Федеральное государственное бюджетное учреждение
Гематологический научный центр
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Сорокина Тамара Викторовна

Модификация стромального микроокружения у больных лейкозами в процессе лечения

14.01.21 – гематология и переливание крови

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель
Академик РАН
Профессор, д.м.н. Савченко В.Г.

Москва 2016

Оглавление

Список использованных сокращений 5

Введение 10

Актуальность проблемы 10

Цель работы 12

Задачи исследования 12

Научная новизна 13

Практическая ценность работы 13

Основные положения, выносимые на защиту 13

Структура диссертации 14

Благодарности 14

Глава 1. Обзор литературы 15

1.1 Структура костного мозга 15

1.1.1 Современная модель кроветворения 15

1.1.1.1 Гемопоэтические кроветворные клетки 15

1.1.1.2 Схема гемопоэза 17

1.1.2 Состав микроокружения костного мозга 18

1.1.2.1 Клеточные компоненты микроокружения костного мозга 18

1.1.2.1.1 Понятие кроветворной ниши 19

1.1.2.1.2 Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки 20

1.1.2.1.3 Колониеобразующие единицы фибробластов 22

1.1.2.2 Неклеточные компоненты микроокружения костного мозга 23

1.2 Функциональные процессы, происходящие в костном мозге в норме 24

1.2.1 Роль стромального микроокружения в процессах гемопоэза 24

1.3 Патогенез гемобластозов 31

1.3.1 Понятие лейкозной стволовой клетки 31

1.3.2 Патогенез острых лейкозов 32

1.3.3 Патогенез хронического миелолейкоза 33

1.4 Терапия гемобластозов 34

1.4.1 Основные препараты, применяемые в терапии острых лейкозов 34

1.4.2 Основные препараты, применяемые в терапии хронического миелолейкоза 35
1.5 Функциональные процессы, происходящие в костном мозге при гемобластозах 36
1.5.1 Функционирование стромального микроокружения при гемобластозах 36
1.5.1.1 Роль стромального микроокружения в развитии острых лейкозов 36
1.5.1.2 Роль стромального микроокружения в развитии ХМЛ 40
1.5.2 Взаимодействие лейкозных стволовых клеток со стромальным микроокружением 40
1.5.2.1 Влияние ЛСК на строму при острых лейкозах 40
1.5.2.2 Влияние ЛСК на строму при ХМЛ 45
1.5.3 Процессы, происходящие в костном мозге при воздействии химиотерапии 46
1.5.3.1 Влияние цитостатических препаратов на стромальное микроокружение 46
1.5.3.2 Защитные механизмы стромальных клеток от воздействия химиопрепаратов 47
1.6 Заключение обзора литературы 48
Глава 2. Материалы и методы 50
2.1 Клиническое исследование 50
2.1.1 Дизайн исследования 50
2.1.2 Характеристика больных 51
2.2 Лабораторные исследования 53
2.2.1 Получение и характеристика ММСК 53
2.2.2 Получение и характеристика КОЕф 54
2.2.3 Анализ относительного уровня экспрессии генов 54
2.2.4 Выделение РНК 54
2.2.5 Построение комплементарных цепей ДНК 56
2.2.6 Выполнение ПЦР 56
2.3 Статистический анализ. 61

Глава 3. Результаты и обсуждение 64
3.1 Клинические характеристики пациентов 64
3.2 Лабораторные исследования 65
3.2.1 Морфологические характеристики ММСК 65
3.2.2 Культуральные характеристики ММСК 66
3.2.2.1 Время достижения конфлюэнтности после первичной посадки мононуклеаров (время до P0) 66
3.2.2.2 Суммарная клеточная продукция за 3 пассажа 69
3.2.3 Экспрессия генов в ММСК 71
3.2.3.1 Отличительные характеристики экспрессии генов в ММСК 71
3.2.3.1.1 Гены, экспрессия которых на нулевой точке была повышена 72
3.2.3.1.2 Гены, экспрессия которых на нулевой точке была нормальной 84
3.2.3.1.3 Гены, экспрессия которых на нулевой точке была снижена 92
3.2.3.2 Анализ экспрессии генов в ММСК больных различными нозологиями в зависимости от статуса заболевания 95
3.2.3.3 Анализ различия экспрессии генов в ММСК больных различными нозологиями в зависимости от протокола терапии 97
3.2.4 Концентрация КОЕф 98
3.2.5 Экспрессия генов в КОЕф 100
3.2.5.1 Особенности экспрессии генов в КОЕф 100
3.2.5.2 Анализ экспрессии генов в КОЕф больных различными нозологиями в зависимости от статуса заболевания 105
Заключения 108
Выводы 111
Приложения 113
Список литературы 128

Список использованных сокращений

ABL – Abelson murine leukemia viral oncogene homolog – гомолог вирусного онкогена лейкоза мышей Абельсона

ANG – angiopoietin – ангиопоэтин

BCR – breakpoint cluster region protein – регион частых разрывов

BGLAP – bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein – костный белок, содержащий гамма-карбоксиглутаминовую кислоту

BMP – bone morphogenetic protein – костный морфогенетический белок

BMPR – bone morphogenetic protein receptor – рецептор для костного морфогенетического белка

BSP (BNSP) – bone sialoprotein – костный сиалопротеин

CD – cluster of differentiation – кластер дифференцировки

CEBPA – CCAAT/enhancer-binding protein alpha – CCAAT/энхансер-связывающий белок альфа

EGF – epidermal Growth Factor – эпидермальный фактор роста (ЭФР)

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay – иммуноферментный анализ

ENPP2 – ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase – пирофосфатаза/фосфодиэстераза эктонуклеотидов

ETA – early T-lymphocyte activation – белок активации ранних Т-лимфоцитов

FAM – carboxyfluorescein – карбоксифлуоресцеин

FGF – fibroblast growth factor – фактор роста фибробластов

FGFR – fibroblast growth factor receptor – рецептор к фактору роста фибробластов

Flk (FLT3) – fetal liver kinase (Fms-like tyrosine kinase 3) – тирозин киназа печени плода (FMS-подобной тирозинкиназы-3)

GAPDH – glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase – глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа

HGF – hepatocyte growth factor – фактор роста гепатоцитов

HLA – human Leukocyte Antigens – человеческие лейкоцитарные антигены

ICAM – inter-Cellular Adhesion Molecule – молекула внутриклеточной адгезии

IGF1 – insulin-Like Growth Factor – инсулиноподобный фактор роста

IL – interleukin – интерлейкин

IL-1bR – interleukin1b receptor – рецептор к интерлейкину 1b

ISCT – international Society of Cellular Therapy – международное общество по клеточной терапии

JAK – Janus kinase – киназа Януса

LFA – lymphocyte function-associated antigen – лимфоцитарный функционально-ассоциированный антиген

LIF – leukemia inhibitory factor – фактор ингибирования лейкемии

MAPK – mitogen-activated protein kinase – митоген-активируемая протеинкиназа

MHC – major histocompatibility complex – главный комплекс гистосовместимости

MOXD – methanol oxidase D – метанол оксидаза D

MPL gene – myeloproliferative leukemia gene – ген, ассоциированный с миелопролиферацией

Myc – myelocytomatosis cellular oncogene – клеточный онкоген миелоцитоматоза

NF-κB – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – ядерный фактор «каппа-би»

NK – natural killer cells – естественные киллеры

NR1C3 – nuclear receptor subfamily 1, group C, member 3 – ядерный рецептор из подсемейства 1, группы C, член 3

Osx – osterix – остерикс

PDGFR – platelet-derived growth factor receptor – рецептор к фактору роста тромбоцитов

Ph-хромосома – philadelphia chromosome – филадельфийская хромосома

PI3K – phosphoinositide 3-kinase – фосфоинозитид-3-киназы

PPARG – peroxisome proliferator-activated receptor gamma – рецептор, активируемый пероксисомными пролифераторами типа гамма

Rac – Ras-related C3 botulinum toxin substrate – субстрат, родственный Ras, C3 ботулинового токсина

RAF protein kinase – rapidly Accelerated Fibrosarcoma protein kinase – протеинкиназа быстро растущей фибросаркомы

RAS protein superfamily – rat sarcoma protein superfamily – суперсемейство белков саркомы крыс

ROX – carboxy-x-rhodamine – карбокси-X-родамин

RTQ – real-time quencher – гаситель в реальном времени

SAGE – serial Analysis of Gene Expression – серийный анализ экспрессии генов

SCF – stem cell factor – фактор роста стволовых клеток

Sdf1 – stromal cell-derived factor-1 – фактор, полученный из клеток стромы

SMARCA – SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A – SWI/SNF связанный, матрикс-ассоциированный, актин-зависимый регулятор хроматина, подсемейство A

SOX9 – sex-determining region Y (SRY) box 9 – определяющий пол регион Y - бокс 2

SPP – secreted phosphoprotein – секретируемый фосфопротеин

STAT – signal transducer and activator of transcription – трансдуктор сигналов и активатор транскрипции

TGF – transforming growth factor – трансформирующий ростовой фактор

TGM – transglutaminase – трансглютаминаза

Tie – tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains – тирозинкиназа с иммуноглобулин- и ЭФР- гомологичными доменами

TNFAIP2 – tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein – белок, индуцированный фактором некроза опухоли альфа

TPO – thyroperoxidase – тиреопероксидаза

VCAM – vascular cell adhesion molecule – молекула адгезии клеток сосудов

VEGF – vascular endothelial growth factor – фактор роста эндотелия сосудов

VLA – very Late Antigen – очень поздний активационный антиген

MEM – minimum Essential Medium – среда с минимальным содержанием незаменимых аминокислот с нуклеозидами

MMP – matrix metalloproteinase – матриксная металлопротеиназа

Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

ГСК – гемопоэтическая стволовая клетка

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксирибонуклеозидтрифосфат

ДЭПК – диэтилпирокарбонат

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

КМ – костный мозг

КОЕ-Баз – колониеобразующая единица базофилов

КОЕ-Г – колониеобразующая единица гранулоцитов

КОЕ-Мег – колониеобразующая единица мегакариоцитов (тромбоцитов)

КОЕ-Мо – колониеобразующая единица моноцитов

КОЕф – колониеобразующие единицы фибробластов

КОЕ-Э – колониеобразующая единица эритроцитов

КОЕ-Эоз – колониеобразующая единица эозинофилов

ЛСК – лейкозная стволовая клетка

МДС – миелодиспластический синдром

ММ – множественная миелома

ММСК – мультипотентная мезенхимальная стромальная клетка

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ОЛЛ – острый лимфобластный лекоз

ОМЛ – острый миелобластный лейкоз

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с предшествующей обратной транскрипцией

ПР – полная ремиссия

РНК – рибонуклеиновая кислота

РСК – раковая стволовая клетка

ТКМ – трансплантация костного мозга

ХМЛ – хронический миелолейкоз

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

Введение.

Актуальность проблемы

Большинство клеток стромы костного мозга (КМ) происходят от мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Эти клетки являются важнейшим компонентом костномозговой ниши, и обеспечивают жизнедеятельность гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) [40, 129]. ММСК, полученные в культуре, способны пролиферировать в течение нескольких пассажей, а также сохраняют способность к дифференцировке во все основные ростки мезенхимных линий. Также они обладают уникальным антиапоптотическими и антипролиферативными свойствами, которые позволяют им неспецифически подавлять иммунный ответ. ММСК демонстрируют относительно однородный иммунофенотип и, будучи однажды активированными, оказывают сильный иммуномодулирующий эффект [18]. Описано также, что они могут ингибировать пролиферацию ГСК. В костномозговых нишах стромальные предшественники играют важную роль в поддержании гемопоэза, предоставляя необходимые для этого процесса цитокины, хемокины, молекулы адгезии и молекулы внеклеточного матрикса [47].

Считается, что лейкозные клетки находятся в тесной взаимосвязи с клетками стромального микроокружения, регулирующими их дифференцировку [104]. В других исследованиях было показано, что ММСК защищают опухолевые клетки от цитотоксического воздействия. До сих пор остаются неясными механизмы взаимодействия между ММСК и кроветворными клетками КМ у больных гемобластозами. Было показано, что ММСК способствуют поддержанию роста опухолевых клеток у пациентов с множественной миеломой (ММ) [174], за счет высвобождения большого количества IL-6, и поддерживают остеокластогенез и ангиогенез [51]. Кроме того, в культурах клеток КМ пациентов с ММ отмечена сниженная

пролиферативная активность колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) [19, 51].

Также и при других опухолевых заболеваниях лейкозные клетки оказывают угнетающее влияние на ММСК. Например, при миелодиспластическом синдроме (МДС) ММСК также обладают меньшим пролиферативным потенциалом в сравнении с ММСК здоровых доноров [72, 149]. Было показано, что изменения в профиле экспрессии генов клеток стромы КМ могут вызывать развитие МДС [5] с неэффективным гемопоэзом и последующей вероятной трансформацией в острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) [193]. ММСК пациентов с лейкозами также отличаются от таковых у здоровых доноров [73, 127]. У ММСК больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) выявлена меньшая пролиферативная активность по сравнению нормальными [50, 56]. В этих же исследованиях было выдвинуто предположение о том, что лейкозные клетки не способствуют, а, наоборот, препятствуют росту и пролиферации ММСК, что было подтверждено сниженной способностью к поддержанию нормального кроветворения ММСК при ОЛЛ по сравнению с донорами [50].

Недавно был определён профиль экспрессии генов в ММСК пациентов с МДС и ОМЛ, отличный от здоровых доноров [198]. Несмотря на то, что эти данные противоречивы, предполагается, что отличия ММСК больных лейкозами от ММСК доноров могут объясняться как селекцией самими злокачественными клетками той субпопуляции ММСК *in vivo*, что будет способствовать росту лейкозных клеток, так и генетическими аномалиями, возникающими в ММСК [51]. Известно, что воздействие цитостатических препаратов влияет на строму КМ [171]. Представляется, что опухолевые клетки модифицируют микроокружение с целью создания для себя наиболее благоприятных условий [205]. И для изучения этого необходимо исследовать стромальное микроокружение до начала и в процессе лечения.

Цель работы

Охарактеризовать изменение пролиферативной активности и профиля экспрессии генов ММСК и КОЕф, полученных из костного мозга больных острыми лейкозами и хроническим миелолейкозом до начала терапии, а также на разных этапах терапевтического воздействия.

Задачи исследования

1) Получить культуру мезенхимальных стромальных клеток из костного мозга и оценить их морфологические характеристики у больных острыми лимфобластными лейкозами и острыми миелоидными лейкозами до начала и на +30, +100, +180 день лечения и у больных хроническим миелолейкозом - до начала и на +3, +6 и +12 месяцев терапии

2) Оценить культуральные характеристики (показатели времени до первого пассажа и кумулятивной клеточной продукции) ММСК больных указанными гемобластозами на каждой из исследуемых временных точек.

3) Охарактеризовать относительный уровень экспрессии генов, влияющих на пролиферацию, миграцию и дифференцировку ММСК, а также отвечающих за регуляцию кроветворения (*IL-6, IL-8, IL-1b, IL-1bR1, Jag1, SPP1, BGLAP, FGF2, FGFR1, FGFR2, TGFβ1, TGFβ2, Sdf1, VEGF, PDGFRa, PDGFRb, IGF, CSF, ANG1, VCAM, ICAM, SOX9, LIF, PPARg*) у больных изучаемыми нозологическими формами в контрольные сроки.

4) Определить различия в уровне экспрессии изучаемых генов у больных указанными нозологическими формами в зависимости от программы химиотерапии, ответа на неё и достижения ремиссии.

5) Определить концентрацию КОЕф в костном мозге больных гемобластозами на тех же сроках.

6) Охарактеризовать относительный уровень экспрессии генов различных стромальных дифференцировок в КОЕф (*SPP1, BGLAP, FGF2, FGFR1, FGFR2, PPARg, BMP4, SOX9, VEGF*) на каждой из исследуемых временных точек.

Научная новизна

Впервые выполнена динамическая оценка как культуральных, так и молекулярно-биологических характеристик стромальных клеток-предшественников, находящихся на различных уровнях дифференцировки, у больных лейкозами до начала и в ходе терапии.

Практическая ценность работы

Определение особенностей клеток стромального микроокружения при каждом из лейкозов позволит прояснить механизмы развития резистентности к цитостатическому воздействию и определить вероятность приживления трансплантата в том случае, когда больному будет выполняться трансплантация стволовых клеток.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Лейкемические клетки модифицируют стромальное микроокружение таким образом, что при сохранении морфологических характеристик значимо изменяются их культуральные характеристики, что выражается в удлинении времени, необходимого для формирования монослоя ММСК, снижения их суммарной клеточной продукции и уменьшения концентрации КОЕф. В ходе терапии культуральные характеристики клеток стромы восстанавливаются, однако, в дальнейшем вновь изменяются, отражая влияние химиотерапии

2. Изменение профиля экспрессии генов в ММСК и КОЕф свидетельствует о том, что лейкемические клетки создают для себя наиболее благоприятные условия, характеризующиеся повышением уровня экспрессии генов, продукты которых способствуют пролиферации опухолевых клеток, и снижением уровня экспрессии генов, продукты которых отвечают за пролиферацию и дифференцировку стромальных клеток

Структура диссертации

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 156 страницах машинописного текста, состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов, списка литературы и 9 приложений. Иллюстративный материал представлен в виде 29 рисунков и 9 таблиц.

Благодарности

Искренне благодарю моего научного руководителя генерального директора Гематологического научного центра академика РАН профессора, д.м.н. Валерия Григорьевича Савченко, руководителя научно-клинического отдела химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга д.м.н. Елену Николаевну Паровичникову, заведующую научно-клиническим отделением трансплантации костного мозга к.м.н. Ларису Анатольевну Кузьмину, заведующую научно-клиническим отделом химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения к.м.н. Веру Витальевну Троицкую, а также всех сотрудников этого отдела, заведующую лабораторией физиологии кроветворения д.б.н. Нину Иосифовну Дризе, старшего научного сотрудника лаборатории физиологии кроветворения к.б.н. Ирину Николаевну Шипунову и всех сотрудников этой лаборатории за помощь в работе и поддержку. Благодарю заведующего лабораторией молекулярной гематологии д.б.н. Андрея Борисовича Сударикова и старшего научного сотрудника этой лаборатории Беллу Вениаминовну Бидерман. Благодарю заведующего лабораторией биостатистики и информационных систем к.т.н. Сергея Михайловича Куликова. Приношу благодарности всем клиническим подразделениям и лабораториям ГНЦ, участвовавшим в лечении пациентов.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Структура костного мозга

Костный мозг (КМ) является важнейшим органом кроветворения у взрослых людей. Составляя 4,6% от массы тела, он распределён внутри позвонков, рёбер, таза, черепа, грудины и проксимальных отделов трубчатых костей. Основной функцией КМ является поддержание числа клеток периферической крови в постоянном количестве на протяжении всей жизни. Структура КМ состоит из прочного костного каркаса, окружающего костномозговые полости, содержащие сосудистую систему, кроветворные клетки и строму.

Кровоснабжение КМ осуществляют артериальные сосуды, разделяющиеся на артериолы и капилляры, которые затем образуют систему костномозговых синусов, впадающие в больший по размеру центральный синус, из которого кровь оттекает в венозное русло. Иннервация КМ осуществляется миелинизированными и немиелинизированными волокнами, проникающими в КМ в составе питающих каналов через эпифизарные и метафизарные отверстия и завершающимися в тканях, окружающих гемопоэтические клетки.

1.1.1 Современная модель кроветворения

1.1.1.1 Гемопоэтические кроветворные клетки

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) являются самыми ранними предшественниками, которые дают начало всем остальным клеткам крови, и происходят от гемангиобластов и прегемангиобластов – потомков клеток первичной эмбриональной мезодермы[48, 160, 196]. В последнее время доказано наличие во взрослом организме небольшого количества ещё более ранних, «пре-гемопоэтических» клеток, способных стать как гемопоэтическими, так и стволовыми клетками гемогенного эндотелия [48, 160, 196].

Ранние ГСК составляют 1 на 10000 клеток ткани КМ, пре-гемопоэтические стволовые клетки – 1 на 50000 [13]. Чем более ранней является ГСК, тем выше её пролиферативная активность, поэтому небольшое их количество (в экспериментах на мышах – всего одна ГСК) способно восстановить всю или почти всю кроветворную ткань после её уничтожения ионизирующей радиацией или химиопрепаратами в летальных дозах [75, 83, 178]. В настоящее время считается, что ГСК не представляют собой какую-то однородную популяцию одинаковых по своим свойствам клеток, а составляют гетерогенную смесь различных субпопуляций, находящихся на разных стадиях дифференцировки и обладающих различными поверхностными антигенами, разной краткосрочной и долгосрочной регенеративной активностью, разными профилями экспрессии генов и разными эпигенетическими программами дальнейшей дифференцировки [236].

Выделяют три класса ГСК, различающихся по соотношению лимфоидных и миелоидных клеток (L/M отношение) в популяции их потомков: предрасположенные к миелоидной дифференцировке ($0 < L/M < 3$), предрасположенные к лимфоидной дифференцировке ($L/M > 10$) и «сбалансированные» ГСК ($3 \leq L/M \leq 10$) [124, 165]. Только предрасположенные к миелоидной дифференцировке и «сбалансированные» ГСК являются долгоживущими и способны к длительному самоподдержанию. В дополнение к этим данным, эксперименты с трансплантацией тех или иных типов ГСК показали, что каждый подтип ГСК в условиях другого организма сохраняет свои «предпочтения» в отношении путей дифференцировки и воссоздаёт типичное для него распределение типов клеток крови [124]. Это позволяет предполагать наличие у каждого подтипа этих клеток унаследованной эпигенетической программы дифференцировки, на которую оказывает сравнительно малое влияние свойства микроокружения.

1.1.1.2 Схема гемопоэза

Кроветворение (гемопоэз) — процесс образования, развития и созревания форменных элементов крови [1]. Родоначальником всех кровяных элементов является длительно репопулирующая ГСК, способная к длительному самоподдержанию и дающая начало всем кроветворным линиям дифференцировки [14]. Такая клетка, как уже упоминалось, одна способна восстановить кроветворение летально облученной мыши [234]. В иерархическом древе наиболее близкими к ней потомками являются коротко репопопулирующие ГСК, способные восстановить кроветворение, но на непродолжительный период, так как способность их к самоподдержанию ограничена [234]. В процессе созревания из этих клеток образуются общие лимфоидный и миелоидный предшественники, а из них — полипотентные колониеобразующие единицы (КОЕ), названные так по их способности образовывать колонии в соответствующих условиях. Это частично детерминированные клетки-предшественники.

В дальнейшем клетки-предшественники дифференцируются в унипотентные (коммитированные) клетки, которые могут развиваться только в направлении определенного вида форменных элементов. Эти клетки, в отличие от вышеперечисленных мультипотентных клеток, являются чувствительными к воздействию ростовых факторов и цитокинов. Существуют следующие виды унипотентных клеток – предшественниц: клетки – предшественники гранулоцитов (нейтрофилы — КОЕ-Г) и моноцитов (КОЕ-Мо), базофилов (КОЕ-Баз), эозинофилов (КОЕ-Эоз), эритроцитов (КОЕ-Э), тромбоцитов (КОЕ-Мег), Т- и В- лимфоцитов (проВ-лимфоциты, протимоциты).

Следующие гемопоэтические классы клеток объединяют в группу морфологически распознаваемых клеток-предшественников.

<u>Бластные формы (бласты)</u>. Эти клетки обладают высокой митотической активностью, но не являются самоподдерживающейся популяцией.

Созревающие (дифференцирующиеся) клетки подвергаются структурной и функциональной дифференцировке, образуя соответствующий специфичный вид форменных элементов.

Зрелые (дифференцированные) форменные элементы переходят из КМ в кровь и циркулируют в ней. Не способны к делению, за исключением моноцитов и лимфоцитов.

Клеточный состав крови и кроветворных органов представляет собой систему, находящуюся в здоровом организме в динамическом равновесии: непрерывно происходящее разрушение форменных элементов уравновешивается соответствующим их образованием. На кроветворение влияют центральная и вегетативная нервная система, ряд гормонов, витаминов и факторов кроветворения. В норме и при патологических состояниях одни факторы стимулируют кроветворение, другие его тормозят.

1.1.2 Состав микроокружения костного мозга

1.1.2.1 Клеточные компоненты микроокружения костного мозга

Для осуществления нормального процесса кроветворения, клетки крови погружены в микроокружение, обеспечивающее их всеми факторами, необходимыми для пролиферации, созревания и дифференцировки [235]. При созревании гемопоэтические клетки проходят сквозь стенку венозного синуса в кровяное русло. Полная картина взаимоотношений в системе костномозгового микроокружения до сих пор остаётся неизвестной.

К некроветворным компонентам стромы КМ относятся ММСК и их потомки, эндотелиальные клетки и клетки симпатической нервной системы [235]. К клеткам мезенхимальной природы относят ранние стромальные клетки-предшественники, фибробласты, остеобласты, хондроциты, адипоциты, ретикулярные клетки и др [87, 187, 204, 250]. Было показано, что некроветворные элементы, вне зависимости от уровня дифференцировки, играют важную роль в регуляции кроветворения. Так, ретикулярные клетки

принимают участие в поддержании В-лимфопоэза, а остеобласты оказывают влияние на изменения числа ГСК, В-лимфоцитов и остеокластов [26]. Адипоциты, которые раньше считались пассивными клетками, выполняющими лишь структурную функцию, сейчас считаются негативными регуляторами гемопоэза в костномозговых полостях [168]. Эндотелиальные клетки кровеносных сосудов в КМ формируют своеобразный барьер между развивающимися кроветворными клетками и кровью [58] и играют важную роль в регуляции ГСК и продукции тромбоцитов мегакариоцитами [125]. Эндотелиальными клетками экспрессируются молекулы, обеспечивающие их взаимодействие с матриксом (VLA-4, VCAM-1, Е-селектин и пр.) [241], за счёт чего они опосредуют адгезию ГСК к эндотелию и сохранение их в КМ.

1.1.2.1.1 Понятие кроветворной ниши

Гемопоэз является достаточно разграниченным в пространстве процессом, при котором созревание разных типов клеток происходит в отдельных локусах или нишах.

Кроветворная ниша – это специализированное стромальное микроокружение, поддерживающее функционирование ГСК [37]. Схема кроветворной ниши была впервые предложена в 1978 году на примере гонад дрозофил [206]. Выделяют остеобластную [38] (эндостальную [172]) нишу, которая содержит остеобласты и стромальные клетки в непосредственном взаимодействии с костью, и сосудистую (периваскулярную) [117] нишу, состоящую из эндотелиальных клеток в тесном взаимодействии с сосудами [136, 163]. Функции эндостальной ниши включают в себя поддержание постоянства числа ГСК, обеспечивая процесс их самообновления. Функции периваскулярной ниши заключаются в активации и обеспечении созревания кроветворных элементов и контроле миграции клеток из КМ и в него [109, 158].

Данные последних исследований показывают, что существует 2 типа периваскулярных ниш для ГСК: для находящихся в состоянии покоя и в процессе деления [132].

Поддерживающие клетки в каждой нише продуцируют растворимые факторы, которые взаимодействуют с лигандами на поверхности ГСК [138] и обусловливают пролиферацию, дифференцировку, миграцию и гибель ГСК. Например, контакт между Notch-1 на ранних ГСК и Jag1 на клетках стромы индуцирует пролиферацию ГСК [226], а связывание рецептора тирозинкиназы-2 на ГСК с ангиопоэтином-1 на остеобластах индуцирует вхождение клетки в состояние покоя [18]. Растворимые факторы, например, фактор стволовых клеток (stem cell factor (SCF)), связываются с рецепторами на поверхности ГСК, чтобы стимулировать их рост и пролиферацию [32]. Фактор, полученный из клеток стромы (Stromal cell-derived factor-1 (Sdf1), который постоянно вырабатывается клетками стромы и эндотелиальными клетками, помогает опосредовать миграцию, рост и дифференцировку ГСК через его рецептор CXCR4 [125], что играет важнейшую роль в регуляции гемопоэза.

1.1.2.1.2 Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

ММСК [41] – это выделяемые в культуре стромальные предшественники с мультилинейным потенциалом дифференцировки [78, 203] (способными под действием соответствующих индукторов дифференцироваться в костную, хрящевую, жировую и другие ткани [186]) и обладающие широкими иммуномодулирующими свойствами [76, 159]. Их существование подтверждено в мышиной модели [230]. Способность к самоподдержанию, характерная для истинных стволовых клеток, для ММСК не доказана. В организме ММСК локализованы, большей частью, периваскулярно [157] и входят в состав стромальной ниши для ГСК [159].

Международным Обществом Клеточной Терапии (International Society of Cellular Therapy (ISCT)) были утверждены 3 основных критерия для определения ММСК [60]:

1) Способность к адгезии к пластику;

2) Экспрессия специфических комбинаций иммунофенотипических маркеров (CD73, CD90 и CD105) при отсутствии экспрессии маркеров кроветворных клеток (CD14, CD34 и CD45) и молекул главного комплекса гистосовместимости 2 класса (MHC-II);

3) Способность к дифференцировке в клетки мезодермальной природы (адипоциты, хондроциты, остеобласты) под воздействием соответствующих индукторов [60].

Под влиянием специфических условий, ММСК могут демонстрировать способность к дифференцировке в клетки эндодермальной и нейроэктодермальной природы [106], как, например, гепатоциты [17], эпителий или нейроны [61], что, однако, до сих пор является предметом споров.

Показано, что при культивировании на первом пассаже ММСК представляют собой достаточно гетерогенную клеточную популяцию, клетки которой различаются по пролиферативному потенциалу [27].

Регуляторная активность ММСК направлена на большое количество эффекторных клеток, таких, как клетки врождённого и приобретённого иммунитета, включая подтипы Т-лимфоцитов, В-клетки, NK-клетки, дендритные клетки и нейтрофилы [159]. Эта способность относится не только к ММСК КМ, но также и к ММСК, полученным из других органов, таких, как жировая ткань, селезёнка, а также к потомкам ММСК, таким, как адипоциты, остеобласты и фибробласты [11]. В частности, фибробласты и мезенхимные клетки предотвращают пролиферацию и апоптоз активированных Т-клеток, что указывает на роль ММСК в иммунной регуляции [159].

1.1.2.1.3 Колониеобразующие единицы фибробластов

Если эксплантировать во флакон для культивирования КМ в виде одноклеточной суспензии, через 10-14 дней образуются дискретные колонии, каждая из которых является клоном, продуцированным единственным предшественником [43]. Ранние клетки-предшественники стромы впервые были описаны А.Я.Фриденштейном [77] как колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕф) из-за их способности образовывать на пластике фибробластоподобные колонии. А.Я.Фриденштейн продемонстрировал, что каждая колония происходила из одной колониеобразующей клетки, или колониеобразующей единицы. Имеются данные о том, что при трансплантации отдельных колоний из КМ человека *in vivo* под кожу иммунодефицитных мышей, часть из них формировала различные ткани стромы, создавая участок микроокружения, необходимого для поддержания гемопоэза, что позволяет предположить мультипотентность исходных КОЕф [77]. Показано, что КОЕф имеют мезенхимную природу [43] и достаточно гетерогенны, что дает возможность некоторых из них, обладающих достаточно высоким пролиферативным потенциалом и способных к дифференцировке, условно соотносить с ММСК [79], однако, КОЕф представляют собой отдельный класс в иерархии стромальных предшественников, традиционно считающийся более зрелым, чем ММСК [171]. Пролиферативный потенциал КОЕф досконально не изучен, известно, что в организме при равновесных условиях большинство КОЕф не делятся и находятся в Go-фазе клеточного цикла [184], однако, при переносе в культуру они начинают пролиферировать. Возмущающее воздействие приводит к активации ММСК и КОЕф и стимулирует пролиферацию ранних клеток-предшественников стромального микроокружения, что, возможно, влияет на их способность регулировать кроветворение.

1.1.2.2 Неклеточные компоненты микроокружения костного мозга

Процессы продукции, дифференцировки и созревания клеток всех кроветворных линий опосредуются гуморальными факторами. Некоторые факторы, например, BPA/IL-3, воздействуют на более ранние клетки, тогда как другие, как, например, эритропоэтин, воздействуют на клетки более поздних стадий дифференцировки.

Источники факторов гемопоэза также разнообразны. Эритропоэтин вырабатывается преимущественно почками и в небольшом количестве – печенью и стимулирует пролиферацию коммиттированных эритроидных предшественников и высвобождение незрелых клеток, IL-1 продуцируется макрофагами. Колониестимулирующие факторы продуцируются большим количеством клеток, включая макрофаги/моноциты, фибробласты, эндотелиальные клетки, лимфоциты и клетки плаценты.

Достоверно показано, что хемокины регулируют процессы миграции и «хоуминга» клеток [82]. Важнейшим хемокином является Sdf1 (stromal-derived factor-1 или CXCL12). Его рецептор CXCR4 обнаруживается на мембранах ММСК и там взаимодействует с Sdf1 [237]. Сигнальный путь Sdf1/CXCR4 играет важную роль в процессах миграции ГСК и ММСК [51, 85, 139, 188, 191, 221].

Эндокринная система оказывает на кроветворную ткань разнообразные влияния, основные из них — прямое действие гормонов на пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток, изменение их чувствительности к специфическим гуморальным регуляторам и формирование характерных для стресс-реакций гематологических изменений [1].

Недавно была показано участие симпатической нервной системы в регуляции гемопоэза, а также роль нейротрансмиттеров в процессах клеточной мобилизации, пролиферации и дифференцировки [64].

1.2 Функциональные процессы, происходящие в костном мозге в норме

1.2.1 Роль стромального микроокружения в процессах гемопоэза

Клетки стромы находятся в тесной взаимосвязи с кроветворными клетками, регулируя процессы их образования, дифференцировки, миграции и гибели [112, 146, 197]. Большинство из этих связей опосредуется прямыми межклеточными контактами за счёт связей лигандов на одном типе клеток с рецептором на другом.

В последнее десятилетие были выявлены несколько механизмов межклеточных взаимодействий клеток в различных компартментах. Несмотря на то, что эндост может находиться на расстоянии нескольких клеток от синусоида, эти два анатомических отдела функционально абсолютно независимы друг от друга. Kiel et al. и соавт. [116] показали, что ГСК локализуются около эндоста, однако, в непосредственной близости от синусоидов [121]. Защищённое положение в эндостальной нише способствует сохранению ГСК [26, 30, 73], тогда как васкулярная ниша поддерживает гомеостаз и стимулирует мегакариоцитопоэз [19]. Взаимодействие между клетками обеспечивается рядом контактов:

1) N-кадгерин и b-катенин взаимодействия между остеобластами и ГСК. Доказательства тому были получены Arai и соавт. [18], которые показали, что ГСК в остеобластной нише имеют большие уровни N-кадгерина по сравнению с таковыми в периваскулярной нише.

2) Взаимодействия между тромбопоэтином и его рецептором. Представители популяции длительно живущих ГСК экспрессируют рецептор к тромбопоэтину [29], который продуцируется клетками эндоста. Тромбопоэтин является основным регулятором тромбоцитарного и мегакариоцитарного метаболизма [31]. Взаимодействия между этими клетками обеспечиваются различными медиаторами и факторами транскрипции, вовлеченными в процесс самообновления ГСК [30, 69]. Более

того, тромбопоэтин индуцирует экспрессию молекул адгезии, поддерживая межклеточные взаимодействия [30], способности ГСК к пролиферации и адгезии [60]. Учитывая, что ГСК с рецепторами к тромбопоэтину локализуются около эндоста, близко к тромбопоэтин-продуцирующих остеобластам, это доказывает вовлечение клеток эндоста в метаболизм ГСК.

3) Ангиопоэтин1 и рецептор тирозинкиназы эндотелиальных клеток 2 (Tie2). Arai и соавт. продемонстрировали важную роль этого взаимодействия в процессах самообновления клеточного пула ГСК [18]. Tie2 экспрессируется на эндотелиальных клетках и на ГСК [21, 181, 227], а его лиганд ангиопоэтин1 продуцируется CD146+ предшественниками остеобластов и остеобластами [223, 249]. Связь между ангиопоэтином и его рецептором обеспечивает сохранение ГСК в нише через N-кадгерин и интегрин 1b – обусловленный механизм, что приводит к сохранению и выживанию ГСК [18, 140, 222]. Также через продукцию ангиопоэтина1 CD146+ субэндотелиальные и стромальные клетки регулируют процесс сосудистого ремоделирования, обеспечивая «хоуминг» ГСК [18].

4) Взаимодействия между остеобластами и макрофагами. Макрофаги периоста экспрессируют большое количество факторов остеоиндукции, включая трансформирующий ростовой фактор бета (TGFb), костный морфогенетический белок 2 (BMP-2) и витамин Д3. В ответ на это, остеобласты поддерживают рост и пролиферацию макрофагов через продукцию колониестимулирующего фактора-1, поэтому эти два типа клеток находятся в постоянной взаимосвязи.

5) Взаимодействия между CXCL12 и CXCR4 играют важнейшую роль в регуляции гемопоэза, о чем уже упоминалось ранее.

6) Кальций-чувствительный рецептор экспрессируется остеобластами и гемопоэтическими клетками, и изменение уровня Ca^{++} позволяет контролировать процессы костного ремоделирования. Adams и соавт. показали, что ГСК локализуются вблизи клеток, высвобождающих Ca^{++},

уровень которого влияет на морфологию, миграцию и эффекты клеток через взаимодействия с кальций-чувствительными рецепторами на ГСК.

7) Фактор стволовых клеток и матриксные металлопротеиназы. Известно, что фактор стволовых клеток (SCF), экспрессируемый различными клетками стромы, является важным медиатором жизнедеятельности ГСК [44]. Heissing и соавт. показали, что матриксная металлопротеиназа-9 (MMP-9) играет важную роль в высвобождении SCF, а CXCL12, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), в свою очередь, стимулирую продукцию MMP-9.

