

М.В. Дяченко<sup>1</sup>  
 І.О. Жалейко<sup>1</sup>  
 І.С. Дягіль<sup>2</sup>  
 Т.П. Перехрестенко<sup>3</sup>  
 Н.М. Білько<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Центр молекулярних та клітинних досліджень Національного університету «Києво-Могилянська академія»

<sup>2</sup>Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України

<sup>3</sup>ДУ «Інститут гематології і трансфузіології НАМН України», Київ, Україна

**Ключові слова:** хронічна мієлоїдна лейкемія, таргетна терапія, іматиніб, кістковий мозок, культура клітин *in vitro*, ефективність лікування.

## ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ КІСТКОВОГО МОЗКУ ЯК ОДИН ІЗ КРИТЕРІЇВ ОЦІНКИ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ ВІДПОВІДІ ПАЦІЄНТІВ ІЗ ХРОНІЧНОЮ МІЄЛОЇДНОЮ ЛЕЙКЕМІЄЮ НА ТЕРАПІЮ ІНГІБІТОРОМ ТИРОЗИНОВИХ КІНАЗ

**Мета:** проаналізувати функціональні особливості клітин-попередників кісткового мозку (КМ) пацієнтів з хронічною мієлоїдною лейкемією (ХМЛ) залежно від ефективності їх лікування для визначення можливої цінності характеристик цих клітин у культурі *in vitro* в прогнозі перебігу ХМЛ. **Об'єкт і методи:** аспірати КМ 32 пацієнтів з ХМЛ, які отримували терапію препаратом іматиніб (25 осіб) або гідроксикарбамідом (7 осіб) та характеризувалися різною (оптимальна, субоптимальна) відповіддю на лікування, досліджували гематологічним, культуральним, цитологічним та імуногістохімічним методами. **Результати:** встановлено, що функціональна активність (формування колоній і кластерів у культурі *in vitro*) клітин-попередників КМ пацієнтів з оптимальною відповіддю на терапію була нижчою, ніж до лікування із застосуванням іматинібу, або у пацієнтів з субоптимальною відповіддю. Проліферативний потенціал КМ пацієнтів з наявністю Ph<sup>+</sup> клітин був вищим, ніж у пацієнтів з повною гематологічною та цитогенетичною відповіддю на терапію. Колонії та кластери, отримані в культурі КМ пацієнтів із субоптимальною відповіддю на терапію іматинібом, характеризувалися підвищеним відносним вмістом CD34<sup>+</sup>-клітин-попередників. Встановлено сильну позитивну статистично достовірну кореляцію між кількістю Ph<sup>+</sup> клітин та кількістю клітинних агрегатів у культурах КМ пацієнтів, які отримували терапію гідроксикарбамідом, а також між індексом дозрівання клітин в клітинних агрегатах та тривалістю лікування іматинібом. **Висновок:** відповідь на терапію ХМЛ (із застосуванням інгібітора тирозинкінази BCR-ABL іматинібу), ймовірно, пов'язана зі змінами в популяції лейкемічних стовбурових клітин та клітин-попередників КМ, зокрема змінами їх проліферативного потенціалу, що може бути використано для моніторингу індивідуальної ефективності лікування.

### ВСТУП

Розвиток хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ) пов'язаний з клональним порушенням кровотворення, що виникає внаслідок появи генетичних аномалій на рівні гемопоетичної стовбурової клітини (ГСК) [7]. Встановлено майже стовідсоткову асоціацію ХМЛ з наявністю унікальної хромосомної аномалії — філадельфійської хромосоми (Ph<sup>1</sup>), поява якої є наслідком реципрокної транслокації t(9;22)(q34;q11). Охарактеризовано молекулярний продукт цієї транслокації — химерний ген BCR-ABL. Розроблено препарат для цілеспрямованої молекулярної терапії при ХМЛ — інгібітор тирозинкіна-

зи (ІТК) BCR-ABL іматиніб, який використовують як сучасний вискоєфективний терапевтичний засіб [12, 20]. Проте цей препарат не впливає на лейкемічні стовбурові клітини (ЛСК), що знаходяться у стані спокою [4, 6, 18].

Останні 20 років ЛСК були предметом ретельних досліджень, визначено їх основні характеристики, а саме: можливість продукувати клітини з різним ступенем диференціювання, висока здатність до самовідновлення, а також нечутливість до дії радіації та хіміотерапевтичних препаратів. Залишаються нез'ясованими деякі спірні питання стосовно прогностичного значення вмісту ЛСК та клітин-по-

передників у кістковому мозку (КМ) пацієнтів [21]. Тому актуальним залишається дослідження характеристик клітин КМ задля з'ясування клінічного та прогностичного значення вмісту клітин-попередників лейкоемічного клону в КМ у кожному індивідуальному випадку.

