-хромосому. Відповідно до показників цитогенетичного дослідження, пацієнти, після 12 місяців прийому ІТК, поділялися на групи: ті, які мали оптимальну відповідь на терапію (у їх кістковому мозку відсутні клітини, що мають Ph-хромосому) та пацієнти, які характеризувалися відсутністю відповіді на лікування (стійкість до препарату; у їхньому кістковому мозку відмічалось 1–100% Ph⁺-клітин).

Мононуклеари кісткового мозку пацієнтів культивували *in vitro* у напіврідкому агарі (0,33% бакто-агару ("Difco", США)), у 24-коміркових планшетах (Nunc, США). Суспензію для культивування готували на основі середовища RPMI-1640 ("Sigma", США) із додаванням 20% фетальної телячої сироватки ("Sigma", США), антибіотиків (50 МО/мл пеніцилін, 50 мг/мл стрептоміцин) та 50 нг/мл гранулоцито-макрофагального ростового фактора ("Sigma", США). Культивування тривало 13 діб за умов абсолютної вологості та 5% CO₂. Після цього визначали функціональну активність клітин кісткового мозку пацієнтів шляхом підрахунку кількості колоній і кластерів у комірках культурального планшета під інвертованим мікроскопом (Nikon, Японія).

Із метою морфологічного дослідження вмісту колоній і кластерів їх вилучали з бактоагару за допомогою мікропіпетки, ресуспендували у 50 мкл середовища RPMI-1640 та виготовляли препарати на цитоцентрифузі (Shandon, Великобританія). Забарвлення цитологічних препаратів здійснювали методом Паппенгейма.

Порівняння вибірок проводили за допомогою непараметричних методів (критерій Манна – Уїтні). Висновок про статистичну значущість відмінності робили при P < 0,05.

Результати та їх обговорення

Кількість клітинних агрегатів у напіврідкому агарі *in vitro* використовується як тест-система для перевірки впливу хіміотерапевтичних препаратів на клітини пухлини. При гемобластозах у багатьох дослідженнях продемонстровано пряму кореляцію між результатами культивування та клінічною картиною пацієнтів (Maayan

et al., 2009). Саме цей феномен наштовхнув нас на думку дослідити особливості функціонування гемопоетичних клітин пацієнтів, які мали різний характер відповіді на терапію ІТК з метою пошуку функціональних і морфологічних особливостей клітин кісткового мозку при ХМЛ, що могли б мати прогностичне значення для оцінки подальшого перебігу хвороби.

На першому етапі досліджень необхідно було встановити оптимальний термін культивування гемопоетичних клітин пацієнтів із ХМЛ, який визначали емпірично. Для цього кожні дві доби підраховували кількість клітинних агрегатів у комірці планшета. Результати дослідження виявили, що при ХМЛ кластери з'являлися на 3-тю добу культивування у великій кількості ($115,5 \pm 1,2$) (рис. 1). До 9-ї доби культивування їх кількість дещо збільшувалася, але недостовірно, і надалі продовжувала стрімко зменшуватися. Крім того, на 3-тю добу культивування також з'являлися невеликого розміру колонії (40–50 клітин). У випадку кластерів кількість колоній

компактного типу до 9-ї доби культивування збільшувалася недостовірно, а з 11-ї по 13-тю добу їх кількість досягла максимуму ($70,7 \pm 12,1$) й у цей період збільшувалася не лише їх кількість, а й розміри. Починаючи з 13-ї доби культивування кількість колоній компактного типу почала поступово зменшуватися. Невеликого розміру колонії дифузного типу при ХМЛ у культурі з'явилися одночасно з іншими клітинними агрегатами, але до 13-ї доби культивування їх кількість не перевищувала 33% загальної кількості клітинних агрегатів у комірці планшета. Однак, надалі (починаючи з 13-ї доби культивування), паралельно зі зменшенням кількості кластерів і колоній компактного типу, число колоній дифузного типу поступово зростало. Ми можемо припустити, що причиною цього було поступове диференціювання клітин до макрофагів, які набували здатності рухатися у напіврідкому агарі. Це сприяло зменшенню кількості колоній компактного типу у комірці планшета (Cheryl, 2012).