В рамках работы была поставлена задача изучить экспрессию генов в ММСК больных гемобластозами в сравнении с донорами. При отборе генов для данного исследования внимание уделялось тем, которые кодируют белки, принимающие участие в гемопоэзе, ангиогенезе, процессах воспалительного и иммунного ответа. Краткий обзор свойств этих белков приведён ниже.

1) Белки, регулирующие иммунный ответ

Интерлейкин-1 бета (IL-1b) (катаболин) – цитокин, относящийся к семейству интерлейкина 1. Является важнейшим медиатором воспалительного ответа и вовлечён в различные клеточные процессы, включая клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз [67, 225].

Рецептор-1 к интерлейкину-1 (IL1R1), также известный как CD121a, относится к семейству рецепторов интерлейкина 1 и является посредником, вовлечённым в иммунные и воспалительные процессы [225].

Интерлейкин 6 (IL-6) – цитокин, обладающий провоспалительными и противовоспалительными свойствами. Синтезируется активированными макрофагами и Т-клетками и стимулирует иммунный ответ [195].

Интерлейкин 8 (IL-8) или хемокин CXCL8, — один из основных провоспалительных хемокинов, вырабатываемый макрофагами,

эпителиальными и эндотелиальными клетками. Относится к хемокинам подсемейства CXC. Играет важную роль в системе врождённого иммунитета. Также было показано, что IL-8 стимулирует агниогенный потенциал ММСК через увеличение содержания VEGF [96].

2) Белки, регулирующие миграцию, морфогенез и дифференцировку ММСК

Остеокальцин, также известный, как костный белок, содержащий гамма-карбоксиглутаминовую кислоту (bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein (BGLAP)) – неколлагеновый белок, найденный в костной ткани и дентине. Рецептор данного белка экспрессируется на лейкоцитах. Является маркером позднего остеогенеза [80].

Транскрипционный фактор SOX9 (sex-determining region Y (SRY)-box 9) играет важную роль в процессе дифференцировки хондроцитов в раннем хондрогенезе [16, 141, 142]. Также было показано, что SOX9 опосредует адипогенную дифференцировку ММСК [212], а также пролиферацию и экспрессию маркеров остеогенеза на стромальных клетках [213].

Рецептор, активируемый пероксисомными пролифераторами типа гамма (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG), известный как рецептор глитазона или ядерный рецептор 1C3 (nuclear receptor subfamily 1, group C, member 3 (NR1C3)). Члены семейства PPARs играют роль в регуляции клеточной дифференцировки, развития и обмена веществ. PPARG является регулятором дифференцировки адипоцитов.

Рецепторы к факторам роста тромбоцитов (Platelet-derived growth factor receptors, PDGFR) — поверхностные тирозинкиназные рецепторы, расположенные, в том числе, на фибробластах. PDGF стимулирует пролиферацию этих клеток. PDGF является одним из многочисленных факторов роста или белков, которые регулируют клеточный рост и деление [97, 143], являясь мощным митогеном для клеток мезенхимального происхождения [234].

Молекула адгезии васкулярных клеток -1 (Vascular cell adhesion molecule 1 – VCAM-1, CD106) — белок, входящий в суперсемейство иммуноглобулинов, играющий значительную роль в опосредовании иммунного ответа, адгезии лейкоцитов и эндотелиальных клеток [4]. Было показано, что высокая экспрессия VCAM1 подавляет способность ММСК к миграции через NF-κB путь [175].

Молекула внутриклеточной адгезии 1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1, CD54) – молекула клеточной адгезии, присутствующая в низкой концентрации на мембранах лейкоцитов и эндотелиальных клеток [201, 240]. При стимуляции цитокинами, в том числе, IL-1, экспрессия ICAM-1 на цитоплазматической мембране резко увеличивается. Участвует в механизмах иммунного ответа, клеточного адгезии, передачи сигналов и миграции лейкоцитов [240]. Эндотелиальный ICAM-1 обеспечивает прочное прикрепление опухолевых клеток к эндотелиальной выстилке сосуда. Также ICAM регулирует дифференцировку ММСК в адипоциты [45].

3) Белки, регулирующие пролиферацию ММСК

Фактор роста фибробластов-2 (fibroblast growth factor (FGF2)) – это белок, относящийся к семейству факторов роста фибробластов, обладающих широким спектром митогенной активности и вовлечённых в разнообразные биологические процессы, включая клеточный рост, морфогенез, опухолевый рост и инвазию. Этот белок работает как модификатор миграции и пролиферации эндотелиальных клеток, а также как ангиогенный фактор. FGF2 ингибирует дифференцировку ММСК, блокируя внеклеточную активацию киназы и повышая уровни экспрессии рецептора FGF2 [135] .

Рецепторы к фактору роста фибробластов-1 и 2 (Fibroblast growth factor receptor 1 и 2(FGFR1, 2)), CD331 и CD332 – рецепторы, чьими лигандами являются члены семейства факторов роста фибробластов.

4) Белки, участвующие в регуляции кроветворения

Остеопонтин, также известный как костный сиалопротеин 1 (bone sialoprotein I (BSP-1 or BNSP)), белок активации ранних Т-лимфоцитов (early T-lymphocyte activation (ETA-1)), секретируемый фосфопротеин 1 (secreted phosphoprotein 1 (SPP1)) – белок, кодируемый геном *SPP1*. Синтезируется фибробластами, остеобластами, хондроцитами и связывается с рецепторами, экспрессируемыми на лейкоцитах. Является важным фактором активации остеокластов [211].

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), также известный, как колониестимулирующий фактор 3, - это гликопротеин, стимулирующий КМ к продукции гранулоцитов и стволовых клеток и к высвобождению их в периферическую кровь. Функционально, это цитокин и гормон, продуцируемый большим количеством клеток. Г-КСФ также стимулирует выживание, пролиферацию, дифференцировку и функционирование нейтрофилов и их предшественников через различные сигнальные пути (JAK/STAT, MAPK/PI3K) [134].

Jag1 (CD339) – мембранный белок, лиганд для рецептора Notch1, играет важную роль на всех этапах гемопоэза. Jag1 стимулирует пролиферацию ГСК, играет роль в определении пути клеточной дифференцировки в процессе гемопоэза и усиливает ангиогенез [226].

Трансформирующий ростовой фактор бета (Transforming growth factor beta (TGFb))— белок, который контролирует пролиферацию, клеточную дифференцировку и другие функции в большинстве клеток. TGFb действует как антипролиферативный фактор в нормальных эпителиальных клетках и на ранних стадиях онкогенеза. TGFb вовлечен в сигнальный путь, который является пусковым механизмом апоптоза [62, 119].

Другим важным регулятором дифференцировки ГСК является BMP4 (bone morphogenetic protein 4 – костный морфогенетический белок 4), снижение которого нарушает функционирование ГСК [190].

BMP4 относится к надсемейству белков TGFb, регулирующих процессы пролиферации, дифференцировки, выживаемости клеток и их гибели, и необходим для поддержания функциональной активности ГСК во взрослом организме [230].

Фактор, полученный из клеток стромы (Stromal cell-derived factor-1, Sdf1) или CXCL12 – хемокин, связывающийся с рецепторами CXCR4 и CXCR7 и играющий важную роль в эмбриональном развитии и гемопоэзе. Sdf1 выступает в роли хемоаттрактанта и стимулирует пролиферацию клеток и миграцию ММСК [210, 237] и ГСК [182].

Ангиопоэтин 1 – тип ангиопоэтина, кодирующийся геном *ANG1*. Ангиопоэтины – это белки, участвующие в процессах васкуло- и ангиогенеза. Играет важнейшую роль в управлении реципрокных взаимодействий между эндотелием и окружающим его матриксом и мезенхимой [33].

Фактор роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor VEGF) – белок, вырабатываемый клетками для стимулирования васкулогенеза и ангиогенеза [96].

Инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1, соматомедин С, Insulin-Like Growth Factor-1 - IGF1)— белок из семейства инсулиноподобных факторов роста. В его функции входит регуляция процессов роста, развития и дифференцировки различных типов клеток, обладает митогенным и антиапоптотическими свойствами [57, 94].

Фактор ингибирования лейкемии (Leukemia inhibitory factor – LIF) – это цитокин, относящийся к классу интерлейкина 6, влияющий на рост клеток, ингибируя процессы дифференцировки. При снижении уровня LIF клетки начинают дифференцироваться [99]. LIF опосредует иммуномодулирующие эффекты ММСК, подавляя пролиферацию Т-лимфоцитов [167].

1.3 Патогенез гемобластозов

1.3.1 Понятие лейкозной стволовой клетки

Раньше существовала стохастическая теория онкогенеза и метастазирования опухолей, постулирующая клоногенность всех опухолевых клеток, т.е. способность любой клетки давать начало новой опухоли. Однако к настоящему моменту распространена иерархическая теория, утверждающая, что опухоли построены по тому же принципу, что и нормальная ткань, и включают опухолевые клетки различной степени дифференцировки. Согласно ей, популяция опухолевых клеток включает опухолевые стволовые клетки (раковые стволовые клетки или РСК), переходные размножающиеся и дифференцированные раковые клетки.

Одно из первых свидетельств существования РСК было показано группой ученых под руководством J.E.Dick в 1997 году [55]. Они исследовали клеток ОМЛ, при котором субпопуляция, составляющая 0,01-1% от общей популяции клеток, могла вызывать лейкоз при трансплантации у иммунодефицитных мышей. Эти клетки и было предложено называть лейкозными стволовыми клетками (ЛСК) [55]. Затем Lapidot и соавт. подтвердили существование ЛСК в эксперименте приживлением человеческих ЛСК в ксеногенных трансплантационных моделях [138].

ЛСК обладают теми же свойствами, что и нормальные стволовые клетки, включая самовоспроизведение и способность к дифференцировке, хоть и аберрантной [36]. Сущность модели ЛСК заключается в том, что гемобластозы организованы иерархично, а ЛСК находятся на вершине иерархии [54]. Несмотря на схожесть фенотипов у ГСК и ЛСК, было показано большее распространение ЛСК в гипоксических областях эндостальных ниш [179], в отличие от ГСК, которые в условиях гипоксии пребывают в состоянии покоя. Так, трансформация, приводящая к появлению ЛСК, может вызывать изменения и в путях передачи сигналов в нише [145].

1.3.2 Патогенез острых лейкозов

В основе патогенеза острых лейкозов (ОЛ) лежит мутация стволовой клетки [2], что влечет за собой потерю потомками этой клетки способности к созреванию [66]. Образовавшийся клон автономен от регулирующих воздействий и достаточно быстро вытесняет нормальные ГСК, замещая собой весь гемопоэз [49, 69]. От мутации до момента появления клинических и лабораторных признаков заболевания проходит в среднем 2 месяца [207]. За этот период количество опухолевых клеток увеличивается с 1 до 10^9-10^{12}. Вытеснение нормальных клеток и замещение их опухолевыми закономерно приводит к уменьшению в крови зрелых клеток, что проявляется соответствующей клинической картиной [80, 92, 123, 131, 192].

Исследования последних лет доказали возможность существования нескольких клонов у пациентов с ОЛ, что позволяет предположить, что, возможно, стромальное микроокружение способствует селекции наиболее агрессивных клонов при исходном наличии диспластических изменений [176]. Убедительные доказательства несомненной роли опухолевого микроокружения в патогенезе заболевания, полученные в исследованиях клеточных культур при колоректальном раке [214], раке предстательной железы [217], раке молочной железы [199], позволяют предположить, что изменения микроокружения влияют на течение заболевания [200].

Реципрокные взаимодействия между стромальными и опухолевыми клетками через молекулы паракринного и аутокринного сигнальных путей, наряду с межклеточными контактами, а также взаимодействием между клетками и матриксом, поддерживают сохранение лейкозных клеток, их активацию и преимущество в выживании, пути ухода от апоптоза, резистентности к проводимой химиотерапии и сохранение даже после лечения на уровне минимальной остаточной болезни [81, 93, 152]. Более того, было показано, что разрыв этих взаимодействий может преодолеть резистентность к проводимой химиотерапии [154, 169, 242].

1.3.3 Патогенез хронического миелолейкоза

ХМЛ – первый из описанных лейкозов и первое онкологическое заболевание, при котором у человека обнаружен специфический хромосомный маркер – так называемая, филадельфийская или Ph-хромосома [177]. В 1973 г в работах J. Rowley было показано, что у всех исследованных больных обнаруживается реципрокная транслокация между хромосомами 9 и 22 [202]`. Молекулярными методами исследования было показано, что у всех больных одновременно сосуществуют Ph-позитивные и Ph-негативные клетки, в то время как исследование зрелых клеток КМ и крови позволяет обнаружить только Ph-позитивные клетки. Это свидетельствует о том, что Ph-позитивные клетки имеют большую пролиферативную активность и подавляют продуктивную способность Ph-негативных стволовых клеток.

В настоящее время частично расшифрованы патогенез ХМЛ и механизм постепенного вытеснения нормального кроветворения патологическим клоном клеток. При t(9;22)(q34;q11) часть гена *ABL* оказывается перемещенной с хромосомы 9 на длинное плечо хромосомы 22, в локус расположения гена *BCR*, в результате чего образуется гибридный ген *BCR-ABL*, кодирующий образование белка p210. Было показано, что даже в тех редких случаях, когда при ХМЛ не удается обнаружить t(9;22), специальные методы всегда позволяют выявить наличие химерного гена *BCR-ABL*. При образовании гибридного гена отменяется физиологическая супрессия ABL-тирозинкиназы, которая начинает активно фосфорилировать тирозин 177 гена *BCR*, что приводит к последовательной активации ряда клеточных белков, которая, в конечном итоге, вызывает активацию генов семейств *RAS* и *RAF*, от которых сигнал пролиферации через систему митогенактивных протеинкиназ поступает к ядру клетки. Активация сигнального пути запускает ряд других генов, что, в итоге, приводит к уменьшению зависимости пролиферации клеток-носителей гена *BCR-ABL* от

регулирующего влияния ростовых факторов, уменьшает их адгезию к строме КМ и снижает чувствительность к сигналам апоптоза [205, 240].

Преимущество в пролиферативной активности, которое в результате указанных изменений приобретает патологический клон, приводит к постепенному расширению плацдарма патологического кроветворения и вытеснению нормального гемопоэза, а уменьшение адгезии – к характерной для ХМЛ циркуляции незрелых элементов гемопоэза (в т.ч. клеток-предшественников) с появлением очагов экстрамедуллярного гемопоэза в селезенке, а позднее и в печени. Снижение чувствительности патологических клеток к сигналам апоптоза может играть роль не только в увеличении массы опухоли, но, благодаря выживанию клеток с добавочными мутациями, и в эволюции болезни в более злокачественную стадию.

1.4 Терапия гемобластозов

1.4.1 Основные препараты, применяемые в терапии острых лейкозов

В терапии острых лейкозов в настоящее время применяются различные схемы химиотерапии, различающиеся набором входящих в их состав препаратов, а также длительностью терапии [6, 7]. Несмотря на постоянные исследования и несомненные успехи в области разработки новых препаратов для лечения ОМЛ, этот вид лейкоза до сих пор ассоциирован с короткой общей выживаемостью и высоким уровнем смертности, особенно, у пациентов пожилого возраста [44].

В терапии ОМЛ применяются протоколы, в рамках которых последовательно применяются курсы с цитарабином, даунорубицином, идарубицином и митоксантроном, после проведения индукции и консолидации проводится поддерживающая терапия курсами с цитарабином и 6-меркаптопурином [10, 12]. Трансплантацию КМ (ТКМ) от HLA-

идентичного донора осуществляется всем больным ОМЛ в первой полной ремиссии (ПР), кроме больных с inv16 и t(8;21) [8].

В Гематологическом научном центре для лечения ОЛЛ используется протокол, основным принципом которого является длительное непрерывное лечение с коррекцией доз препаратов в зависимости от глубины миелосупрессии [9]. Всем больным при установлении диагноза лимфобластного лейкоза выполняется семидневная предфаза преднизолоном. Индукционная терапия содержит преднизолон или дексаметазон, даунорубицин, винкристин, L-аспарагиназу, 6-меркаптопурин, циклофосфан и цитарабин. Консолидирующий этап обычно состоит из нескольких курсов и содержит те же препараты в различных комбинациях. Поддерживающая терапия продолжается 2 года. Для больных Т-клеточным ОЛЛ/лимфомой в этом протоколе предусматривается выполнение трансплантации аутологичных стволовых клеток после кондиционирования по схеме BEAM с последующим продолжением поддерживающей терапии по протоколу. Больным В-ОЛЛ, у которых имеются HLA-идентичные доноры, выполняется аллогенная ТКМ [8].

1.4.2 Основные препараты, применяемые в терапии хронического миелолейкоза

Учитывая значительное снижение летальности при лечении иматинибом, он рекомендован всем больным в качестве первой линии терапии. В хронической фазе доза иматиниба составляет 400 мг/день ежедневно, в фазе акселерации и бластного криза — 600-800 мг/день. Иматиниб — ингибитор тирозинкиназы, механизм его действия заключается в блокировании активности белка bcr/abl-тирозинкиназы, играющей ключевую роль в патогенезе ХМЛ.

1.5 Функциональные процессы, происходящие в костном мозге при гемобластозах

1.5.1 Функционирование стромального микроокружения при гемобластозах

1.5.1.1 Роль стромального микроокружения в развитии острых лейкозов

Костномозговая строма регулирует кроветворение (и локально, в кроветорных нишах, и дистантно, продуцируя цитокины и ростовые факторы) как в норме, так и при различных заболеваниях кроветворной системы [128, 136]. Все исследования указывают на исключительную роль ММСК в процессах поддержания как нормального, так и патологического кроветворения [157, 230]. Нарушения в функционировании микроокружения могут возникнуть с возрастом и оказывают прямое влияние в развитии нарушений кроветворения, включая МДС [30], ММ [19, 51] и ОМЛ [29, 73].

Новые данные о взаимодействии между опухолевыми клетками и их микроокружением подтверждают гипотезу о том, что изменение микроокружения способствует селекции и экспансии лейкозных клеток [23, 24, 31]. Также в ряде экспериментов была доказана роль ММСК в поддержании выживания опухолевых клеток и защите их от воздействия цитостатических препаратов [19, 98, 105, 107, 152, 243]. Недавние исследования показали, что аномальное стромальное микроокружение само по себе может приводить к дисфункциональному гемопоэзу и даже развитию лейкоза [120, 123, 192, 232, 233]. В одном исследовании в мышиной модели линия остеопрогениторных клеток была дефектна по гену *Dicer1*, из-за чего нарушалась нормальная дифференцировка в остеобласты, что, в итоге, вело к развитию миелодисплазии [192]. Трансплантация кроветворных клеток от мышей этой линии в мышей дикого типа приводила к нормальному приживлению без признаков миелодисплазии. Однако трансплантация кроветворных клеток от мышей дикого типа в мышей линии Dicer1 также приводила к развитию миелодисплазии и даже ОМЛ. В другом исследовании

активация мутации β-катенина в остеобластах приводила к развитию ОМЛ через сигнальный путь Notch [123].

Взаимодействие с клетками стромы опосредует выживаемость лейкозных клеток, наличие которых вызывает изменения в КМ, влияя как на кроветворение, так и на стромальное микроокружение. В ряде экспериментов предпринимались попытки выращивания линий человеческих бластных клеток от пациентов с ОМЛ с использованием линий мышиных стромальных клеток и ростовых факторов. [89, 122]. Было выдвинуто предположение, что ММСК обеспечивают преимущество в выживании ЛСК, так как последние имеют общие характеристики с ГСК, и ММСК могут использоваться в культурах ЛСК даже без добавления ростовых факторов [65, 84].

В исследовании Ito и соавт. было показано, что бласты от пациентов с лейкозом имели огромное преимущество в выживаемости при их совместном культивировании со стромой по сравнению с выращиванием в одной среде [103]. Последующие эксперименты продемонстрировали, что это преимущество было контакт-обусловленным, так как бласты, которые выращивались в условиях физического контакта с клетками стромы, пролиферировали лучше, чем те, что выращивались в среде со стромой, но вне контакта с ней или же в среде без стромальных клеток. Аналогичные данные были получены ранее в работах Gosliga и соавт. [89] и Klco и соавт. [122]. Это доказывает, что как растворимые факторы, так и межклеточные взаимодействия являются критичными в выживаемости лейкозных клеток.

Однако не только ММСК, но и более дифференцированные клетки остеогенной линии дифференцировки опосредуют процесс кроветворения [38, 246]. Нарушения в функционировании элементов остеобластного компартмента приводит к нарушению кроветворения [80]. Так, Chandran и соавт. показали снижение потенциала к остеогенной дифференцировке у пациентов с ОМЛ [44], что согласуется с аналогичными данными, полученными у пациентов с миелодисплазией [85].

Было показано наличие физических контактов между остеобластами и ГСК через молекулы адгезии, включая катгерины и интегрины. После их связывания происходит активация сигнальных путей, что приводит к запуску механизмов пролиферации, адгезии и миграции[34, 218].

Костные морфогенетические белки (BMPs; bone morphogenetic proteins), играют важную роль в патогенезе гемобластозов [52, 88], в частности, ОЛЛ [53]. Было показано, что BMP6, выделяемый клетками стромы, ингибирует В-лимфопоэз у взрослых [114], BMP2 регулирует дифферецировку ММСК, а BMP4 является важнейшим компонентом, выделяемым клетками костно-мозгового микроокружения, регулирующим число и функционирование ГСК [88]. Недавно Khurana и соавт. было продемонстрировано участие BMP4 в процессах «хоуминга» стволовых клеток [115]. Было показано, что ММСК выделяют BMP4 и отвечают в дозозависимой манере на стимуляцию сигнального пути BMP4 [231]. В других недавних исследованиях была продемонстрирована как проонкогенная, так и антионкогенная активность этого белка при различных опухолевых заболеваниях [111], его участие в развитии опухолей гематологической [52, 137] и негематологической [74, 153, 180] природы.

В различных исследованиях были показаны противоположные эффекты TGFB1, в зависимости от их природы, как, например, подавление клеток ХМЛ и стимуляцию пролиферации клеток ОМЛ [137, 213]. Выявление в плазме больных в ремиссии ОМЛ экзосом с TGFb может являться предвестником рецидива [95].

В исследовании Geyh и соавт. в образцах КМ больных ОМЛ была показана сниженная экспрессия Kit-лиганда и повышенная экспрессия *Jag1* [86]. Аналогичные данные были получены в недавних экспериментах на мышах [123]. Также выявлено, что фактор роста фибробластов-1 (FGF-1), выделяемый фибробластами, играет ключевую роль в процессах самообновления и миграции ГСК, выполняя ту же функцию и для ЛСК.

После связывания со своими рецепторами (FGFR 1–4), FGF-1 может запускать различные пути передачи сигнала, включая MAP киназный, STAT и PI3K пути [161].

Показано, что для КМ пациентов с острыми лейкозами, МДС и миелопролиферативными заболеваниями характерна более высокая степень васкуляризации и ангиогенеза [22]. Одно из исследований, в котором сравнивались результаты исследований трепанобтатов детей с ОЛЛ в сравнении со здоровыми донорами, выявило, что в биоптатах пациентов с ОЛЛ имелись отдельные паттерны микроваскуляризации с повышенной жёсткостью сосудистой стенки [183]. Способность вызывать ангиогенез, может быть механизмом усиления выживаемости лейкозных клеток в КМ.

Факторы роста могут также способствовать выживаемости бластных клеток в КМ. Так, уровень фактора роста эндотелия сосудов VEGF, который экспрессируется клетками ОМЛ [70], может играть прогностическую роль при этом заболевании [15], а повышение уровня ангиопоэтина-2 коррелирует с плохим ответом на терапию [148]. Уровень FGF был повышен у пациентов с ОЛЛ [183]. Более того, было показано, что клетки стромы пациентов с острыми лейкозами продуцировали большие количества IGF-1 и CXCL12, чем стромальные клетки людей из контрольной группы [162].

Также показано, что повышение уровня экспрессии лептина, регулирующего жировую дифференцировку в КМ, увеличивает количество лейкозных клеток, заселяющих данную территорию [220].

Эти эксперименты показали важнейшую роль стромального микроокружения в развитии гемобластозов, однако, как именно ММСК регулируют процесс лейкемогенеза, до сих пор остаётся неясным [22, 28, 126, 127].

1.5.1.2 Роль стромального микроокружения в развитии ХМЛ

В экспериментах было показано, что клетки-предшественники ХМЛ являются более примитивными, чем нормальные ГСК. Например, ген *BCR–ABL* был идентифицирован в гемангиобластоподобных клетках [90], а также, Fang и соавт., обнаружили этот ген в еще более примитивных Flk1(+)CD31(−) CD34(−) прогениторных клетках [68]. Стоит отметить, что ММСК из КМ больных ХМЛ не экспрессировали BCR–ABL [42].

Недавние исследования Zhang и соавт. продемонстрировали изменение эффектов ММСК, оказываемых ими на гемопоэтические клетки, при развитии хронического миелолейкоза [244]. Так, например, было показано, что при совместном культивировании с культурой клеток ХМЛ ММСК выделяют IFNa, ингибирующий пролиферацию клеток ХМЛ [235, 245].

В экспериментах на мышах было показано, что активация рецепторов для белка, связанного с паратиреоидным гормоном, приводит к увеличению числа остеобластов в эндосте, тем самым увеличивая нишу для ГСК [39], что косвенно приводило к увеличению числа клеток ХМЛ. Также было продемонстрировано, что делеция рецептора костного морфогенетического белка (bone morphogenetic protein receptor (BMPR)-1) также приводила к увеличению количества остеобластов с последующим возрастанием числа клеток ХМЛ [91]. Таким образом, дезрегуляция микроокружения является как фактором развития, так и следствием гематологических заболеваний.

1.5.2 Взаимодействие лейкозных стволовых клеток со стромальным микроокружением

1.5.2.1 Влияние ЛСК на строму при острых лейкозах

До сих пор остаётся неясным, являются ли изменения в ММСК при острых лейкозах первичными или отражают эффекты, оказываемые опухолевыми бластными клетками. Результаты, полученные на мышиных

моделях, соответствуют обеим гипотезам [80, 92, 123, 192], тогда как другие исследования доказывают, что это изменения вторичны [100, 118, 131].

Совместное культивирование здоровых ММСК с лейкозными клетками блокировало пролиферацию стромальных предшественников на 68-76% по сравнению с клетками здоровых доноров, что приводило к нарушению и дезорганизации их внутриклеточной архитектоники, а также ингибированию способности к остеогенной дифференцировке [86]. Таким образом, было доказано влияние лейкозных клеток на изначально здоровую строму.

При различных формах лейкозов опухолевые клетки заселяют территорию КМ, подавляя собственное кроветворение больного [20, 205, 244]. Более того, для некоторых заболеваний показано, что злокачественные клетки изменяют окружающие их стромальные клетки так, что последние повышают устойчивость лейкозных клеток к цитостатическим препаратам, при этом такое микроокружение становится малопригодным для поддержания здоровых ГСК [133].

В недавних исследованиях было показано ингибирующее действие лейкозных клеток на остеобласты [80, 131]. Было предположено, что лейкозные клетки поражают ключевые звенья гомеостаза костномозгового окружения, обусловливая тем самым возможность развития рецидива заболевания после его лечения [49].

Имеются доказательства, что лейкозные клетки могут использовать механизмы регуляции роста и развития ГСК. Серия экспериментов с использованием *in vivo* визуализации продемонстрировали, что лейкозные клетки специфическим образом нарушают взаимоотношения в нишах и взаимодействия с ГСК [49]. Эксперименты на мышах показали, что как нормальные, так и лейкозные стволовые клетки, предпочтительно локализуются в периваскулярных нишах, богатых CXCL12. Однако, когда они трансплантировались единовременно, ЛСК «выигрывали» у ГСК в конкуренции за локализацию в нише [49], из-за чего последние были

вынуждены размещаться в менее предпочтительных нишах КМ. Данные этого исследования показали, что наличие лейкозных клеток разрывает нормальные пути межклеточной передачи сигнала, приводя к необратимым изменениям здоровых гемопоэтических предшественников [49].

Очевидно, что при развитии неопластических гематологических заболеваний, клетки стромы КМ изменяются, но данные до сих пор скудны и неоднозначны, демонстрируя противоречивые результаты по характеристикам ММСК и данным экспрессии генов [73, 121, 191, 248]. Также расходятся данные о наличии морфологических изменений в клетках в разных исследованиях. В большинстве исследований по изучению особенностей стромального микроокружения при развитии гемобластозов не было выявлено различий в морфологических и культуральных характеристиках ММСК у больных лейкозами [28,46,76,87,242,260]. Однако в исследовании Geyh и соавт. в образцах КМ больных с ОМЛ были выявлены как внешние отличия ММСК (более крупные клетки с дезорганизованной архитектурой), так и функциональные (более низкая суммарная клеточная продукция, более длительное время до достижения конфлуентности, меньшее возможное число пассажей, а также сниженная способность поддержания кроветворения). Не было выявлено различий в способности к хондрогенной и адипогенной дифференцировке, однако, была показана сниженная способность к остеогенной дифференцировке [86].

При изучении свойств ММСК была продемонстрирована сниженная способность к поддержанию нормального кроветворения [46,237,242] или полное отсутствие её [247]. Однако исследование Flores-Figueroa E и соавт. не выявило каких-либо значимых различий между ММСК пациентов и здоровых доноров, клетки которых демонстрировали одинаковую способность к поддержанию нормального кроветворения [72].

Таким образом, все предыдущие исследования демонстрировали противоречивые результаты, однако, они были ограничены небольшим

числом образцов и зачастую отсутствием либо образцов до лечения, либо в процессе терапии.

При анализе экспрессии генов, регулирующих гемопоэз, большинство исследователей отмечают множественные изменения в уровне экспрессии факторов, регулирующих кроветворение, в ММСК больных острыми лейкозами, тем не менее, данные остаются противоречивыми [29, 30, 247]. Так, например, одни авторы описывают постоянное снижение уровня экспрессии стромального фактора *Sdf1* в ММСК больных ОМЛ, другие отмечают повышенную экспрессию этого гена в ММСК больных с тем же диагнозом [82]. Например, в работе Ge и соавт. был показан существенно более высокий уровень Sdf1в группе ММСК пациентов с ОМЛ до лечения в сравнении с группами ММСК пациентов с ОМЛ после лечения и здоровыми донорами [82], что согласуется с данными предыдущих исследований о том, что лейкозные клетки модифицируют микроокружение, снижая уровень Sdf1 в местах локализации ММСК. Предполагается, что дефицит Sdf1 обуславливает нарушение миграции клеток при гемобластозах. Одним из способов достижения этого может быть задержка его высвобождения из ММСК, сопровождающееся повышением его внутриклеточного содержания с соответствующим снижением внеклеточной концентрации [35, 82].

Также в ММСК больных ОМЛ выявлено повышение экспрессии генов, ассоциированных с жировой дифференцировкой [215], а в ММСК больных ОЛЛ повышена экспрессия *TGFB1* и *HGF*, в процессе лечения повышается уровень экспрессии *BMP4* [208, 222].

Данные многочисленных исследований продемонстрировали, что снижение экспрессии гена остеокальцина (*BGLAP*), наблюдаемое в ММСК больных лейкозами, приводит к угнетению остеогенеза, уменьшению числа остеобластов и снижению объёма костной ткани [80, 131], что было подтверждено в работе Geyh и соавт. [86] и согласовалось с результатами Kim и соавт., продемонстрировавших аналогичные результаты [118].

В исследовании Calkoen и соавт. было выявлено достоверное снижение уровня экспрессии гена *CXCL12* [37], согласующееся с данными предыдущих работ [25, 216, 244]. В ММСК больных лейкозами было выявлено повышение уровня IL-6, что представляется закономерным из-за супрессивного механизма действия последнего [38, 164]. Ингибирование дифференцировки на пути к антигенпрезентирующим клеткам может помогать лейкозным клеткам избегать иммунного ответа. Было показано, что продукция IL-6 подавляет цитотоксичность NK-клеток в отношении бластных [224, 239].

В исследовании Chandran и соавт. в ММСК больных ОМЛ было показано повышение уровней экспрессии генов *ANG1* и *SPP1*, чем у здоровых доноров, тогда как экспрессия *Sdf1*, *SCF* и *VCAM1* была аналогична таковой в контрольной группе [44]. Такие данные согласуются с гипотезой о том, что ММСК больных лейкозами демонстрируют сниженную способность к стимуляции пролиферации и дифференцировки более коммиттированных клеток. Недавнее исследование Hanoun и соавт. также показало увеличение экспрессии генов *ANG1* и *SPP1в* мышиных ММСК после воздействия на них лейкозных клеток *in vivo* [92]. Эти белки отвечают за модулирование состояния покоя ГСК в КМ [144, 185]. Это наблюдение согласуется с данными исследования Nilsson и соавт., в котором было показано, что увеличенная экспрессия SPP1 уменьшает пролиферативный потенциал ГСК [173], а также исследования Arai и соавт., доказавших роль *ANG1* в индуцировании перехода ГСК в состояние покоя [18]. Их увеличенная экспрессия может объяснять блокирование нормального гемопоэза у больных гемобластозами [44], а также возможный переход лейкозных клеток в состояние покоя, обусловливая развитие резистентности к проводимой химиотерапии и развитие последующих рецидивов [101].

Все различия в экспрессии генов в ММСК являются скорее следствием, нежели причиной заболевания, что подтверждается восстановлением их уровней в случае достижения полной ремиссии [37].

Существует небольшое количество исследований о состоянии КОЕф при гемобластозах. Некоторые авторы, анализируя КМ до начала химиотерапии, не находят отличий между КОЕф здоровых доноров и пациентов [43]. Другие показывают снижение, вплоть до полного истощения, концентрации КОЕф в КМ пациентов с острыми лейкозами [166]. В нескольких работах, посвященных исследованию стромы у больных ОМЛ, было показано, что в момент диагностики, т.е. до начала лечения, концентрация КОЕф в КМ больных существенно снижена. Впоследствии, по мере достижения полной ремиссии, концентрация КОЕф восстанавливается [46]. С другой стороны, имеются данные, что изменения концентрации КОЕф, вызванные высокодозной химиотерапией, практически невосстановимы [194].

1.5.2.2 Влияние ЛСК на строму при ХМЛ

Известно, что «хоуминг» клеток в КМ при лейкозах осуществляется так же, как и при здоровом кроветворении, - по градиенту Sdf1, экспрессируемому стромой [182, 210]. При ХМЛ в клетках стромы снижается экспрессия Sdf1, что приводит к уменьшению количества здоровых кроветворных предшественников [156]. При ХМЛ злокачественные клетки стимулируют пролиферацию остеобластов, причем осуществляют это одновременно при помощи прямого клеточного контакта и благодаря повышенной экспрессии генов *TPO* и *CCL3*. Однако такие остеобласты существенно хуже поддерживают здоровые ГСК, не теряя, при этом, способности поддерживать лейкозные клетки. Более того, по сравнению с остеобластами здоровых доноров, в таких стимулированных остеобластах больных ХМЛ существенно снижена экспрессия *TGFB1*, участвующего в удержании ГСК в состоянии покоя, и повышена экспрессия *TGFB2*, стимулирующего миелопоэз [156]. Таким образом, клетки опухоли и микроокружения взаимодействуют друг с другом, опосредуя угнетение здорового гемопоэза и потенциируя развитие заболевания.

1.5.3 Процессы, происходящие в костном мозге при воздействии химиотерапии

1.5.3.1 Влияние цитостатических препаратов на стромальное микроокружение

Существует сравнительно небольшое количество исследований, посвящённых изучению воздействия химиопрепаратов на ММСК [170, 188]. В исследованиях было показано, что ММСК повреждаются при воздействии химиотерапии, однако, природа этого поражения и его длительность до сих пор остаются неизвестными. Восстановление кроветворения после цитостатического воздействия препаратов могут быть медленным и/или неполным, что обычно объясняется нарушением функционирования ГСК, однако, свою роль могут играть и дефекты стромы. У пациентов после воздействия химиопрепаратов обычно наблюдается нарушение архитектоники КМ и потеря компартментализации стромы [209].

Изучение эффектов лекарств на состояние стромального микроокружения осложняется тем, что в большинстве случаев используются их сочетания для усиления оказываемого эффекта [209]. Было показано, что в культурах клеток от пациентов после химиотерапии наблюдался рост клеток с аномальной морфологией, например, в ряде случаев клетки имели более округлую форму и демонстрировали меньшую пролиферативную активность. Однако после первого пассажа клетки становились морфологически сходными с нормальными фибробластоподобными клетками. Было показано, что многие химиопрепараты нарушают способность ГСК к «хоумингу» путём нарушения эндотелиального барьера и увеличения секреции цитокинов и хемокинов, влияющих на миграцию и репопуляцию ГСК.

Одним из наиболее часто используемых химиотерапевтических агентов является циклофосфан. В исследовании Kemp и соавт [113] было показано, что воздействие циклофосфана не приводило к изменению жизнеспособности ММСК в течение 48 часов при использовании

стандартных доз препаратов. Применение циклофосфана не влияло на пролиферативную активность ММСК.

Многие цитостатические препараты нарушают способность ММСК к делению, что отражается в снижении темпов пролиферации клеток [209]. Было показано, что после высокодозного цитостатического воздействия экспрессия CD44 на ММСК снижается на 49%, а после воздействия циклофосфана – на 28%. CD44 – это молекула, играющая важную роль в межклеточных взаимодействиях, клеточной адгезии и миграции. Известно, что CD44 влияет на миелоидную дифференцировку и продукцию клеток-предшественников. Сниженные уровни CD44 сохраняются длительное время без признаков восстановления. Моноклональные анти-CD44 антитела нарушали образование клеток миелоидной природы, а также рост лимфоцитов в культуре.