Таким чином, метою цієї роботи було проаналізувати у культурі *in vitro* функціональні особливості клітин-попередників КМ пацієнтів з ХМЛ залежно від ефективності їх лікування для визначення можливої цінності характеристики цих клітин в прогнозі перебігу ХМЛ.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проаналізовано аспірати КМ 32 хворих на ХМЛ у віці від 20 до 46 років (середній вік —  $32,9 \pm 7,5$  року), які отримували лікування в Національному науковому центрі радіаційної медицини НАМН України та в ДУ «Інститут гематології і трансфузіології» НАМН України. Усі пацієнти дали інформовану згоду на використання їх матеріалу в дослідницьких цілях. Групи пацієнтів були сформовані залежно від ефективності лікування, яку оцінювали за наявністю Ph-позитивних (Ph+) клітин. Оптимальною відповіддю вважалося досягнення повної гематологічної та цитогенетичної ремісії впродовж 12 міс від початку лікування (відсутність Ph+ клітин у КМ). Субоптимальною відповідь на терапію визнавали у разі, коли була досягнута гематологічна відповідь, але цитогенетична відповідь була частковою або взагалі відсутньою (наявність Ph+ клітин у КМ). Загальна кількість пацієнтів з оптимальною відповіддю на лікування становила 17 осіб, субоптимальною — 15. Відповідно до терапевтичних схем, які застосовували для лікування хворих, загалом можна виділити 2 групи пацієнтів. До 1-ї групи належать 25 хворих, які отримували ІТК (імаїніб) протягом 5–36 міс (медіана —  $22,5 \pm 13,4$  міс), у тому числі після застосування гідроксикарбаміду. У 2-гу групу увійшли пацієнти (7 осіб), які отримували лише монотерапію гідроксикарбамідом. У всіх хворих застосовували препарати у стандартних дозах та схемах.

Клітини КМ культивували *in vitro* у напіврідкому агарі (0,33% бактоагару «Difco», США) у 24-лункових планшетах («Nunc», США) при температурі 37 °С, за умов абсолютної вологості та 5% CO<sub>2</sub> в середовищі DMEM («Sigma», США), яке містило 20% фетальної телячої сироватки («Sigma», США), 50 нг/мл GM-CSF («Sigma», США) та антибіотики (50 МО/мл пеніциліну, 50 мг/мл стрептоміцину). Функціональну активність клітин КМ характеризували за даними обчислення кількості клітинних агрегатів після 14 діб культивування. Для подальшого вивчення вилучали індивідуальні колонії.

За колонію (колонієутворююча одиниця гранулоцитарно-макрофагальна — КУО-ГМ) брали скупчення > 40 клітин. Клітинні агрегати, до складу яких входило 20–40 клітин, вважали кластером

(кластероутворююча одиниця — КЛУО) (рис. 1). Особливості проліферативної активності клітин-попередників КМ визначали за співвідношенням між гранулоцитарними колоніями та кластерами (проліферативний потенціал — ПП). За показником ПП усі зразки ділили на 2 групи. До 1-ї включали культури КМ, рівень ПП яких становив  $\leq 1$ , до 2-ї — культури КМ з ПП > 1.

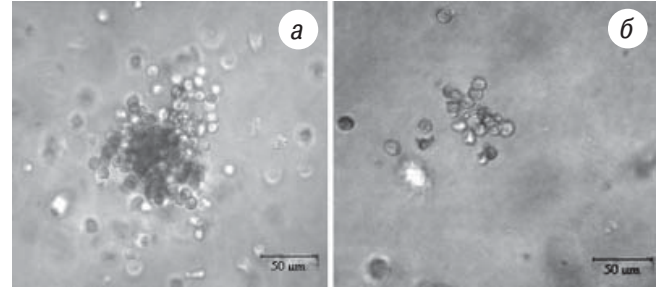


Рис. 1. Типи клітинних агрегатів КМ пацієнтів із ХМЛ на 14-й день культивування: а — колонія; б — кластер

