

## МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА КЛІТИН– ПОПЕРЕДНИКІВ ЕРИТРОЇДНОЇ ЛАНКИ ГЕМОПОЕЗУ ПРИ ТЕРАПІЇ ІНГІБІТОРАМИ ТИРОЗИНКІНАЗ З ПЕРШОГО ТА ДРУГОГО ПОКОЛІННЯ

Статтю присвячено вивченню особливостей проліферації та диференціювання клітин еритроїдної ланки гемопоезу в пацієнтів із хронічною мієлоїдною лейкемією при терапії інгібіторами тирозинкіназ – іматинібом та нілотинібом. У результаті проведення паралельного культивування моноклеарів пацієнтів у культурах *in vivo* та *in vitro* було продемонстровано, що при набутті клітинами лейкемічного клону стійкості до препаратів тергетної терапії відбувається підвищення проліферативної активності та зниження рівня диференціювання клітин–попередників еритропоезу незалежно від наявності у середовищі цитокінів та ростових факторів нормального мікрооточення. Крім того, при стійкості до препаратів клітини кісткового мозку набувають здатності формувати еритроїдні колонії за відсутності еритропоєтину в культурі.

**Ключові слова:** хронічна мієлоїдна лейкемія, клітини–попередники еритропоезу, культура клітин *in vitro*, культура клітин *in vivo*, інгібітори тирозинкіназ.

### Вступ

Під час розвитку та прогресування хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ) спостерігається накопичення ранніх клітинних форм гранулоцито-макрофагального ряду у кістковому мозку та периферичній крові пацієнтів [2; 3; 12]. Це відбувається за рахунок підвищення проліферації ранніх клітин–попередників мієлоїдної ланки кровотворення [2; 3]. Вважається, що причиною розвитку захворювання є трансформація ранньої гемопоетичної клітини, що призводить до появи в ній так званої Філадельфійської хромосоми (Ph-хромосоми) [9]. На ній міститься химерний онкоген *bcr-abl*, що кодує BCR – ABL тирозинкіназу. Вона постійно фосфорилує низку внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, призводячи до надмірної проліферативної активності, нечутливості до впливу сигналів кісткомозкового мікрооточення та блокування апоптозу у клітинах лейкемічного клону [7; 10; 11]. Однак було виявлено, що незважаючи на активність тирозинкінази BCR–ABL, в хронічній фазі захворювання гемопоетичні клітини ще не втрачають здатності до диференціювання. Підтвердженням цьому є той факт, що Ph-хромосому виявляють у клітинах усіх ланок гемопоезу, у тому числі еритроїдної [4; 8]. Припускають, що під час прогресії ХМЛ за фізіологічних умов відбувається інгібування проліферації та диференціювання клітин еритроїдної ланки гемопоезу за допомогою факторів мікрооточення [13]. Однак існують експериментальні підтвердження того, що у культурах клітин кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ окрім збільшення

кількості гранулоцито-макрофагальних, також спостерігається підвищення рівня еритроїдних колоній [6; 8; 11]. Крім того, наразі в науковій літературі немає однозначних результатів стосовно впливу інгібіторів тирозинкіназ на морфофункціональні характеристики клітин еритропоезу пацієнтів з ХМЛ. Отже, метою роботи було виявлення особливостей зміни функціональних характеристик клітин–попередників еритропоезу у разі терапії інгібіторами тирозинкіназ першого і другого покоління – іматинібом та нілотинібом.

### Матеріали і методи

Здійснювали дослідження в культурі *in vitro* 300 зразків кісткового мозку від 75 пацієнтів, серед яких було 27 чоловіків і 48 жінок. Залежно від тактики терапії, яку отримували пацієнти, їх було поділено на три групи: ті, у яких ХМЛ діагностовано вперше (n = 7), пацієнти, що отримували препарат іматиніб (n = 47), та хворі, котрі отримували препарат нілотиніб (n = 21). Всі пацієнти перебували на амбулаторному лікуванні гематологічного відділення інституту клінічної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» і перед початком дослідження підписували добровільну інформовану згоду.

Оцінку відповіді клітин лейкемічного клону та терапію іматинібом та нілотинібом здійснювали шляхом цитогенетичного дослідження гемопоетичних клітин пацієнтів на 12-й місяць від початку терапії. Відповідно до результатів цитогенетичного аналізу хворих розділяли на підгрупи

з оптимальною відповіддю (відсутність клітин з Ph-хромосою) та резистентністю до терапії інгібіторами тирозинкіназ (у їхньому кістковому мозку було від 1 до 100 % Ph<sup>+</sup>- клітин).