1.5.3.2 Защитные механизмы стромальных клеток от воздействия химиопрепаратов

Стромальные клетки поддерживают выживание опухолевых клеток [151], а также защищают их от влияния цитостатических препаратов [164]. Например, показано, что лейкозные клетки, находятся в тесном контакте со стромой через молекулы IL7 [110], CXCR4 [208] и TGFb [63] и практически не пролиферируют, защищаясь, от проапоптотического воздействия цитостатических препаратов, а также от влияния ингибиторов тирозинкиназ. В лечении ОЛЛ применяется препарат L-аспарагиназа, который вызывает апоптоз в клетках ОЛЛ из-за низкого содержания аспарагинсинтетазы. Было продемонстрировано, что при совместном культивировании клеток ОЛЛ с клетками стромы, последние защищают клетки ОЛЛ от аспарагиназа-обусловленного апоптоза путём избыточной экспрессии аспарагинсинтетазы. Существуют доказательства важнейшей роли стромальных клеток при ХМЛ в развитии резистентности к проводимой химиотерапии.

Было показано, что ММСК КМ неселективно защищают клетки ХМЛ от иматиниб-опосредованного апоптоза через CXCR4/CXCL12 путь [229]. В исследованиях была показана повышенная продукция Г-КСФ клетками ХМЛ, снижение экспрессии CXCL12 в стромальных клетках КМ больных ХМЛ, что вызывало нарушение «хоуминга» клеток и способности к их задержке в КМ [108]. Иматиниб приводил к повышенной экспрессии CXCR4 в клетках больных ХМЛ, что обуславливало их миграцию в строму и сохранение там в состоянии покоя [108].

Интересно, что в рамках поиска терапевтических подходов при ХМЛ были предложены обратные регуляторы ГСК, которые включали трансформирующий ростовой фактор – β (TGF-β) и ангиопоэтин-1, также выделяемые стромальными клетками. После связывания с ЛСК эти факторы путём обратной регуляции c-Kit, FLT3, MPL и IL-6 приводили к остановке клеточного цикла в ЛСК и переходу их в состояние покоя [91].

1.6 Заключение обзора литературы

Таким образом, ММСК – это стромальные предшественники с мультилинейным потенциалом дифференцировки, играющими важную роль в процессах поддержания кроветворения, как в норме, так и при патологии. Многочисленные исследования показали, что аномальное микроокружение способно приводить к дисфункциональному гемопоэзу и – впоследствии – развитию лейкоза.

Взаимодействие с клетками стромы опосредует выживаемость лейкозных клеток, которые, в свою очередь, вызывают изменения в КМ, влияя как на кроветворение, так и на стромальное микроокружение. Было показано, что бласты от пациентов с лейкозом имеют преимущество в выживаемости при их совместном культивировании со стромой по сравнению с выращиванием в одной среде. В противоположность этому, сами бластные клетки оказывают на ММСК угнетающее влияние.

Так, совместное их культивирование блокирует пролиферацию стромальных предшественников и приводит к ингибированию их способности к дифференцировке. Также они способны изменять окружающие их стромальные клетки так, что последние повышают устойчивость лейкозных клеток к химиотерапии, становясь малопригодным для поддерживания здоровых ГСК[133].

При изучении ММСК у больных лейкозами было показано отсутствие различий в их морфологических характеристиках, сниженная способность к поддержанию нормального кроветворения и остеогенной дифференцировке. Выживаемость бластных клеток в КМ определяется повышенной степенью васкуляризации и ангиогенеза, а также увеличенной экспрессией факторов роста и использования механизмов регуляции роста и развития ГСК. При этом, лейкозные клетки специфическим образом нарушают взаимоотношения в нишах, выигрывая у ГСК в конкуренции за более предпочтительную локализацию. При ХМЛ злокачественные клетки стимулируют пролиферацию остеобластов, причем такие остеобласты существенно хуже поддерживают здоровые ГСК, не теряя, при этом, способности поддерживать лейкозные клетки.

Воздействие цитостатических препаратов приводит к изменению морфологии ММСК, снижению пролиферативной активности и уменьшению экспрессии CD44.

Все предыдущие исследования демонстрировали противоречивые результаты, будучи ограниченными небольшим числом образцов и зачастую отсутствием либо образцов до лечения, либо в процессе терапии. В этой связи выполнение этого исследования представляется особенно актуальным.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Клиническое исследование

2.1.1 Дизайн исследования

Работа носила проспективный клинико-лабораторный характер и выполнялась в научно-клиническом отделе высокодозной химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ ГНЦ МЗ РФ (заведующая отделом д.м.н. Паровичникова Е.Н.) и научно-консультативного отделения химиотерапии миелопролиферативных заболеваний (заведующая отделением проф., д.м.н. Туркина А.Г.). Лабораторная часть работы осуществлялась на базе лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ ГНЦ МЗ РФ (зав. лаборатории д.б.н. Дризе Н.И.) и лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ ГНЦ МЗ РФ (зав. лаборатории д.б.н. Судариков А.Б.).

Исследование проб КМ проводили на момент диагностики заболевания перед началом лечения, на + 30 день, + 100 день, +180 день терапии и перед началом кондиционирования (в случае проведения ТКМ) для пациентов с острыми лейкозами и на момент диагностики заболевания, на + 3 мес, + 6 мес, +12 мес терапии для пациентов с диагнозом ХМЛ. Из проб КМ выделяли ядросодержащие клетки, которые затем культивировали в питательной среде с последующей оценкой культуральных характеристик ММСК. Из клеток первого пассажа выделяли РНК и оценивали уровень экспрессии 24 генов (*IL-6, IL-8, IL-1b, IL-1bR1, Jag1, SPP1, BGLAP, FGF2, FGFR1, FGFR2, TGFβ1, TGFβ2, Sdf1, VEGF, PDGFRa, PDGFRb, IGF, CSF, ANG1, VCAM, ICAM, SOX9, LIF, PPARg*) методом полимеразной цепной реакции с предшествующей обратной транскрипцией.

Одновременно клетки КМ высаживали для определения концентрации КОЕф и последующего анализа экспрессии 9 генов (*SPP1, BGLAP, FGF2, FGFR1, FGFR2, PPARg, BMP4, SOX9, VEGF*).

2.1.2 Характеристика больных

В исследование были включены 74 больных (33 мужчины и 41 женщина), в возрасте от 17 до 75 лет (медиана – 35 лет) с впервые выявленными гемобластозами: 33 пациентов с диагнозом ОМЛ, 21 пациент с диагнозом ОЛЛ, 20 пациентов с диагнозом ХМЛ. При распределении пациентов по классификации ВОЗ из 33 больных ОМЛ у 19 пациентов выявлялся нормальный кариотип, у 2-х человек обнаружилась транслокация t(8;21), у 1 пациента – t(15;17) и у 1 пациента выявлялась inv(16)(p13q22), у 9 человек были обнаружены иные мутации (трисомия 8, делеция 9, 7, t(3;5) и др), 1 пациенту цитогенетическое исследование не проводилось. Более детальные клинические характеристики пациентов даны в таблице 1 Приложения. Из 21 пациентов с ОЛЛ у 10 определялся В-клеточный вариант заболевания, у 11 пациентов – Т-клеточный вариант ОЛЛ. Основные характеристики пациентов изложены в табл.1.

Все пациенты наблюдались в ФГБУ ГНЦ МЗ РФ с мая 2013 года по февраль 2016 года. Диагностика гемобластозов выполнена в ФГБУ ГНЦ МЗ РФ на основании морфологического, цитохимического, иммунофенотипического, (клиническая лаборатория ГНЦ МЗ РФ, зав. лаб. к.м.н. Двирнык В.Н.), цитогенетического (клиническая лаборатория ГНЦ МЗ РФ, зав. лаб. к.м.н. Обухова Т.Н.) и молекулярного (клиническая лаборатория ГНЦ МЗ РФ, зав. лаб. д.б.н. Судариков А.Б.) исследований пунктатов КМ.

Проведение данного исследования было одобрено на заседании Локального этического комитета ФГБУ ГНЦ МЗ РФ от 22.05.2014 (заседание №99) и проводилось в соответствии с нормами хельсинкской декларации. Все пациенты перед забором проб КМ были осведомлены об участии в исследовании и подписали формы информированного согласия.

Лечение больных проводилось в условиях ФГБУ ГНЦ МЗ РФ в соответствии с нозологической формой заболевания. Пациентам с диагнозом острый лейкоз была начата терапия в соответствии с вариантом заболевания:

пациентам с острым миелобластным лейкозом была начата терапия по протоколу ОМЛ 01.10 (за исключением одного пациента с М3 вариантом заболевания, которому проводилась терапия по протоколу AIDA), пациентам с острым лимфобластным лейкозом – по протоколу ОЛЛ-2009 (протоколы терапии указаны в Приложении 1) [8]. Пациентам с диагнозом ХМЛ проводилась терапия иматинибом, пациентам, не достигшим ответа, производилась смена на препараты других поколений ингибиторов тирозинкиназ. Забор образцов осуществляли в контрольные точки путём аспирации 6 мл КМ при пункции КМ. Образцы КМ помещались в пенициллиновые флаконы с гепарином и доставлялись в лабораторию.

Таблица 1. Клинические характеристики пациентов.

Диагноз	Число пациентов	Возраст	Процент бластных клеток в КМ в дебюте	Статус пациентов к моменту 1 точки
ОМЛ	33	39,2±2,2	67,65±3,9%	26 живы 7 умерли
ОЛЛ	21	29,4±2,9	86,13±1,19%	19 живы 2 умерли
ХМЛ	20	44,6±3,8		20 живы

Доноры костного мозга

В качестве контроля в работе были использованы образцы костного мозга 95 здоровых доноров, 46 мужчин и 49 женщин в возрасте от 13 до 61 года (медиана – 33 года). Все образцы костного мозга были получены во время эксфузии донорского костного мозга для аллогенной трансплантации в отделении высокодозной химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга ФГБУ ГНЦ Минздрава России после подписания донорами информированного согласия.

2.2 Лабораторные исследования

2.2.1 Получение и характеристика ММСК

Для выделения ядросодержащих клеток к 6 мл КМ добавляли равный объем среды αMEM (ICN) с 0,2% раствором метилцеллюлозы (Sigma) и инкубировали в течение 45 минут при комнатной температуре. В течение инкубации большая часть эритроцитов и гранулоцитов преципитировала, а мононуклеарные клетки оставались в жидкой фазе. Затем верхнюю жидкую фазу отбирали и центрифугировали в течение 10 минут при скорости 1200 оборотов в минуту (24000g) (Beckman GPR Refrigerated Centrifuge) при 4°C. Клетки осадка ресуспендировали в среде αMEM. Клетки подсчитывали в камере Горяева при окраске генциановым фиолетовым и рассаживали в концентрации $3x10^6$ клеток в среду для культивирования, состоящую из среды альфа-MEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 1% раствора L-глутамина (ICN), 0.5% раствора пенициллина (Ferein) на флакон для культивирования с площадью поверхности дна 25 $см^2$ (Costar) и инкубировали в условиях гипоксии с 5% CO_2 и 5% O_2 при 37^0C в трехгазовом инкубаторе (Sanyo). После формирования монослоя клетки промывали версеном (0,02% раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты в физиологическом растворе (Sigma)), а затем обрабатывали 0,25% раствором трипсина (ICN) и рассаживали в концентрации $4x10^3$ клеток на $см^2$ поверхности дна флакона (1-й пассаж P0) с последующей их инкубацией, остаток клеток замораживался в среде с добавлением равного объёма ЭТС+ДМСО (диметилсульфоксид).

Количество снятых со дна флакона клеток определяли в камере Горяева, жизнеспособность клеток определяли по отсутствию окраски трипановым синим. На 2-м пассаже (P1) после высаживания клеток из оставшихся выделяли РНК. На 3-м пассаже (P2) после снятия и подсчёта отделялись 100 000 клеток для последующей оценки их способности к поддержанию кроветворения, остаток клеток замораживался.

2.2.2 Получение и характеристика КОЕф

Для культивирования КОЕф мононуклеарные клетки выделяли и подсчитывали по методу, описанному выше для ММСК. После подсчёта ядерные клетки рассаживали в количестве от 0.5 до $1x10^6$ клеток на флакон Т25 в среде αMEM с 20% ЭТС, культивировали в течение 2-х недель в условиях гипоксии с 5% CO_2 и 5% O_2 при 37^0С в трехгазовом инкубаторе (Sanyo), а затем окрашивали 0,1% раствором кристаллического фиолетового на 20% метаноле. Окрашенные колонии подсчитывали под инвертированным микроскопом.

2.2.3 Анализ относительного уровня экспрессии генов

Анализ экспрессии генов проводили, как правило, в клетках 1 пассажа. Уровень экспрессии генов оценивали с помощью количественной Taqman полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с предшествующей обратной транскрипцией. Для этого из исследуемых ММСК выделяли рибодезоксинуклеиновую кислоту (РНК), на основании которых впоследствии строили комплементарные цепи дезоксинуклеиных кислот (кДНК).

2.2.4 Выделение РНК

Для выделения РНК из ММСК остаток клеток промывали 1 мл ЭДТА (Этилендиаминтетрауксусная кислота) с целью лизиса клеток и денатурации клеточных белков, после чего к осадку добавляли денатурирующий раствор, содержащий 25мМ цитрата натрия (Sigma), 0,5% N-лаурил саркозина (ICN), 4М гуанидина изотиоцианата (ICN) и 0,1М β-меркаптоэтанола (Sigma) и хранили при температуре -20^0С.

Для выделения РНК из КОЕф во флаконы для культивирования после предварительной промывки их ЭДТА добавляли 400мкл Тризола и хранили при температуре -70^0С.

В дальнейшем пробы размораживали, на протяжении всей процедуры выделения РНК пробирки держали на льду. В каждую пробу добавляли 1/10 объема 2М ацетата натрия (NaAc), pH 4,0, и перемешивали в течение нескольких минут. Затем в каждую пробирку добавляли равный объем кислого фенола (ICN) и инкубировали на льду в течение 15 минут. Далее добавляли 1/5 объема хлороформа (Sigma), перемешивали и инкубировали на льду в течение 10 минут.

Затем пробы центрифугировали на скорости 10000 оборотов в минуту (10620g) (Eppendorf Centrifuge 5417R) при 4°С в течение 20 минут. Смесь фенола и хлороформа создает двухфазную систему, в которой в нижней фазе и интерфазе остаются денатурированные белки, липиды и большая часть ДНК, а в верхней – растворенная в воде РНК. Верхнюю фазу, содержащую водный раствор РНК, переносили в RNA-free пробирки объемом 1,5мл, затем к каждой пробе добавляли равный объем изопропанола для осаждения РНК и оставляли на ночь при температуре -20^{0}С.

В дальнейшем РНК осаждали центрифугированием на скорости 10000 оборотов в минуту (10620g) (Eppendorf Centrifuge 5417R) при 4°С в течение 20 минут. Осадок РНК промывали 75% этанолом. После очистки РНК растворяли в 100 мкл воды обработанной диэтилпирокарбонатом (ДЭПК, Sigma).

Аликвоту 1/10 объема пробы использовали для определения концентрации РНК на спектрофотометре, для чего РНК разводили водой соответственно объему имеющейся кюветы. На спектрофотометре (Ultrospec 300, Pharmacia Biotech) определяли поглощение при 260, 280 и 320 (фон) нм.

Количество РНК оценивали по значению А260. Чистоту образца оценивали по соотношению А260/А280 (допустимые пределы 1,7 – 2,0).К оставшейся пробе добавляли 1/10 объема 3М NaAc и 2,5 объема этанола и хранили при температуре -20^{0}С.

2.2.5 Построение комплементарных цепей ДНК

Для построения комплементарной ДНК (кДНК) брали по 2 мкг РНК из каждой пробы, растворенной в воде, обработанной диэтилпирокарбонатом (ДЭПК) (в концентрации 1 мкг в мкл). Присоединение затравки производили следующим образом: 2 мкл РНК, 2,5 мкл смеси Т13-праймеров (20 пикомоль/мкл), 5,5 мкл воды, обработанной ДЭПК, смешивали и инкубировали 10 минут при 70^0С и 10 минут при 4^0С в амплификаторе (Терцик, ДНК-Технология). Затем проводили ревертазную реакцию. Для этого в каждую пробу добавили 5 мкл пятикратного буфера для ревертазы, 2,5 мкл 10мМ дНТФ, 1 мкл Рназина (40ЕД), 1 мкл ревертазы M-MLV (200ЕД) (все реагенты фирмы Promega) и 5,5 мкл воды. Все перемешивали и инкубировали в термостате при 42^0С в течение 1 часа, после чего пробы охлаждали, добавляли 75 мкл воды и использовали в качестве раствора кДНК соответствующего образца.

2.2.6 Выполнение ПЦР

В ММСК и КОЕф оценивался относительный уровень экспрессии ряда генов, отвечающих за:

- способность к самоподдержанию (*FGFR1, FGFR2, PDGFRA, PDGFRB*),
- пролиферацию (*FGF2*),
- морфогенез (*BMP4, SOX9, SPP1, BGLAP, PPARG, VEGF*),
- регуляцию кроветворения (*Jag1, TGFB2, TGFB1, CSF, ANG1*) и
- иммунный ответ (*IL1b, IL1R, IL6, IL8*).

В качестве контроля во всех проводимых исследованиях использовались данные, полученные по группе здоровых доноров.

Наличие интересующего гена определяли с помощью специфических праймеров и зондов. В качестве флуоресцентного красителя использовали карбокси-Х-родамин (ROX) для генов «домашнего хозяйства» (β-actin и GAPDH) и карбоксифлуоресцеин (FAM) для исследуемых генов. В качестве

гасителей флуоресценции для флуорофора ROX использовали RTQ2, для флуорофора FAM – RTQ1. Все ПЦР проводили на приборе StepOnePlus Applied Biosystems (Life technologies).

ПЦР проводили в объеме 25 мкл в ПЦР буфере Б (Syntol) с рабочей концентрацией ионов Mg^{+2} 3,5мМ, 0,25мМ дНТФ, с 0,4 пикомоль/мкл соответствующих праймеров, 0,2 пикомоль/мкл флуоресцентного зонда, 1 мкл кДНК и 0,05 ЕД/мкл Taq полимеразы с ингибирующими активность антителами. Нуклеотидные последовательности специфичных к соответствующим генам праймеров и зондов приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов.

Название гена		**Нуклеотидная последовательность**
β-актин	Прямой праймер	5’-CAACCGCGAGAAGATGACC-3’
	Обратный праймер	5’-CAGAGGCGTACAGGGATAGC-3’
	Зонд	ROX-AGACCTTCAACACCCCAGCCATGTACG-RTQ2
GAPDH	Прямой праймер	5’-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3’
	Обратный праймер	5’-TGGGTGGAATCATATTGGAACA-3’
	Зонд	ROX-CTCTGGTAAAGTGGATATTGTTGCCATCA-RTQ2
IL-6	Прямой праймер	5’-ACCTGAACCTTCCAAAGATG-3’
	Обратный праймер	5’-CTCCAAAAGACCAGTGATGA-3’
	Зонд	FAM-ATTCAATGAGGAGACTTGCCTGGTG-RTQ1
IL-8	Прямой праймер	5’-ACCATCTCACTGTGTGTAAAC-3’
	Обратный праймер	5’-GTTTGGAGTATGTCTTTATGC-3’
	Зонд	FAM-CAGTTTTGCCAAGGAGTGCTAAAG-RTQ1
Jag1	Прямой праймер	5’-ATAAAGTCCTTCCCGCTG-3’
	Обратный праймер	5’-TTATCTTCTCCCATCATTAAG-3’
	Зонд	FAM-AGACAACAGACAAATCACCATTCGT-RTQ1

IL-1b	Прямой праймер	5’-ATTCTCTTCAGCCAATCTTCA-3’
	Обратный праймер	5’-AAGGAGCACTTCATCTGTTTA-3’
	Зонд	FAM-AGAACAAGTCATCCTCATTGCCAC-RTQ1
FGF2	Прямой праймер	5’-GAAGAGCGACCCTCACATCAAG-3’
	Обратный праймер	5’-TCCGTAACACATTTAGAAGCCAGTA-3’
	Зонд	FAM-TCATAGCCAGGTAACGGTTAGCACACACTCCT-RTQ1
VEGF	Прямой праймер	5’-AGG CGA GGC AGC TTG AGT TA-3’
	Обратный праймер	5’-ACC CTG AGG GAG GCT CCT T-3’
	Зонд	FAM-CCT CGG CTT GTC ACA TCT GCA AGT ACG T-RTQ1
BGLAP	Прямой праймер	5’-GCAGCGAGGTAGTGAAGAG-3’
	Обратный праймер	5’-GAAAGCCGATGTGGTCAG-3’
	Зонд	FAM-CTCCCAGCCATTGATACAGGTAGC-RTQ1
PDGFRB	Прямой праймер	5’-CTCCCTTATCATCCTCATCA-3’
	Обратный праймер	5’-TCCACGTAGATGTACTCATG-3’
	Зонд	FAM-TCACAGACTCAATCACCTTCCATC-RTQ1
TGFb1	Прямой праймер	5’-TGCGTCTGCTGAGGCTCAA-3’
	Обратный праймер	5’-CGGTGACATCAAAAGATAACC-3’
	Зонд	FAM-AGGAATTGTTGCTGTATTTCTGGTAC-RTQ1
Sdf1	Прямой праймер	5’-CTACAGATGCCCATGCCGAT-3’
	Обратный праймер	5’-TAGCTTCGGGTCAATGCACA-3’
	Зонд	FAM-CAGTTTGGAGTGTTGAGAATTTTGAG-RTQ1
TGFb2	Прямой праймер	5’-AGTGCCTGAACAACGGATTG-3’
	Обратный праймер	5’-CACAACTTTGCTGTCGATGTA-3’
	Зонд	FAM-ATATCAGATTCTCAAGTCCAAAGATTT-RTQ1
PDGFRA	Прямой праймер	5’-TGGCTAAGAATCTCCTTGGA-3’
	Обратный праймер	5’-ACCAGGACAATAAGTGAGATG-3’
	Зонд	FAM-CAATCACCAACAGCACCAGGACT-RTQ1

SPP1	Прямой праймер	5’-ATAGTGTGGTTTATGGACTGAG-3’
	Обратный праймер	5’-ATTCAACTCCTCGCTTTCC-3’
	Зонд	FAM-CCAGTACCCTGATGCTACAGACGAG-RTQ1
FGFR1	Прямой праймер	5’-CAGAATTGGAGGCTACAAGG-3’
	Обратный праймер	5’-TGATGCTGCCGTACTCATTC-3’
	Зонд	FAM- CATCATAATGGACTCTGTGGTGC-RTQ1
FGFR2	Прямой праймер	5’-GCAGCGAGGTAGTGAAGAG-3’
	Обратный праймер	5’-GAAAGCCGATGTGGTCAG-3’
	Зонд	FAM-CTCCCAGCCATTGATACAGGTAGC-RTQ1
SOX9	Прямой праймер	5’-AGCAAGACGCTGGGCAAG-3’
	Обратный праймер	5’-GTTCTTCACCGACTTCCTC-3’
	Зонд	FAM-CTGGAGACTTCTGAACGAGAGC-RTQ1
IL-1bR1	Прямой праймер	5’-CTAATGAGACAATGGAAGTAGAC-3’
	Обратный праймер	5’-AGCACTGGGTCATCTTCATC-3’
	Зонд	FAM- CAGTTGAGTGACATTGCTTACTGGAA -RTQ1
VCAM	Прямой праймер	5’-CCGAAAGGCCCAGTTGAAG-3’
	Обратный праймер	5’-CACGAGAAGCTCAGGAGAAA-3’
	Зонд	FAM-AACAAAGTTGGCTCACAATTAAGAAGTTT-RTQ1
PPARg	Прямой праймер	5’-TACTGTCGGTTTCAGAAATGC-3’
	Обратный праймер	5’-CAACAGCTTCTCCTTCTCG-3’
	Зонд	FAM-CCATCAGGTTTGGGCGGATGCC-RTQ1
IGF1	Прямой праймер	5’-CTAAGGAGGCTGGAGATGTATTGC -3’
	Обратный праймер	5’-TTGCGTTCTTCAAATGTACTTCCT-3’
	Зонд	FAM-CCTGCCAAGTCAGCTCGCTCTGTC-RTQ1
ANG1	Прямой праймер	5’-CAGTCAGAGGCAGTACATGCTAAG-3’
	Обратный праймер	5’-TTCCTGCTGTCCCAGTGTGA-3’
	Зонд	FAM-TGAATAGGCTCGGTTCCCTTCCCAGT-RTQ1

LIF	Прямой праймер	5’-AAGTGCAGCCCATAATGAAG-3’
	Обратный праймер	5’-CATTGAGCTGTGCCAGTTG-3’
	Зонд	FAM-TTGTGCCCCTGCTGTTGGTTCT-RTQ1
CSF	Прямой праймер	5’-AGGAACTCTCTTTGAGGCTG-3’
	Обратный праймер	5’-CATTCTTGACCTTCTCCAGCA-3’
	Зонд	FAM-CTTGTCATGCTCTTCATAATCCTTGG-RTQ1
ICAM	Прямой праймер	5’-GCAATGTGCAAGAAGATAGC-3’
	Обратный праймер	5’-CTCCACCTGGCAGCGTAG-3’
	Зонд	ROX-CACGGTGAGGAAGGTTTTAGCTGTT-RTQ2
BMP4	Прямой праймер	5’-ACAGCACTGGTCTTGAGTATC-3’
	Обратный праймер	5’-TGGGATGTTCTCCAGATGTTC-3’
	Зонд	FAM- AACACCGTGAGGAGCTTCCACCA -RTQ1

Реакцию проводили в следующем временном режиме: предварительная денатурация при температуре 95^0С в течение 10 мин, циклические денатурация при 95^0С в течение 20 секунд, гибридизация матрицы с праймерами и элонгация при температуре 60^0С в течение 60 с. Всего 40 циклов. Для каждого образца выполнялись по 3 пробы. По окончании реакции в управляющей программе выбирали уровень базовой флуоресценции, наблюдающейся в реакции до появления сигнала репортерной флуоресценции. На основании измерений её сигнала с учетом уровня базовой флуоресценции программа рассчитывала пороговый цикл (Ct), т.е. такой цикл, на котором достигается некий заданный уровень репортерной флуоресценции. Разница средних значений порогового цикла для исследуемого гена вычислялась между опытным и контрольным образцом (в качестве контрольного образца была взята смесь кДНК из проб от 8 доноров).

После определения Ct в каждом образце для вычисления среднего значения в серии из трёх повторов и оценки расхождений среди повторов вычислялось среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации по следующим формулам:

$\mu = \Sigma (X)/N$

$\sigma = \sqrt{(\sum(X-\mu)^2/N)}$

$\nu = \sigma / \mu$, где

N – число членов совокупности (в данном случае, 3)

X – значение признака (Ct)

μ – среднее значение признака

σ – стандартное отклонение

ν – коэффициент вариации [6]

2.3 Статистический анализ.

Метод ПЦР в реальном времени позволяет вычислять количество субстрата (в нашем случае уровень экспрессии гена) в различных образцах. Осуществляется это путем подсчета числа циклов ПЦР, необходимых для достижения пороговой флуоресценции. В связи с тем, что интенсивность флуоресценции отражает количество продукта, то для образцов, которые первоначально имели больше субстрата, потребуются меньше циклов ПЦР для достижения заданного порога флуоресценции, чем для образцов с меньшим количеством субстрата [6]. Такая взаимосвязь может быть задана математически: количество циклов, необходимых для достижения пороговых циклов, обратно пропорционально логарифму первоначального количества субстрата:

$Ct= -(1/\log E)*\log P_0 + \log Pct/\log E$, где

P_0- исходное количество субстрата,

E- эффективность амплификации.

В идеальных условиях E=2, то есть на каждом цикле цепной реакции происходит удвоение количества продукта.

Применяемый нами в данном случае метод – относительный количественный анализ – это определение изменений уровней экспрессии изучаемых генов в кДНК относительно уровней экспрессии контрольных генов (то есть таких генов на которые не действуют изучаемые факторы). В качестве таких референсных генов были выбраны гены «домашнего хозяйства»: *β-актин* и *GAPDH*. Относительный количественный анализ не требует использования стандартов с известной концентрацией. Относительный количественный анализ хорошо подходит для выявления эффекта экспериментальных факторов в опытном образце по сравнению с контрольным, что имеет место в нашем эксперименте.

Из уравнения

$$Ct = -(1/\log E)*\log P_0 + \log Pct/\log E$$

следует, что при равной эффективности реакции E в образцах 1 и 2, относительная концентрация субстрата

$$R = P1/P2 = E^{-(C(T)1-C(T)2)} = E^{-\Delta C(T)}$$

Проведем нормализацию этих результатов по данным амплификации с контрольной последовательностью REF (соответствующей референсному гену). Пусть реакция REF в обоих образцах протекает с эффективностью Eref. Тогда

$$R = E^{-\Delta C(T)} / E_{ref}^{-\Delta C(T)\ ref}$$

Если эффективности «контрольной» и «опытной» реакций сходны, приближенно можно записать:

$$R = E^{-\Delta C(T)} / E_{ref}^{-\Delta C(T)\ ref} = E_{ref}^{\Delta C(T)\ ref\ -\Delta C(T)}$$

И, наконец, если обе реакции протекают со сходной эффективностью, близкой к 2, формула упрощается до вида:

$$C(T)R = E_{ref}^{\Delta C(T)\ ref\ -\Delta C(T)} \sim 2^{\Delta C(T)\ ref\ -\Delta C(T)}$$

Суммарный фактор нормализации (NF) вычисляли как среднее геометрическое из факторов нормализации по отдельным генам «домашнего хозяйства». Нормированную разницу экспрессии интересующих нас генов вычисляли по формуле 2:

C(T)Rn = C(T)R/NF, где

C(T)Rn – нормированная разница экспрессии гена, C(T)R – ненормированная разница экспрессии гена, NF – суммарный фактор нормализации по 2 генам «домашнего хозяйства» [6].

Статистическая обработка данных

Ввиду того, что распределение в исследуемых выборках не является нормальным, а в большей части случаев относится к логнормальному, при статистическом анализе нами использовались непараметрический аналог критерия Стьюдента – критерий Вилкоксона. Сравниваемые группы сбалансированы по основным демографическим показателям (полу и возрасту) и значимым клиническим признакам. Результаты считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$ [3].

Данные об относительном уровне экспрессии исследуемых генов представлены в виде оценок уровней исследованных показателей и величины стандартного отклонения. Тесноту и направление корреляционной связи при анализе относительного уровня экспрессии генов также определяли методом ранговой корреляции Вилкоксона. Результаты были обработаны с помощью программы Statistical Analysis System (SAS 9.3).

Ввиду того, что в большинстве случаев наблюдаемое распределение относится к логнормальному, графическое пояснение представлено в виде диаграмм размаха (бокс-плоты) данных логарифмов значений с отраженными значениями минимума и максимума для каждого из исследованных значений, первым-третьим квартилями (Q_{25}-Q_{75}), значениями среднего и медианы.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Клинические характеристики пациентов

Нулевая точка исследования для всех пациентов приходится на момент диагностики, то есть, образцы КМ были получены в развернутой стадии заболевания. Процент содержания бластных клеток в КМ у пациентов с диагнозом ОМЛ в момент диагностики составлял от 22% до 86,6% (67,65±3,9%, медиана 64%). После 1-го курса индукции в живых остались 26 из 33 пациентов (78,8%). К моменту второй точки (+100 дней от начала терапии) в живых остались 25 пациентов (76%) (табл.3), из них ремиссия была достигнута у 22 человек (табл.4). У пациентов, не достигших ремиссии, производилась смена химиотерапии на альтернативные курсы (HAM, малые дозы цитарабина (МДЦ), МДЦ+этопозид). К моменту третьей точки (+180 дней от начала терапии) в живых остались 24 пациента (73%), из которых ремиссия сохранялась у 20 человек.

Таблица 3. Число больных, обследованных на разных этапах

	0 точка	1 точка	2 точка	3 точка
ОМЛ	33	26 (78,8%)	25 (76%)	24 (73%)
ОЛЛ	21	19 (90%)	19 (90%)	19 (90%)
ХМЛ	20	19 (95%)	19 (95%)	19 (95%)

Процент содержания бластных клеток в КМ у пациентов с диагнозом ОЛЛ в момент диагностики составлял от 68 до 97% (86,13±1,19%, медиана 88%). К моменту первой точки (+30 дней от начала терапии) в живых остались 19 из 21 пациентов (90%) (табл.3), из них у 16 была достигнута ремиссия (табл.4). К моменту второй точки (+100 дней от начала терапии) ремиссия была достигнута у 18 из 19 пациентов. К моменту третьей точки (+180 дней от начала терапии) все пациенты (19 человек) находились в состоянии ремиссии.

Таблица 4. Эффективность лечения

	ОМЛ	ОЛЛ	ХМЛ
ПР	22 (67%)	19 (90%)	17 (85%)
Ранняя летальность	8 (24%)	2 (9.5%)	0
Резистентность	3 (9%)	1 (4.75%)	3 (15%)

19 из 20 пациентов (95%) с диагнозом ХМЛ к моменту первой точки (+3 мес терапии) ответили на терапию иматинибом. Пациентам, не достигшим ответа, впоследствии производилась смена на препараты других поколений ингибиторов тирозинкиназ. Учитывая недостаточный ответ, одному пациенту иматиниб был заменён на дазатиниб на сроке +4 мес от начала терапии, 2-м пациентам – на сроке более 1 года от начала терапии, с 5 пациентами контакт был утерян.

3.2 Лабораторные исследования

3.2.1 Морфологические характеристики ММСК

Все ММСК, полученные из образцов КМ больных гемобластозами, морфологически не отличались от таковых, полученных от здоровых доноров. При анализе с помощью фазового контраста все они имели типичную веретеновидную фибробластоподобную форму и демонстрировали способность к формированию колоний на пластике. Скорость и темпы роста ММСК отличались в отдельных образцах, однако, в подавляющем большинстве случаев удавалось добиться конфлюэнтности на первом пассаже (P0). В ряде случаев, если клетки после высаживания формировали плотные многослойные колонии, их пассировали, не дожидаясь конфлюэнтости. Все культуры формировали конфлюэнтный монослой на последующих пассажах.

3.2.2 Культуральные характеристики ММСК

Культуральные характеристики ММСК изучали в течение 3 пассажей и сравнивали с таковыми у ММСК здоровых доноров. Оценивали время, необходимое для достижения конфлюэнтного монослоя (время до P0), и суммарное количество клеток (кумулятивная клеточная продукция) за 3 пассажа.

3.2.2.1 Время достижения конфлюэнтности после первичной посадки мононуклеаров (время до P0)

Время до P0 (время до первого пассажа) соответствует временному промежутку от первичной посадки клеток до момента формирования ими конфлюэнтного монослоя и последующего их пассажа. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Время до первого пассажа ММСК

	Точка	ОМЛ	ОЛЛ	ХМЛ	Доноры
Время до P0, дни	0	17,6 ± 0,6 *	19,8 ± 1,4 *	17,7 ± 0,8 *	13,7±0,3
	1	15,5 ± 0,9	14,1 ± 0,9	16,7 ± 0,8 *	
	2	16,6 ± 0,6 *	16,0 ± 0,9	18,2 ± 1,0 *	
	3	16,8 ± 0,5 *	16,2 ± 0,7 *	17,6 ± 0,7 *	

* указывает на статистически достоверные отличия от доноров, $p<0,05$

Как видно из таблицы, время достижения конфлюэнтности у здоровых доноров составляет 13,7±0,3 дней. У пациентов с диагнозом ОМЛ на нулевой точке время до P0 варьировало от 12 до 24 дней (в среднем, 17,6±0,6 дней), что статистически достоверно превышало таковое у доноров ($p < 0,05$).

Было показано, что процент содержания бластных клеток в КМ не коррелировал с культуральными характеристиками ММСК (Табл. 6). Таким образом, изменения ростовых характеристик ММСК больных не могут быть объяснены повышением доли бластных клеток и, следовательно, снижением доли стромальных клеток в исследуемых образцах.

Таблица 6. Значения времени до первого пассажа ММСК у больных ОЛ в зависимости от процента содержания бластных клеток в КМ.

Бластные клетки в КМ, %	20-40	41-60	61-75	76-100		
				76-85	86-95	96-100
Время до Р0 у больных ОМЛ, дни	18,3± 1,4	20,0±1,1	17,1±1,1	16,1±1,0		
Время до Р0 у больных ОЛЛ, дни				20,3±2,3	19,3±2,8	20,3±2,6

У больных ОМЛ на первой точке (+30 дней от начала терапии) время до Р0 составило, в среднем, 15,5±0,9 дней (от 9 до 25), что достоверно не отличалось от группы здоровых доноров. Стоит иметь в виду, что на первой точке 42% пациентов с диагнозом ОМЛ находились вне ремиссии заболевания, в связи с чем культуральные характеристики для этих двух групп пациентов были изучены отдельно. Было показано, что у больных, у которых была и не была достигнута ремиссия заболевания, время до Р0 на первой точке составило 15,8±1,5 дней (от 11 до 25) и 15,3±1,5 дней (от 9 до 21) соответственно, что достоверно не отличалось от показателя здоровых доноров. На второй точке (+100 дней от начала терапии) время до Р0 у больных ОМЛ варьировало от 12 до 23 дней (в среднем, 16,6±0,6 дней), что на 20% превышало таковое у доноров ($p < 0,05$). На третьей точке (+180 дней от начала терапии) время до Р0 у данной группы пациентов варьировало от 13 до 22 дней (в среднем, 16,8±0,5 дней), что на 20% превышало таковое у доноров ($p < 0,05$).