Особливості фенотипу стовбурових клітин та клітин-попередників КМ визначали за допомогою імуногістохімічного методу. Частки агару з колоніями (кластерами) клітин переносили на скло, розділяли тонкими голками. Колонії індивідуально виділяли із шару агару за допомогою мікропіпетки варіабельного обсягу та ресуспендували у середовищі RPMI-1640 («Sigma», США). Препарати як початкової (до культивування *in vitro*) суспензії мононуклеарів КМ, так і клітин, які становили клон (колонію, кластер), виготовляли за допомогою цитоцентрифуги («Shandon», США) (центрифування протягом 1 хв при 300 g), підсушували на повітрі та забарвлювали за відповідними методами. Так, задля візуалізації морфологічних особливостей клітин використовували забарвлення за методом Папенгейма. Імуногістохімічне дослідження проводили із застосуванням стандартної методики [1], використовуючи IgG2 моноклональні антитіла до антигену CD34 (клон 4H11) людини, кон'юговані з флуоресцеїнізотіоціанатом («Ebioscience», США). З метою попередження висихання препарати покривали 1% розчином сироваткового альбуміну бика у фосфатному буфері, накривали покривним склом та зберігали у темряві при температурі +4 °С. Для обчислення кількості позитивних клітин використовували флуоресцентний мікроскоп («Leica DMRB», Німеччина) з імерсійним збільшенням  $\times 1000$  та цифровий фотоапарат («Canon D400», Японія).

Для опрацювання результатів використовували статистичну програму Microsoft Excel. Для кожної групи даних робили обчислення таких показників: середнє арифметичне зі стандартною середньою похибкою, середнє квадратичне відхилення. Для визначення статистичної достовірності показників використовували критерій Стьюдента, різницю вважали достовірною на рівні значущості 5% ( $p \leq 0,05$ ) [4]. Для оцінки взаємозв'язків між отриманими показниками проводили кореляційний аналіз зі встановленням показника кореляції Спірмена.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що типи росту *in vitro* агрегатів лейкоцитних клітин пацієнтів із гострою мієлоїдною лейкемією [5, 8, 16, 17], клітин КМ пацієнтів з мієлодиспластичним синдромом [23] та апластичною анемією [2] мають прогностичне значення для визначення імовірності отримання ремісії чи прогресування захворювання. Цей феномен був використаний нами для встановлення відповідності між показниками росту клітинних агрегатів у культурі *in vitro* та індивідуальною відповіддю на терапію, а також прогнозу перебігу захворювання у пацієнтів з ХМЛ.

Аналіз особливостей росту гемопоетичних клітин КМ хворих на ХМЛ показав, що на етапі встановлення діагнозу (до терапії ІТК) відбувається значне коливання індивідуальної здатності до утворення *in vitro* клітинних проліфератів (колоній та кластерів). Середнє значення кількості колоній (КУО-ГМ) становило  $65,8 \pm 43,2$  (варіювало у межах від 3 до 140) на  $1 \times 10^5$  мієлокаріоцитів (рис. 2). Функціональна активність клітин-попередників КМ пацієнтів, які демонстрували оптимальну (повну) відповідь на терапію ІТК, також була варіабельною, але нижчою ( $p = 0,05$ ) від ефективності колонієутворення до лікування та в зразках КМ пацієнтів із субоптимальною відповіддю на терапію. Середня кількість КУО-ГМ становила відповідно  $29,3 \pm 21,7$  (від 0 до 68) і  $79,3 \pm 54,7$  (від 2 до 188) на  $1 \times 10^5$  мієлокаріоцитів. Аналогічні відмінності (але на рівні тенденції) відзначали також для середніх значень кількості кластерів. У зразках КМ до лікування показник КЛУО становив  $39,6 \pm 29,4$  (від 5 до 67) на  $1 \times 10^5$  мієлокаріоцитів (див. рис. 2); при оптимальній відповіді на лікування —  $29,8 \pm 9,3$  на  $1 \times 10^5$  мієлокаріоцитів, при субоптимальній відповіді —  $56,3 \pm 39,6$  на  $1 \times 10^5$  мієлокаріоцитів ( $p > 0,05$ ).

Проведено кореляційний аналіз (рис. 3) з метою виявлення чинників, що можуть бути пов'язані з кількістю Ph<sup>+</sup> клітин у КМ. Встановлено, що такі фактори, як тривалість прийому ІТК та кількість мононуклеарних клітин у вихідній суспензії КМ, не корелюють із відсотком клітин, що містять філадельфійську хромосому ( $\rho = 0,439$ ,  $\rho = 0,044$  від).

У зразках КМ пацієнтів, які отримували лікування гідроксикарбамідом, виявлено кореляцію ( $\rho = 0,944$ ,  $\rho = 0,9863$ ) між показниками колонієутворення (відповідно, кількість КУО-ГМ та КЛУО) та відсотком Ph<sup>+</sup> клітин (рис. 4 а, б), що вказує на зв'язок транслокації t(9;22)(q34;q11) у лейкоцитних клітинах-попередниках КМ з їх функціональним станом та на BCR/ABL-індуковане підвищення їх проліферативної активності при ХМЛ. Водночас для підгрупи пацієнтів із субоптимальною відповіддю на терапію ІТК такої кореляції не виявляли (рис. 4 в, г). Відсутність кореляції між кількістю клітинних агрегатів у культурі та вмістом Ph<sup>+</sup> клітин у КМ пацієнтів, які приймали імаїніб, підтверджує наявність модулюючого впливу цього препарату на функціо-