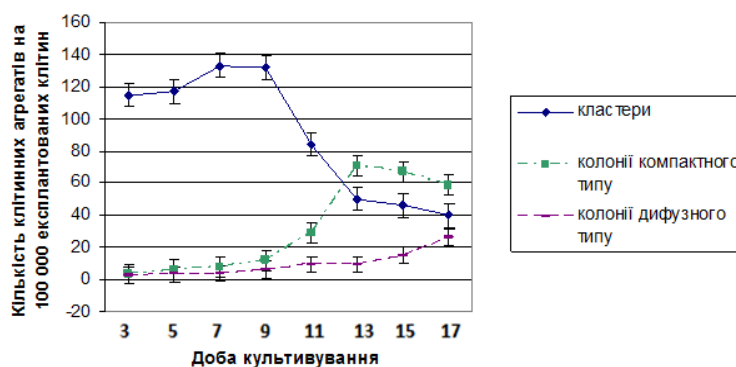


Рис. 1. Залежність кількості колоній, що утворилися в комірці планшета, від доби культивування

Для перевірки нашого припущення відбирали клітинні агрегати, виготовляли препарати на цитоцентрифузі та забарвлювали за Паппенгеймом. Результати морфологічного аналізу внутрішнього складу колоній у напіврідкому агарі *in vitro* свідчили про те, що кількість бластних клітин у культурі була високою до 9-ї доби культивування, коливаючись у межах 16–29% (рис. 2). При цьому їх кількість на 5-ту добу культивування удвічі зменшувалася порівняно з 3-тю ($16 \pm 0,8\%$), але до 9-ї доби все ж продовжувала зростати. Починаючи з 11-ї доби культивування кількість бластних клітин в агрегатах почала поступово зменшуватися, однак на 17-ту добу культивування їх кількість сягала $6 \pm 0,1\%$, що є свідченням високої проліферативної активності клітин лейкемічного клону, незважаючи на тривалий термін культивування. Кількість

промієлоцитів та мієлоцитів у клітинних агрегатах суттєво не відрізнялася протягом усього терміну культивування (14–22% і 18–32%, відповідно). Подібна картина спостерігалася й у випадку метамієлоцитів, але після 13-ї доби культивування їх кількість почала поступово зменшуватися (з $21 \pm 1,6\%$ на 13-ту до $14 \pm 0,5\%$ на 17-ту добу культивування). Кількість сегментоядерних гранулоцитів з 3-ї по 11-у добу культивування збільшувалася до $15 \pm 0,7\%$, а починаючи з 13-ї доби поступово зменшувалася (імовірно, за рахунок того, що частина сегментоядерних гранулоцитів диференціювалася на макрофаги, кількість яких починаючи з 13-ї доби культивування стрімко збільшувалася). На 15-ту добу культивування кількість макрофагів зростає утричі ($21 \pm 0,6\%$ загальної кількості клітин), а на 17-ту добу – більше ніж учетверо ($34 \pm 1,3\%$).

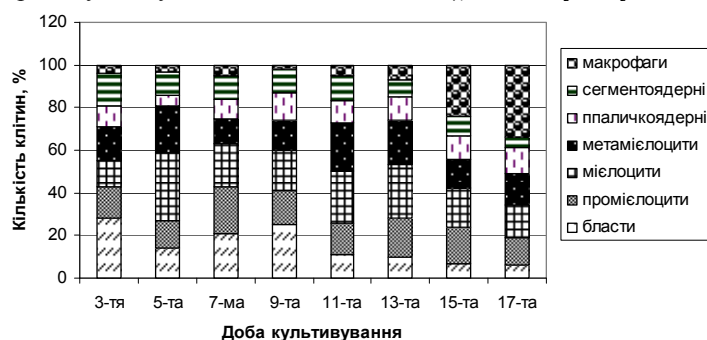


Рис. 2. Залежність внутрішнього складу клітинних агрегатів від доби культивування

Ураховуючи особливості колонієутворення та внутрішній склад клітинних агрегатів у напіврідкому агарі *in vitro*, оптимальним терміном культивування клітин кісткового мозку пацієнтів при ХМЛ є 13 діб, оскільки саме на цю добу спостерігалася максимальна кількість колоній компактного типу та невелика кількість макрофагальних клітин, що сприятиме адекватній оцінці функціональних і морфологічних особливостей гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників у культурі *in vitro*.