Культивування гемопоетичних клітин здійснювали в метилцелюлозі у 24-комірковому планшеті (Nunc, Німеччина). Суспензію клітин готували на основі середовища RPMI-1640 (Sigma, США) із додаванням 20 % фетальної телячої сироватки (Sigma, США), 2 мМоль L-глутаміну (Sigma, США), 100 Од/мл пеніциліну (Київмедпрепарат, Україна) і 100 Од/мл стрептоміцину (Київмедпрепарат, Україна). Клітинну суспензію змішували з комерційним розчином метилцелюлози (Sigma, США) таким чином, щоб кінцева кількість клітин у комірці культурального планшета становила 100 тисяч. Розчин метилцелюлози містив 50 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора, 30 нг/мл еритропоєтину, а також по 20 нг/мл млінерлейкіну-6 та інтерлейкіну-9. З метою визначення особливостей еритропоєтиннезалежного формування еритроїдних колоній суспензію клітин кісткового мозку пацієнтів культивували в напіврідкому агарі (Difco, США) із концентрацією 0,033 %, крім того, до культури додавали гранулоцито-макрофагальний колонієстимулюючий фактор у концентрації 50 мг/мл. Культивування здійснювали протягом 13 діб за умов 100 %, 5 % концентрації CO<sub>2</sub> та температури 37 °С.

Культивування гемопоетичних клітин *in vivo* здійснювали із використанням оригінальної моделі гелевих дифузійних камер, які занурювали у черевну порожнину анемізованих мишей лінії Balb/C [1]. Для цього протягом тижня із синуса ока тварин за допомогою скляної піпетки Пастера, попередньо обробленої гепарином, забирали по 0,5 мл крові. За 20 хвилин до оперування у черевну порожнину мишам вводили тіопентал натрію (Київмедпрепарат, Україна) у дозі 200 мг/кг маси тварини. На 13-ту добу культивування тварин забивали методом цервікальної дислокації спинного мозку у шийному відділі, вилучали

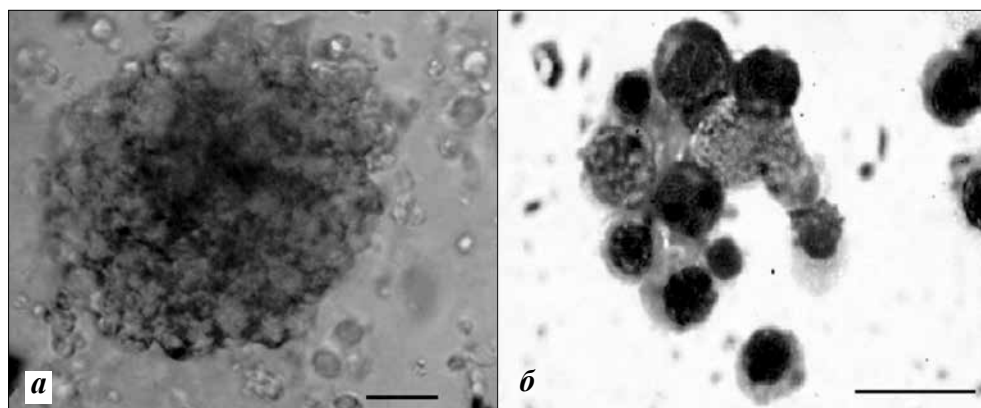
камери, очищали їх від сполучної тканини та досліджували під інвертованим мікроскопом (Zeiss, Німеччина). Всі маніпуляції із тваринами проводили відповідно до вимог біоетики та міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин і національного законодавства з гуманного поводження із тваринами, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей [5].

По закінченню терміну культивування під інвертованим мікроскопом (Zeiss, Німеччина) підраховували кількість сформованих клітинних агрегатів, які вилучали з напіврідкого середовища за допомогою автоматичної мікропіпетки і готували препарати на цитоцентрифузі (Shandon, Німеччина) протягом 1 хв при 360 g. Отримані препарати забарвлювали за методом Паппенгейма і здійснювали диференційний підрахунок та дослідження морфологічних особливостей клітин у агрегаті за допомогою мікроскопа (Leika, Японія) при збільшенні × 630.