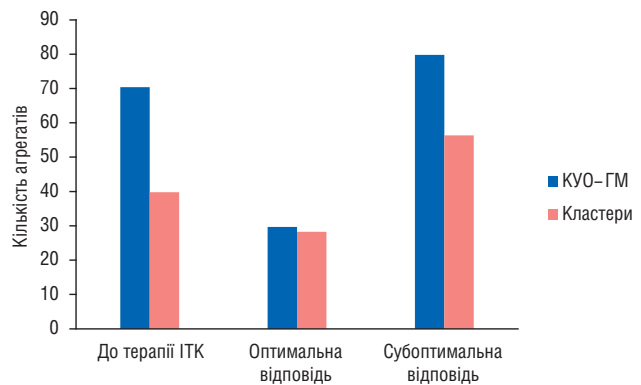


Рис. 2. Показники ефективності утворення колоній та кластерів клітинами КМ пацієнтів з ХМЛ залежно від етапу лікування та рівня терапевтичної відповіді

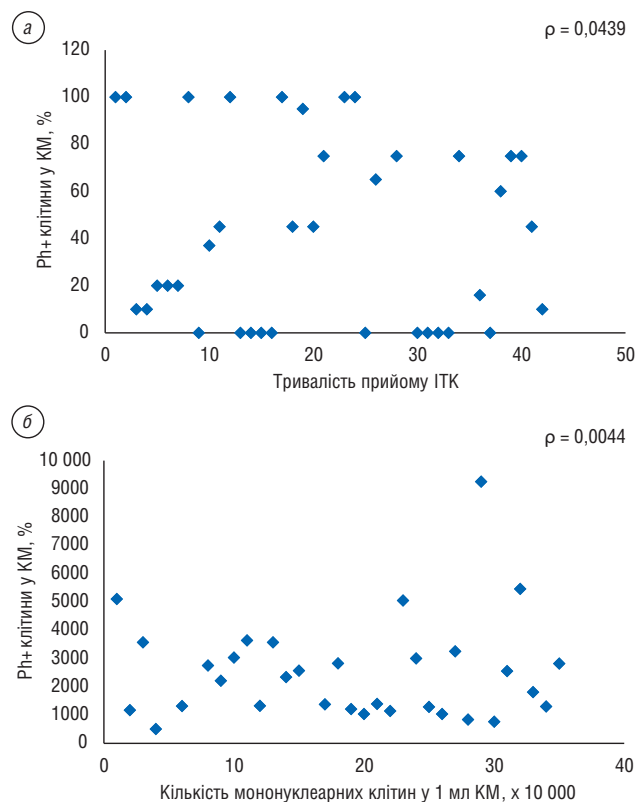
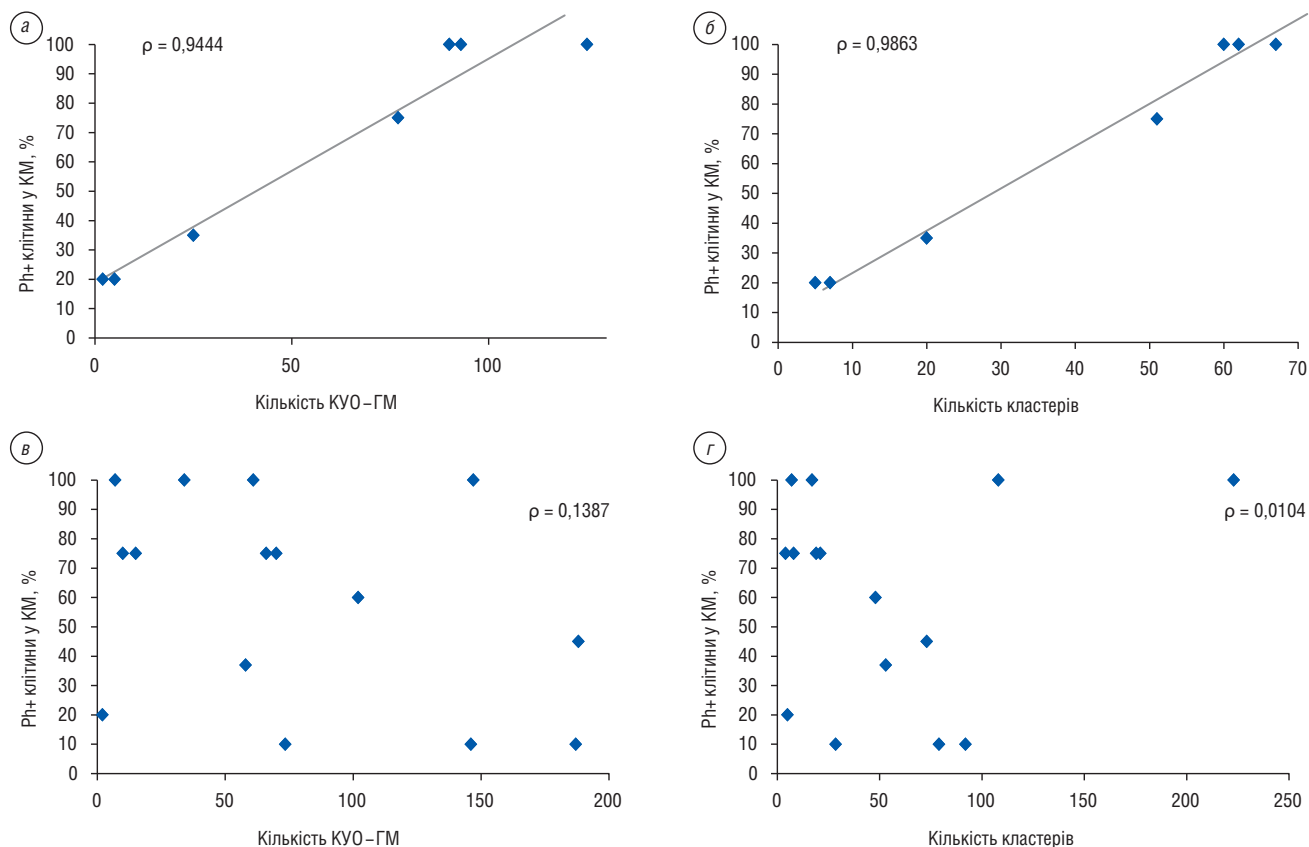