У больных ОЛЛ на нулевой точке время до Р0 варьировало от13 до 34 (в среднем, 19,8±1,4 дней), что на 40% превышало таковое у доноров ($p < 0,05$). На первой точке (+30 дней от начала терапии) время до Р0 составило,

в среднем, 14,1±0,9 дней (от 10 до 25), что достоверно не отличалось от группы здоровых доноров. На второй точке (+100 дней от начала терапии) время до Р0 варьировалось от 10 до 25 (в среднем, 16±0,9 дней), что на 16% превышало таковое у доноров (р = 0,05). На третьей точке (+180 дней от начала терапии) время до Р0 у данной группы пациентов варьировало от 10 до 23 дней (в среднем, 16,2±0,7 дней), что на 18% превышало таковое у доноров (р < 0,05).

Таким образом, видно, что описанная динамика изменения показателя времени до Р0 одинакова для больных ОМЛ и ОЛЛ. При этом, для больных ХМЛ были выявлены иные закономерности. На нулевой точке время до Р0 у больных ХМЛ варьировало от 14 до 28 дней (в среднем, 17,7±0,8 дней), что на 30% превышало таковое у доноров (р < 0,05). На первой точке (+ 3 мес от начала терапии ИТК) значение этого показателя варьировало от 12 до 28 дней (в среднем, 16,7±0,8 дней), что на 20% превышало таковое у доноров (р < 0,05). На второй точке (+ 6 мес от начала терапии ИТК) время до Р0 варьировало от 14 до 28 (в среднем, 18,2±1 дней), что на 33% превышало таковое у доноров (р < 0,05). На третьей точке (+ 12 мес от начала терапии ИТК) значение показателя у пациентов варьировало от 13 до 22 (в среднем, 17,6±0,7 дней), что на 30% превышало таковое у доноров (р < 0,05).

Так как показатель времени до Р0 косвенно свидетельствует о числе предшественников стромальных клеток в КМ, представляется вероятным, что на момент диагностики у пациентов с острыми лейкозами достоверно удлинённое время до Р0 обусловлено уменьшением количества ММСК в связи с тотальной опухолевой пролиферацией и экспансией бластных клеток, подавляющих нормальное кроветворение. К моменту 1-й точки (+30 дней от начала терапии), то есть, по завершении 1-го индукционного курса, количество предшественников восстанавливается до нормальных значений, что связано с эффективностью химиотерапии и уменьшением числа бластных клеток в КМ. Последующее снижение показателя времени до Р0, скорее

всего, отражает влияние химиопрепаратов на клетки КМ. У пациентов с хроническим миелолейкозом достоверное удлинение времени до Р0 на всех точках отражает непрерывное влияние химиопрепарата и персистенцию основного заболевания, что подтверждает данные литературы [28,46,76,87,242,260].

3.2.2.2 Суммарная клеточная продукция за 3 пассажа

Показатель суммарной клеточной продукции отражает общее количество клеток, собранных за 3 пассажа. Результаты средних значений этого показателя приведены в таблице 7.

Таблица 7. Суммарная клеточная продукция

	Точка	ОМЛ	ОЛЛ	ХМЛ	Доноры
Суммарная клеточная продукция за 3 пассажа, $x10^6$	0	4,8 ± 0,7 *	5,2 ± 1,4	7,5 ± 1,6	7,1 ± 1
	1	7,9 ± 1,4	7,7 ± 1,5	7,1 ± 1,1	
	2	10,1 ± 1,7	8,2 ± 1,4	6,7 ± 1,2	
	3	9,8 ± 1,4	9,4 ± 2,3	6,5 ± 0,7	

Только у пациентов с диагнозом ОМЛ показатель суммарной клеточной продукции был достоверно ниже, чем в группе доноров, составляя 4,8±0,7 $x10^6$ клеток (от 0 до 15). На первой точке он варьировался от 0 до 36 (в среднем, 7,9±1,4 $x10^6$) клеток, не отличаясь от группы доноров. При отдельной оценке групп пациентов, достигших к моменту первой точки (после 1-го курса индукции) ремиссии заболевания, и не достигших ее, не было найдено достоверных отличий (у пациентов в ремиссии показатель составил 5,7±1 $x10^6$ клеток (от 0 до 10,6), у пациентов вне ремиссии – 10,5±3,4 $x10^6$ клеток (от 0,5 до 36)). На второй (от 1,26 до 34,1, в среднем, 10,1±1,7 $x10^6$ клеток) и третьей точках (от 1,05 до 27,7, в среднем, 9,8±1,4 $x10^6$ клеток) также достоверных отличий выявлено не было.

У пациентов с диагнозом ОЛЛ данный показатель достоверно не отличался от группы доноров (от 0 до 17,3, в среднем, 5,2±1,4$x10^6$ клеток). К

моменту первой точки (после 1 курса индукции) у пациентов, достигших ремиссии заболевания, показатель суммарной клеточной продукции варьировался от 0 до 23,17, в среднем, 8,5±2 x10^6 клеток, достоверно не отличаясь от такового в группе доноров. На этой точке ремиссия не была достигнута только у 3-х пациентов, в связи с чем, оценивать такую немногочисленную группу с использованием t-критерия Стьюдента не представляется возможным. Поэтому для анализа различий в этих группах применялся 95% доверительный интервал, построенный для значений в группе пациентов в ремиссии. Значения суммарной клеточной продукции у двух из трех пациентов, находившихся на первой точке вне ремиссии, выходили за пределы 95%-ного доверительного интервала (0,5 и 0,9x10^6 клеток при границах доверительного интервала от 7,4 до 9,6x10^6 клеток). На второй (от 0 до 22,9, в среднем, 8,2±1,4x0^6 клеток) и третьей точках (от 0,87 до 41,8, в среднем, 9,4±2,3x10^6 клеток) достоверных отличий также выявлено не было. Было показано, что значительно хуже росли ММСК больных, страдающих В2-ОЛЛ (суммарная клеточная продукция на нулевой точке у данной группы пациентов составила 3,4±2,3x10^6 клеток, на первой точке – 4,8±2,8x10^6, однако, эти отличия не были статистически достоверными).

У пациентов с диагнозом ХМЛ показатели суммарной клеточной продукции также статистически достоверно не отличались от таковых в группе доноров, варьируя на нулевой точке от 0 до 30 (в среднем, 7,5±1,6 x10^6) клеток, на первой точке (+3 мес терапии ИТК) от 0,7 до 16,9 (в среднем, 7,1±1,1 x10^6) клеток, на второй (+6 мес терапии ИТК) – от 0 до 17,2 (в среднем, 6,7±1,2 x10^6) клеток, на третьей точке (+12 мес терапии ИТК) – от 1,67 до 13,6 (в среднем, 6,5±0,7 x10^6) клеток.

Таким образом, в рамках данного исследования было показано, что показатель суммарной клеточной продукции достоверно отличался от такового у здоровых доноров только в дебюте ОМЛ, отражая, предположительно, наиболее агрессивный характер заболевания.

3.2.3 Экспрессия генов в ММСК

3.2.3.1 Отличительные характеристики экспрессии генов в ММСК

Относительные уровни экспрессии проанализированных генов приведены в Приложении 2. Так как самые значимые различия наблюдались в момент диагностики заболевания, когда лейкемическая экспансия была наибольшей, то результаты анализа нами представляются в зависимости от их уровня экспрессии в дебюте. Были сформированы 3 группы: гены, экспрессия которых была повышена, нормальной или сниженной.

Таблица 8. Уровни экспрессии генов в дебюте заболевания в зависимости от ихфункции

	Гены, уровни экспрессии которых в дебюте заболевания были		
	повышены	нормальные	снижены
Гены, регулирующие иммунный ответ	*IL6, IL8, IL1b, IL1R1*		
Гены, регулирующие кроветворение	*CSF, LIF, Jag1, IGF1, SPP1*	*Sdf1,TGFa, TGFb*	
Гены, регулирующие дифференцировку и миграцию ММСК	*PDGFRa, VCAM, ICAM*		*BGLAP, SOX9*
Гены, регулирующие пролиферацию ММСК		*FGF2, FGFR1, FGFR2*	*VEGF*

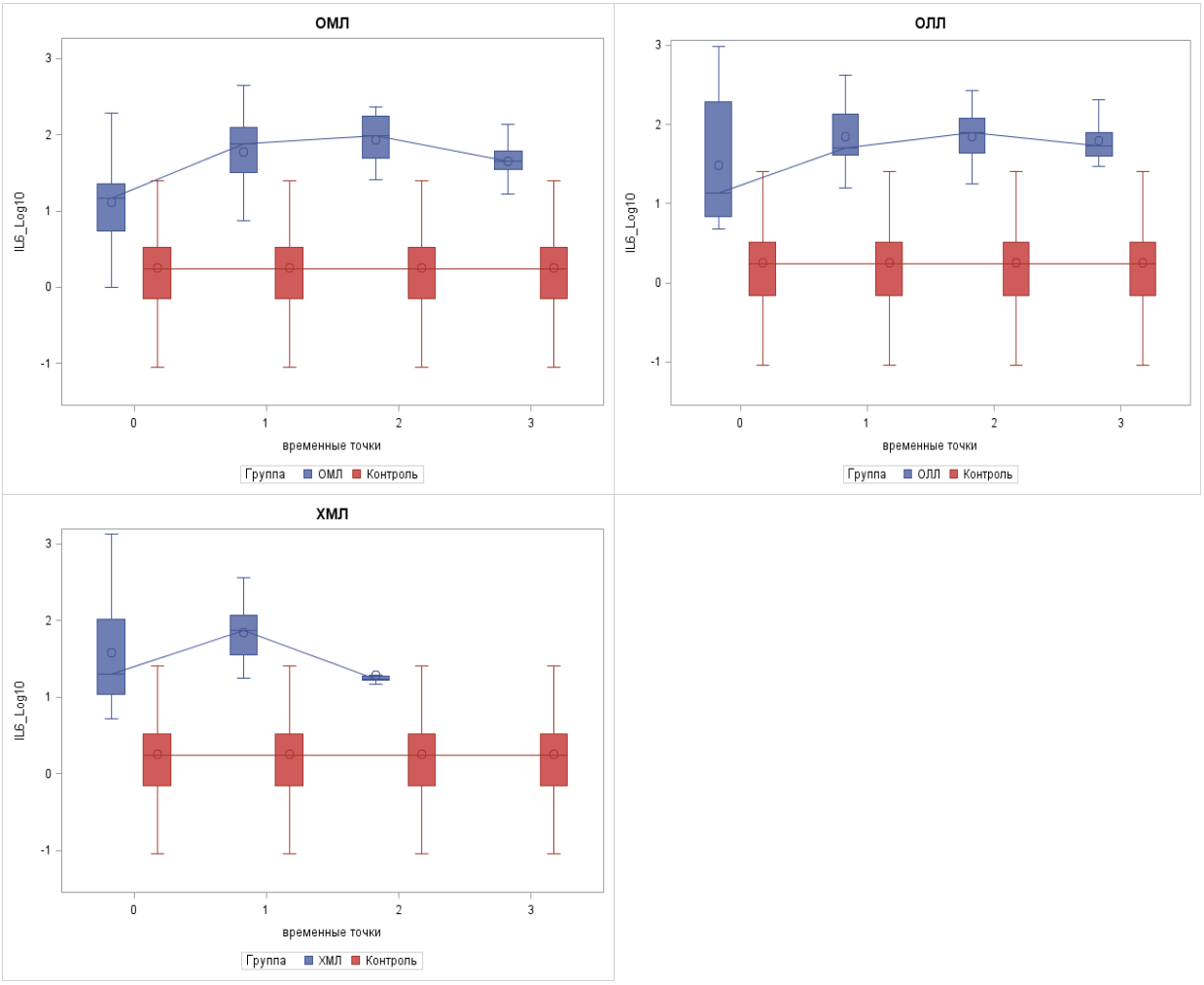
3.2.3.1.1 Гены, экспрессия которых на нулевой точке была повышена

Экспрессия генов, ответственных за поддержание иммунного ответа

1) Интерлейкин-6

На нулевой точке (в дебюте заболевания), а также на всех последующих точках во всех группах отмечалось повышение экспрессии гена *IL-6*, что согласуется с данными Calkoen и соавт., также отметившими повышение экспрессии этого гена у пациентов с миеломоноцитарным лейкозом [37] (Рис 1).

Рисунок 1. Относительный уровень экспрессии гена *IL6* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения



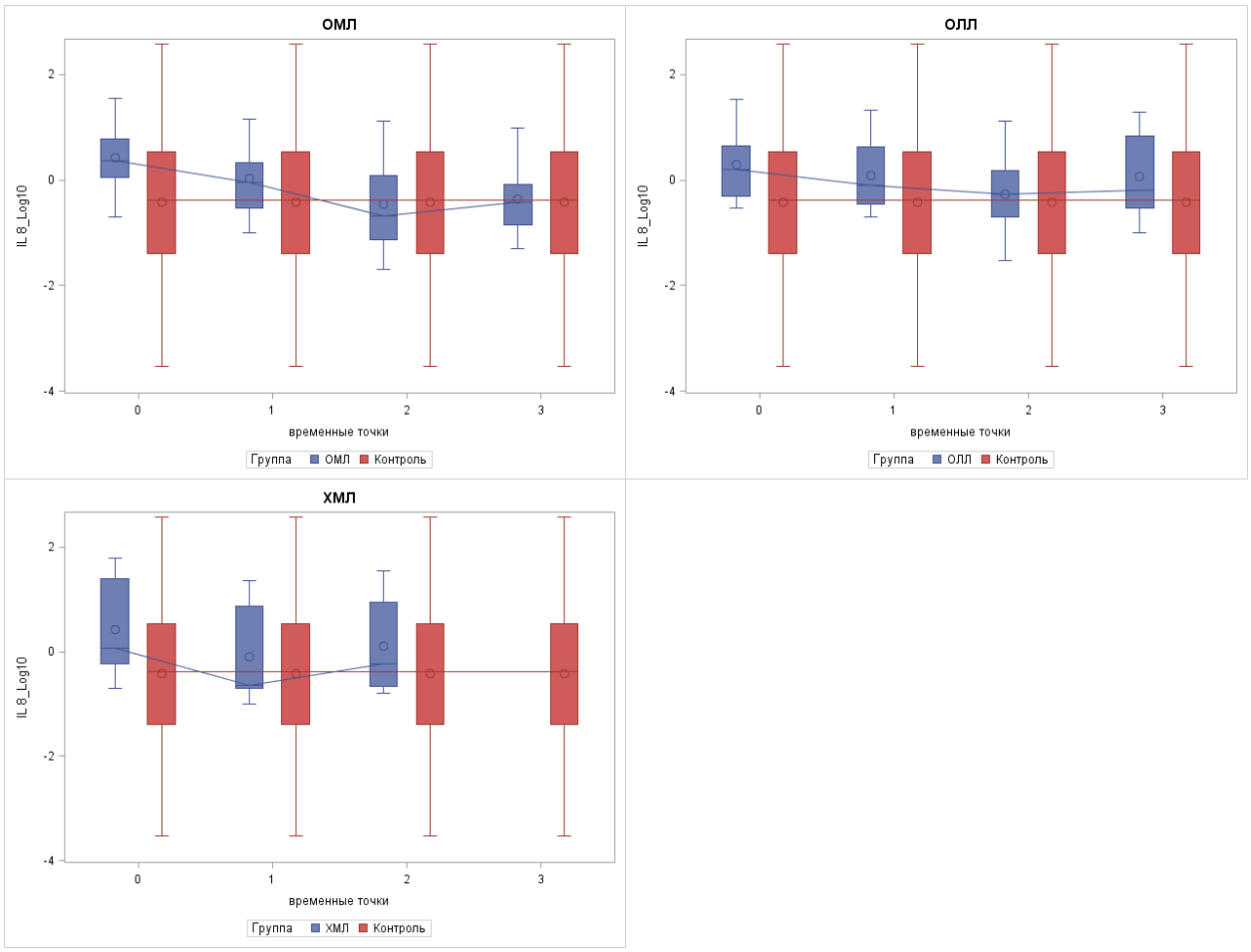
Ранее было показано, что лейкозные клетки повышают в ММСК экспрессию генов, кодирующих белки, которые вовлечены в сигнальные пути, опосредуемые NFκB, в том числе, IL-6 [195]. IL-6 секретируется ММСК [256, 257] и относится к провоспалительным цитокинам. Недавно, однако, было показано, что IL-6 вовлечён в подавление Т-клеточной пролиферации и местного воспаления [258, 259] и что IL-6, полученный из ММСК, может быть ответственен за иммунорегуляторную активность [260, 261]. Основываясь на этих данных, можно заключить, что IL-6 обладает мощным иммуносупрессивным действием.

Также было показано, что IL-6 подавляет цитотоксичность НК-клеток в отношении бластных клеток [224, 239], После связывания ГСК с ЛСК эти факторы путём обратной регуляции IL-6 приводили к остановке клеточного цикла в ЛСК и переходу их в состояние покоя [91]. Таким образом, можно предположить, что повышенная экспрессия гена *IL-6* отражает создание более благоприятных условий для лейкозных клеток в дебюте заболевания, а последующее сохранение высокого уровня экспрессии согласуется с данными ряда исследований, продемонстрировавших, что высокая концентрация IL-6 блокирует дифференцировку ММСК [189].

2) Интерлейкин 8

В ходе терапии (на точках 1-3) для пациентов с острыми лейкозами было продемонстрировано достоверное уменьшение экспрессии гена *IL8,* уровень экспрессии которого был повышен в дебюте заболевания. Для пациентов с ХМЛ этот показатель также снижен, но статистически недостоверно) (Рис. 2).

Рисунок 2. Относительный уровень экспрессии гена *IL8* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения

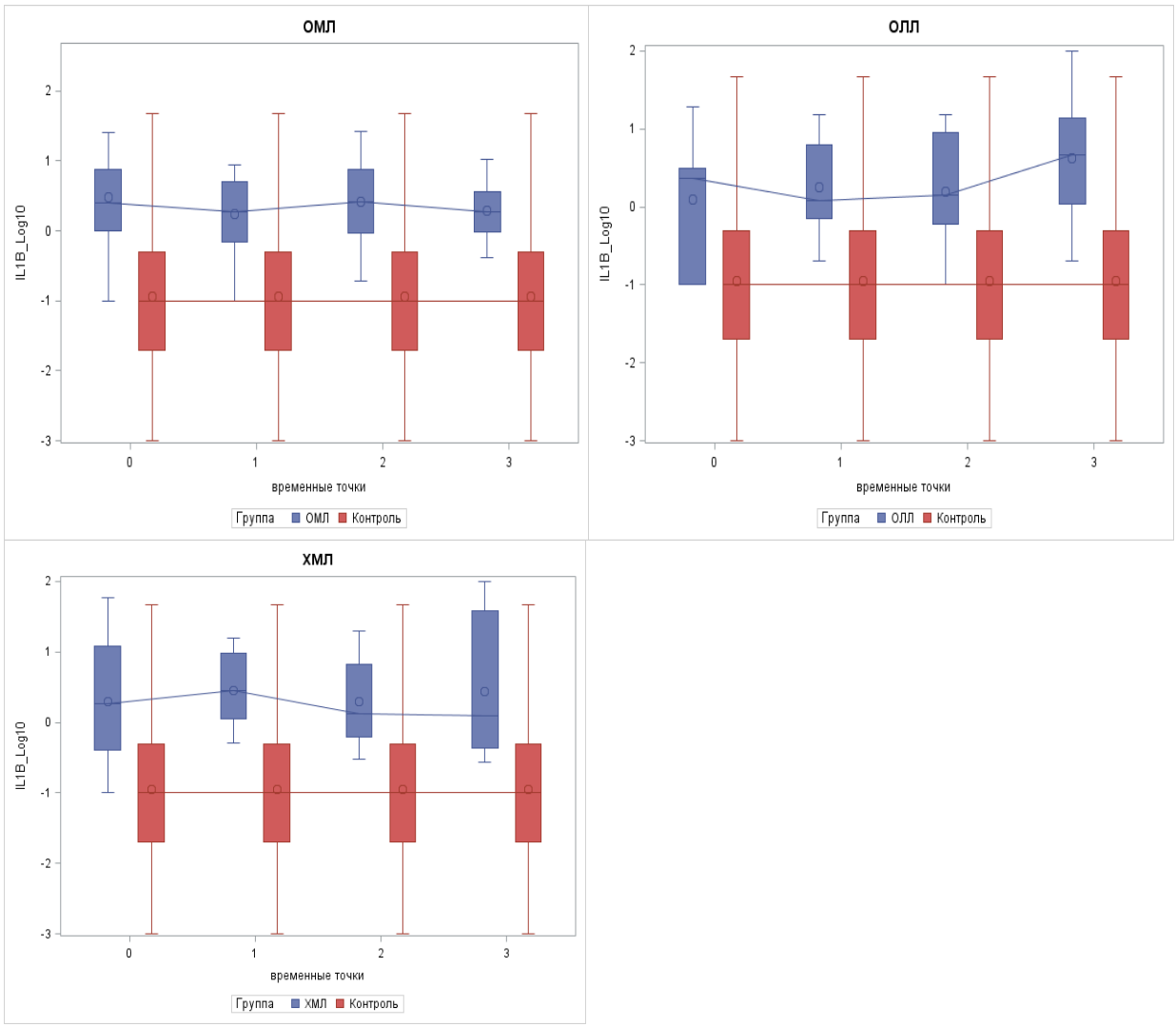


Учитывая, что IL8 стимулирует ангиогенез и пролиферацию бластных клеток, миграцию и дегрануляцию нейтрофилов, а также агниогенный потенциал ММСК через увеличение содержания VEGF [96], данное наблюдение укладывается в вышеуказанные закономерности. Таким образом, повышенный уровень IL8 способствует лейкемической экспансии, а снижение его экспрессии свидетельствует об эффективности терапии.

3) Интерлейкин1b1

На нулевой точке отмечалось повышение экспрессии гена *IL1b*(Рис.3).

Рисунок 3. Относительный уровень экспрессии гена *IL1b* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения

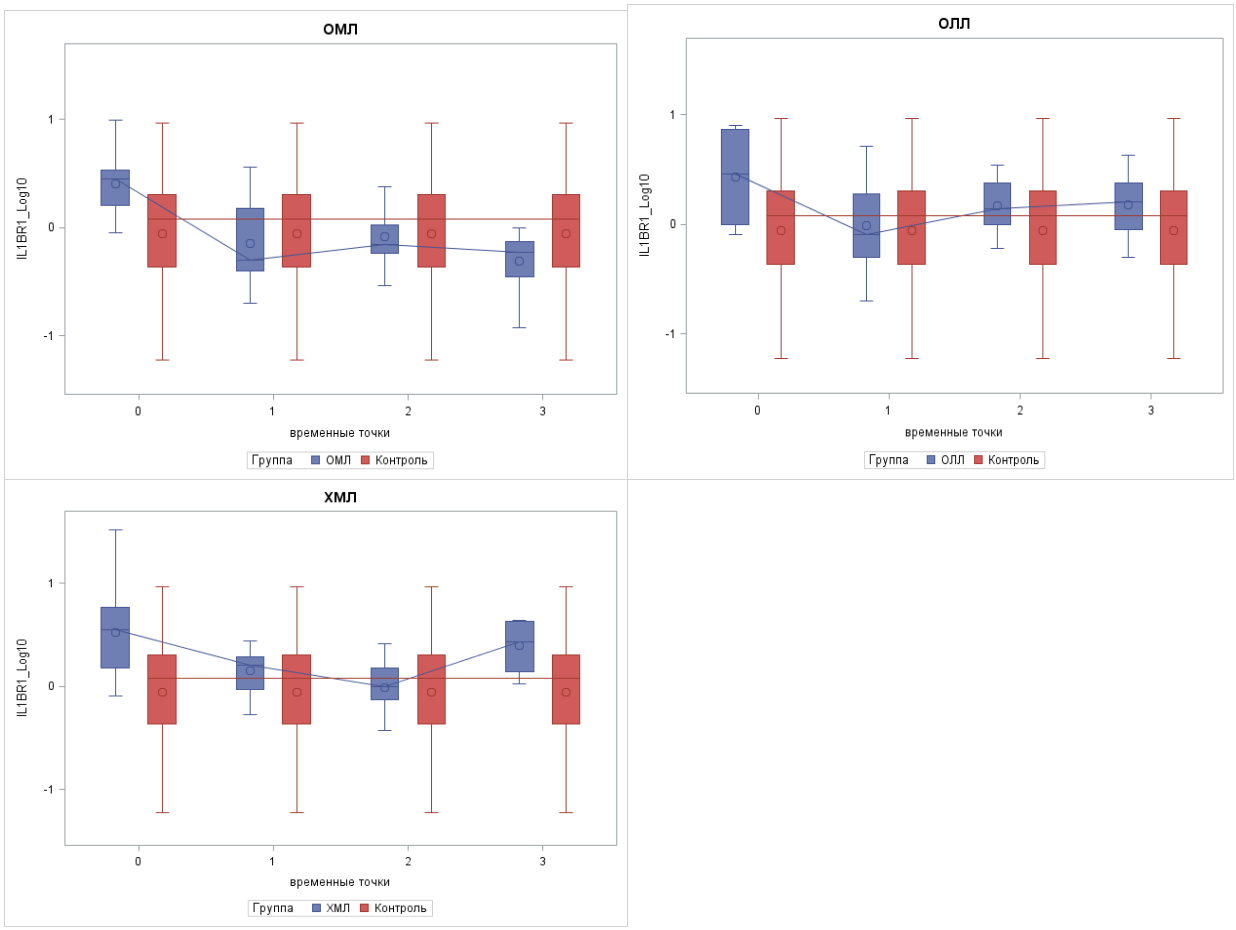


IL1b это провоспалительный цитокин. Он стимулирует пролиферацию клеток ОМЛ, активируя в них NFkB путь [101-105], а также потенциирует рост клеток ХМЛ. Его ингибирование приводит к гибели клеток ХМЛ [114]. IL1b ингибирует синтез остеобластами остеокальцина [113]. Полученные результаты согласуются с данными ряда исследований, продемонстрировавших аналогичные результаты [67, 225], а также укладываются в вышеуказанное предположение о том, что экспрессия гена *IL1b* отражает создание более благоприятных условий для лейкозных клеток..

4) Рецептор для интерлейкина1-бета

Аналогичные закономерности были продемонстрированы и в отношении гена рецептора для IL1 – гена *IL1R1* (Рис. 4)

Рисунок 4. Относительный уровень экспрессии гена *IL1R1* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения.



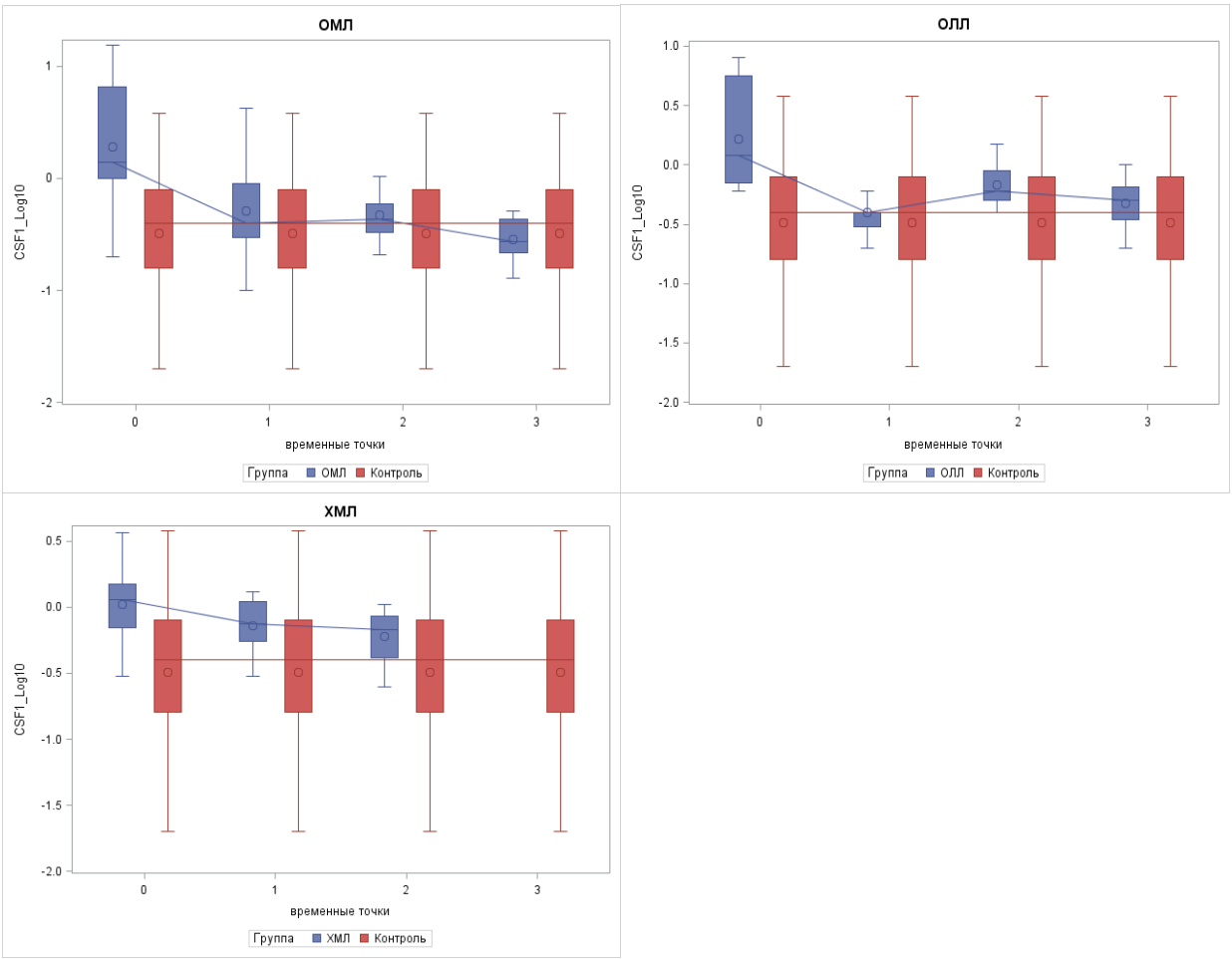
Учитывая, что продуктом гена *IL1R1* является рецептор, экспрессируемый на самих ММСК, то при интерпретации результатов стоит рассматривать не весь спектр эффектов IL1, а только таковые, оказываемые им на стромальные клетки. Учитывая широкий спектр стимулов, оказываемых IL1, трактовать данные можно только предположительно. Повышение уровня экспрессии гена *IL1R1* в ходе терапии может говорить о стимуляции дифференцировки ММСК, подавленной в начале терапии, а исходно высокий уровень его экспрессии – о подавлении синтеза остеокальцина.

Экспрессия генов, ответственных за регуляцию кроветворения

1) Колониестимулирующий фактор

На нулевой точке также была показана повышенная экспрессия гена *CSF*, которая, однако, снижалась в ходе терапии. (Рис. 5).

Рисунок 5. Относительный уровень экспрессии гена *CSF* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения.



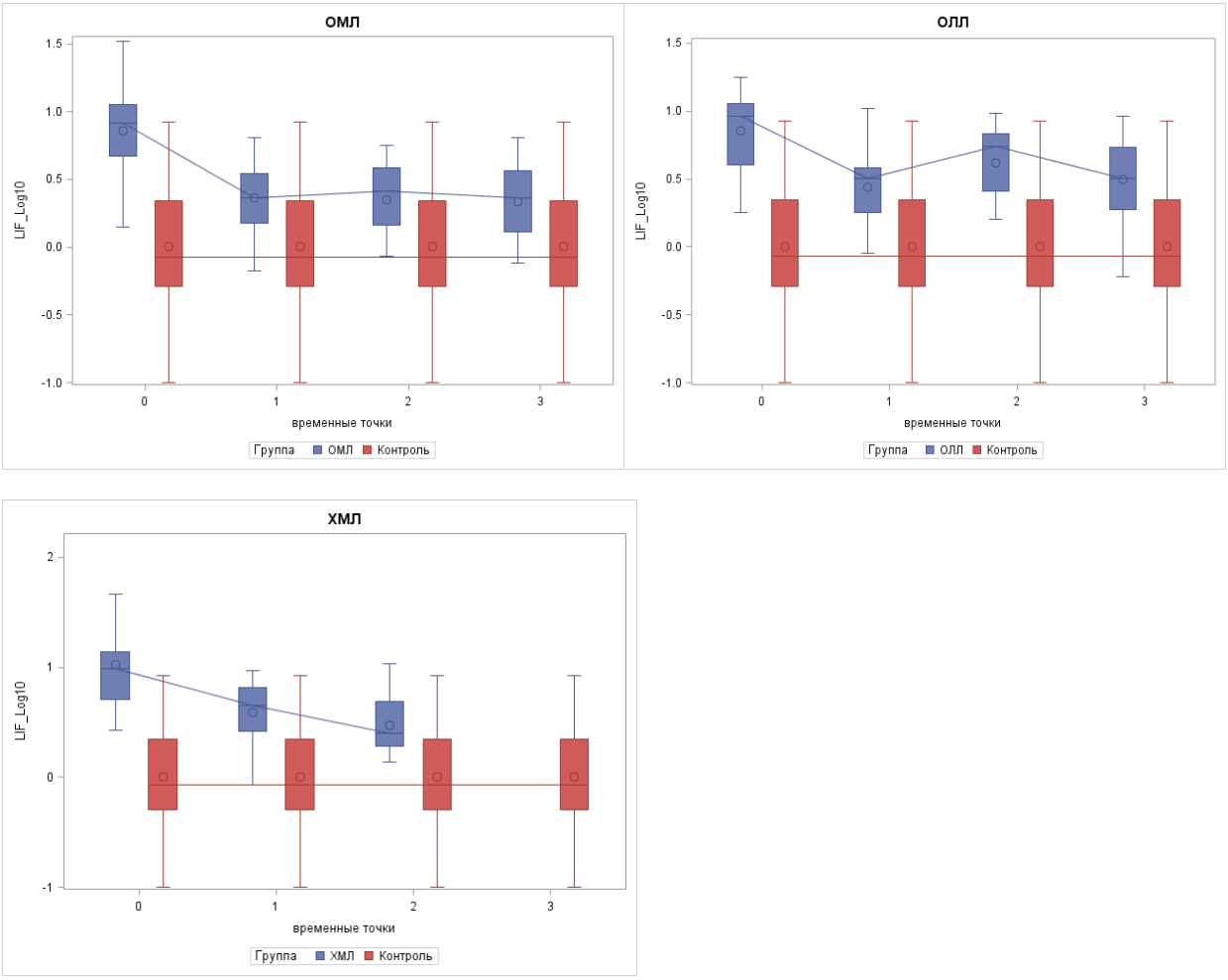
В ряде исследований было показано, что CSF, помимо стимуляции выживания, пролиферации и дифференцировки нейтрофилов и их предшественников через различные сигнальные пути (JAK/STAT, MAPK/PI3K), оказывает влияние также и на лейкозные клетки. Так, например, при ХМЛ повышенная продукция CSF вызывала уменьшение хоуминга ММСК и способности их к задержке в КМ [108]. Таким образом, повышенная экспрессии данного гена в дебюте заболевания также отражает

создание более благоприятных условий для лейкозных клеток, а нормализация её в ходе лечения говорит о восстановлении нормальных сигнальных путей в клетках стромального микроокружения.

2) LIF

Была показана повышенная экспрессия гена *LIF* в дебюте гемобластозов, которая снижалась в ходе терапии. Так, для ОМЛ она составляла более 400% от нормы на момент диагностики заболевания и снижалась к моменту третьей точки до значения, близкого к наблюдаемому у здоровых доноров. У пациентов с ХМЛ значение на нулевой точке составляло более 800% от нормы (Рис. 6).