У результаті аналізу функціональної активності клітин кісткового мозку пацієнтів різних груп виявилось, що у хворих із відсутністю відповіді на терапію нілотинібом та у пацієнтів, у яких уперше діагностовано ХМЛ, статистично достовірної різниці між кількістю колоній у

напіврідкому агарі *in vitro* не було ($147,0 \pm 4,6$ та $148,0 \pm 2,2$ колоній на 1×10^5 експлантованих мієлокаріоцитів, відповідно) (рис. 3). Натомість, у пацієнтів, які характеризувалися відсутністю відповіді на терапію іматинібом, колонієтворна активність була в 1,6 раза меншою ($90,8 \pm 2,8$ на 1×10^5 експлантованих клітин). У випадку пацієнтів з оптимальною відповіддю на ІТК колонієтворна активність була значно нижчою. У культурі клітин кісткового мозку пацієнтів, які мали оптимальну відповідь на терапію іматинібом, кількість колоній становила $48,1 \pm 1,8$ на 1×10^5 експлантованих мієлокаріоцитів, а у пацієнтів з оптимальною відповіддю на нілотиніб кількість колоній у напіврідкому агарі *in vitro* сягала $30,1 \pm 7,6$ на 1×10^5 експлантованих мононуклеарів.

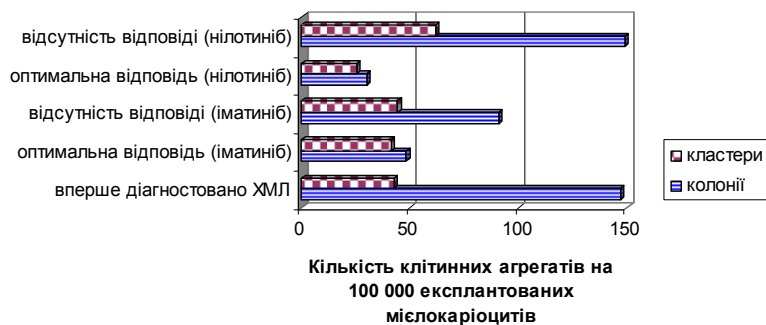


Рис. 3. Результати культивування в напіврідкому агарі *in vitro* кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ

Подібні відмінності, але тільки на рівні тенденції, спостерігалися і для середніх значень кластерів. У культурі клітин кісткового мозку пацієнтів, у яких уперше діагностовано ХМЛ, кількість кластерів у культурі клітин *in vitro* становила $42,8 \pm 4,7$ на 1×10^5 експлантованих мієлокаріоцитів. У пацієнтів, які характеризувалися відсутністю відповіді на терапію іматинібом, їх кількість недостовірно збільшилася до $44,3 \pm 1,1$ на 1×10^5 експлантованих клітин, а у пацієнтів із відсутністю відповіді на терапію нілотинібом кількість кластерів була найвищою ($61,3 \pm 4,7$ на 1×10^5 експлантованих мієлокаріоцитів). У культурі клітин кісткового мозку пацієнтів, які через рік після початку терапії характеризувалися оптимальною відповіддю на терапію іматинібом, кількість кластерів становила $41,3 \pm 1,4$ на 1×10^5 експлантованих клітин, а в культурі клітин кісткового мозку пацієнтів, які характеризувалися оптимальною відповіддю на терапію нілотинібом, кількість кластерів була в 1,4 раза вищою ($61,8 \pm 3,7$ на 1×10^5 експлантованих мієлокаріоцитів).