Рис. 3. Кореляційний аналіз зв'язку між відносною кількістю Ph<sup>+</sup> клітин у КМ та клініко-лабораторними параметрами: тривалістю прийому ІТК (а); кількістю мононуклеарних клітин у вихідній суспензії КМ (б)

нальний стан клітин-попередників КМ завдяки інгібуванню тирозинкінази BCR-ABL. Враховуючи, що мова іде про підгрупу пацієнтів із субоптимальною відповіддю на лікування, відсутність кореляції між відсотком Ph<sup>+</sup> клітин та кількістю клітинних агрегатів може пояснюватися накопиченням Ph<sup>+</sup> клітин, які перебувають у стані спокою та є нечутливими як до зовнішніх ростових факторів, так і до дії ІТК [9, 24].

За даними деяких авторів, зміна функціональної активності клітин-попередників КМ не є специфічним маркером лейкоцитної трансформації та може визначатися також при деяких нейтропеніях, а також апластичній анемії [13, 19, 22]. Також раніше було встановлено, що й нормальна функціональна

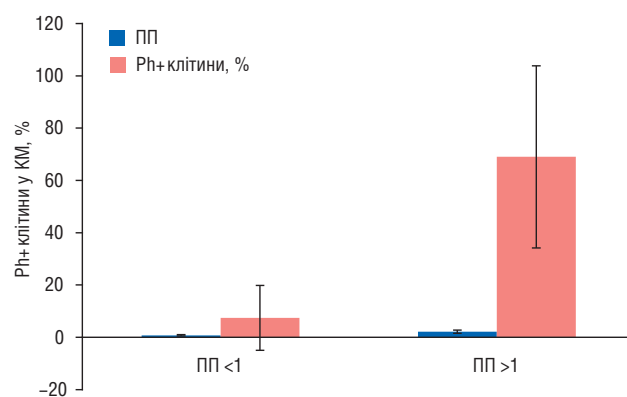


**Рис. 4.** Кореляція між рівнем функціональної активності (за кількістю КУО-ГМ та КЛУО) клітин-попередників КМ та відсотком Rh+ клітин: *а, б* — для групи осіб із альтернативним лікуванням гідроксикарбамідом; *в, г* — для групи осіб із субоптимальною відповіддю на терапію ІТК

активність клітин КМ може бути асоційованою з поганим прогнозом перебігу захворювання [10, 25]. Із цими даними принципово збігаються й описані вище результати наших досліджень. Так, функціональна активність (здатність до колонієутворення *in vitro*) клітин-попередників не може використовуватися як самостійний прогностичний фактор при ХМЛ. Тому ми вважали за доцільне виявити додаткові показники, які можуть дозволити індивідуалізувати моніторинг відповіді на терапію та прогнозування перебігу захворювання.