Рисунок 6. Относительный уровень экспрессии гена *LIF* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения

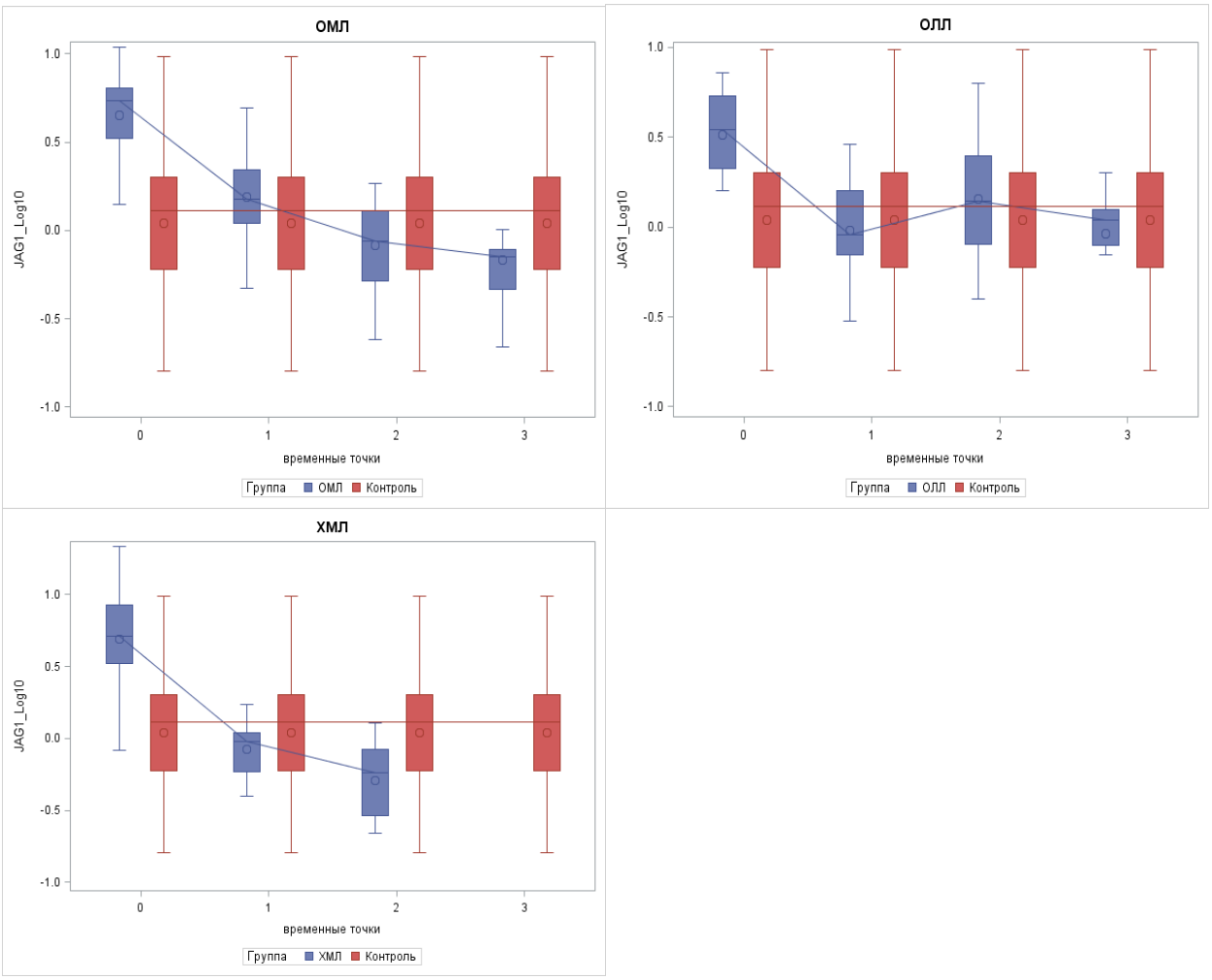


Продукт экспрессии гена *LIF* в своем действии сходен с IL6 и ингибирует процессы дифференцировки клеток [99], а также подавляет пролиферацию Т-клеток [167]. Так как при снижении уровня LIF клетки начинают дифференцироваться, вышеуказанное наблюдение также подтверждает восстановление микроокружения в ходе терапии.

3) Jag1

В дебюте заболевания была продемонстрирована повышенная экспрессия гена *Jag1*. У пациентов с диагнозами ОМЛ и ХМЛ экспрессия гена *Jag1* снижалась с более, чем 300% до начала лечения до 50% от нормы в ходе терапии. (Рис. 7).

Рисунок 7 Относительный уровень экспрессии гена *Jag* 1 в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения



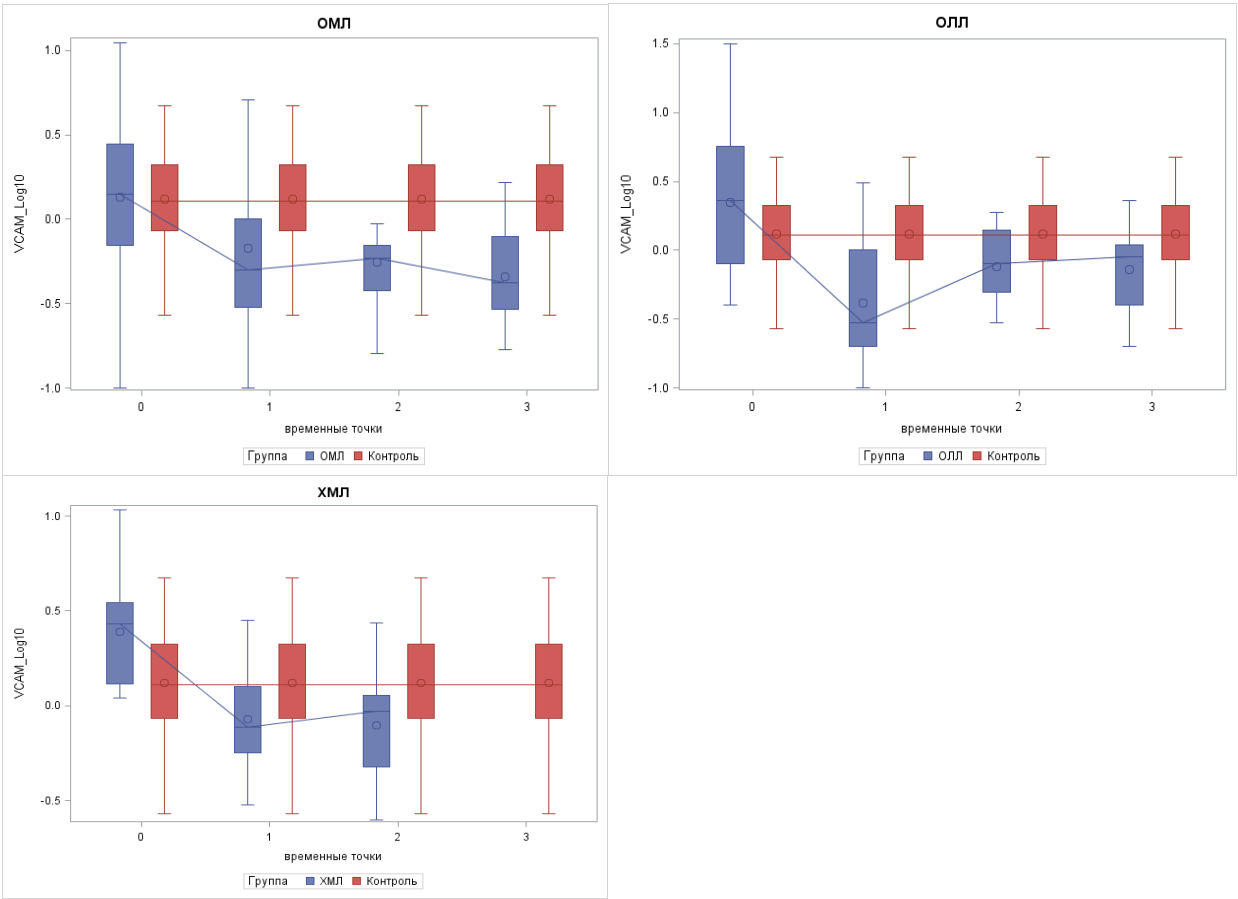
По литературным данным в экспериментах на мышах было показано, что повышенная экспрессия *Jag* 1 наблюдалась при развитии ОМЛ [123], что согласуется с выявленным нами повышением его экспрессии в точке 0. Кроме того, было показано, что Jag1, выделяющийся ММСК, оказывает антиапоптотический эффект на клетки ОЛЛ [115]. Значимое снижение его экспрессии на последующих точках может свидетельствовать об эффективности терапии гемобластозов.

Экспрессия генов, ответственных за способность ММСК к самоподдержанию, миграции и дифференцировке

1) VCAM

В дебюте была продемонстрирована повышенная экспрессия гена *VCAM*. В ходе терапии экспрессия этого гена стойко снижалась (Рис. 8).

Рисунок 8. Относительный уровень экспрессии гена *VCAM* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения

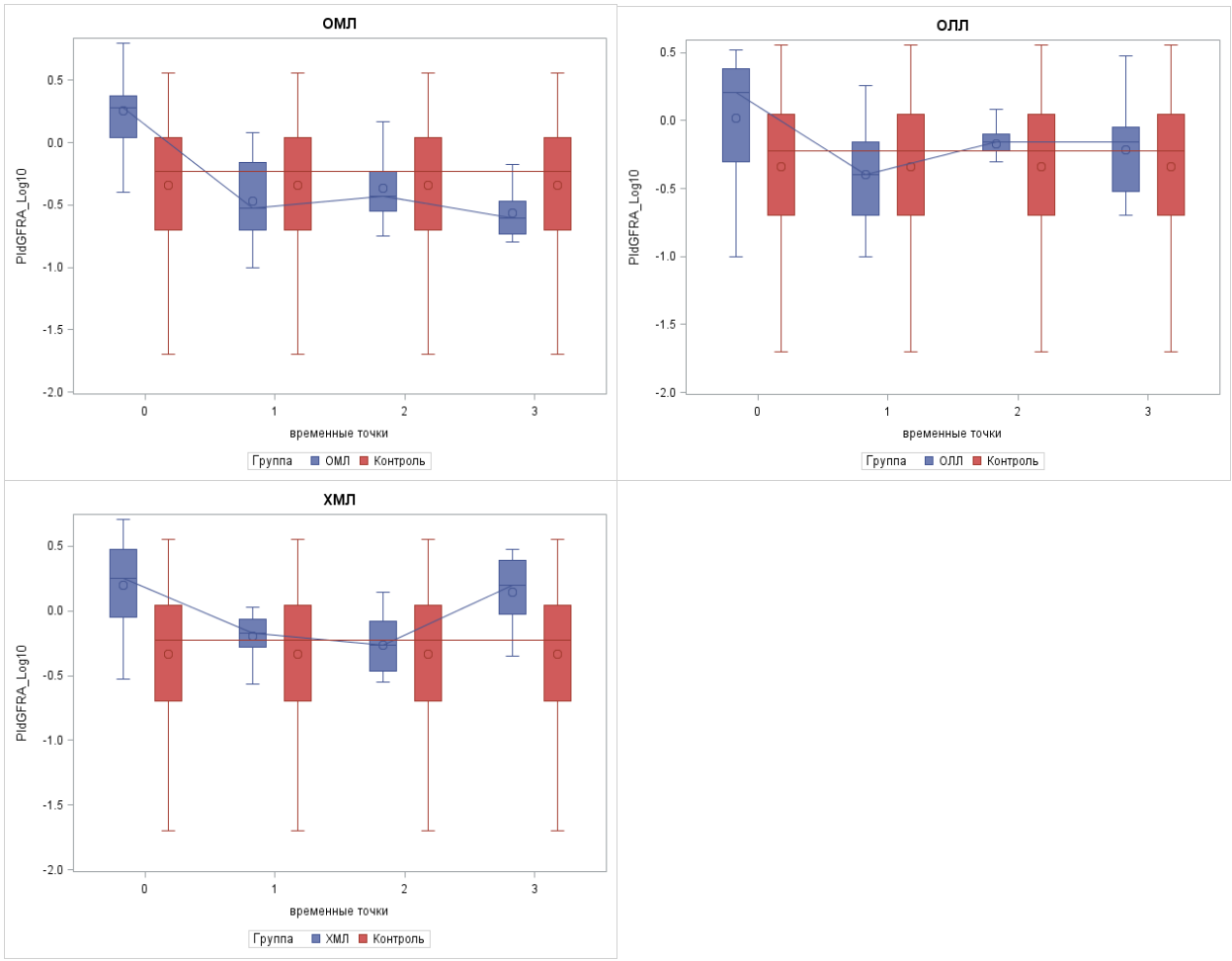


Учитывая, что в ряде исследований было показано, что высокий уровень белка VCAM1 подавляет способность ММСК к миграции через NF-кB путь [175], что также демонстрирует восстановление нормального кроветворения после химиотерапии.

2) PDGFRa

Также в дебюте заболевания была продемонстрирована повышенная экспрессия гена *PDGFRa*, кодирующего белок, который является рецептором к белку из группы факторов роста – *PDGFa* (Рис. 9).

Рисунок 9. Относительный уровень экспрессии гена *PDGFRa* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения

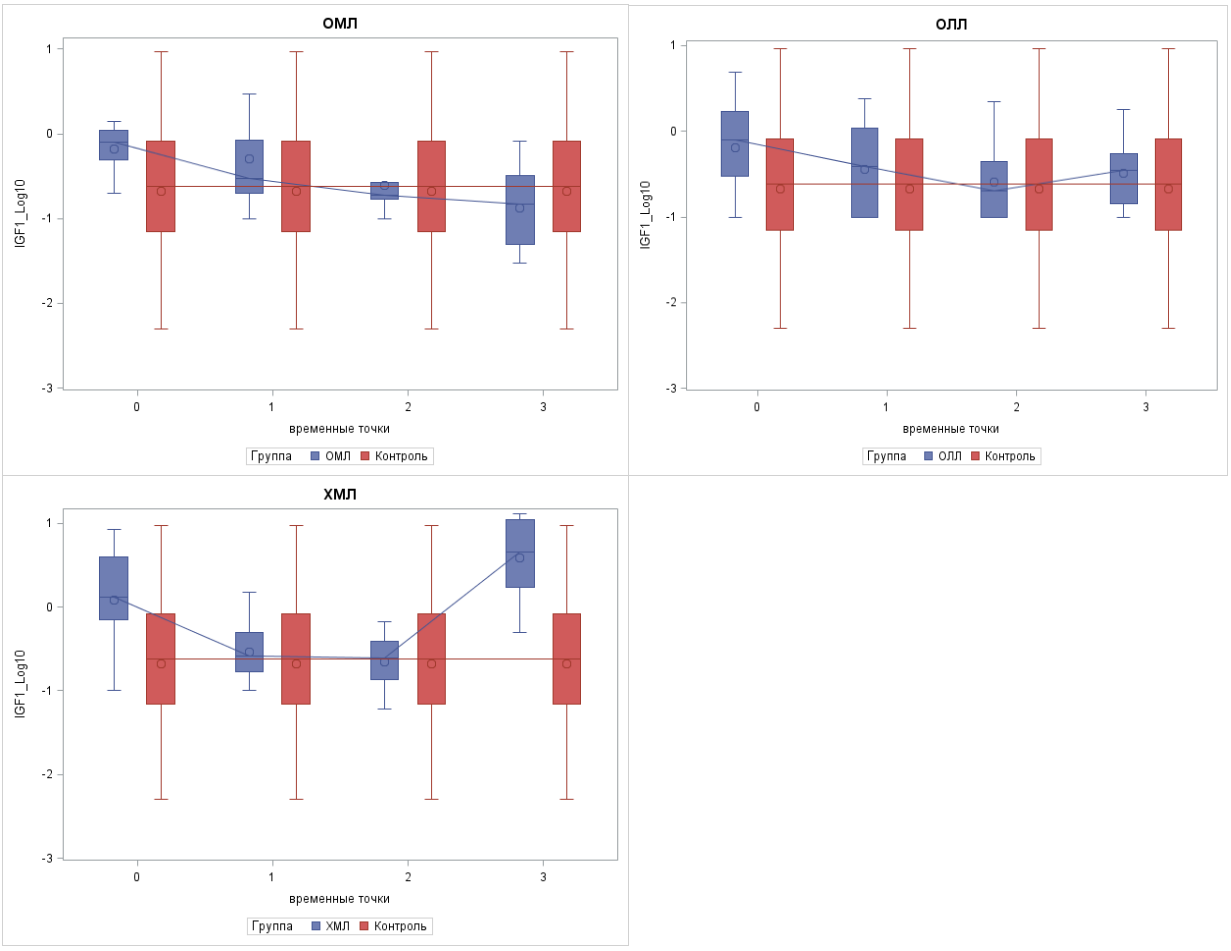


Белок PDGFRa является мощным митогеном для клеток мезенхимального происхождения [59, 147, 234]. Он играет важную роль в ангиогенезе, а также обладает способностью к поддержанию кроветворения [97, 143]. Ингибирование PDGFR приводит к изменениям процесса костного ремоделлирования [71]. Таким образом, повышение его экспрессии в ходе терапии может свидетельствовать о восстановлении процессов дифференцировки ММСК.

3) IGF1

Во всех группах пациентов на нулевой точке наблюдался повышенный уровень экспрессии гена *IGF1*. На последующих точках наблюдалось статистически достоверное снижение его экспрессии. (Рис. 10).

Рисунок 10. Относительный уровень экспрессии гена *IGF1* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения

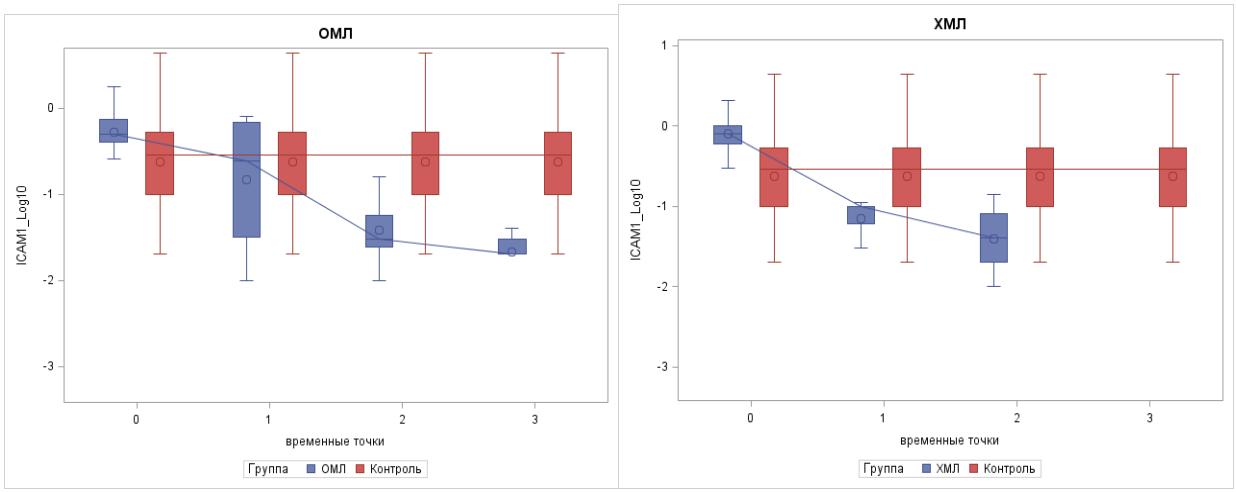


В ряде исследований были показаны стимулирующие эффекты IGF на разные типы клеток, в том числе, потенциирование роста кроветворных предшественников через взаимодействие с рецептором CXCR4, находящимся на поверхности клеток [102]. Возможно, этим механизмом можно объяснить повышение экспрессии этого гена на нулевой точке. Затем происходит закономерное снижение уровня экспрессии, отражая эффективность терапии. В последующем повышение экспрессии гена *IGF* можно объяснить его стимулирующим влиянием на дифференцировку ММСК.

4) ICAM

Также у больных ОМЛ и ХМЛ был показан повышенный уровень экспрессии гена *ICAM* в дебюте заболевания (Рис. 11).

Рисунок 11. Относительный уровень экспрессии гена *ICAM* в ММСК доноров и больных ОМЛ и ХМЛ до и в процессе лечения



Учитывая провоспалительные эффекты ICAM [238], оказываемые им в развернутой стадии лейкоза, это может объяснять наблюдаемое повышение уровня экспрессии его гена. Изменения динамики уровня показателя будет обсуждаться ниже.

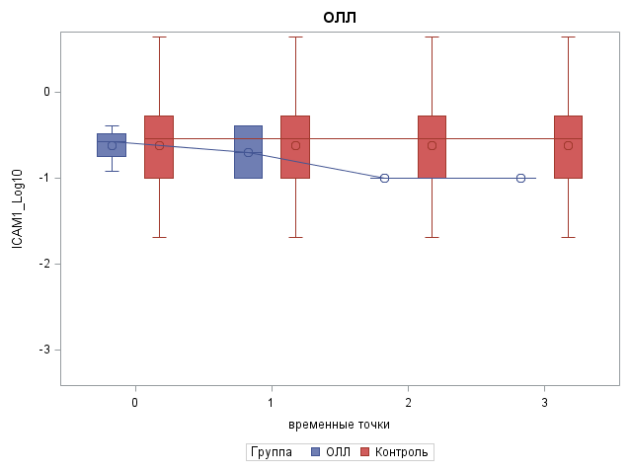
3.2.3.1.2 Гены, экспрессия которых на нулевой точке была нормальной

Экспрессия генов, ответственных за способность ММСК к самоподдержанию, миграции и дифференцировке

1) ICAM

У больных ОЛЛ было продемонстрировано уменьшение уровня экспрессии гена *ICAM* в ходе лечения, который был нормальным в дебюте заболевания (Рис. 12).

Рисунок 12. Относительный уровень экспрессии гена *ICAM* в ММСК доноров и больных ОЛЛ до и в процессе лечения

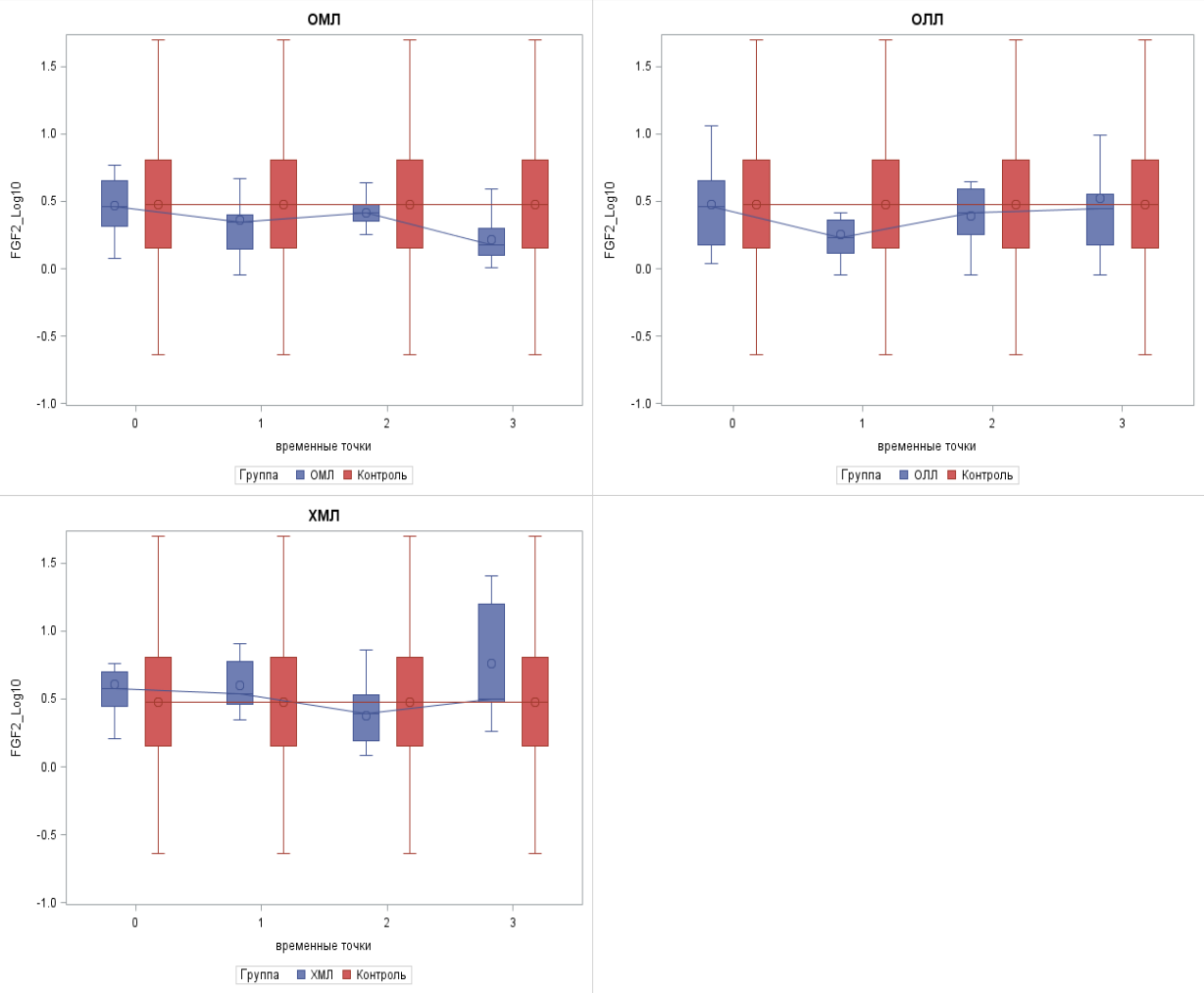


ICAM, как и VCAM, является одной и основных молекул адгезии, регулирует миграцию и дифференцировку клеток, а также их дифференцировку в адипоциты через МАРК-путь [45]. Таким образом, снижение его экспрессии также подтверждает теорию о неблагоприятных внешних условиях для ММСК, снижения возможностей для их пролиферации и дифференцировки клеток на фоне химиотерапии.

2) FGF2

В начале терапии изучаемых нами гемобластозов отмечалось незначительное снижение уровня экспрессии гена *FGF2*, который нормализовался в дальнейшем (Рис. 13).

Рисунок 13. Относительный уровень экспрессии гена *FGF2* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения



FGF2 обладает широким спектром митогенной активности и вовлечён в процессы опухолевого роста и инвазии, работает как модификатор миграции и пролиферации эндотелиальных клеток, а также как ангиогенный фактор. Было показано, что FGF2 повышает чувствительность клеток ОМЛ к воздействию цитокинов и ингибирует дифференцировку ММСК, блокируя внеклеточную активацию киназы и повышая уровни экспрессии рецептора FGF2 [135] .

Таким образом, снижение экспрессии данного гена в ходе терапии отражает её эффективность и восстановление нормального гемопоэза. Это подтверждает данные работы Mailloux и соавт. [150].

3) FGFR1 и 2

Также в процессе терапии было выявлено достоверное уменьшение экспрессии генов рецепторов FGF – FGFR1 и 2, уровень которой был исходно повышен, в большей степени, у больных ОМЛ и ХМЛ (Рис. 14 и 15).

Рисунок 14. Относительный уровень экспрессии гена *FGFR1* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения

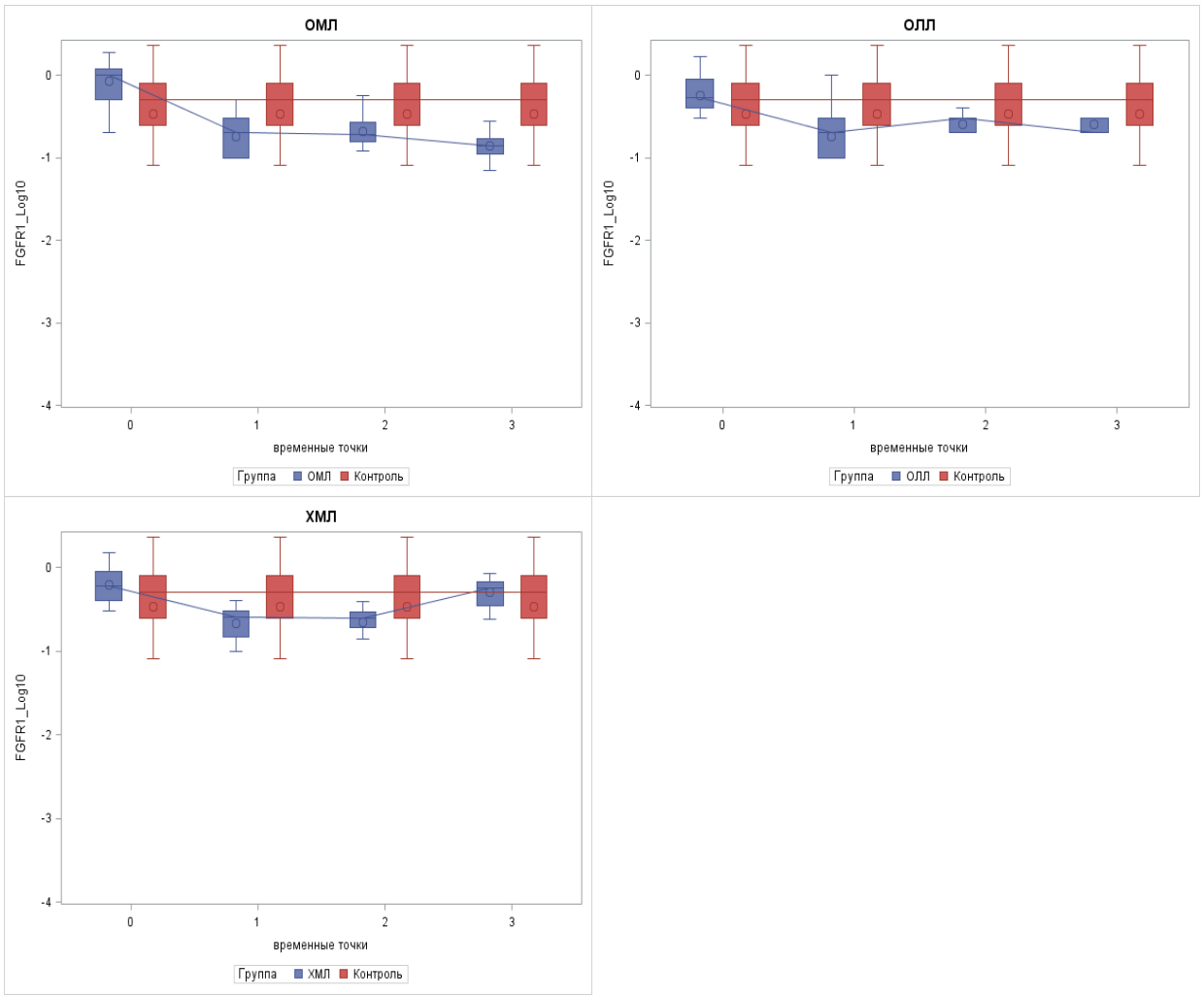
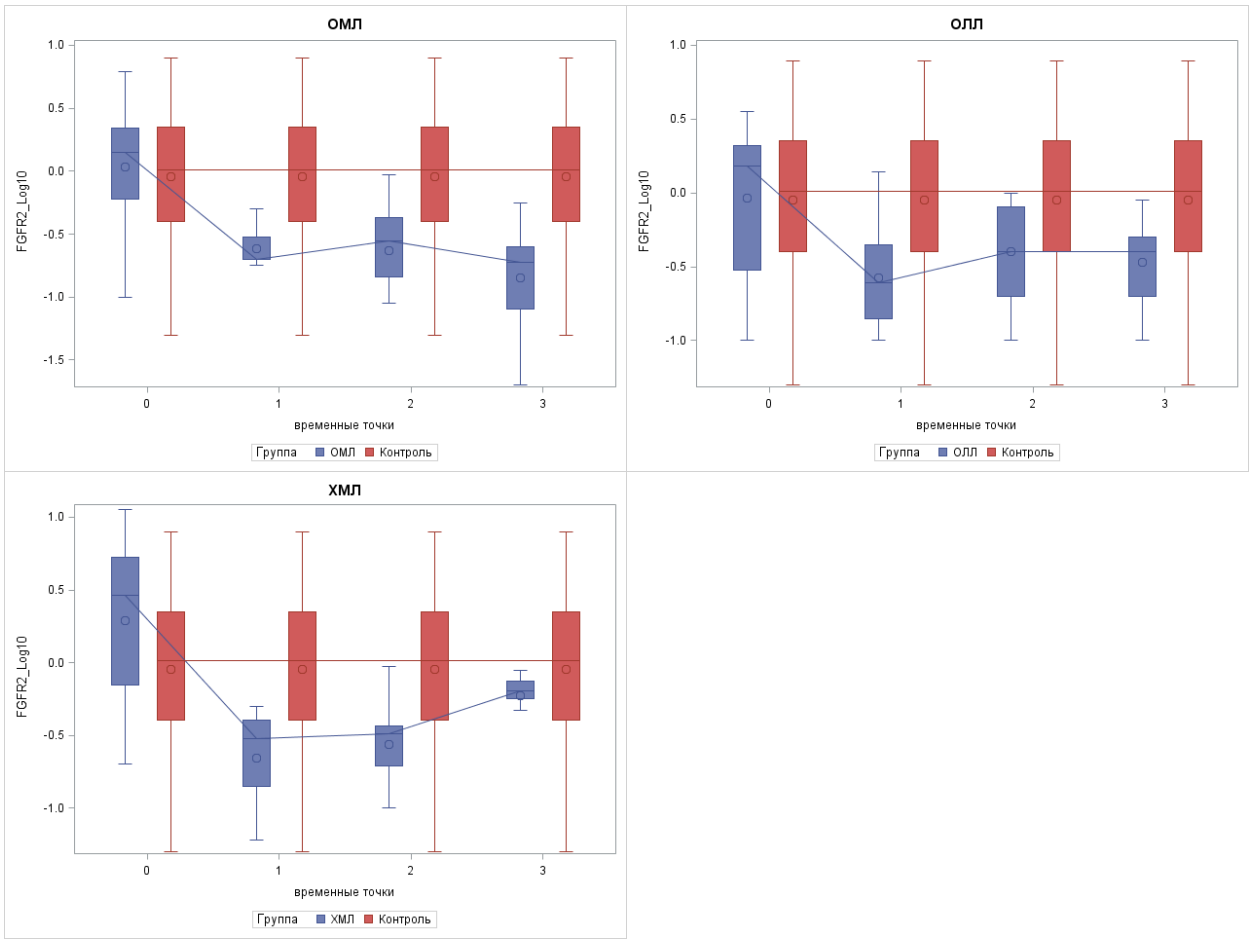


Рисунок 15. Относительный уровень экспрессии гена *FGFR2* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения



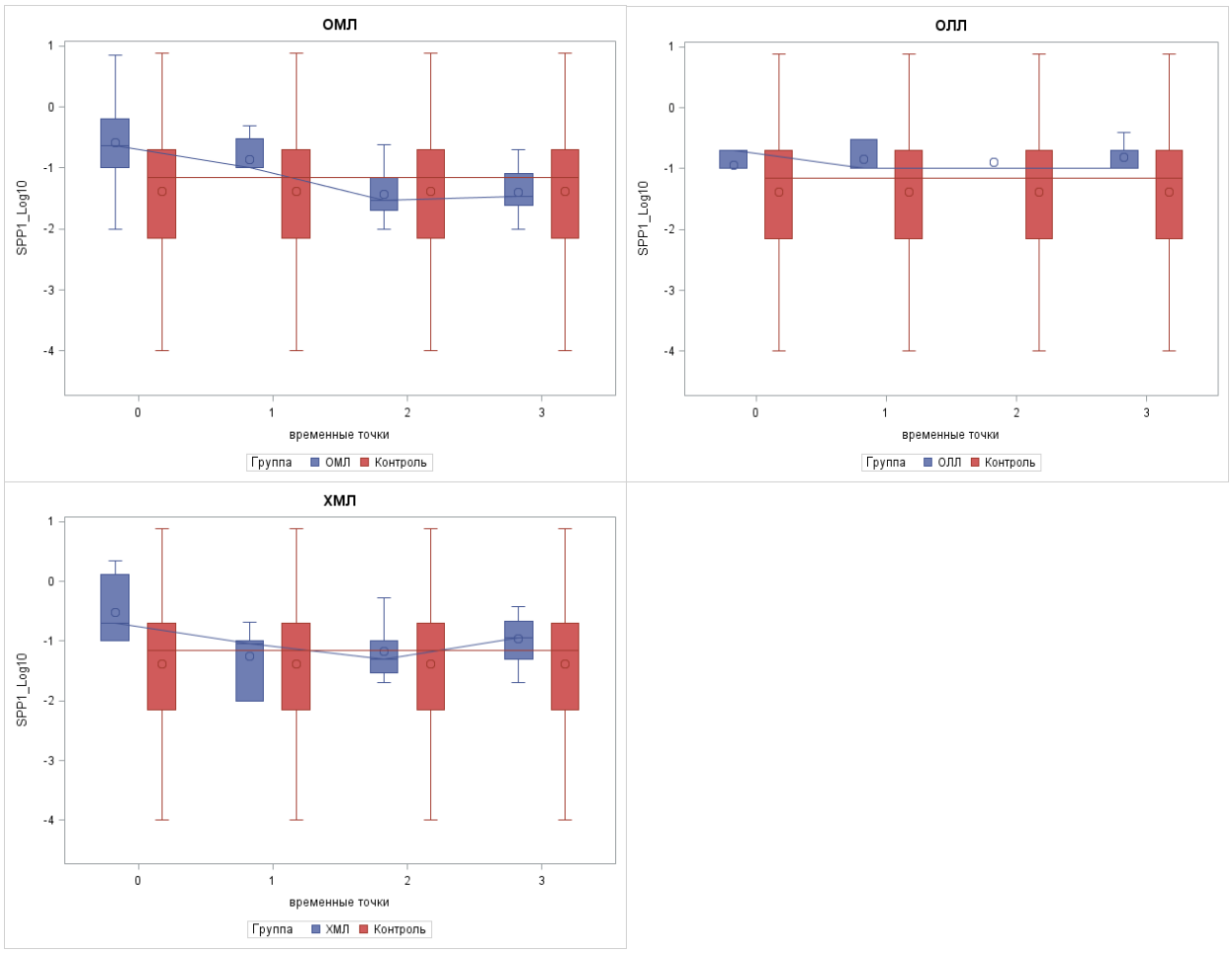
Было показано, что FGFR1 и 2 потенциируют остеогенную дифференцировку ММСК через пути ERK1/2 и протеинкиназы С [161]. Таким образом, снижение их экспрессии в ходе терапии отражает подстраивание микроокружения под потребности лейкозных клеток.

Экспрессия генов, ответственных за регуляцию кроветворения

1) Остеопонтин (SPP1)

Также в процессе терапии было показано снижение экспрессии гена *SPP1* (Рис. 16).