Як відомо з літературних джерел, при ХМЛ у кістковому мозку пацієнтів спостерігається накопичення мієлоцитарних клітин (Corbin et al., 2011). При прогресуванні захворювання до фази акселерації та бластного кризу спостерігається порушення дозрівання клітин мієлоїдного ростка кровотворення та зменшення кількості зрілих форм, тобто паличкоядерних і сегментоядерних гранулоцитів (Grineeva et al., 2009). Однак те, яким чином терапія ІТК впливає на диференціювання клітин кісткового мозку в напіврідкому агарі *in vitro*, досі чітко не з'ясовано. Тому для оцінки особливостей морфологічного складу клітин кісткового мозку пацієнтів із різним характером відповіді на терапію ІТК після культивування *in vitro* колонії та кластери вилуча-

ли з напіврідкого агару, готували препарати на центрифугу та забарвлювали за Паппенгеймом. У цитологічних препаратах клітинних агрегатів пацієнтів з уперше діагностованою ХМЛ спостерігалася висока чисельність бластних клітин (близько $14 \pm 0,6\%$ загальної кількості, рис. 4). У пацієнтів з оптимальною відповіддю на терапію іматинібом кількість бластних клітин була значно меншою ($7 \pm 0,2\%$), а у пацієнтів з оптимальною відповіддю на нілотиніб кількість бластних клітин була найменшою ($5 \pm 0,1\%$ загальної кількості клітин в агрегаті). У хворих, які характеризувалися відсутністю відповіді на терапію іматинібом, кількість бластних клітин у колоніях і кластерах на 13-ту добу культивування становила $12 \pm 0,4\%$, а у пацієнтів із відсутністю відповіді на терапію нілотинібом кількість бластних клітин була дещо меншою ($8 \pm 0,1\%$). Подібні результати отримано Catriona et al. (2004), які досліджували ранні клітини-попередники кісткового мозку за допомогою методів проточної цитофлуориметрії та виявили, що у пацієнтів з оптимальною відповіддю на іматиніб відбувається значне зниження CD34+Lin-клітин, а кількість мієлоїдних попередників повертається до норми, у той час, як у зразках кісткового мозку пацієнтів зі стійкістю до іматинібу відмічається збільшення кількості ранніх гранулоцито-макрофагальних клітин-попередників.

Разом із цим, у пацієнтів різних груп статистично достовірної різниці у кількості промієлоцитарних та мієлоцитарних клітин не спостерігалось. У хворих із відсутністю відповіді на терапію ІТК та у пацієнтів з уперше діагностованою ХМЛ відзначалося переважання недиференційованих клітин мієлоїдного ростка кровотворення (сумарної кількості бластних, промієлоцитарних, мієлоцитарних і метамієлоцитарних клітин). У хво-

рих із відсутністю відповіді на терапію іматинібом кількість недиференційованих клітин становила $70 \pm 2,9\%$, у пацієнтів із відсутністю відповіді на терапію нілотинібом їх кількість складала $65 \pm 3,1\%$ загальної

кількості клітин в агрегатах. У цитологічних препаратах кісткового мозку пацієнтів з уперше діагностованою ХМЛ кількість недиференційованих клітин у колоніях і кластерах становила $80 \pm 2,7\%$.