Нещодавні дослідження показали, що міелоїдна експансія при ХМЛ більш імовірно викликана змінами на рівні пулу лейкемічних клітин-попередників, а не стовбурових клітин КМ [11, 15]. Наразі розглядаються два основних механізми міелоїдної експансії на ранніх стадіях ХМЛ: зниження чутливості гемопоетичних клітин-попередників/стовбурових клітин до апоптозу [14], а також підвищення їх проліферативної активності [3]. Хоча показник ПП використовується у якості прогностичного фактора для низки захворювань, дані, отримані різними дослідницькими групами, все ще залишаються суперечливими. Так, раніше показано [23], що низький рівень ПП (< 0,3) асоційований з прогресуванням мієлодиспластичного синдрому. Автори дослідження також припустили, що пацієнти, у яких показник ПП не відрізнявся від такого у «гематологічно здорових» осіб, проте кількість кластерів становила > 15, також

входять до групи високого ризику прогресування захворювання. У проведених нами дослідженнях поганий прогноз, який ґрунтувався на високій відносній кількості (> 60%) Rh+ клітин, встановлювали у пацієнтів із підвищеним показником ПП (> 1) (рис. 5). Отримані дані продемонстрували, що показник ПП пов'язаний з прогнозом перебігу захворювання також і у пацієнтів із ХМЛ. На відміну від дослідження [23], поганий прогноз асоціювався з підвищеним значенням ПП. Такі розбіжності можуть бути пов'язані з різним патогенезом досліджених гематологічних захворювань, із застосуванням різноманітних протоколів визначення ПП, а також накопиченням в процесі лікування хворих із ХМЛ за допомогою ІТК ЛСК, що перебувають в стані спокою.



**Рис. 5.** Показник ПП та рівень Rh+ клітин у КМ пацієнтів із ХМЛ

За даними літератури, у хронічній фазі ХМЛ у культурі *in vitro* в основному накопичуються мієлоцити, переважання в клітинних агрегатах промієлоцитів та мієлобластів свідчить про прогресування захворювання та перехід до бластного кризу. Крім того, разом із прогресуванням ХМЛ відбувається зменшення кількості сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів. Залишається не до кінця з'ясованим вплив ІТК на процеси диференціювання клітин КМ. Щоб краще зрозуміти особливості функціонування клітин-попередників КМ при різних типах відповіді на терапію ІТК, проводили дослідження клітинного складу отриманих *in vitro* клітинних агрегатів. У цитологічних препаратах, забарвлених за Папенгеймом, при субоптимальній відповіді на терапію визначали переважно недиференційовані клітини мієлоїдного ряду, в той час як у клітинних агрегатах КМ пацієнтів із оптимальною відповіддю — переважно паличкоядерні та сегментоядерні гранулоцити (рис. 6). Виявлено сильний прямий кореляційний зв'язок ( $\rho = 0,91$ ) між індексом дозрівання клітин мієлоїдного ряду та тривалістю лікування препаратом імаїніб.

Імунофенотипування клітин вихідної (до культивування *in vitro*) суспензії мононуклеарів КМ показало, що частка CD34<sup>+</sup>-клітин була зівставною (рис. 7) для пацієнтів, які отримували лікування гідроксикарбамідом, та хворих з оптимальною відповіддю на терапію ІТК. У зразках КМ пацієнтів із субоптимальною відповіддю на терапію кількість CD34<sup>+</sup>-клітин була достовірно вищою (відповідно  $3,79 \pm 0,39$  та  $2,65 \pm 0,45\%$  ( $p > 0,05$ ) проти  $7,96 \pm 0,78\%$  ( $p < 0,05$ )). Аналогічні результати отримано і при дослідженні клітин, вилучених із клітинних агрегатів після культивування *in vitro*. Такі дані можуть свідчити про накопичення у КМ пацієнтів із субоптимальною відповіддю на лікування (нечутливих до дії ІТК) клітин, що знаходяться у стані спокою.

## ВИСНОВКИ

Виявлено, що проліферативна активність (утворення кластерів і колоній у напіврідкому агарі *in vitro*) клітин-попередників КМ пацієнтів із ХМЛ, які показали оптимальну відповідь на терапію ІТК, була нижчою, ніж до початку лікування, або у пацієнтів із субоптимальною відповіддю.

Встановлено, що показник ПП клітин-попередників КМ пацієнтів, які мали більш низький рівень Ph<sup>+</sup> клітин, був значно нижчим порівняно з ПП клітин-попередників КМ осіб, що мали високий вміст клітин з Ph-хромосою.

Виявлено, що колонії та кластери, отримані в культурі КМ пацієнтів із ХМЛ, які виявилися стійкими до терапії ІТК, переважно складаються з CD34<sup>+</sup> стовбурових клітин та клітин-попередників.