Рисунок 16. Относительный уровень экспрессии гена *SPP1* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения

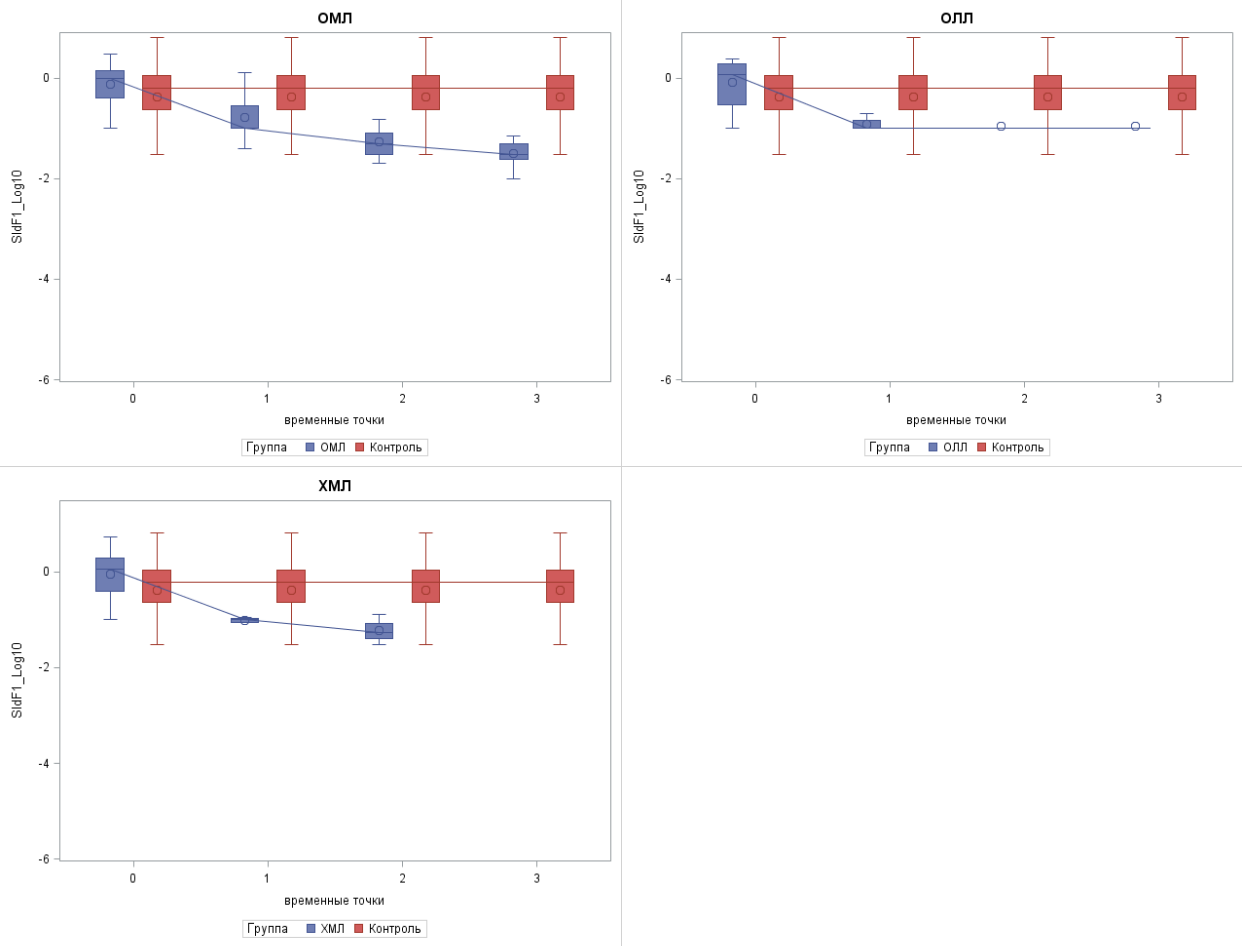


Продукт его экспрессии белок SPP1 регулирует число ГСК в КМ и является важным фактором активации остеокластов [211]. Было показано, что увеличенная экспрессия *SPP1* уменьшает пролиферативный потенциал ГСК [173]. Таким образом, повышенная его экспрессия на нулевой точке у больных ОМЛ может свидетельствовать об уменьшении пролиферативного потенциала нормальных ГСК. Нормализация его экспрессии на последующих точках может говорить о восстановлении этого потенциала в процессе терапии, а также нарушении процесса остеогенеза в ходе лечения.

2) Sdf1

В дебюте заболевания в группе больных острыми лейкозами наблюдался нормальный уровень экспрессии гена *Sdf1*, который на последующих точках неуклонно снижался (Рис. 17).

Рисунок 17. Относительный уровень экспрессии гена *Sdf1* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения



Это согласуется с данными предыдущих исследований о том, что лейкозные клетки модифицируют микроокружение, снижая уровень Sdf1 в местах локализации ММСК [132, 179, 182, 210]. Sdf1 стимулирует пролиферацию, и миграцию клеток, после взаимодействия с его рецептором стимулируется выживание ММСК. ММСК с высокой экспрессией *Sdf1* помогают гемопоэтической реконституции за счёт «хоуминга» CD34.

При хронической фазе ХМЛ в клетках стромы существенно снижается экспрессия *Sdf1*, что приводит к уменьшению количества здоровых кроветворных предшественников [156].

Снижение его экспрессии при острых лейкозах также отражает стрессовые условия для ММСК, а также нарушение «хоуминга» гемопоэтических клеток.

3) TGFb

Также исходно нормальный уровень экспрессии был отмечен для генов семейства *TGFb* в группе больных ОЛЛ и ХМЛ (у больных ОМЛ отмечено незначительное его повышение в дебюте). Однако на последующих точках отмечалось значительное снижение их экспрессии (Рис. 18,19).

Рисунок 18. Относительный уровень экспрессии гена *TGFb1* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения

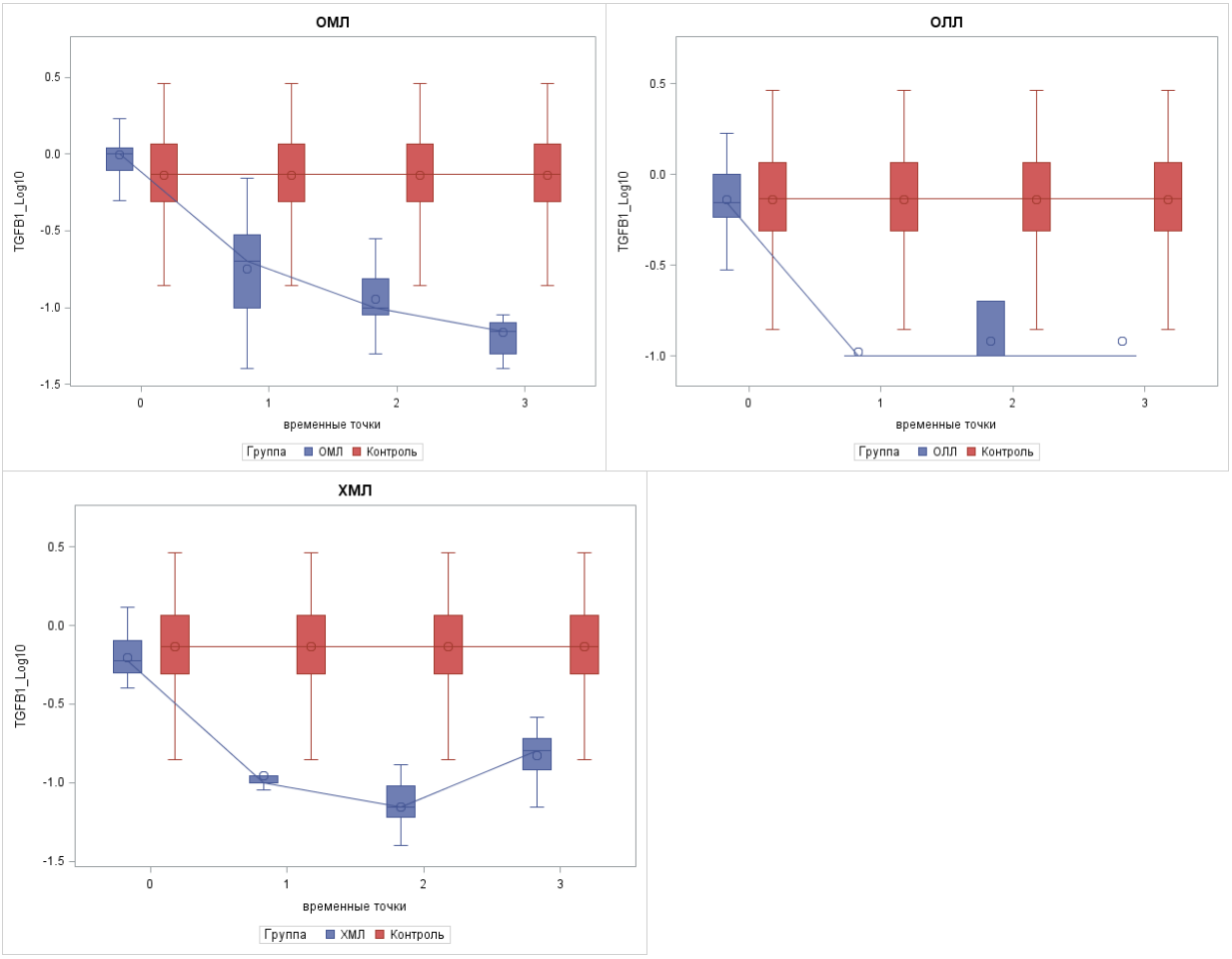
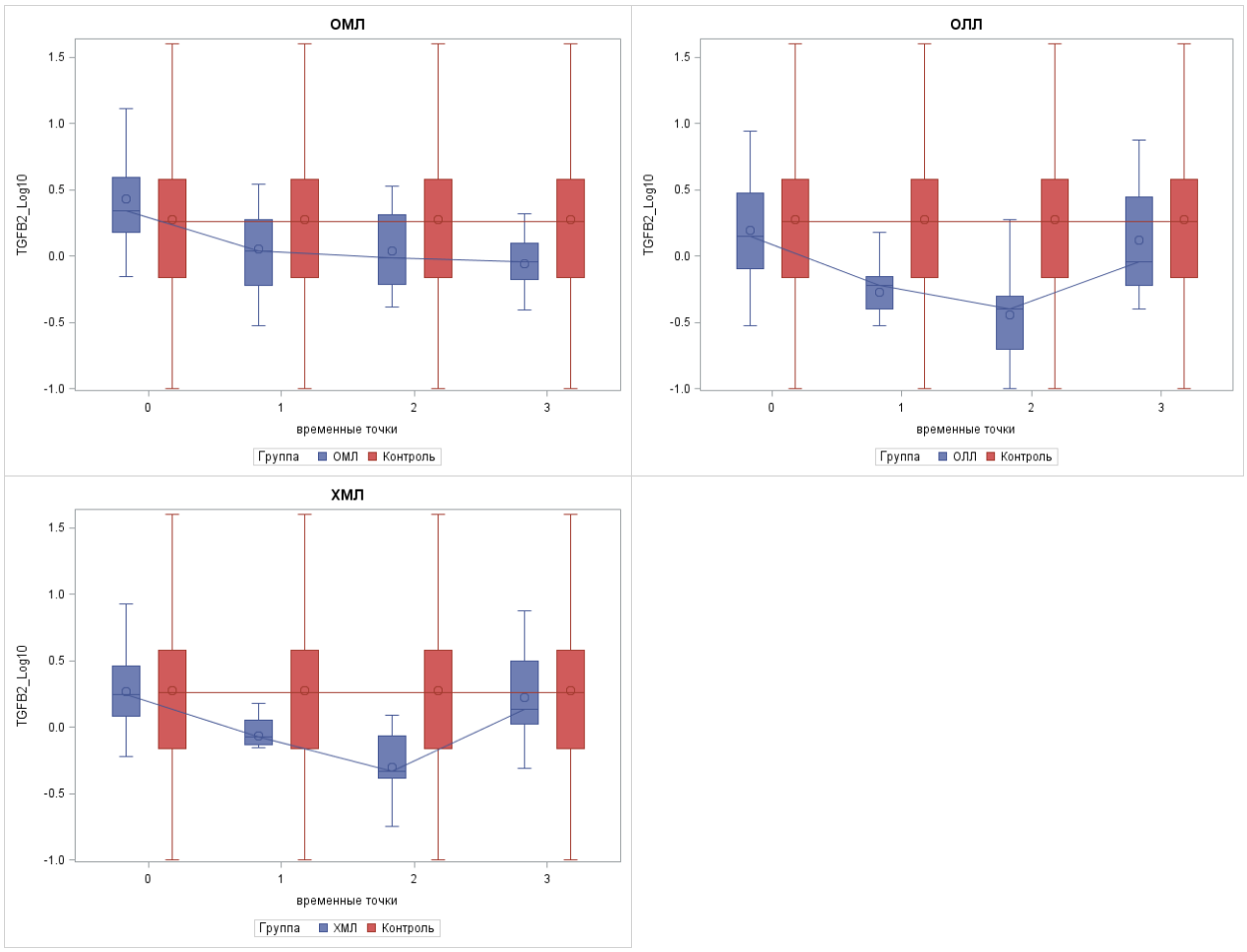


Рисунок 19. Относительный уровень экспрессии гена *TGFb2* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения



Широко известно, что белки семейства TGFb действуют как антипролиферативные факторы для гемопоэтических клеток. Данные белки ингибируют пролиферацию клеток через многочисленные сигнальные пути, включая SMAD, Марк, p38 и JNK [62, 119]. Кроме того, TGFb вовлечен в сигнальный путь SMAD, который является пусковым механизмом апоптоза [62]. Таким образом, уменьшение экспрессии ослабляет антипролиферативные эффекты TGF, восстанавливая механизмы нормальной регуляции клеток.

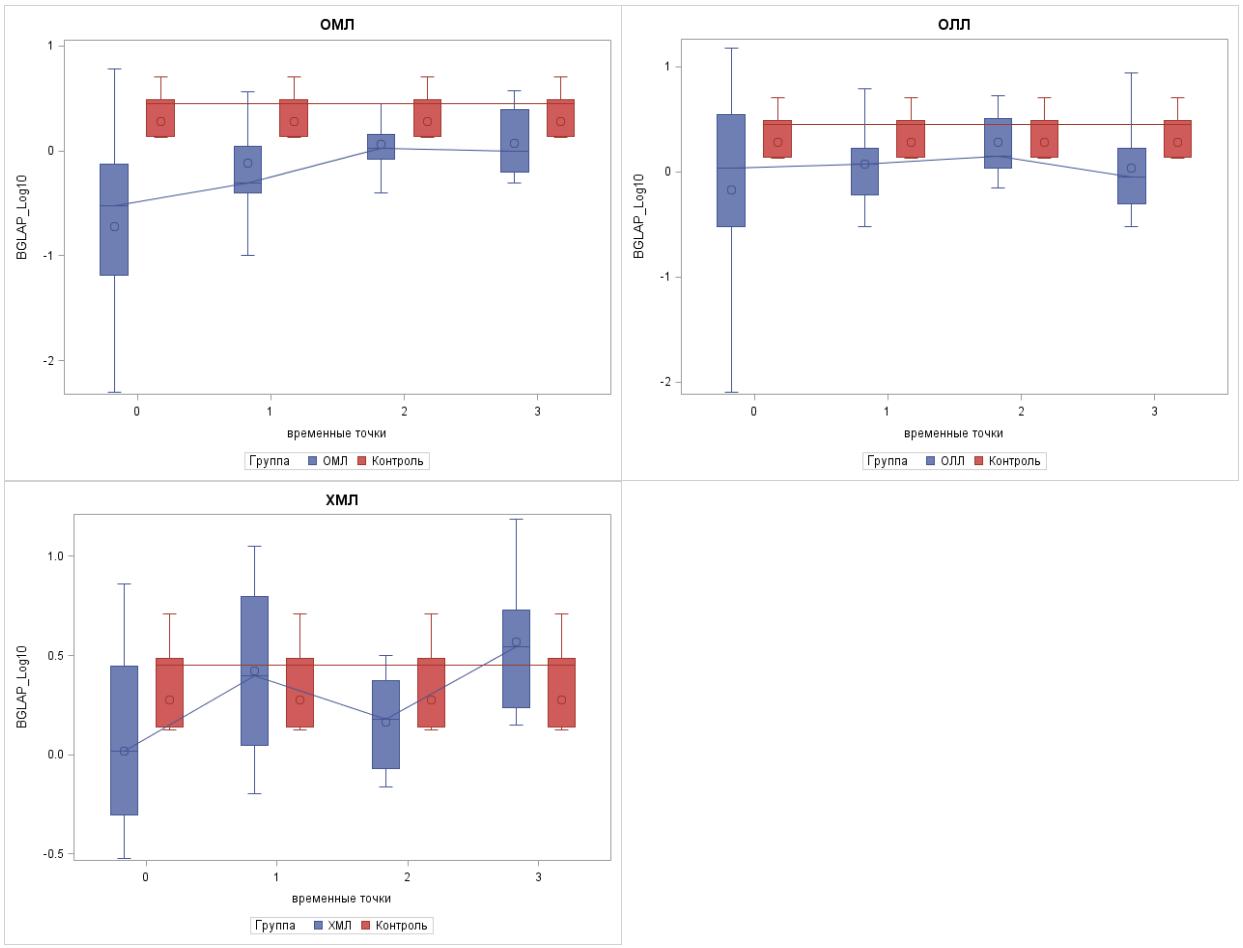
3.2.3.1.3 Гены, экспрессия которых на нулевой точке была снижена

Экспрессия генов, ответственных за морфогенез ММСК

1) Остеокальцин (BGLAP)

Было показано значительное снижение уровня экспрессии гена *BGLAP* в дебюте заболевания во всех группах пациентах и постепенное увеличение его уровня в ходе терапии (Рис 20).

Рисунок 20. Относительный уровень экспрессии гена *BGLAP* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения

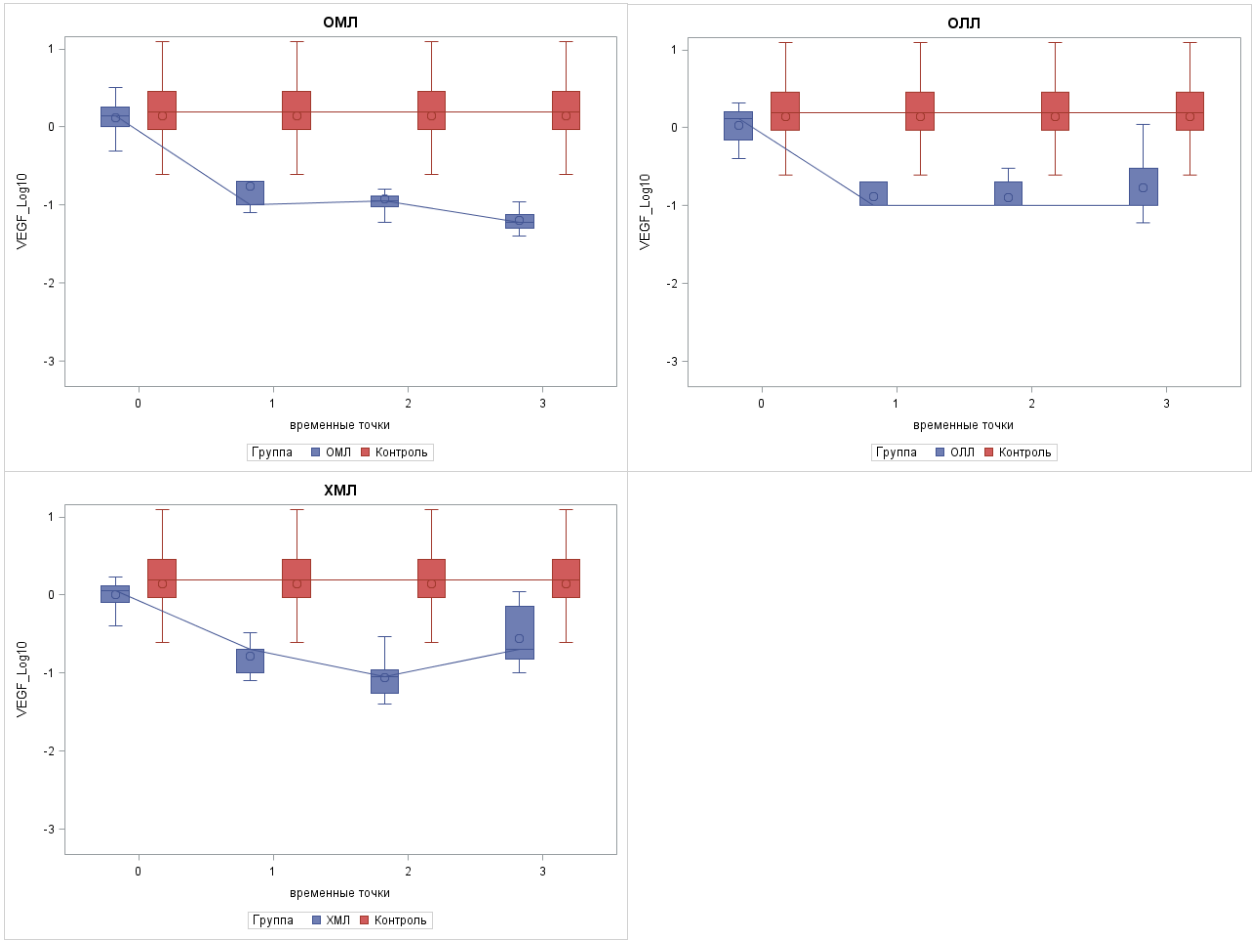


BGLAP является маркером позднего остеогенеза, поэтому сниженный уровень экспрессии его гена ожидаем по причине ингибирования дифференцировки ММСК во всех направлениях при развитии гематологического заболевания. В ходе лечения уровень экспрессии гена постепенно восстанавливается.

2) VEGF

В ходе работы было выявлено стойкое снижение экспрессии гена *VEGF* на всех исследуемых точках, что, наиболее вероятно, отражает супрессивный механизм для самих ММСК, подавляющий пролиферацию в условиях стресса (Рис. 21).

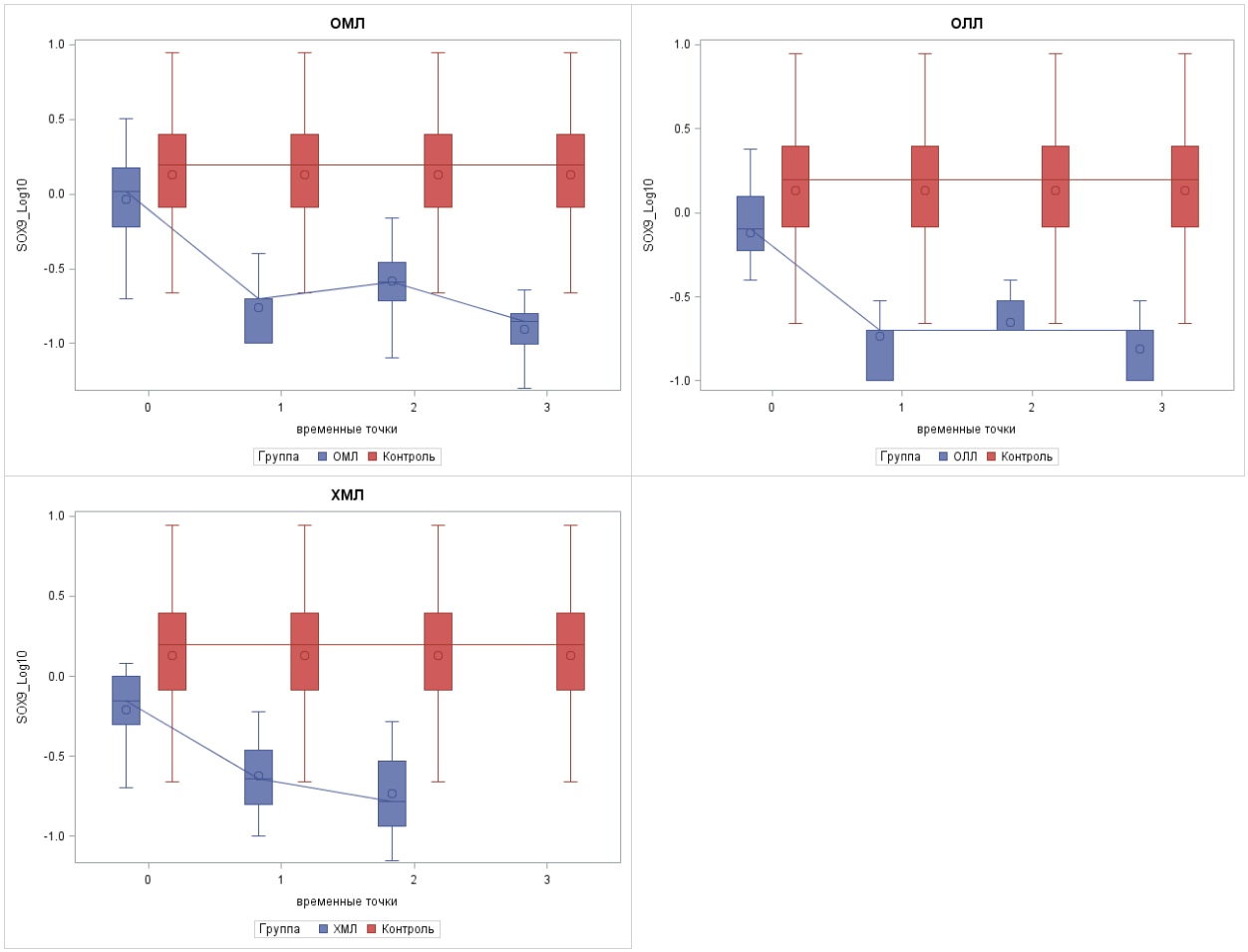
Рисунок 21. Относительный уровень экспрессии гена *VEGF* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения



3) SOX9

Также на всех точках во всех группах пациентов было выявлено стойкое снижение экспрессии гена *SOX9* (Рис. 22).

Рисунок 22. Относительный уровень экспрессии гена *SOX9* в ММСК доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения



Продукт экспрессии этого гена стимулирует хондрогенную [16, 141, 142] и адипогенную [212] дифференцировку ММСК, а также пролиферацию и экспрессию маркеров остеогенеза на стромальных клетках [213]. Сниженная его экспрессия отражает ингибирование дифференцировки ММСК в стрессовых условиях.

Таким образом, было показано, что в дебюте повышена экспрессия генов способствующих пролиферации лейкозных клеток и генов, ингибирующих пролиферацию и миграцию ММСК, в ходе терапии уровни генов, отвечающих за дифференцировку ММСК, восстанавливались.

3.2.3.2 Анализ экспрессии генов в ММСК больных различными гемобластозами в зависимости от статуса заболевания

В группе больных ОМЛ на первой точке 42% больных находились вне ремиссии заболевания. При детальном анализе полученных данных было показано, что, наряду с одинаковыми результатами по экспрессии некоторых генов, которые уже были описаны выше, у этих двух подгрупп пациентов имеются и различия.

Так, например, у пациентов, находящихся вне ремиссии ОМЛ, наблюдалось повышение уровня экспрессии генов, ответственных за регуляцию кроветворения, таких как *CSF*, *IGF* и *Jag1*, которые обладают способностью к стимуляции, наряду с нормальными ГСК, также и лейкозных клеток (Приложение 3).

При изучении генов, ответственных за морфогенез и дифференцировку ММСК, было показано, что у пациентов, находящихся вне ремиссии ОМЛ, были выявлены повышенные, по сравнению с группой в ремиссии, уровни экспрессии генов, подавляющих способность ММСК к миграции, например, *VCAM1*, а также сниженные уровни генов, продукты экспрессии которых отвечают за дифференцировку ММСК – *SPP1*, *BGLAP* и *SOX9*.

Интересно, что на второй точке, при сравнении тех же подгрупп, у пациентов, которые на предыдущей точке находились вне ремиссии заболевания, несмотря на её достижение к этому времени, эти отличия сохранялись. Такие же закономерности наблюдались при ретроспективном анализе тех же групп пациентов на нулевой точке (в момент диагностики заболевания) (Приложение 3).

В группе больных ОЛЛ к моменту 1 точки ремиссия не была достигнута только у 3-х пациентов, в связи с чем оценивать такую немногочисленную группу с использованием t-критерия Стьюдента не представляется возможным. Поэтому для анализа различий в этих группах применялся 95% доверительный интервал, построенный для значений в

группе пациентов в ремиссии. Было показано, что у пациентов, находящихся вне ремиссии заболевания, за пределы доверительного интервала выходили значения уровня экспрессии генов *Il*-6, *FGF2*, *VCAM*, которые были выше, чем у пациентов, находящихся в ремиссии заболевания. Это согласуется с вышеописанными гипотезами о том, что повышенный уровень экспрессии IL6 может свидетельствовать о способствовании лейкемической экспансии, а повышенные уровни генов *FGF2*, *VCAM*, ингибирующих процессы дифференцировки и миграции ММСК, - о нарушении процессов развития нормальных стромальных предшественников. Экспрессия этих генов сохранялась повышенной и на момент второй точки, хотя вне ремиссии на этот момент находилась только одна пациентка (Приложение 4).

У больных ХМЛ на сроке +3 мес смена терапии на препарат другого поколения ИТК был произведен у одного пациента. При анализе экспрессии генов у этого пациента, а также пациента, смена терапии которому была произведена в более поздний срок, были обнаружены, например, сниженные уровни экспрессии гена *ICAM*, стимулирующего процессы дифференцировки ММСК, а также повышенный уровень гена *LIF*, продукт экспрессии которого, напротив, ингибирует развитие и дифференцировку ММСК, отражая большее поражение стромы у этих пациентов. К моменту второй точки снизились уровни экспрессии и других генов, отвечающих за стромальную дифференцировку, таких как *Sdf1* и *BGLAP*, а также уровень экпрессии гена, продуктом которого является мощный митоген PDGFRB, что подтверждает предположение о наличии большего дефекта стромы у этих пациентов. К моменту третьей точки уровни экспрессии этих генов также сохранялись сниженными. Интересно, что на нулевой точке – в момент диагностики заболевания – такого снижения уровней экспрессии, за исключением снижения уровня экспрессии *PDGFRb*, не наблюдалось. Более того, уровни экспрессии генов *BGLAP*, *SPP1* и *SOX9* были даже выше границ доверительного интервала, свидетельствуя, вероятно, об одинаковом

состоянии стромы в дебюте заболевания, вне зависимости от последующего ответа на терапию препаратами ИТК (Приложение 5).

Таким образом, при отдельном анализе групп пациентов в ремиссии заболевания и вне её были подтверждены вышеописанные закономерности о большем поражении стромы у пациентов, находящихся в развёрнутой стадии гемобластозов.

3.2.3.3 Анализ различий экспрессии генов в ММСК больных различными гемобластозами в зависимости от протокола терапии

В процессе терапии пациентам проводилось лечение по различным протоколам в зависимости от статуса заболевания. Учитывая разный состав цитостатических препаратов, а также их дозы, представляется интересным проанализировать экспрессию генов в зависимости от проведённого лечения. Всем пациентам, страдающим ОМЛ, после установления диагноза была начата терапия по протоколу ОМЛ 01.10 [8]. Таким образом, все пациенты на точках 0 и 1 не различались по этому критерию. После оценки эффективности на первой точке нескольким пациентам терапия была заменена на терапию МДЦ (малые дозы цитарабина). На второй точке в этой группе пациентов уровни экспрессии некоторых генов выходили за границы доверительного интервала. Так, было показано, что у пациентов, получавших лечение МДЦ, была повышена экспрессия генов *IL*-6, *VCAM*, *TGFb1*, ингибирующих пролиферацию, миграцию и дифференцировку ММСК. При оценке экспрессии генов на третьей точке у этой группы пациентов было показано также снижение уровня экспрессии гена *CSF* по сравнению со значениями 95%-ого доверительного интервала (Приложение 6), что может свидетельствовать о большем поражении стромы у пациентов на этом протоколе терапии, несмотря на относительно меньшую его гематологическую токсичность.

Пациентам с диагнозом ОЛЛ проводилась терапия по протоколу ОЛЛ-2009 вне зависимости от статуса заболевания, и все пациенты достигли ремиссии на том или ином этапе.

Больным ХМЛ была начата терапия иматинибом, смена которой на препараты других поколений ИТК производилась при отсутствии ответа, таким образом, оценка разницы в экспрессии генов в зависимости от используемого препарата совпадает с таковой, уже проведённой в рамках изучения влияния статуса заболевания (см. выше).

В целом, было выявлено, что в ММСК в дебюте заболевания наблюдалось повышение уровней экспрессии генов, способствующих пролиферации лейкозных клеток (*IL-6, IL1b, IL1R1, CSF, LIF, Jag1,* а также *Sdf1* и *IGF1* в группе больных ХМЛ) и генов, ингибирующих пролиферацию и миграцию ММСК (*VCAM, PDGFRa*), которые впоследствие восстанавливались в ходе терапии, а также снижение уровней экспрессии генов, отвечающих за миграцию и дифференцировку ММСК (*VEGF* и *SOX9*). У пациентов вне ремиссии заболевания отмечались более высокие уровни генов, ингибирующих дифференцировку ММСК и сниженные уровни экспрессии генов, стимулирующих их дифференцировку, морфогенез и пролиферацию.

3.2.4 Концентрация КОЕф

Концентрация КОЕф отражается в количестве колоний клеток КОЕф, выросших за 2 недели. Более зрелые, чем ММСК, клетки-предшественники (КОЕф) могут поддерживать кроветворение и дифференцироваться в остеогенном и адипогенном направлениях. Было показано, что они также повреждаются у больных гематологическими заболеваниями. Концентрация их в КМ больных гемобластозами достоверно снижена по сравнению с таковой у доноров. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9. Концентрация КОЕф

	Точка	ОМЛ	ОЛЛ	ХМЛ	Доноры
Концентрация КОЕф на 10^6 клеток КМ	0	11,5 ± 4,6 *	8,3 ± 3,6*	15,8 ± 4,2*	25,4±3,1x10^6
	1	27,7 ± 4,4	30,3 ± 8,2	21,2 ± 4,4	
	2	16,3 ± 3,5	18,5 ± 6,5	12,6 ± 2,8 *	
	3	21,2 ± 3,7	28,9 ± 7,8	4,9 ± 1,1 *	

* указывает на статистически достоверные отличия от доноров, $p<0,05$

Как видно из таблицы, концентрация КОЕф в КМ больных ОМЛ в дебюте заболевания составила от 0 до 133 (в среднем, 11,5±4,6) x10^6 клеток КМ, что оказалось на 50% ниже таковой у доноров (p=0,02). Показатели на всех последующих этапах терапии (первая точка – от 0 до 75, в среднем, 27,7±4,4 x10^6, вторая точка – от 0 до 56, в среднем, 16,3±3,5 x10^6, третья точка – от 0 до 65, в среднем, 21,2±3,7 x10^6 клеток КМ) достоверно не отличались от группы здоровых доноров.

У больных ОЛЛ концентрация КОЕф достоверно снижена от группы здоровых доноров также только на нулевой точке, то есть, в дебюте заболевания, составляя от 0 до 60 (в среднем, 8,3±3,6) x10^6 клеток КМ (p = 0,001).

Показатели на последующих этапах терапии (первая точка – от 0 до 140, в среднем, 30,3±8,2 x10^6, вторая точка – от 0 до 85, в среднем, 18,5±6,5 x10^6, третья точка – от 0 до 106,5, в среднем, 28,9±7,8 x10^6 клеток КМ) достоверно не отличались от группы здоровых доноров.

У больных ХМЛ динамика показателей концентрации КОЕф отличалась от таковой у больных острыми лейкозами. На нулевой точке концентрация КОЕф составляла от 0 до 65 (в среднем, 15,8±4,2) x10^6 клеток КМ, что оказалось на 40% ниже таковой у доноров (p = 0,07). Значение этого показателя на первой точке достоверно не отличалась от группы доноров (от 0 до 68, в среднем, 21,2±4,4 x10^6 клеток КМ). Однако в отличие от больных

острыми лейкозами, на второй и третьей точках (+3 и +6 мес терапии препаратами ИТК соответственно) вновь было отмечено достоверное сокращение концентрации КОЕф. На второй точке этот показатель составил от 0 до 38,5, в среднем, 12,6±2,8 x10^6 клеток КМ, что оказалось на 50% ниже таковой у доноров ($p = 0,01$).

На третьей точке этот показатель составил от 0 до 13, в среднем, 4,96±1,1 x10^6 клеток КМ – 20% от таковой у доноров ($p < 0,05$).

Таким образом, концентрация КОЕф в группе ОЛ достоверно отличалась от таковой у здоровых доноров только на нулевых точках, то есть, в момент диагностики заболевания. Тогда как при ХМЛ концентрация предшественников фибробластов уменьшалась в ходе лечения, отражая прогрессирующее поражение стромы на фоне замедленной, по сравнению с острыми лейкозами, элиминацией опухолевого клона.