Статистичний аналіз проводили за допомогою критерію Манна–Вітні. Кореляційний аналіз між показниками здійснювали із використанням критерію Пірсона. Достовірність оцінювали на рівні значущості  $p < 0,05$ .

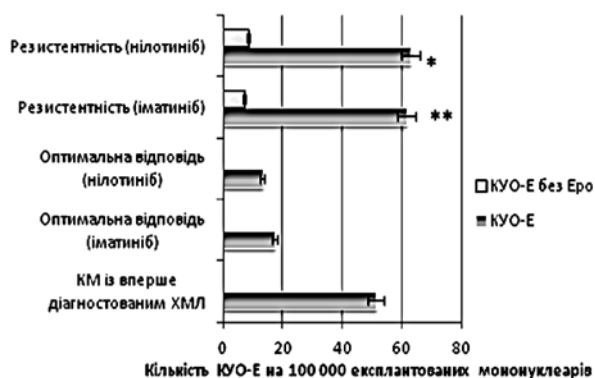
### Результати дослідження та їх обговорення

Колонієутворюючі одиниці еритроїдні (КУО-Е), що формувалися на 13-ту добу від початку культивування, як у метилцелюлозі, так і в напіврідкому агарі являли собою клітинні агрегати, що склалися з дрібних, щільно розташованих клітин червоного відтінку за рахунок синтезу гемоглобіну (рис. 1, а). У комірці культурального планшета еритроїдні колонії переважно розміщувалися по периферії, біля стінок комірки. У результаті морфологічного дослідження КУО-Е виявили, що до їхнього складу входили диференційовані клітини еритроїдної ланки кровотворення із вираженою базofilією цитоплазми: проеритробласти та поліхроматофільні еритробласти і нормобласти (рис. 1, б).



**Рис. 1.** КУО-Е в метилцелюлозі *in vitro* клітин кісткового мозку пацієнта 2.16:

а – під інвертованим мікроскопом; б – цитологічний препарат, забарвлений за методом Паппенгейма



Примітка: \*  $p < 0,05$  порівняно з групою, що не мала Ph-клітин у результаті терапії нілотинібом; \*\*  $p < 0,05$  порівняно з групою, що не мала Ph-клітин у результаті терапії імаїнібом.

**Рис. 2.** Показники ефективності формування еритроїдних колоній зразків кісткового мозку досліджуваних груп у напіврідкому агарі та метилцелюлозі *in vitro*

Результати підрахунку кількості клітинних агрегатів у метилцелюлозі свідчать, що у культурах кісткового мозку пацієнтів із вперше виявленою ХМЛ кількість КУО-Е становила  $51,3 \pm 1,8$  на  $1 \times 10^5$  експлантованих мононуклеарів (рис. 2). У культурах гемопоетичних клітин пацієнтів із оптимальною відповіддю на терапію інгібіторами тирозинкіназ число КУО-Е було значно меншим та сягало  $17,2 \pm 0,8$  і  $13,3 \pm 0,7$  на  $1 \times 10^5$  експлантованих мононуклеарів у випадку застосування імаїнібу та нілотинібів відповідно. При набутті клітинами лейкемічного клону стійкості до імаїнібу та нілотинібів кількість КУО-Е в 4 рази перевищувала кількість таких у разі оптимальної відповіді на терапію препаратами і становила  $61,4 \pm 2,7$  та  $62,8 \pm 3,2$  на  $1 \times 10^5$  експлантованих мононуклеарів відповідно.

Крім того, було виявлено, що із набуттям стійкості до препаратів таргетної терапії клітини лейкемічного клону одночасно набували здатності до формування КУО-Е за відсутності еритропоєтину у культуральному середовищі. Кількість колоній була невисокою та коливалася від 2 до 10 у різних хворих. Так, у культурах клітин кісткового мозку пацієнтів із резистентністю до імаїнібу число КУО-Е становило  $7,3 \pm 2,8$  на  $1 \times 10^5$  експлантованих мононуклеарів, а у культурах кісткового мозку зі стійкістю до нілотинібів воно було дещо вищим і сягало  $8,4 \pm 3,6$  на  $1 \times 10^5$  експлантованих моноцитів. Можливим поясненням цього феномена може бути підвищена експресія гена *bcr-abl*, що відмічається в клітинах при набутті резистентності до інгібіторів тирозинкіназ. Вона, своєю чергою, призводить до підвищення експресії гена рецептора до еритропоєтину [10].