У результаті дослідження встановлено пряму кореляцію між відносною кількістю Ph<sup>+</sup> клітин та кількістю клітинних агрегатів у культурах КМ

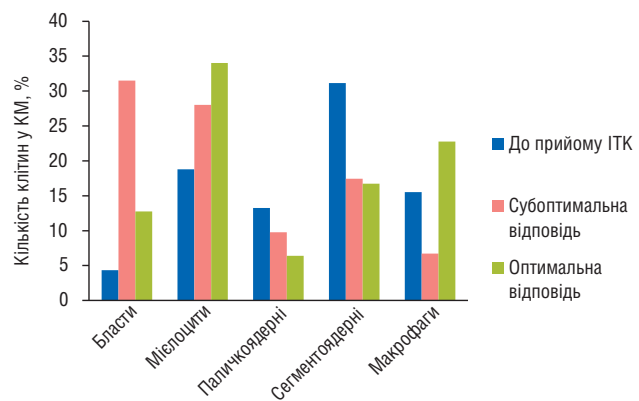


Рис. 6. Клітинний склад колонії та кластерів, отриманих у результаті культивування КМ хворих на ХМЛ *in vitro*

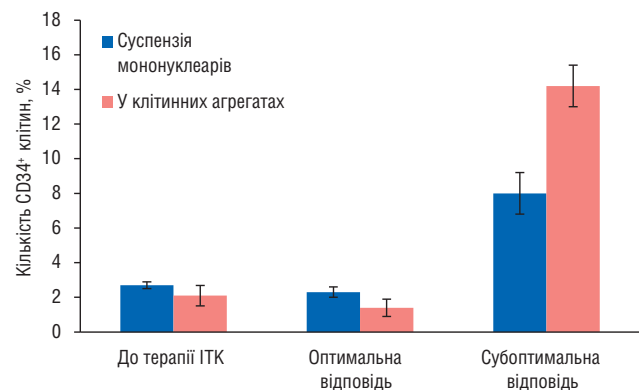


Рис. 7. Вміст CD34<sup>+</sup> клітин у суспензії мононуклеарів КМ та в клітинних агрегатах після 14 діб культивування

пацієнтів із ХМЛ, які одержували лікування гідроксикарбамідом, а також пряму кореляцію між індексом дозрівання клітин мієлоїдного ряду в клітинних агрегатах та тривалістю лікування пацієнтів ІТК.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гольдберг ЕД, Дыгай АМ, Шахов ВП. Методы культуры ткани в гематологии. Томск: Изд-во Том Ун-та, 1992: 246.
2. Barrett AJ, Faille A, et al. Serum inhibitors of granulocyte CFU-C in aplastic anaemia. Haematol Blood Transfus 1979; **24**: 237–46.
3. Bhatia R, Munthe HA, Williams AD, et al. Chronic myelogenous leukemia primitive hematopoietic progenitors demonstrate increased sensitivity to growth factor-induced proliferation and maturation. Exp Hematol 2000; **12** (28): 1401–12.
4. Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, et al. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. J Clin Invest 2011; **121** (1): 396–409.
5. Cañizo MC, Mota A, Orfao A, et al. Value of colony forming unit-granulocyte macrophage assay in predicting relapse in acute myeloid leukaemia. J. Clin. Pathol 1996; **49** (6): 450–2.
6. Eiring AM, Khorashad JS, Morley K et al. Advances in the treatment of chronic Myeloid Leukemia Advances in the treatment of chronic Myeloid Leukemia. BMC Medicine 2011; **9**: 99.
7. Fialkow PJ, Jacobson RJ, Singer JW, et al. Philadelphia chromosome (Ph1)-negative chronic myelogenous leukemia (CML): a clonal disease with origin in a multipotent stem cell. Blood 1980; **56** (1): 70–73.
8. Findley HW, Steuber CP, Krischer JP, et al. Pediatric Oncology Group Study of *in vitro* clonal growth patterns of leukemic cells in childhood acute nonlymphocytic leukemia as a predictor of induction response. Cancer Res 1987; **47** (15): 4225–8.

9. Hamilton A, Helgason GV, Schemionek M, *et al.* Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *Blood* 2012; **119** (6): 1501–10.

10. Jacobs P, Dubovsky D, Smith S, *et al.* Bone marrow culture *in vitro*. A technique for analysis and permanent recording of cellular composition. *Exp Hematol* 1979; **4**: 177–82.

11. Jorgensen HG, Holyoake TL. Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukaemia. *Biochem Soc Trans* 2007; **35**: 1347–51.

12. Leber B. CML biology for the clinician in 2011: six impossible things to believe before breakfast on the way to cure. *Curr Oncol* 2011; **18** (4): 185–90.

13. Lidbeck J. Studies on hemopoietic dysplasia (the preleukemic syndrome). *Acta Med Scandinav* 1980; **208**: 459–62.

14. Mak DH, Wang RY, Schober WD, *et al.* Activation of apoptosis signaling eliminates CD34<sup>+</sup> progenitor cells in blast crisis CML independent of response to tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia* 2012; **4** (26): 788–94.