3.2.5 Экспрессия генов в КОЕф

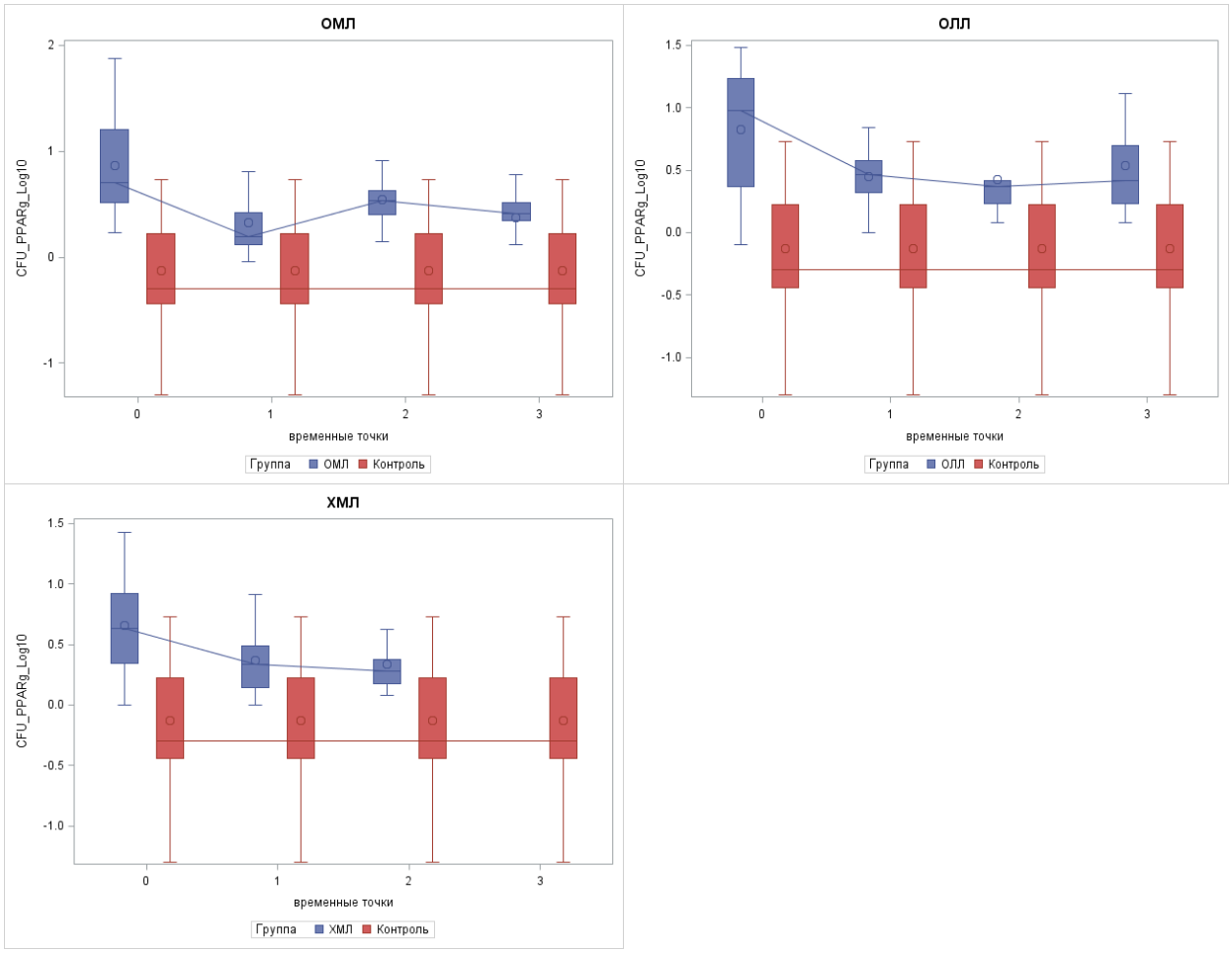
3.2.5.1 Особенности экспрессии генов в КОЕф

При анализе уровней экспрессии генов, участвующих в регуляции кроветворения, а также опосредовании морфогенеза и дифференцировки стромальных предшественников в КОЕф на разных сроках до начала и в процессе лечения, были выявлены некоторые закономерности.

1) PPARg

Прежде всего, было показано значительное снижение уровня экспрессии гена *PPARg* в ходе терапии, который, однако, оставался выше нормы. (Рис. 23).

Рисунок 23. Относительный уровень экспрессии гена *PPARg* в КОЕф доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения

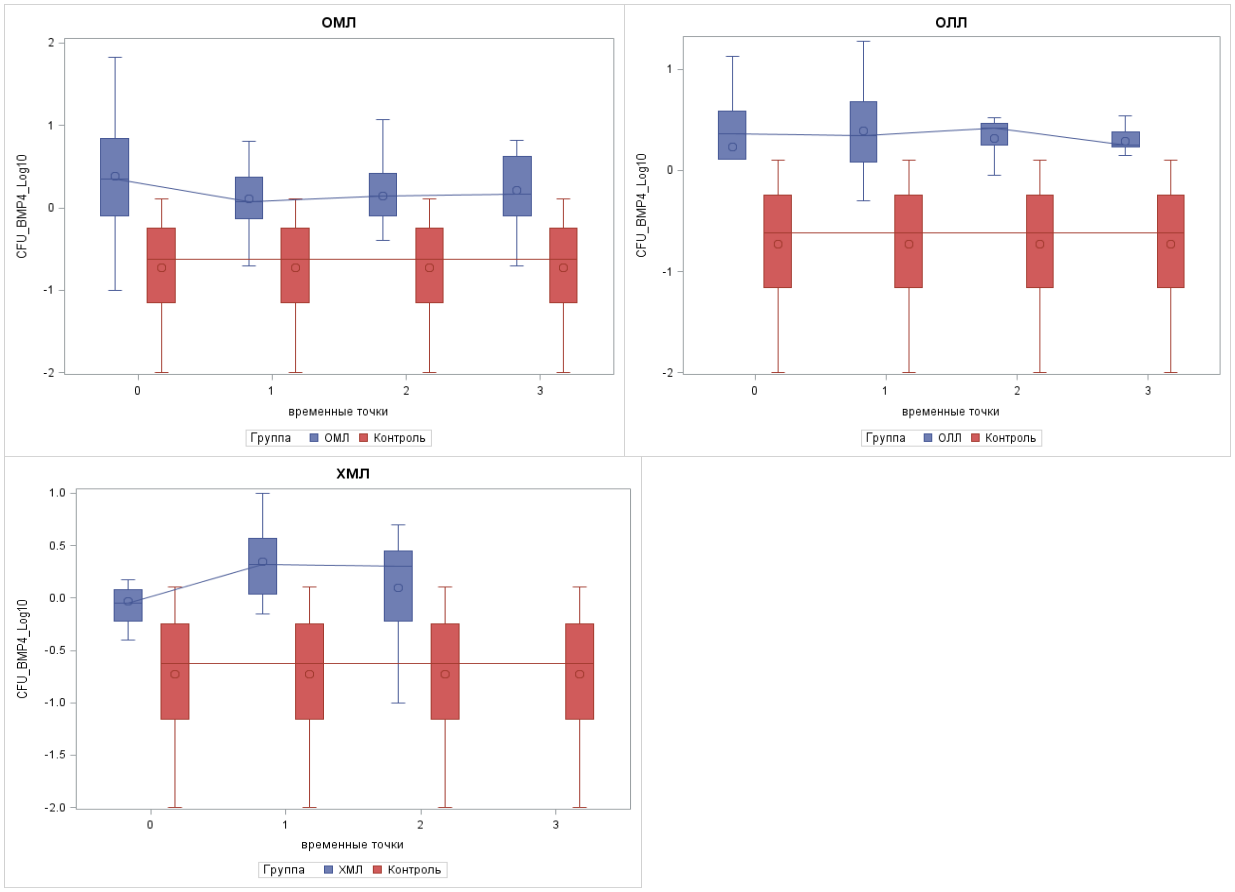


PPARg относится к генам, продукты экспрессии которых отвечают за морфогенез стромальных клеток. Был выявлен повышенный уровень РНК PPARg в образцах КМ и периферической крови больных ОМЛ [219]. В ряде исследований было показано, что лиганды рецепторов PPARg способны приводить к активации апоптоза, остановке клеточного цикла, снижению экспрессии ключевых генов, ответственных за пролиферацию опухолевых клеток, а также к стимуляции дифференцировки клеток [139]. Таким образом, повышенная экспрессия гена *PPARg* отражает стремление КОЕф остановить экспансию опухолевых клеток, а снижение его экспрессии в ходе терапии – эффективность лечения.

2) Костный морфогенетический белок BMP4

Также был продемонстрирован стойко повышенный уровень экспрессии гена *BMP4* в ходе терапии (Рис. 24).

Рисунок 24. Относительный уровень экспрессии гена *BMP4* в КОЕф доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения

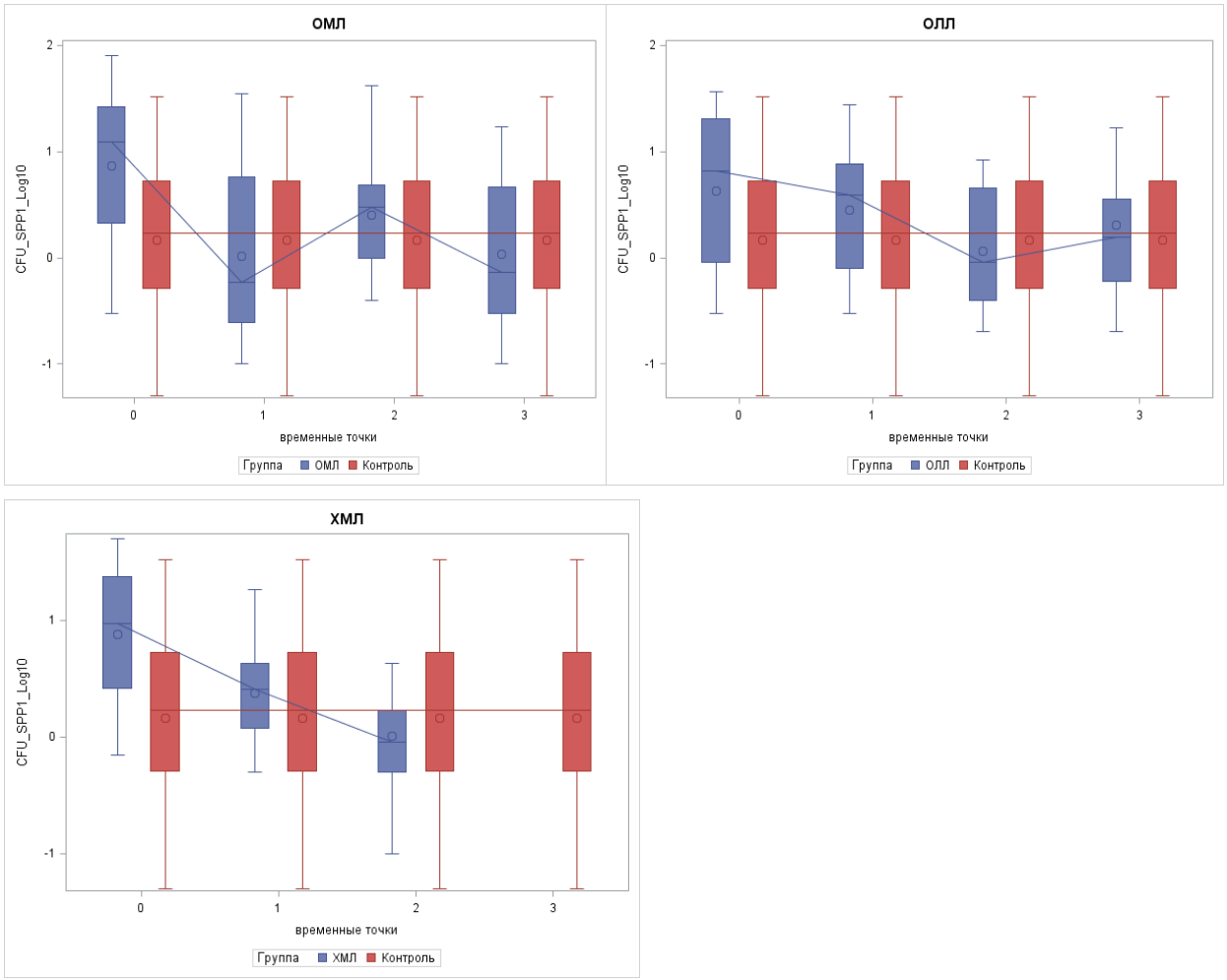


BMP4 является белком, регулирующим число и функционирование ГСК [88]. Это согласуется с данными литературы, в которых также был показан повышенный уровень РНК BMP4 в образцах крови и КМ больных ОМЛ [221] и ОЛЛ [230]. BMP4 является одним из ключевых белков, секретируемым клетками микроокружения, и регулирующим количество и функционирование как нормальных ГСК [88], так и ЛСК [53] в случае развития заболевания. Было показано, что BMP4 ингибирует пролиферацию клеток при острых лейкозах [230].

3) Остеопонтин (SPP1)

В процессе лечения также было продемонстрировано снижение исходно повышенного уровня экспрессии гена *SPP1* (Рис. 25).

Рисунок 25. Относительный уровень экспрессии гена *SPP1* в КОЕф доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения



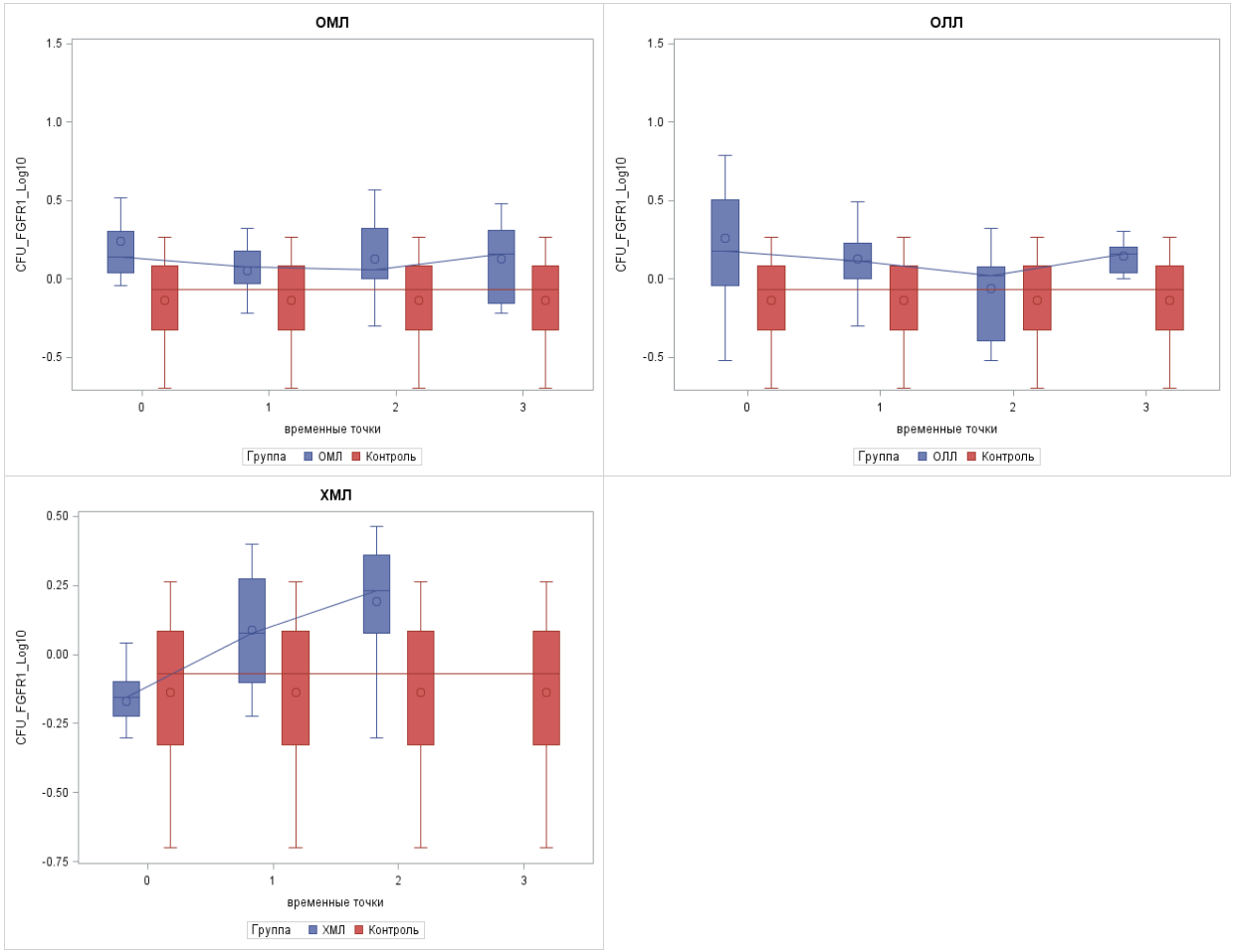
Этот белок отвечает за модулирование состояния покоя ГСК в КМ [144, 185]. Таким образом, полученные данные согласуются с результатами исследования Nilsson и соавт., в котором было показано, что увеличенная экспрессия SPP1 уменьшает пролиферативный потенциал ГСК при наблюдаемом повышении пролиферации бластных клеток [173]. Кроме того, недавнее исследование Hanoun и соавт. показало увеличение экспрессии гена *SPP1*в стромальных клетках мышей после воздействия на них лейкозных клеток in vivo [92]. Таким образом, полученные нами результаты

подтверждают данные литературы. Последующее снижение его экспрессии в ходе терапии отражает уменьшение воздействия лейкозных клеток, а повторное повышение его уровня – на восстановление стромального микроокружения и регуляции остеогенеза.

4) FGFR1

Также в процессе терапии было выявлено повышение уровня экспрессии генов *FGFR1* и *2* (Рис. 26).

Рисунок 26. Относительный уровень экспрессии гена *FGFR1* в КОЕф доноров и больных гемобластозами до и в процессе лечения



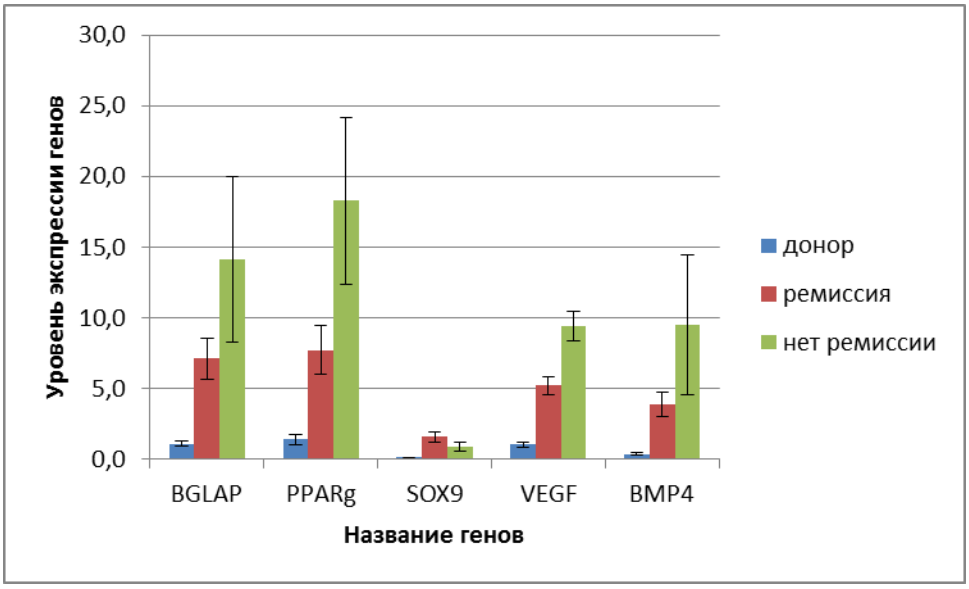
Так как лиганды к FGFR1 стимулируют пролиферацию стромальных клеток, повышение экспрессии его гена свидетельствует о восстановлении микроокружения в ходе терапии.

Таким образом, в рамках исследования был продемонстрирован в дебюте заболевания повышенный уровень экспрессии генов, регулирующих пролиферацию опухолевых клеток (*PPARG, BMP4, SPP1*), а в ходе терапии – повышение уровней экспрессии генов, стимулирующих морфогенез стромальных клеток.

3.2.5.2 Анализ экспрессии генов в КОЕф у больных различными гемобластозами в зависимости от статуса заболевания

У больных ОМЛ на первой точке 42% больных находились вне ремиссии заболевания. При детальном анализе было показано, что уровни экспрессии исследуемых генов в этих двух подгруппах отличался. Так, в момент диагностики заболевания у пациентов, у которых не будет достигнута ремиссия заболевания к первой точке, почти в 2 раза была повышена экспрессия генов *BGLAP*, *PPARG*, *VEGF* и *BMP4*, а также в 2 раза снижена экспрессия гена *SOX9* по сравнению с пациентами, у которых терапия оказалась эффективной к моменту исследования в первой точке (Рис. 27).

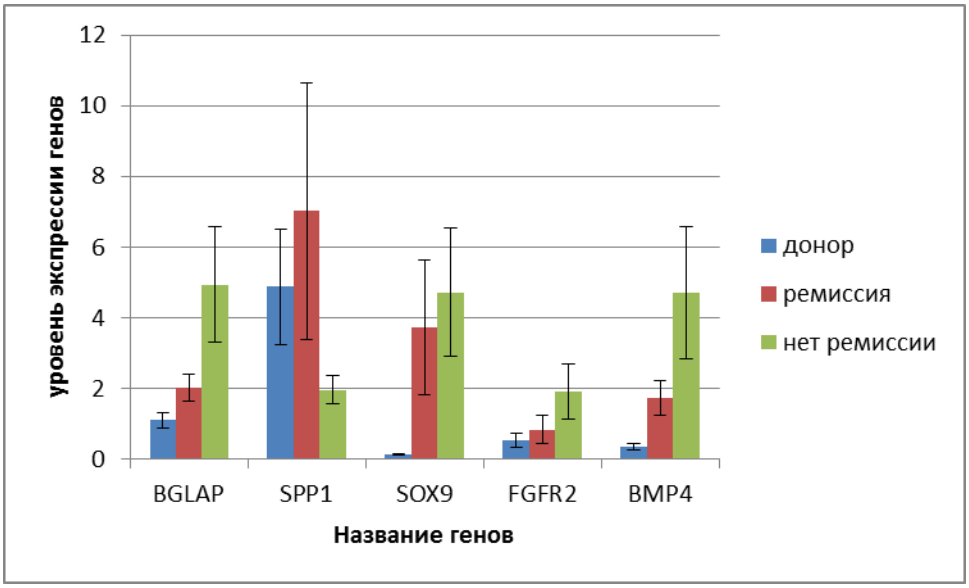
Рисунок 27. Относительные уровни экспрессии генов в КОЕф больных ОМЛ на нулевой точке в зависимости от достижения ПР в дальнейшем.



Наблюдаемая картина согласуется с вышеописанными закономерностями, что повышенная экспрессия гена *PPARg* отражает стремление КОЕф остановить экспансию опухолевых клеток, сниженная экспрессия гена *SOX9*, стимулирующего дифференцировку стромальных клеток, отражает ингибирование ее в стрессовых условиях гематологического заболевания, а повышенная экспрессия гена *BMP4* – одного из ключевых белков, регулирующих количество ГСК и ЛСК – большей необходимостью к ингибированию пролиферации лейкозных клеток в группе больных с рефрактерным течением заболевания.

К моменту исследования в первой точке сохранялись наблюдаемые закономерности. При исследовании на второй точке сохранялись повышенными уровни экспрессии генов *BGLAP*, *FGFR2* и *BMP4*, а также отмечалось почти трехкратное снижение экспрессии гена *SPP1* (Рис. 28), что может говорить о резком угнетении остеогенной дифференцировки стромальных предшественников в группе пациентов вне ремиссии заболевания.

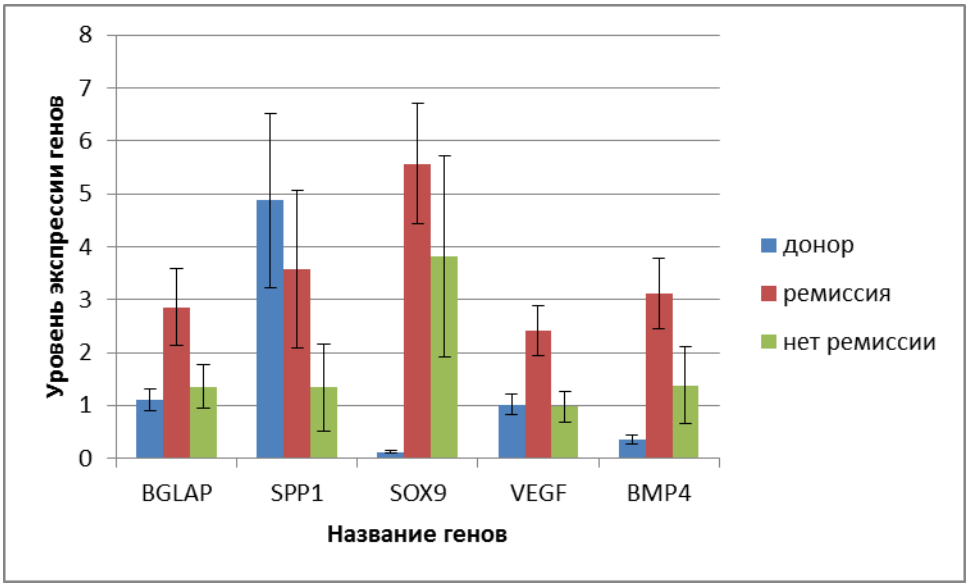
Рисунок 28. Относительные уровни экспрессии генов в КОЕф у больных ОМЛ на второй точке в зависимости от достижения ПР.



При исследовании на третьей точке уровни экспрессии всех вышеперечисленных генов в этой группе стали ниже, чем в группе больных,

достигших ремиссии к моменту первой точки (Рис. 29), что также отражает глубокий дефект микроокружения и ингибрование пролиферации и дифференцировки стромальных клеток.

Рисунок 29. Относительные уровни экспрессии генов в КОЕф больных на третьей точке



У больных ОЛЛ после 1-го курса индукции ремиссия не была достигнута только у 3-х пациентов, в связи с чем для анализа различий в этих группах применялся 95% доверительный интервал, построенный на данных больных в ремиссии. Было показано, что у пациентов, находящихся вне ремиссии заболевания, на первой точке за пределы доверительного интервала выходили значения уровня экспрессии генов *FGFR1* и *2*, *VEGF* и *BMP4*, которые были выше, чем у пациентов, находящихся в ремиссии заболевания, а также *FGF2*, уровень экспрессии которого был ниже, чем у пациентов, находящихся в ремиссии заболевания. Эти изменения сохранялись и на момент второй точки. Интересно, что к моменту третьей точки, уровни экспрессии этих генов снизились до границ доверительного интервала, а уровни экспрессии генов *SOX9*, *FGFR1* и *BMP4* стали даже ниже данных границ (Приложение 7), что полностью повторяет и согласуется с закономерностями, описанными выше для пациентов с ОМЛ вне ремиссии.

Среди больных ХМЛ «резистентными» считались пациенты, у которых не достигнут достаточный ответ на терапии иматинибом, и которым была произведена смена на другие препараты ИТК. При анализе экспрессии генов в этой группе на нулевой, первой и второй точках было обнаружено, что за пределы доверительного интервала выходили значения уровня экспрессии генов *BGLAP*, *PPARg*, *SPP1* и *FGFR2*, которые были выше, а также уровня экспрессии генов *SOX9* и *FGF2*, которые был ниже, чем у пациентов, достигших ответа на иматиниб (Приложение 8). Эти данные также совпадают с предположениями о большем поражении стромы у больных вне ремиссии заболевания, описанными нами для пациентов с острыми лейкозами.

При оценке экспрессии генов в КОЕф у больных различными нозологческими формами гемобластозов в зависимости от протокола терапии достоверных отличий выявлено не было.

Заключения

Таким образом, нами были получены культуры ММСК из образцов КМ, взятых в контрольные точки у больных онкогематологическими заболеваниями. Морфологически они не отличались от таковых, полученных от здоровых доноров. Все они имели типичную веретеновидную фибробластоподобную форму при анализе с помощью фазового контраста и демонстрировали способность к формированию колоний на пластике. При оценке культуральных характеристик были выявлены некоторые закономерности.

В группе больных острыми лейкозами время до первого пассажа было достоверно выше в дебюте заболевания, отражая экспансию опухолевых клеток и подавление ими нормального кроветворения, тогда как достоверное удлинение времени до первого пассажа на 2-й и 3-й точках, наиболее вероятно, обусловлено воздействием цитостатических препаратов. В группе больных ХМЛ достоверное удлинение этого показателя на всех точках

отражает длительную персистенцию заболевания и опухолевого клона под постоянным терапевтическим воздействием.

Показатель суммарной клеточной продукции был достоверно снижен на нулевой точке в группе пациентов с диагнозом ОМЛ, отражая нарушение пролиферативных способностей ММСК у этих больных в дебюте заболевания. Процент бластных клеток ни при одной из нозологий не коррелировал с культуральными характеристиками ММСК. При оценке генов в ММСК были выявлены следующие закономерности:

1. Повышенные на нулевой точке уровни экспрессии генов, способствующих пролиферации лейкозных клеток (*IL-6, IL-8, IL1b, CSF, Jag1*, а также *Sdf1* и *IGF1* в группе больных ХМЛ), снижаются далее в ходе терапии.

2. Повышенные (*VCAM*) или сниженные (*FGF2, TGF a* и *b*) на нулевой точке уровни экспрессии генов, ингибирующих пролиферацию и миграцию ММСК, снижаются далее в ходе терапии.

3. На нулевой точке выявлено повышение уровней экспрессии генов, снижающих пролиферативный потенциал нормальных ГСК (*SPP1*)

4. В ходе терапии выявлено повышение уровней экспрессии генов, отвечающих за пролиферацию, миграцию и дифференцировку ММСК (*IL1R1, PDGERa, IGF, FGFR1* и *2, SPP1, BGLAP*).

5. У пациентов вне ремиссии ОЛ обнаружено повышенные уровней экспрессии генов, способствующих пролиферации лейкозных клеток по сравнению с больными в ремиссии.

6. У пациентов вне ремиссии ОЛ выявлялось снижение уровней экспрессии генов, отвечающих за пролиферацию, миграцию и дифференцировку ММСК по сравнению с больными в ремиссии.

7. У пациентов на фоне длительного низкодозного цитостатического воздействия обнаруживается снижение уровней

экспрессии генов, отвечающих за дифференцировку ММСК по сравнению с пациентами, получающими импульсную высокодозную химиотерапию.

Концентрация КОЕф в группе острых лейкозов была достоверно снижена по сравнению с группой здоровых доноров только на нулевых точках, то есть, в момент диагностики заболевания, тогда как при ХМЛ концентрация этой группы предшественников снижалась в ходе терапии, отражая прогрессирующее поражение стромы продолжающейся терапией на фоне замедленной, по сравнению с острыми лейкозами, элиминацией опухолевого клона.

При оценке экспрессии генов в КОЕф были выявлены следующие закономерности:

1. Повышение уровней экспрессии генов, регулирующих пролиферацию опухолевых клеток (*PPARG, BMP4, SPP1*) в дебюте гемобластозов
2. Повышение уровней экспрессии генов, стимулирующих морфогенез и дифференцировку стромальных клеток в ходе терапии.
3. Повышенные уровни экспрессии генов, ингибирующих пролиферацию и дифференцировку стромальных клеток у пациентов вне ремиссии ОЛ по сравнению с таковыми, достигшими ее..

Выводы

1. В мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках (далее мезенхимальные клетки), полученных из костного мозга больных острыми лейкозами и хроническим миелолейкозом, при отсутствии морфологических отличий от клеток здоровых доноров, были выявлены значимые изменения в культуральных характеристиках.
2. У больных острыми лейкозами в дебюте заболевания показатель времени до первого пассажа мезенхимальных клеток достоверно выше (17,6 ± 0,6 дней при острых миелоидных лейкозах, 19,8 ± 1,4 дней при острых лимфобластных лейкозах; $p < 0,05$), чем у здоровых доноров (13,7±0,3 дней). Этот показатель достигает нормальных значений после индукции и вновь увеличивается на всех этапах консолидирующего лечения. У больных хроническим миелолейкозом значение этого показателя достоверное увеличено, по сравнению со здоровыми донорами, на всех этапах терапии (от 16,7 ± 0,8 до 18,2 ± 1,0 дней; $p < 0,05$).
3. Показатель суммарной клеточной продукции мезенхимальных клеток у больных острыми миелоидными лейкозами в дебюте заболевания достоверно снижен ($4,8 \pm 0,7 \times 10^6$ клеток; $p < 0,05$), по сравнению со здоровыми донорами ($7,1 \pm 1 \times 10^6$ клеток).
4. При оценке экспрессии генов в мезенхимальных клетках больных острыми лейкозами и хроническим миелолейкозом выявлено повышение в дебюте заболевания уровня экспрессии генов, продукты которых способствуют пролиферации лейкемических клеток (*IL-6, IL-8, IL1b, CSF, JAG1, SPP1, SDF1*) и ингибируют пролиферацию и миграцию стромальных клеток (*ICAM, VCAM*). В процессе терапии уровень экспрессии этих генов снижается. В ходе лечения повышается уровень экспрессии генов, продукты которых отвечают за пролиферацию, миграцию и дифференцировку мезенхимальных клеток, что отражает

восстановление стромального микроокружения в процессе терапии (*IL1R1, PDGERa, IGF, FGFR1 и 2, BGLAP*).

5. Обнаружено, что у больных вне ремиссии заболевания ингибирование стромы глубже, по сравнению с пациентами, достигшими ремиссии заболевания. У пациентов на фоне длительного низкодозного цитостатического воздействия выявляется более глубокое снижение уровня экспрессии генов, отвечающих за дифференцировку стромальных клеток, по сравнению с пациентами, получающими импульсную высокодозную химиотерапию.
6. Продемонстрировано, что концентрация колониеобразующих единиц фибробластов у больных острыми лейкозами достоверно ниже (11,5 ± 4,6x10^6 клеток костного мозга для больных острыми миелоидными лейкозами, 8,3 ± 3,6 x10^6 клеток костного мозга для больных острыми лимфобластными лейкозами; $p < 0,05$), по сравнению со здоровыми донорами (25,4±3,1x10^6 клеток костного мозга), только в момент диагностики заболевания. У больных хроническим миелолейкозом концентрация этих предшественников снижалась в ходе терапии (от 15,8 ± 4,2x10^6 клеток костного мозга в дебюте заболевания до 4,9 ± 1,1x10^6 клеток костного мозга после 12 месяцев терапии иматинибом), отражая нарастающее поражение стромы на фоне продолжающейся терапией при замедленной, по сравнению с острыми лейкозами, элиминации опухолевого клона.
7. В колониеобразующих единицах фибробластов больных острыми лейкозами и хроническим миелолейкозом в дебюте заболевания было выявлено повышение уровня экспрессии генов, продукты которых регулируют пролиферацию опухолевых клеток (*PPARG, BMP4, SPP1*). В ходе терапии показано повышение уровня экспрессии генов, продукты которых стимулируют морфогенез и дифференцировку стромальных клеток.