Крім того, відомо, що гемопоетичні клітини кісткового мозку за наявності фетальної телячої сироватки в культурі *in vitro* здатні синтезувати невелику кількість еритропоєтину [8]. Саме тому ми припускаємо, що при збільшенні кількості рецепторів до еритропоєтину на поверхні BCR-ABL<sup>+</sup>-клітин, тих невеликих кількостей еритропоєтину в культурі могло би бути достатньо для диференціювання невеликої кількості клітин у еритроїдному напрямку.

У результаті кількісного аналізу внутрішнього вмісту КУО-Е виявили, що у культурах кісткового мозку із вперше виявленою ХМЛ та у культурах гемопоетичних клітин пацієнтів зі стійкістю як до імаїнібу, так і до нілотинібів статистично достовірної різниці між кількістю проеритробластів не було (табл. 1). Так, у зразках кісткового мозку із вперше діагностованою ХМЛ їхня кількість становила  $21,1 \pm 1,7$  % на  $1 \times 10^5$  експлантованих мієлокаріоцитів. У культурах кісткового мозку, у яких за результатами цитогенетичного аналізу не виявили Ph-клітин після терапії імаїнібом та нілотинібом, кількість проеритробластів становила  $16,2 \pm 0,9$  % та  $15,7 \pm 2,4$  % відповідно. Число проеритробластів у зразках кісткового мозку зі стійкістю до імаїнібу та нілотинібів було недостовірно вищим і становило  $19,3 \pm 1,6$  % та  $17,7 \pm 4,1$  % на  $1 \times 10^5$  експлантованих мононуклеарів відповідно.

Кількість еритробластів у КУО-Е коливалася від 58 % до 62 % у культурах кісткового мозку різних груп. Так, у зразках кісткового мозку із вперше виявленою ХМЛ кількість еритробластів

**Таблиця 1.** Внутрішній склад КУО-Е, отриманих у результаті культивування кісткового мозку при ХМЛ у культурі клітин *in vitro*

	Проеритробласти, %	Еритробласти, %	Нормобласти, %
КМ із вперше діагностованою ХМЛ	$21,1 \pm 1,7$	$71,2 \pm 5,3$	$6,7 \pm 1,4$
Оптимальна відповідь (імаїніб)	$16,2 \pm 0,9^*$	$61,9 \pm 4,8^*$	$21,3 \pm 5,2^*$
Оптимальна відповідь (нілотиніб)	$15,7 \pm 2,4^{**}$	$60,3 \pm 5,3^{**}$	$22,4 \pm 2,1^{**}$
КМ зі стійкістю до імаїнібу	$19,3 \pm 1,6$	$68,5 \pm 6,1$	$5,1 \pm 1,5$
КМ зі стійкістю до нілотинібів	$17,7 \pm 4,1$	$65,3 \pm 7,3$	$7,2 \pm 2,3$

Примітка: \*  $p < 0,05$  – при порівнянні з групою зразків кісткового мозку пацієнтів з резистентністю до імаїнібу; \*\*  $p < 0,05$  – при порівнянні з групою кісткового мозку пацієнтів із вперше діагностованою ХМЛ.

сягала  $71,2 \pm 5,3$  %. У зразках зі стійкістю до ІТК першого та другого покоління число еритробластів суттєво не різнилося та сягало  $68,5 \pm 6,1$  % та  $65,3 \pm 7,3$  % відповідно. У зразках кісткового мозку з оптимальною відповіддю на терапію інгібіторами тирозинкіназ кількість еритробластів була найнижчою та становила  $61,9 \pm 4,8$  % та  $60,3 \pm 5,3$  % у разі терапії іматинібом та нілотинібом відповідно.

Найбільш суттєва різниця відмічалася між кількістю нормобластів у еритроїдних агрегатах при ХМЛ. Так, у випадку зразків кісткового мозку пацієнтів із вперше виявленою ХМЛ відзначали  $6,7 \pm 1,4$  % нормобластів. У культурах зразків кісткового мозку зі стійкістю до іматинібуму та нілотинібуму кількість нормобластів була недостовірно вищою і становила  $5,1 \pm 1,5$  % та  $7,2 \pm 2,3$  % відповідно. Натомість у культурах *in vitro* зразків кісткового мозку з оптимальною відповіддю на терапію іматинібом та нілотинібом кількість нормобластів була у три рази вищою, ніж у культурах зразків кісткового мозку інших груп, і становила  $21,3 \pm 5,2$  % та  $22,4 \pm 2,1$  % відповідно.