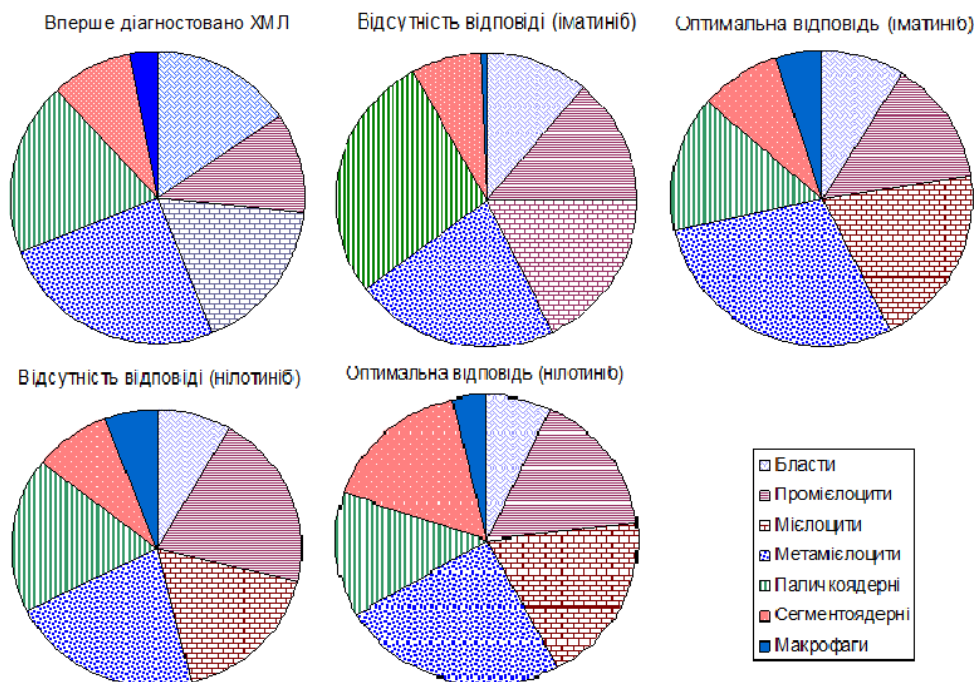


Рис. 4. Внутрішній склад клітинних агрегатів, отриманих у результаті культивування кісткового мозку при ХМЛ у культурі клітин *in vitro*

Кількість паличкоядерних гранулоцитів у пацієнтів з уперше діагностованою ХМЛ становила $22 \pm 1,3\%$, а у пацієнтів з оптимальною відповіддю на іматиніб та нілотиніб їх кількість була значно меншою ($12 \pm 0,2\%$ та $13 \pm 0,4\%$, відповідно). У пацієнтів із відсутністю відповіді на іматиніб кількість паличкоядерних гранулоцитів була найвищою ($30 \pm 2,5\%$ загального числа клітин у колоніях і кластерах). У хворих зі стійкістю до нілотинібу кількість паличкоядерних клітин гранулоцито-макрофагального ряду була значно меншою ($23 \pm 1,7\%$ клітин в агрегаті).

Кількість макрофагів у цитологічних препаратах колоній і кластерів клітин кісткового мозку пацієнтів, які як таргетну терапію отримували препарат нілотиніб, була вищою, ніж у пацієнтів з уперше діагностованою ХМЛ та у хворих, які як протилейкемічну терапію отримували іматиніб. У пацієнтів з уперше діагностованою ХМЛ кількість макрофагів сягала $3,5\%$, у пацієнтів з оптимальною відповіддю на іматиніб – $4 \pm 0,1\%$, нілотиніб – $3,7 \pm 0,1\%$. У хворих із відсутністю відповіді на іматиніб кількість макрофагів становила близько 1% , а у пацієнтів зі стійкістю до терапії нілотинібом кількість макрофагів була значно вищою ($5,6 \pm 0,2\%$ загальної кількості клітин у колоніях та кластерах на 13-ту добу культивування).

Таким чином, у разі формування стійкості до препаратів ІТК відновлювався пул лейкемічних клітин із переважанням ранніх форм клітин мієлоїдного ростка кровотворення, як і в пацієнтів з уперше діагностованою ХМЛ. Крім цього, спостерігалася тенденція, коли за більшої кількості клітин, які мають Ph-хромосому, ви-

значалося більше ранніх форм мієлоїдних клітин у колоніях і кластерах кісткового мозку пацієнтів, що могло свідчити про прогресування захворювання до фази акселерації та бластного кризу (Ruiba, 2005).