15. Marley SB, Gordon MY. Chronic myeloid leukaemia: stem cell derived but progenitor cell driven. *Clin Sci (Lond)* 2005; **109** (1): 13–25.

16. Mertelsmann R, Moore MA, Broxmeyer HE, *et al.* Diagnostic and prognostic significance of the CFU-c assay in acute nonlymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1981; **41** (11): 4844–8.

17. Najfeld V, Fialkow PJ, Karande A, *et al.* Chromosome analyses of lymphoid cell lines derived from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 1980; **15** (26): 543–9.

18. Risueño RM, Campbell CJ, Dingwall S, *et al.* Identification of T-lymphocytic leukemia-initiating stem cells residing in a small subset of patients with acute myeloid leukemic disease. *Blood* 2011; **117**: 7112–20.

19. Soliera AR, Mariani SA, Audia A, *et al.* Gfi-1 inhibits proliferation and colony formation of p210BCR/ABL-expressing cells via transcriptional repression of STAT 5 and Mcl-1. *Leukemia* 2012; **26** (7): 1555–63.

20. Pavlu J, Szydlo RM, Goldman JM, *et al.* Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? *Blood* 2011; **117** (3): 755–63.

21. Ross DM, Hughes TP, Melo JV. Do we have to kill the last CML cell? *Leukemia* 2011; **25**: 193–200.

22. Tang M, Gonen M, Quintas-Cardama A, *et al.* Dynamics of chronic myeloid leukemia response to long-term targeted therapy reveal treatment effects on leukemic stem cells. *Blood* 2011; **118** (6): 1622–31.

23. Tennant GB, Bowen DT, Jacobs A. Colony-cluster ratio and cluster number in cultures of circulating myeloid progenitors as indicators of high-risk myelodysplasia. *Br J Haematology* 1991; **77**: 296–300.

24. Weisberg E, Azab AK, Manley PW, *et al.* Inhibition of CXCR4 in CML cells disrupts their interaction with the bone marrow microenvironment and sensitizes them to nilotinib. *Leukemia* 2012; **26**: 985–90.

25. Zhang B, Strauss AC, Chu S. Effective targeting of quiescent chronic myelogenous leukemia stem cells by histone deacetylase inhibitors in combination with imatinib mesylate. *Cancer Cell* 2010; **17**: 427–42.

## CHARACTERISTICS OF BONE MARROW PROGENITOR CELLS AS AN CRITERION FOR EVALUATING INDIVIDUAL RESPONSE OF PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA TO THERAPY WITH TYROSINE KINASE INHIBITOR

M.V. Diachenko, I.O. Zhaleiko, I.S. Dyagil,  
T.P. Perekhrestenko, N.M. Bilko

**Summary. Objective:** to analyze the functional features of bone marrow (BM) progenitor cells of patients with chronic myeloid leukemia (CML), depending on the efficacy of treatment to determine the possible values of the characteristics of these cells in culture *in vitro* in the prognosis of CML. **Object and methods:** aspirate of BM of 32 patients with CML who received therapy with imatinib (25 patients) or hydroxyurea (7 patients) and characterized by different (optimal, suboptimal) response to treatment, were examined by hematologic, cultural, cytological and immunohistochemical methods. **Results:** it was revealed that functional activity (formation of colonies and clusters in the culture *in vitro*) BM progenitor cells of patients with optimal response to therapy was lower than before treatment with imatinib, or in patients with suboptimal response. Proliferative potential of BM of patients with Ph<sup>+</sup> cells was higher than in patients with complete hematological and cytogenetic response to therapy. Colonies and clusters obtained in the BM culture of the patients with suboptimal response to imatinib therapy were characterized by a high relative content of CD34<sup>+</sup> progenitor cells. A strong statistically significant positive correlation between the number of Ph<sup>+</sup> cells and the number of cell aggregates in cultures of BM patients treated hydroxyurea and between the index of cells maturation in cellular aggregates and duration of imatinib treatment. **Conclusion:** the response to therapy of CML (using tyrosine kinase inhibitor of BCR-ABL imatinib), probably due to changes in the population of leukemic stem cells and BM progenitor cells, including changes in their proliferative capacity that can be used to monitor individual efficacy treatment.

**Key words:** chronic myeloid leukemia, target therapy, imatinib, bone marrow, cells in culture *in vitro*, efficacy of treatment.

### Адреса для листування:

Дяченко М.В.  
04655, Київ, вул. Сковороди, 2  
Національний університет  
«Києво-Могилянська академія»  
E-mail: diachenko.m@gmail.com

Одержано: 21.05.2013