Вважають, що розчинні фактори мікрооточення мають здатність пригнічувати диференціювання клітин лейкоїдного клону у еритроїдному напрямку [8], що призводить до розширення пулу переважно гранулоцито-макрофагальних клітин-попередників [2; 3]. Тому для ліпшого розуміння впливу розчинних факторів нормального мікрооточення у разі терапії інгібіторами тирозинкіназ на морфофункціональні характеристики клітин-попередників еритропоезу порівнювали результати культивування клітин кісткового мозку пацієнтів досліджуваних груп у культурах *in vitro* та *in vivo*. Встановлено, що незважаючи на характер відповіді клітин лейкоїдного клону на терапію іматинібом та нілотинібом між кількістю БУО-Е у дифузійних камерах *in vivo* та в метилцелюлозі *in vitro* не було статистично значущої різниці (рис. 3).

Отже, ми можемо припустити, що під час ХМЛ фактори нормального мікрооточення не підвищують проліферативну активність клоногенних клітин-попередників еритроїдної ланки гемопоезу, незалежно від ефективності терапії інгібіторами тирозинкіназ. Однак також було встановлено, що під час культивування клітин кісткового мозку пацієнтів досліджуваних груп у дифузійних камерах, в організмі неанемізованих тварин не спостерігалася еритропоетин-незалежного формування КУО-Е, яке відмічалася під час культивування клітин кісткового мозку пацієнтів *in vitro* за відсутності у культуральному середовищі еритропоетину.

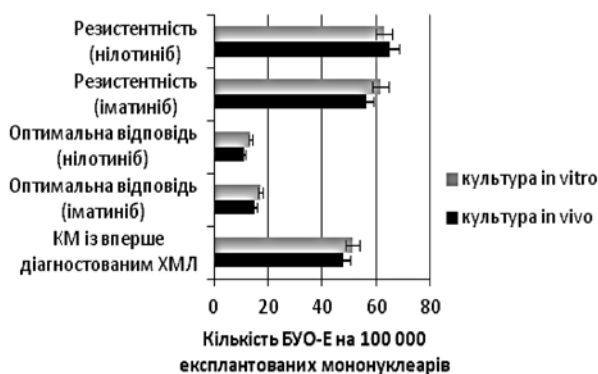


Рис. 3. Показники колонієутворюючої активності клітин кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ у культурах *in vitro* та *in vivo* пацієнтів із різним характером відповіді на терапію ІТК першого та другого покоління

Ми можемо припустити, що причиною цього є наявність цитокінового механізму пригнічення надмірної проліферації клітин еритроїдної ланки гемопоезу, який і спрацьовує при культивуванні *in vivo*, а також у організмі пацієнтів, у яких під час ХМЛ, незважаючи на наявність Рh-хромосоми і у клітинах-попередниках еритропоезу, відбувається розширення лише гранулоцито-макрофагальної ланки кровотворення [11].

Для дослідження впливу розчинних факторів нормального мікрооточення на диференціювання клітин еритроїдної ланки гемопоезу порівнювали результати морфологічного аналізу вмісту КУО-Е, отримані шляхом культивування в метилцелюлозі *in vivo* та у дифузійних камерах *in vitro*. Результати порівняння свідчать про те, що додаткові фактори нормального мікрооточення не впливають на процеси диференціювання клітин еритроїдної ланки гемопоезу у зразках кісткового мозку пацієнтів зі стійкістю до іматинібуму та нілотинібуму (табл. 2). Натомість у клітинних агрегатах, що формувалися у культурах зразків кісткового мозку пацієнтів, що не підлягали лікуванню, та у культурах зразків, що в результаті терапії іматинібом та нілотинібом не містили Рh-клітин, виявили статистично достовірну різницю між числом еритробластів у культурі *in vivo* та *in vitro*. Крім того, було виявлено, що в культурі *in vivo* відбувається пригнічення диференціювання проеритробластів до еритробластів. Це може свідчити про те, що у процесах диференціювання клітин еритроїдного ряду важливу роль відіграє не лише еритропоетин, а й інші фактори нормального мікрооточення [8]. Крім того, можемо також