Як відомо, при ХМЛ мієлоїдна ланка кровотворення розширюється на всіх стадіях дозрівання. Це відбувається у результаті порушення балансу між самооновленням і диференціюванням, у результаті чого в напіврідкому агарі *in vitro* спостерігається підвищення проліферативного потенціалу клітин кісткового мозку (Faderl et al., 2005). Використання ІТК дозволяє пригнічувати проліферативну перевагу Ph⁺-клітин, сприяючи відновленню нормального гемопоєзу (Zhang et al., 2010). У пацієнтів, які мають оптимальну відповідь на терапію ІТК, тобто у їх кістковому мозку наявно 0% клітин із Ph-хромосомою, спостерігалася значне зниження кількості колоній і кластерів у культурі клітин *in vitro*. У пацієнтів, які характеризувалися резистентністю до терапії ІТК, кількість колоній і кластерів достовірно не відрізнялася від кількості таких у пацієнтів, у яких ХМЛ діагностовано уперше. Це могло бути спричинене тим, що після набуття клітинами резистентності до препарату пул Ph⁺ клітин поступово відновлювався й у клітинах кісткового мозку хворих знову накопичувалися ранні клітини-попередники, що характеризувалися високою проліферативною активністю. Причини резистентності до ІТК могли бути пов'язані з мутаціями у гені BCR-ABL, його ампліфікацією, зменшенням поглинання препарату клітинами лейкемічного клону або підвищенням рівня відтоку ІТК (Zhang et al., 2010).

Також на основі проведених досліджень виявився феномен зменшення кількості колоній у пацієнтів, які мали оптимальну відповідь на нілотиніб, порівняно з пацієнтами, які характеризувалися оптимальною відповіддю на препарат іматиніб. Це могло бути пов'язано з тим, що нілотиніб у 20 разів ефективніший за іматиніб, має здатність впливати на примітивні CD34+ клітини (O'Sullivan et al., 2011). Із даних літератури також відомо, що пацієнти з ХМЛ при лікуванні ІТК, навіть у разі повної цитогенетичної відповіді на терапію, все ж таки залишаються BCR-ABL-позитивними (Rosti et al., 1995). Це свідчить про те, що в їх кістковому мозку залишаються клітини, які підтримують експресію гена BCR-ABL, тобто залишаються клітинами лейкемічного клону. Можливо, нілотиніб елімінує ці клітини, що відбивається у меншій кількості колоній у пацієнтів з оптимальною відповіддю на нілотиніб, порівняно з кількістю таких у пацієнтів з оптимальною відповіддю на іматиніб. Деякі дослідники стверджують, що нілотиніб не специфічний винятково до BCR-ABL тирозинкінази, але він здатен пригнічувати також кіназу c-Abl, що може викликати інгібування формування колоній у культурі *in vitro* (O'Sullivan et al., 2011).

Висновки

ІТК здатні пригнічувати функціональну активність клітин кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ. Спостерігалось значне зниження кількості колоній у пацієнтів, які мали оптимальну відповідь на терапію нілотинібом порівняно з пацієнтами, які мали оптимальну відповідь на терапію іматинібом. У разі набуття клітинами лейкемічного клону стійкості до ІТК, рівень функціональної активності гемопоетичних стовбурових клітин та клітин попередників пацієнтів відновлювався до рівня такого у хворих з уперше діагностованою ХМЛ. У пацієнтів із набутою резистентністю до ІТК першого та другого покоління у клітинних агрегатах спостерігалось переважання ранніх форм клітин гранулоцито-макрофагального ростка кровотворення. Отримані дані свідчать про те, що зміни функціональної активності гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників відображають рівень лейкемічної трансформації клітин кісткового мозку при ХМЛ і можуть використовуватися як додатковий метод моніторингу відповіді пацієнтів на терапію препаратами ІТК першого та другого покоління.