Таблиця 2. Клітинний склад КУО-Е кісткового мозку в культуральних системах *in vitro* та *in vivo* пацієнтів при ХМЛ із різним характером відповіді на терапію інгібіторами тирозинкіназ

	Культура клітин <i>in vivo</i>			Культура клітин <i>in vitro</i>		
	Проеритро- бласти, %	Еритро- бласти, %	Нормо- бласти, %	Проеритро- бласти, %	Еритро- бласти, %	Нормо- бласти, %
КМ із вперше діагностованою ХМЛ	23,1 ± 2,5	54,2 ± 4,1*	12,7 ± 1,3	21,1 ± 1,7	71,2 ± 5,3	6,7 ± 1,4
Оптимальна відповідь (імагініб)	14,2 ± 3,2	47,9 ± 5,3*	31,3 ± 2,7	16,2 ± 0,9	61,9 ± 4,8	21,3 ± 5,2
Оптимальна відповідь (нілотиніб)	12,7 ± 0,9	43,3 ± 3,7*	26,4 ± 2,4	15,7 ± 2,4	60,3 ± 5,3	22,4 ± 2,1
КМ зі стійкістю до імагініб	24,3 ± 3,1	51,5 ± 5,6	7,1 ± 0,4	19,3 ± 1,6	68,5 ± 6,1	5,1 ± 1,5
КМ зі стійкістю до нілотиніб	27,7 ± 2,4	55,3 ± 4,7	5,2 ± 1,2	17,7 ± 4,1	65,3 ± 7,3	7,2 ± 2,3

Примітка: \*  $p < 0,05$  у порівнянні з культурою *in vitro*.

припустити, що клітини-попередники еритропоезу при набутті стійкості до імагініб та нілотиніб втрачають здатність реагувати на дію факторів мікрооточення, що відповідають за диференціювання. Можливо це, як і у випадку з еритропоетин-незалежним формуванням КУО-Е, пов'язано з ампліфікацією гена *bcr-abl*, що призводить до підвищення автономності клітин лейкемічного клону в організмі [8].

Отже, фактори нормального мікрооточення не впливають на проліферацію клітин-попередників еритропоезу незалежно від характеру відповіді на терапію інгібіторами тирозинкіназ. Крім того, було виявлено пригнічення диференціювання проеритробластів до еритробластів у культурі дифузійних камер зразків кісткового мозку з оптимальною відповіддю на терапію інгібіторами тирозинкіназ, а також пригнічення еритропоетин-незалежного формування КУО-Е у культурах зразків кісткового мозку з резистентністю до терапії імагінібом та нілотинібом.

## Висновки

За допомогою оригінальної моделі ми вперше отримали КУО-Е при ХМЛ у культурі клітин *in vivo*. Крім того, за допомогою морфологічного аналізу отриманих клітинних агрегатів було показано, що у разі резистентності клітин лейкемічного клону при ХМЛ до інгібіторів тирозинкіназ першого та другого покоління відбувається зрушення дозрівання клітин еритроїдної ланки гемопоезу у бік більш ранніх форм, незважаючи на присутність цілого спектра хемокінів, що відповідають за проліферацію та дозрівання клітин еритроїдного ряду, в організмі тварини-реципієнта гелевих дифузійних камер. Крім того, клітини кісткового мозку хворих із набуттям стійкості до імагініб та нілотиніб також набувають здатності до формування КУО-Е за відсутності еритропоетину у культуральному середовищі. Разом з тим, при культивуванні *in vivo* клітин кісткового мозку пацієнтів не відмічається формування КУО-Е у випадку відсутності анемізації тварини.

## Список літератури

1. Гольдберг Е. Д. Методы культуры ткани в гематологии / Е. Д. Гольдберг, А. М. Дыгай, В. П. Шахов. – Томск : Изд-во Том. ун-та, 1992. – 246 с.
2. Глузман Д. Ф. Эволюция лейкемических стволовых клеток при хроническом миелолейкозе / Д. Ф. Глузман, Л. М. Складенко, Т. С. Ивановская и др. // Лабораторна діагностика. – 2012. – Т. 4, № 62. – С. 44–49.
3. Vacco D. A. Molecular Abnormalities in Chronic Myeloid Leukemia: Dereglulation of Cell Growth and Apoptosis / D. A. Vacco, K. Keeshan, S. L. McKenna, et al. // The Oncologist. – 2000. – Vol. 5. – P. 405–415.
4. Catriona H. M. Granulocyte-Macrophage Progenitors as Candidate Leukemic Stem Cells in Blast-Crisis CML / H. M. Catriona, M. D. Jamieson, Ailles E. Laurie, et al. // The new england journal of medicine. – 2004. – No. 351. – P. 657–667.
5. Commission of European Communities. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member

- States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes // 1986. – 86/ 609EES. – ISSN 03780698.
6. Deininger M. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL positive cells / M. Deininger, J. M. Goldman, N. B. Lydon, et al. // Blood. – 1997. – Vol. 90. – P. 3691–3698.
  7. Hariharan I. K. *bcr-abl* oncogene renders myeloid cell line factor independent: Potential autocrine mechanism in chronic myeloid leukemia / I. K. Hariharan, J. M. Adams, S. Cory // Oncogene Res. – 1988. – Vol. 3. – P. 387.
  8. Issaad C. Growth of erythroid colonies in chronic myelogenous leukemia is independent of erythropoietin only in the presence of steel factor / C. Issaad, W. Vainchenker // Blood. – 1994. – Vol. 84, No. 10. – P. 3447–3456.
  9. Lozzio C. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome / C. B. Lozzio, B. B. Lozzio // Blood. – 1975. – Vol. 45. – P. 321–334.
  10. Majsternek I. Chromosom Philadelphia / I. Majsternek, J. Błasiak // Postępy biochemii. – 2002. – T. 48, No. 3. – S. 156–166.
  11. Mayani H. In vitro biology of human myeloid leukemia / H. Mayani, E. Flores-Figueroa, A. Chavez-Gonzalez // Leukemia Research. – 2009. – No. 33. – P. 624–637.
  12. Weisberg E. Beneficial effects of combining nilotinib and imatinib in preclinical models of BCR-ABL<sup>+</sup> leukemias / E. Weisberg, L. Catley, R. D. Wright, et al. // Blood. – 2007. – Vol. 19, No. 5. – P. 2112–2120.
  13. Zhou H. Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia / H. Zhou, R. Xu // Protein&Cell. – 2015. – Vol. 6, No. 6. – P. 403–412.

*I. Sviezhentseva, D. Bilko, I. Russu, N. Bilko*

### **MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS' ERYTHROID PROGENITOR CELLS DURING THE FIRST AND SECOND GENERATION OF TYROSINE KINASE INHIBITORS THERAPY**

*The article is devoted to research of the proliferation and differentiation features of erythroid progenitor cells of patients with chronic myeloid leukemia during the treatment with tyrosine kinase inhibitors – imatinib and nilotinib. We studied the ability of erythroid progenitor cells to form erythroid aggregates in semisolid medium in vivo and in vitro. The results showed that the increase of erythroid progenitor cells proliferation rates and the reduction of differentiation rates as a result of the parallel cultivation of patients' bone marrow cells in vivo and in vitro happen irrespective of the presence of cytokines and growth factors in a normal microenvironment of these cultures. As a result of morphological studies of the erythroid colonies we discovered that these colonies included proerythroblasts, erythroblasts and normoblasts. The average number of proerythroblasts was 18 %. The number of erythroblasts in CML patients from different groups ranged from 58 % to 70 %. Normoblasts number was higher in patients with the optimal response to tyrosine kinase inhibitor therapy, and considerable lower in patients with resistance to therapy. Moreover, in case of the absence of erythropoietin in the cultures, bone marrow cells, which are resistant to tyrosine kinase inhibitors, get an ability to form erythroid colonies. In addition, we showed that bone marrow cells of patients with chronic myeloid leukemia form erythroid colonies, when placed in the animals' body without previous anemia. Therefore, we make an assumption that CML patients have a cytokine inhibition of cell proliferation mechanism of erythroid hematopoiesis. That is why we can explain the reason for the prevalence of undifferentiated granulocyte-macrophage progenitor cells in the bone marrow of CML patients.*

**Keywords:** chronic myeloid leukemia, erythroid progenitor cells, cell culture in vitro, cell culture in vivo, tyrosine kinase inhibitors.

*Матеріал надійшов 28.12.2015*