Бібліографічні посилання

Bacco Di, A., Keeshan, K., McKenna, S.L., 2000. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: Deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist* 5, 405–415.
 Baran, Y., Saydam, G., 2012. Cumulative clinical experience from a decade of use: Imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *J. Blood Med.* 3, 139–150.
 Belle, L., Bruck, F., Foguene, J., 2012. Imatinib and nilotinib inhibit hematopoietic progenitor cell growth, but do not prevent adhesion, migration and engraftment of human cord blood CD34+ cells. *PLoS One* 7(12), e52564.

Chen, Y., Peng, C., Sullivan, C., 2010. Critical molecular pathways in cancer stem cells of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 24(9), 1545–1554.
 Helgason, C.D., Helgason, C.L.M., 2012. *Basic cell culture protocols*. 3rd ed. Vol. 290. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
 Corbin, A.S., Agarwal, A., Loriaux, M., 2011. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J. Clin. Invest.* 121, 396–409.
 Falder, S., Talpaz, M., Estrov, Z., 1999. The biology of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 15, 164–172.
 Frazer, R., Irvine, A., McMullin, M.F., 2007. Chronic myeloid leukaemia in the 21st century. *Ulster Med. J.* 76(1), 8–17.
 Grineva, N.I., Ahlynina, T.V., Gerasimova, L.P., 2009. Razlichija v proliferacii i differencirovke Ph+ kletok ot individual'nyh bol'nyh HML v suspenzionnoj kul'ture. Ph+ kletki s vysokoj skorost'ju proliferacii [Differences in proliferation and differentiation of Ph+ cells from CML patients in individual suspension culture. Ph+ cells with high proliferation rates]. *Jeksperimental'naja Onkologija* 8, 53–68 (in Russian).
 Jamieson, C.H.M., Ailles, L.E., Dylla, S.J., Muijtjens, M., Jones, C., Zehnder, J.L., Gotlib, J., Li, K., Manz, M.G., Keating, A., Sawyers, C.L., Weissman, I.L., 2004. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N. Engl. J. Med.* 351(7), 657–667.
 Jorgensen, H.G., Allan, E.K., Jordanides, N.E., 2007. Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells. *Blood* 109, 4016–4019.
 Lenaerts, T., Castagnetti, F., Traulsen, A., 2011. Explaining the *in vitro* and *in vivo* differences in leukemia therapy. *Cell Cycle* 15, 1540–1544.
 Mayani, H., Flores-Figueroa, E., Chavez-Gonzalez, A., 2009. *In vitro* biology of human myeloid leukemia. *Leukemia Res.* 33, 634–637.
 Deininger, M.W.N., Goldman, J.M., Melo, J.V., 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96(10), 3343–3355.
 Mughal, A., Aslam, M., Khan, A.M.H., Saleem, S., Umar, R., Saleem, M., 2013. Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors – current status. *Infect. Agents Cancer* 8(1), 23.
 Mukhopadhyay, A., Dasgupta, S., Mukhopadhyay, S., 2012. Imatinib mesylate therapy in patients of chronic myeloid leukemia with philadelphia chromosome positive: An experience from Eastern India. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 28(2), 82–88.
 O'Sullivan, S., Lin, J.M., Watson, M., 2011. The skeletal effects of the tyrosine kinase inhibitor nilotinib. *Bone* 49, 281–289.
 Rosti, V., Bergamaschi, G., Lucotti, C., 1995. Oligodeoxynucleotides antisense to c-abl specifically inhibit entry into S-phase of CD34+ hematopoietic cells and their differentiation to granulocyte-macrophage progenitors. *Blood* 86, 3387–3393.
 Ruibao, R., 2005. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Nat. Rev. Cancer* 5, 172–183.
 Weisberg, E., Catley, L., Renee, D., 2007. Beneficial effects of combining nilotinib and imatinib in preclinical models of BCR-ABL leukemias. *Blood* 109, 2112–2120.
 Zhang, B., Strauss, A.C., Chu, S., 2010. Effective targeting of quiescent chronic myelogenous leukemia stem cells by histone deacetylase inhibitors in combination with imatinib mesylate. *Cancer Cell* 17(5), 427–442.

Надійшла до редколегії 12.07.2014