Приложения

Приложение 1. Клинические характеристики больных гемобластозами на различных точках

Инициалы	возраст	Диагноз	бласты в дебюте	Кариотип	протокол лечения	Точка		Точка 2		Точка 3		дата ремиссии	дата рецидива	дата смерти	причина смерти
ЗСА	32	ОМЛ М4	70%	N	ОМЛ 01.10	0.8%	ОМЛ 01.10	2.8%	ОМЛ 01	-	ОМЛ 01.10	04.07.2013	05.02.2014		
КЮВ	23	ОМЛ М2	64%	t(8;21)	ОМЛ 01.10	-	-	-	-	-	-	abs		07.06.2014	сепсис
ДМВ	54	ОМЛ М4	89%	N	ОМЛ 01.10	-	ОМЛ 01.10	2.3%	ОМЛ 01	17%	МДЦ	15.07.2013	10.12.2013		
ВАС	42	ОМЛ М2	48%	-	ОМЛ 01.10	-	ОМЛ 01.10	-	-	-	-	05.08.2013	abs	сен.13	сепсис
ТТВ	54	ОМЛ	94%	47XX + mar [4]/46,XX [16]	ОМЛ 01.10	-	ОМЛ 01.10	-	-	-	-	abs		09.07.2013	отёк г/м, вклинение
КЕВ	52	ОМЛ М4	60%	tris 8	ОМЛ 01.10	6,4%	ОМЛ 01.10	1,6%	ОМЛ 01	2%	ОМЛ 01.10	26.11.2013	03.09.2015		
ЧАА	41	ОМЛ	41%	N	ОМЛ 01.10	0.8%	ОМЛ 01.10	1.2%	ОМЛ 01	0%	ОМЛ 01.10	15.10.2013	abs		
ГЕС	39	ОМЛ М4	62%	N	ОМЛ 01.10	64%	HAM	3% и 1.5%	IdAC Ida	1.2%	алло-ТКМ	10.12.2013	abs		
АВВ	35	ОМЛ М4	80%	N	ОМЛ 01.10	1.6%	МДЦ + этопозид	1.2%	МДЦ + этопози	4.4%	ВДЦ	(16.01.2014 к/м)25.02.2014	abs		
НВА	21	ОМЛ М0	90%	N	ОМЛ 01.10	82.5%	МДЦ	2%	МДЦ	3%	МДЦ	03.02.2014	abs		
ШМН	53	ОМЛ М2	84%	del (9)	ОМЛ 01.10	-	-	-	-	-	-	abs		01.01.2014	субдуральная гематома, отёк г/м, вклинение
БЕЕ	20	ОМЛ М3	91%	t(15;17)	AIDA	0.8%	AIDA	2.4%	AIDA		AIDA	22.01.2014	abs		
ЗИС	32	ОМЛ М4	93%	N	ОМЛ 01.10	24%	МДЦ + этопозид	-	МДЦ + этопози	3.2%	МДЦ + этопозид	15.05.2014	abs		
АДА	43	ОМЛ М6	19.8%	N	МДЦ	13%	ОМЛ 01.10	-	ОМЛ 01	2.2%	ОМЛ 01.10				
НЕЮ	33	ОМЛ М4	61%	N	ОМЛ 01.10	36%	ОМЛ 01.10	2%	ОМЛ 01	2%	ОМЛ 01.10	15.04.2014	abs		
КЗМ	31	ОМЛ М2	34%	t(8;21), del (9)	ОМЛ 01.10	-	-	-	-	-	-	abs		12.03.2014	отёк лёгких, лёгочное кровотечение
МРА	42	ОМЛ М1	41%	N	ОМЛ 01.10	-	ОМЛ 01.10	2%	ОМЛ 01	0,8%	ОМЛ 01.10		12.05.2015		
СИМ	43	ОМЛ М4	60%	N	ОМЛ 01.10	-	-	-	-	-	-	abs		24.04.2014	сепсис
ИВВ	25	ОМЛ М4	94%	N	ОМЛ 01.10	1.4%	ОМЛ 01.10	0%	ОМЛ 01	2.2%	ОМЛ 01.10	04.06.2014	abs		
ПГВ	24	ОМЛ М4	86.6%	del(17p13)	ОМЛ 01.10	-	-	-	-	-	-	abs		04.09.2014	сепсис
РМА	30	ОМЛ М4	76%	N	ОМЛ 01.10	1,8%	ОМЛ 01.10	1,2%	ОМЛ 01	0,80%	алло-ТКМ	30.06.2014	abs	21.09.2015	сепсис
ГЦЦ	59	ОМЛ М4	48.8%	N	ОМЛ 01.10	0.8%	ОМЛ 01.10	2%	МДЦ	-	МДЦ	16.09.2014	abs		
БВХ	51	ОМЛ М5	22%	N	ОМЛ 01.10	11.2%	ОМЛ 01.10	74%	МДЦ+этозид+вонностат	-	-	abs		05.11.2014	сепсис
ВНС	61	ОМЛ М0	47.6%	N	ОМЛ 01.10	7%	ОМЛ 01.10	2,4%	ОМЛ 01	8,8%	МДЦ	20.10.2014	abs		
АЭХ	51	ОМЛ М0	61%	45XX + del (9)(q22) [20]/48XX +8 +9 del (9)(q22) [15]/46XX [4]	ОМЛ 01.10	4%	ОМЛ 01.10	-	ОМЛ 01	-	ОМЛ 01.10	09.10.2014	abs		
ЕАГ	58	ОМЛ М4	65.6%	46XX inv (16)(p13q22) [20]	ОМЛ 01.10	0.4%	ОМЛ 01.10	0,8%	ОМЛ 01	4,4%	ОМЛ 01.10	13.10.2014	abs		
ММК	34	ОМЛ М1	58%	N	ОМЛ 01.10	2%	ОМЛ 01.10	-	ОМЛ 01	-	ОМЛ 01.10	30.10.2014	abs		
БВВ	22	ОМЛ М4	22%	t(3;5)(q25; q34-35)	ОМЛ 01.10	0.8%	ОМЛ 01.10	1,2%	ОМЛ 01	0,5%	ОМЛ 01.10	12.11.2014	abs	09.10.2015	ПОН
КСН	56	ОМЛ М4	27.6%	N	ОМЛ 01.10	33.6%	ОМЛ 01.10	68%	МДЦ	65%	МДЦ	abs	abs		
ЗЯГ	22	ОМЛ М0	90%	del (7)	ОМЛ 01.10	90%	ТДЛ	-	-	-	-	abs		24.02.2015	отёк лёгких
ПАВ	26	ОМЛ М4	29.6%	inv (7)	ОМЛ 01.10	2%	ОМЛ 01.10	0,8%	ОМЛ 01	0,40%	ОМЛ 01.10	17.12.2014	19.08.2015		
ДОД	53	ОМЛ М2	87%	N	ОМЛ 01.10	2%	ОМЛ 01.10	-	ОМЛ 01	0.4%	ОМЛ 01.10	02.03.2015	20.08.2015		
АРМ	33	ОМЛ	90%	N	-	-	-	-	-	-	-	abs		22.04.2015	

КЕН	30	ОЛЛ Т	87%		ОЛЛ-2009	1,6%	ОЛЛ-2009	2,0%	ОЛЛ-200	0,8%	ОЛЛ-2009	18.10.2013	abs		
РАА	23	ОЛЛ В2	90%		ОЛЛ-2009	2,4%	ОЛЛ-2009	1,6%	ОЛЛ-200	3,2%	ОЛЛ-2009	16.10.2013	abs		
КЕБ	40	ОЛЛ Взр	91.2%		NHL-BFM-90	2%	NHL-BFM-9	0,4%	NHL-BF 90	1,6%	R-CHOP	10.12.2013	abs		
НАМ	33	ОЛЛ Т	96%		ОЛЛ-2009	35%	ОЛЛ-2009	2,8%	ОЛЛ-200	0.4%	ОЛЛ-2009	14.03.2014	abs		
ГДМ	26	ОЛЛ Т	80%		ОЛЛ-2009	2%	ОЛЛ-2009	3,4%	ОЛЛ-200	0,6%	ОЛЛ-2009	30.12.2013	abs		
СДН	24	ОЛЛ Т	88%		ОЛЛ-2009	2,4%	ОЛЛ-2009	2%	ОЛЛ-200	2,8%	ОЛЛ-2009	27.02.2014	abs		
АЕЕ	31	ОЛЛ В1	97%		ОЛЛ-2009	-		-		-		27.03.2014	abs	08.04.2014	зигомикоз
КМИ	17	ОЛЛ Всом	92%		ОЛЛ-2009	-		-		-					
БАА	19	ОЛЛ Всом	78%		ОЛЛ-2009	3,4%	ОЛЛ-2009	0,8%	ОЛЛ-200	0,4%	ОЛЛ-2009	08.07.2014	abs		
БНА	23	ОЛЛ Т	73%		ОЛЛ-2009	81%	ОЛЛ-2009	2%	ОЛЛ-200	3,4%	ОЛЛ-2009	02.09.2014	abs		
БСВ	43	ОЛЛ Т	76%		ОЛЛ-2009	3%	ОЛЛ-2009	0,8%	ОЛЛ-200	1,2%	ОЛЛ-2009	28.08.2014	abs		
ОЕН	75	ОЛЛ Взр	68%		ОЛЛ-2009	-	-	-	-	-		abs		21.09.2014	сепсис
ЗЛА	20	ОЛЛ В1	96%		ОЛЛ-2009	2,8%	ОЛЛ-2009	-	ОЛЛ-200	2,4%	ОЛЛ-2009	20.10.2014	abs		
ГОВ	22	ОЛЛ Т	98%		ОЛЛ-2009	1,2%	ОЛЛ-2009	0,4%	ОЛЛ-200	3,6%	ОЛЛ-2009	20.10.2014	abs		
КРП	19	ОЛЛ Т	92%		ОЛЛ-2009	3,4%	ОЛЛ-2009	2,2%	ОЛЛ-200	-	ОЛЛ-2009	05.11.2014	abs		
ИАА	24	ОЛЛ Т	91.6%		ОЛЛ-2009	91.4%	ОЛЛ-2009	15.6%	ОЛЛ-200	2,0%	ОЛЛ-2009	13.10.2015	abs		
СИН	31	ОЛЛ В2	88%		ОЛЛ-2009	1,2%	ОЛЛ-2009	2,8%	ОЛЛ-200	0,8%	ОЛЛ-2009	30.04.2015	abs		
РКС	31	ОЛЛ В2	92%		ОЛЛ-2009	0,4%	ОЛЛ-2009	3,2%	ОЛЛ-200	0,5%	ОЛЛ-2009	30.04.2015	abs		
МЯИ	20	ОЛЛ Т	78%		ОЛЛ-2009	-	ОЛЛ-2009	-	ОЛЛ-200	2,3%	ОЛЛ-2009	15.05.2015	abs		
ПАВ	48	ОЛЛ В2	76%		ОЛЛ-2009	-	ОЛЛ-2009	2,4%	ОЛЛ-200	2%	ОЛЛ-2009	20.05.2015	abs		
КДЮ	19	ОЛЛ Т	92%		ОЛЛ-2009	0,6%	ОЛЛ-2009	0,8%	ОЛЛ-200	0,4%	ОЛЛ-2009	19.07.2015	abs		
КВД	62	ХМЛ			иматиниб		иматиниб	-	иматини		иматиниб	28.05.2014	abs		
ОСТ	38	ХМЛ			иматиниб		иматиниб		иматини		иматиниб	10.11.2014	abs		
АН	53	ХМЛ			иматиниб	-	-	-	-	-	-	нет данных			
СНГ	39	Ph- ХМПЗ			иматиниб	-	-	-	-	-	-	26.08.2014	abs		
БПС	24	ХМЛ			иматиниб		иматиниб		иматини		иматиниб	13.11.2014	abs		
ДЕВ	42	ХМЛ			иматиниб		иматиниб		иматини		иматиниб	13.11.2014	abs		
ЗМС	27	ХМЛ			иматиниб		иматиниб		иматини		иматиниб	17.10.2014	abs		
БВП	54	ХМЛ			иматиниб	-	-	-	-	-	-	нет данных			
БЕИ	63	ХМЛ			иматиниб		иматиниб		иматини		нилотиниб	abs			
ГВВ	27	ХМЛ			иматиниб		дазатиниб		дазатини		дазатиниб	16.03.2015	abs		
ФКВ	28	ХМЛ			иматиниб		иматиниб		иматини		иматиниб	13.01.2015	abs		
ФСС	28	ХМЛ			иматиниб		иматиниб		иматини		иматиниб	29.04.2015	abs		
ЦИА	35	ХМЛ			иматиниб		иматиниб		иматини		иматиниб	15.12.2015	abs		
ЧШИ	48	ХМЛ (БЛ КРИЗ)			иматиниб	-	алло-ТКМ	-		-		abs		05.08.2015	сепсис
ПЕА	19	ХМЛ			иматиниб		иматиниб		иматини		иматиниб	09.02.2015	abs		
ЛИИ	57	ХМЛ			иматиниб		иматиниб		иматини		иматиниб	25.02.2015	abs		
КНВ		ХМЛ			иматиниб	-	-	-	-	-	-	нет данных			
ШВК	59	ХМЛ			иматиниб		иматиниб		иматини		иматиниб	24.06.2015	abs		
ЦТГ	70	ХМЛ			иматиниб		иматиниб		иматини		иматиниб	09.07.2015	abs		
КРН	74	ХМЛ			иматиниб	-	-	-	-	-	-	нет данных			
ПЛА	75	ХЛЛ			FCR-lite	-	-	-	-	-	-	нет данных			
КГК	52	лимфома			R- EPOCH	-	-	-	-	-	-	16.04.2014	abs		

Приложение 2. Относительный уровень экспрессии генов, изучавшихся в работе, у больных гемобластозами на различных точках

	0			1			2			3		
	ОМЛ	ОЛЛ	ХМЛ	ОМЛ	ОЛЛ	ХМЛ	ОМЛ	ОЛЛ	ХМЛ	ОМЛ	ОЛЛ	ХМЛ
IL6	83,95	193,19	197,11	99,83**	101,09**	101,50**	108,92**	92,91**	20,92**	50,86**	80,50**	81,30
IL 8	8,01	6,25	13,05	6,55	3,40*	4,47*	2,24**	1,67**	6,48	1,78**	4,69	3,40
IL1b	27,09	3,98	7,48	8,66	3,88	4,94	6,55	4,42	5,06	2,97	17,70*	21,44
IL1R1	3,10*	3,73	5,23	1,04*	1,37**	1,56**	1,00*	1,66	1,12*	0,58**	1,84	2,77
CSF	3,57**	2,56**	1,32**	0,96	0,53	0,80**	0,55	0,74	0,66	0,31	0,52	0,47
FGF2	3,86*	4,00	4,74	3,32**	2,00**	4,35*	2,96**	2,71**	2,76**	1,78**	6,18	9,31
FGFR1	0,96**	0,71	0,68	0,21**	0,23**	0,24**	0,22**	0,28**	0,23**	0,15**	0,33**	0,54
FGFR2	1,59	1,21	3,22*	0,27**	0,32**	0,24**	0,31**	0,48**	0,33**	0,19**	0,39**	0,62**
VEGF	1,49**	1,19**	1,37**	0,31**	0,14**	0,18**	0,13**	0,13**	0,11**	0,07**	0,26**	0,39**
VCAM	2,36	5,18	2,89	1,35	0,66**	1,04*	0,74**	0,94**	0,97**	0,56**	0,87**	0,78
ANG1	9,88	18,04	14,81	7,15	7,80	18,66	7,94	13,29	17,59	5,03	12,01	7,89
Jag1	5,33**	3,69**	6,28**	1,86	1,06**	0,92**	0,95**	1,96	0,60**	0,79**	1,06**	1,20
Sdf1	1,06	1,09	2,60	0,18**	0,08**	0,10**	0,06**	0,09**	0,07**	0,04**	0,06**	1,05
BGLAP	0,65**	2,98	1,67	1,55	1,92	3,87*	1,52	2,99	1,70	1,48	1,87	4,90**
SPP1	0,65	0,17*	0,37	0,11**	0,03**	0,06*	0,05	0,08*	0,12	0,06*	0,09	0,16
SOX9	1,14**	0,98**	0,94**	0,16**	0,22**	0,28**	0,29**	0,24**	0,23**	0,14**	0,15**	0,13**
PPARG	1,45**	1,26	1,44**	0,39	0,41	0,44	0,52	0,42	0,68	0,82	0,47	0,41
PDGFRA	2,24**	1,37	2,08**	0,45**	0,56	0,68	0,52	0,73	0,62	0,31**	0,85	1,63**
PDGFRB	1,37**	1,45	1,22	0,75	1,06	1,93**	1,03	1,40**	0,92	0,43	0,80	1,67**
TGFB1	1,10	0,80	0,65**	0,23**	0,09**	0,11**	0,12**	0,13**	0,07**	0,07**	0,13**	0,16**
TGFB2	4,37	2,35**	2,47**	1,41**	0,65**	0,90**	1,38**	0,46**	0,58**	0,99**	1,88**	2,26**
IGF1	1,22*	1,20	2,29*	1,54	0,58	0,36*	0,33*	0,35	0,28**	0,21**	0,47*	0,31
ICAM1	0,55	0,19**	1,21	0,08**	0,06**	0,06	0,05**	0,04**	0,05**	0,03**	0,04**	0,03**
LIF	9,06**	8,64**	19,11*	2,68	3,59	4,68*	2,62	5,07**	3,57	2,57	3,98	2,89

** указывает на статистически достоверные отличия от доноров, $p<0,05$

* указывает на достоверные отличия от доноров, $0,05<p<0,1$

Приложение 3. Относительный уровень экспрессии генов, изучавшихся в работе, у больных ОМЛ в группах пациентов, достигших ремиссии на 1 точке и не достигших ее

	0 точка		1 точка		2 точка		3 точка	
	ремиссия	вне ремиссии	ремиссия	вне ремиссии	ремиссия	вне ремиссии	ремиссия	вне ремиссии
IL6	104,59	44,74	104,46**	94,75**	98,14**	141,27**	60,70**	38,21**
IL 8	10,22	3,82	11,68	0,92**	2,90**	0,28**	1,98**	1,52**
IL1b	37,42	7,45	15,01	1,68	7,77	2,88	4,05	1,58
IL1R1	2,74	3,78	0,94*	1,14*	0,93**	1,24	0,60**	0,55**
CSF	3,75**	3,24**	0,81	1,12	0,52	0,66	0,35*	0,25**
FGF2	4,36	2,90**	4,15	2,40**	3,03**	2,77**	1,74**	1,83**
FGFR1	0,89**	1,10**	0,19**	0,24**	0,21**	0,27	0,17**	0,12**
FGFR2	1,47	1,82	0,22**	0,32**	0,25**	0,49**	0,22**	0,14**
VEGF	1,62**	1,23**	0,35**	0,28**	0,13**	0,13**	0,07**	0,07**
VCAM	2,39	2,30	1,12	1,59	0,56**	1,26	0,65**	0,44**
ANG1	9,72	10,17	6,55	7,81	8,27	6,95	5,01	5,05
Jag1	5,67**	4,69**	1,56	2,19	0,92**	1,02**	0,85**	0,73**
Sdf1	1,05	1,09	0,12**	0,24**	0,05**	0,09**	0,03**	0,04**
BGLAP	0,49**	0,97	1,68	1,41	1,30	2,18	1,20	1,84
SPP1	0,75	0,47	0,14	0,08	0,04*	0,07	0,07	0,03
SOX9	1,21**	1,01**	0,15**	0,17**	0,25**	0,41**	0,16**	0,11**
PPARG	1,33**	1,67**	0,35	0,44				
PDGFRA	1,99**	2,65**	0,36**	0,56	0,48*	0,65	0,37**	0,23**
PDGFRB	1,34**	1,43*	0,54	0,98	0,96	1,23	0,52	0,31**
TGFB1	1,17	0,98	0,21**	0,25**	0,11**	0,17**	0,08**	0,06**
TGFB2	4,72	3,71	1,71**	1,09**	1,47**	1,13**	1,17**	0,76**
IGF1	1,03	1,59	1,54	1,54	0,26**	0,55	0,18**	0,24**
ICAM1	0,55	0,53	0,08**	0,09**	0,05**	0,04**	0,03**	0,02**
LIF	9,22**	8,77**	3,13	2,19	2,62	2,62	3,54	1,32**

** указывает на статистически достоверные отличия от доноров, $p<0,05$

* указывает на достоверные отличия от доноров, $0,05<p<0,1$

Приложение 4. Границы 95% доверительного интервала (ДИ) и относительный уровень экспрессии генов в ММСК трёх больных ОЛЛ, находящихся вне ремиссии (ИАА, НАМ и БНА)

ген		0 точка		1 точка		2 точка		3 точка	
IL6	ДИ (от/до)	-22,80	444,26	35,17	108,51	44,15	99,09	128,03	45,20
	ИАА			422,76		270,38		34,30	
	НАМ			135,73		183,90		88,24	
	БНА	17,83				79,95		63,88	
IL 8	ДИ (от/до)	-0,04	13,68	0,48	3,12	0,22	1,44	9,75	1,14
	ИАА			20,94		13,39		0,05	
	НАМ			1,06		1,55		1,33	
	БНА	0,54				0,12		5,89	
IL1b	ДИ (от/до)	0,36	8,00	0,78	6,03	0,36	6,61	37,15	4,27
	ИАА			9,11		9,04		0,22	
	НАМ			0,75		14,94		6,12	
	БНА	2,15				0,58		4,57	
IL1R1	ДИ (от/до)	2,30	5,75	0,46	2,22	1,14	2,07	2,68	1,41
	ИАА			1,71		2,74		0,71	
	НАМ			2,72		1,79		1,55	
	БНА	0,82				1,05		0,47	
CSF	ДИ (от/до)	0,91	4,40	0,21	0,88	0,51	0,87	0,63	0,38
	ИАА			0,37		1,46		0,60	
	НАМ			0,44		0,54		0,25	
	БНА	1,58				0,75		0,84	
FGF2	ДИ (от/до)	1,85	6,36	1,33	1,91	1,89	3,08	11,65	2,43
	ИАА			6,26		4,43		1,39	
	НАМ			2,63		3,87		2,20	
	БНА	2,93				2,45		2,87	
FGFR1	ДИ (от/до)	0,47	1,03	0,09	0,40	0,22	0,32	0,47	0,22
	ИАА			0,12		0,32		0,24	
	НАМ			0,33		0,33		0,14	
	БНА	0,32				0,30		0,29	
FGFR2	ДИ (от/до)	0,61	2,04	0,13	0,56	0,25	0,55	0,54	0,29
	ИАА			0,03		0,90		0,29	

	НАМ			0,49		0,88		0,20	
	БНА	0,02				0,62		0,35	
VEGF	ДИ (от/до)	0,84	1,50	0,09	0,17	0,09	0,13	0,47	0,13
	ИАА			0,20		0,33		0,09	
	НАМ			0,15		0,16		0,08	
	БНА	1,30				0,11		0,13	
VCAM	ДИ (от/до)	-0,17	11,39	0,10	1,11	0,50	1,08	1,15	0,47
	ИАА			1,23		1,89		1,08	
	НАМ			2,72		1,66		1,11	
	БНА	0,84				1,14		0,92	
ANG1	ДИ (от/до)	3,21	36,40	2,43	13,11	6,89	17,14	17,36	9,27
	ИАА			8,09		34,72		5,62	
	НАМ			17,20		12,21		7,51	
	БНА	0,40				8,23		11,14	
Jag1	ДИ (от/до)	2,39	4,28	0,63	1,52	0,84	3,18	1,26	0,71
	ИАА			0,95		1,33		1,09	
	НАМ			2,32		2,48		1,57	
	БНА	7,25				1,49		1,16	
Sdf1	ДИ (от/до)	0,54	1,62	0,04	0,12	0,06	0,11	0,09	0,05
	ИАА			0,12		0,24		0,03	
	НАМ			0,08		0,09		0,10	
	БНА	1,15				0,06		0,01	
BGLAP	ДИ (от/до)	0,31	6,19	0,55	2,59	0,74	5,79	3,43	0,89
	ИАА			5,71		1,35		0,46	
	НАМ			1,16		2,32		0,85	
	БНА	0,27				2,05		0,34	
SPP1	ДИ (от/до)	0,02	0,31	0,02	0,04	0,01	0,15	0,15	0,03
	ИАА			0,07		0,04		0,12	
	НАМ			0,25		0,11		0,03	
	БНА	0,22				0,07		0,09	
SOX9	ДИ (от/до)	0,63	1,44	0,13	0,32	0,15	0,33	0,17	0,11
	ИАА			0,18		0,15		0,14	
	НАМ			0,14		0,26		0,26	
	БНА	0,44				0,26		0,16	
PDGFR	ДИ	0,73	2,17	0,24	0,91	0,57	0,84	1,36	0,53

A	(от/до)								
	ИАА			0,35		1,04		0,70	
	НАМ			0,74		0,56		0,31	
	БНА	0,62				0,79		0,16	
PDGFRB	ДИ (от/до)	0,69	2,48	0,28	2,00	0,89	1,92	1,17	0,52
	ИАА			0,22		1,20		0,59	
	НАМ			1,11		1,28		0,43	
	БНА	0,05				1,64		0,74	
TGFB1	ДИ (от/до)	0,57	1,06	0,07	0,12	0,10	0,15	0,17	0,10
	ИАА			0,06		0,12		0,13	
	НАМ			0,10		0,20		0,08	
	БНА	0,66				0,10		0,08	
TGFB2	ДИ (от/до)	0,60	3,62	0,42	0,88	0,16	0,73	2,89	0,88
	ИАА			0,64		0,35		0,82	
	НАМ			0,56		0,84		0,90	
	БНА	4,75				0,32		3,85	
IGF1	ДИ (от/до)	0,42	2,21	0,05	0,88	-0,02	0,65	0,81	0,24
	ИАА			1,82		0,46		0,23	
	НАМ					0,83		0,47	
	БНА	0,07				0,13		0,13	
ICAM1	ДИ (от/до)	0,10	0,25	0,00	0,12	0,02	0,04	0,05	0,02
	ИАА			0,07		0,12		0,01	
	НАМ			0,02		0,03		0,04	
	БНА	0,40				0,03		0,12	
LIF	ДИ (от/до)	5,71	12,31	2,04	5,15	3,22	6,65	5,57	2,54
	ИАА			3,48		6,30		1,98	
	НАМ			1,22		6,13		5,86	
	БНА	4,94				4,36		3,41	

Приложение 5. Границы 95% доверительного интервала (ДИ) и относительный уровень экспрессии генов в ММСК двух больных ХМЛ, находящихся вне ремиссии (БЕИ и ГВВ)

ген		0 точка		1 точка		2 точка		3 точка	
IL6	ДИ (от/до)	21,32	407,39	41,87	173,59	13,47	29,27		
	БЕИ	15,82		71,28					
	ГВВ	102,43		69,42		16,00			
IL 8	ДИ (от/до)	2,48	22,74	0,45	10,19	0,16	13,37		
	БЕИ	0,28		0,23					
	ГВВ	32,77		0,18		3,25			
IL1b	ДИ (от/до)	0,41	14,73	2,50	8,88	1,15	9,67	1,85	45,68
	БЕИ	1,42		1,64				0,53	
	ГВВ	12,07		0,79		1,24			
IL1R1	ДИ (от/до)	2,56	4,89	1,15	2,09	0,76	1,51	2,20	3,65
	БЕИ	2,07		1,12				1,36	
	ГВВ	32,51		1,40		0,93			
CSF	ДИ (от/до)	0,88	1,82	0,60	1,05	0,53	0,85		
	БЕИ	0,69		0,64					
	ГВВ	1,51		0,74		0,31			
FGF2	ДИ (от/до)	2,93	5,64	3,58	5,91	1,87	3,89	4,18	15,85
	БЕИ	3,93		2,47				3,01	
	ГВВ	12,69		2,22		1,35			
FGFR1	ДИ (от/до)	0,50	0,76	0,18	0,31	0,19	0,29	0,44	0,67
	БЕИ	0,61		0,23				0,34	
	ГВВ	1,53		0,26		0,18			
FGFR2	ДИ (от/до)	1,67	4,07	0,14	0,34	0,19	0,46	0,59	0,74
	БЕИ	0,70		0,21				0,23	
	ГВВ	11,32		0,34		0,36			
VEGF	ДИ (от/до)	0,78	1,41	0,14	0,23	0,07	0,15	0,21	0,63
	БЕИ	1,39		0,13				0,14	
	ГВВ	5,72		0,16		0,05			
VCAM	ДИ (от/до)	1,50	3,94	0,57	1,53	0,55	1,38		
	БЕИ	2,70		0,73					
	ГВВ	5,77		1,25		1,03			
ANG1	ДИ (от/до)	8,48	21,98	13,07	28,87	13,63	23,13		
	БЕИ	6,36		5,23					
	ГВВ	16,55		9,03		8,89			
Jag1	ДИ (от/до)	3,84	6,94	0,73	1,19	0,41	0,84		
	БЕИ	5,27		0,96					
	ГВВ	21,58		0,43		0,33			
Sdf1	ДИ (от/до)	0,67	2,03	0,06	0,16	0,05	0,09		
	БЕИ	0,93		0,07					
	ГВВ	24,32		0,06		0,04			

BGLAP	ДИ (от/до)	0,66	1,61	1,91	6,40	1,21	2,31	2,35	5,11
	БЕИ	7,32		2,45				15,41	
	ГВВ	4,61		2,49		1,03			
SPP1	ДИ (от/до)	0,02	0,32	0,03	0,10	0,01	0,24	0,08	0,24
	БЕИ	2,24		0,03				0,19	
	ГВВ	1,73		0,04		0,03			
SOX9	ДИ (от/до)	0,50	0,86	0,16	0,39	0,14	0,33		
	БЕИ	0,87		0,29					
	ГВВ	5,21		0,34		0,20			
PDGFRA	ДИ (от/до)	1,35	2,75	0,49	0,77	0,42	0,83	1,21	2,25
	БЕИ	1,14		1,02				0,71	
	ГВВ	3,50		0,86		0,56			
PDGFRB	ДИ (от/до)	0,73	1,89	1,13	2,74	0,57	1,35	1,17	2,40
	БЕИ	0,23		2,13				0,65	
	ГВВ	0,72		1,67		0,51			
TGFB1	ДИ (от/до)	0,52	0,69	0,09	0,13	0,06	0,09	0,12	0,20
	БЕИ	0,62		0,12				0,15	
	ГВВ	1,33		0,11		0,06			
TGFB2	ДИ (от/до)	1,32	3,49	0,82	1,15	0,43	0,81	1,11	3,67
	БЕИ	3,89		0,71				1,06	
	ГВВ	2,11		0,26		0,18			
IGF1	ДИ (от/до)	1,20	3,63	0,14	0,66	0,18	0,40		
	БЕИ	0,13		0,09					
	ГВВ	2,38		0,18		0,19			
ICAM1	ДИ (от/до)	0,41	0,94	0,05	0,08	0,03	0,07		
	БЕИ	0,61		0,03					
	ГВВ	10,34		0,02		0,04			
LIF	ДИ (от/до)	35,01	0,58	2,64	6,18	1,98	5,23		
	БЕИ	12,86		4,29					
	ГВВ	46,49		7,81		3,17			

Приложение 6. Границы 95% доверительного интервала (ДИ) экспрессии генов в ММСК больных ОМЛ, получавших терапию по протоколу ОМЛ 01.10, и относительный уровень экспрессии генов в ММСК трёх больных ОМЛ, получавших терапию МДЦ (АВВ, НВА и ЗИС)

ген		2 точка		3 точка	
IL6	ДИ (от/до)	50,53	115,07	30,90	70,48
	АВВ	**136,18**			
	НВА	**193,06**		45,73	
	ЗИС			37,07	
IL 8	ДИ (от/до)	0,000	3,06	3,84	-0,63
	АВВ	0,07			
	НВА	0,08		**0,38**	
	ЗИС			**0,06**	
IL1b	ДИ (от/до)	0,96	7,30	5,57	1,38
	АВВ	**0,55**			
	НВА	2,37		3,68	
	ЗИС			**0,78**	
IL1R1	ДИ (от/до)	0,58	0,98	0,72	0,38
	АВВ	**2,39**			
	НВА	0,94		**0,73**	
	ЗИС			0,25	
CSF	ДИ (от/до)	0,36	0,47	0,40	0,25
	АВВ	**1,01**			
	НВА	0,36		**0,13**	
	ЗИС			**0,22**	
FGF2	ДИ (от/до)	1,74	4,70	2,27	1,25
	АВВ	2,14			
	НВА	2,49		1,58	
	ЗИС			1,46	
FGFR1	ДИ (от/до)	0,17	0,22	0,19	0,13
	АВВ	**0,33**			
	НВА	0,16		**0,07**	
	ЗИС			0,14	
FGFR2	ДИ (от/до)	0,21	0,35	0,20	0,11
	АВВ	**0,57**			
	НВА	0,33		**0,08**	
	ЗИС			**0,28**	
VEGF	ДИ (от/до)	0,09	0,15	0,09	0,05
	АВВ	0,09			

	НВА	**0,16**		0,05	
	ЗИС			0,07	
VCAM	ДИ (от/до)	0,36	0,56	0,86	0,31
	АВВ	**0,94**			
	НВА	**0,68**		0,30	
	ЗИС			0,36	
ANG1	ДИ (от/до)	3,83	9,81	6,89	1,91
	АВВ	**18,67**			
	НВА	3,83		5,03	
	ЗИС			1,40	
Jag1	ДИ (от/до)	0,67	1,17	1,25	0,52
	АВВ	0,88			
	НВА	**1,50**		**0,43**	
	ЗИС			0,60	
Sdf1	ДИ (от/до)	0,04	0,06	0,04	0,02
	АВВ	**0,11**			
	НВА	**0,11**		**0,05**	
	ЗИС			0,03	
BGLAP	ДИ (от/до)	0,80	1,42	1,91	0,82
	АВВ	**3,29**			
	НВА	1,11		**2,51**	
	ЗИС			**0,56**	
SPP1	ДИ (от/до)	0,01	0,06	0,09	0,02
	АВВ	0,04			
	НВА	**0,00**		0,02	
	ЗИС			0,03	
SOX9	ДИ (от/до)	0,25	0,33	0,17	0,11
	АВВ	**0,39**			
	НВА	0,26		0,12	
	ЗИС			0,16	
PDGFRA	ДИ (от/до)	0,30	0,52	0,42	0,19
	АВВ	**1,21**			
	НВА	0,33		0,23	
	ЗИС			0,27	
PDGFRB	ДИ (от/до)	0,78	1,27	0,50	0,30
	АВВ	**1,83**			
	НВА	0,82		**0,18**	
	ЗИС			0,46	
TGFB1	ДИ (от/до)	0,09	0,12	0,10	0,06
	АВВ	**0,16**			
	НВА	**0,19**		0,06	
	ЗИС			0,07	
TGFB2	ДИ (от/до)	0,81	1,98	1,41	0,75

	АВВ	**0,52**			
	НВА			**0,39**	
	ЗИС			0,95	
IGF1	ДИ (от/до)	0,18	0,29	0,23	0,07
	АВВ	**0,93**			
	НВА	0,25		**0,26**	
	ЗИС			**0,03**	
ICAM1	ДИ (от/до)	0,02	0,05	0,04	0,02
	АВВ	0,04			
	НВА	**0,02**		0,01	
	ЗИС			0,02	
LIF	ДИ (от/до)	1,52	2,94	3,89	1,89
	АВВ	**1,39**			
	НВА	**1,64**		**1,60**	
	ЗИС			**1,48**	

Приложение 7. Границы 95% доверительного интервала (ДИ) и относительный уровень экспрессии генов в КОЕф трёх больных ОЛЛ, находящихся вне ремиссии (ИАА, НАМ и БНА)

ген		0 точка		1 точка		2 точка		3 точка	
BGLAP	ДИ (от/до)	3,40	8,50	1,07	9,81	1,52	4,80	1,28	3,63
	ИАА	3,02				1,36			
	НАМ	2,16		7,40		3,67			
	БНА	3,76				9,15		1,96	
SPP1	ДИ (от/до)	3,12	16,57	1,23	2,81	0,46	3,77	-3,02	23,05
	ИАА	2,84				0,24			
	НАМ	9,73		6,42		1,65			
	БНА	20,35				6,54		2,09	
PPARg	ДИ (от/до)	3,97	15,31	2,46	4,70	1,54	4,56	0,53	12,00
	ИАА	16,80				2,28			
	НАМ	17,33		2,58		2,09			
	БНА	25,48				2,96		5,03	
SOX9	ДИ (от/до)	1,01	3,51	1,02	3,32	1,55	3,97	2,23	4,64
	ИАА					2,63			
	НАМ			4,92		1,91			
	БНА					5,10		1,10	
FGFR1	ДИ (от/до)	0,33	7,11	0,74	2,37	0,66	1,28	1,29	1,70
	ИАА	3,23				1,17			
	НАМ	1,42		3,11		1,52			
	БНА	2,19				1,68		1,00	
FGFR2	ДИ (от/до)	0,34	1,53	-0,02	1,50	0,03	0,73	-18,78	65,11
	ИАА					0,47			
	НАМ			4,81		1,74			
	БНА					0,87		0,11	
VEGF	ДИ (от/до)	0,44	1,14	0,84	1,31	0,79	1,54	1,28	2,36
	ИАА					1,09			
	НАМ			1,81		0,33			
	БНА					1,28		1,51	
FGF2	ДИ (от/до)	1,53	6,93	2,91	10,91	1,78	5,23		
	ИАА	1,03				0,74			
	НАМ			0,91		0,34			
	БНА					2,05			
BMP4	ДИ (от/до)	1,35	5,79	1,38	3,76	1,61	2,67	1,65	3,05
	ИАА					1,86			
	НАМ			4,78		2,56			
	БНА					3,53		0,85	

Приложение 8. Границы 95% доверительного интервала (ДИ) и относительный уровень экспрессии генов в КОЕф двух больных ХМЛ, находящихся вне ремиссии (БЕИ и ГВВ)

ген		0 точка		1 точка		2 точка	
BGLAP	ДИ (от/до)	2,10	3,32	0,29	14,16	1,44	3,67
	БЕИ	4,36		27,95		12,91	
	ГВВ	4,36		2,55		1,79	
SPP1	ДИ (от/до)	6,55	19,21	1,37	7,30	-0,33	8,55
	БЕИ	8,81		5,17		0,40	
	ГВВ	48,22		0,52		0,52	
PPARg	ДИ (от/до)	3,10	6,46	2,02	4,40	1,69	4,74
	БЕИ	16,06		1,44		2,40	
	ГВВ	26,75		0,97		1,18	
SOX9	ДИ (от/до)	0,75	2,05	0,70	2,27	1,82	4,30
	БЕИ	0,15		2,68		7,00	
	ГВВ	0,07		5,13		7,59	
FGFR1	ДИ (от/до)	0,68	0,83	0,95	1,77	1,18	1,86
	БЕИ	0,51		1,18		2,92	
	ГВВ	0,28		1,56		2,66	
FGFR2	ДИ (от/до)	0,12	0,33	0,14	1,44	0,24	0,94
	БЕИ			0,25		0,92	
	ГВВ	3,28		0,73		1,57	
VEGF	ДИ (от/до)	0,92	1,35	1,98	3,94	1,77	3,05
	БЕИ			1,74		1,68	
	ГВВ			3,09		0,96	
FGF2	ДИ (от/до)	3,15	12,05			5,69	14,49
	БЕИ	1,68				4,20	
	ГВВ	0,14				5,59	
BMP4	ДИ (от/до)	0,65	1,01	1,00	7,64	0,87	2,36
	БЕИ	4,90		5,06		4,77	
	ГВВ			2,67		3,94	

Приложение 9. Границы 95% доверительного интервала (ДИ) значений экспрессии генов в КОЕф больных ОМЛ, получавших терапию по протоколу ОМЛ 01.10, и относительный уровень экспрессии генов у трёх больных ОМЛ, получавших терапию МДЦ (АВВ, НВА и ЗИС)

ген		2 точка		3 точка	
BGLAP	ДИ (от/до)	1,10	4,39	1,38	3,80
	АВВ	1,79			
	НВА	2,31		1,46	
	ЗИС			0,49	
SPP1	ДИ (от/до)	-0,46	12,78	0,72	5,61
	АВВ	5,70			
	НВА	3,45		1,13	
	ЗИС			0,58	
PPARg	ДИ (от/до)	2,79	5,43	2,15	3,44
	АВВ	2,54			
	НВА	3,68		3,28	
	ЗИС			0,65	
SOX9	ДИ (от/до)	0,67	8,01	2,97	6,95
	АВВ	0,47			
	НВА	2,53		0,40	
	ЗИС			10,46	
FGFR1	ДИ (от/до)	0,86	2,85	1,18	2,11
	АВВ	1,12			
	НВА	1,13		1,27	
	ЗИС			0,72	
FGFR2	ДИ (от/до)	0,29	2,14	0,29	1,07
	АВВ	0,30			
	НВА	0,10		1,56	
	ЗИС			0,71	
VEGF	ДИ (от/до)	1,03	2,25	1,29	3,04
	АВВ	0,48		1,44	
	НВА	1,82		0,75	
	ЗИС			1,36	
FGF2	ДИ (от/до)	1,22	5,64	2,43	11,45
	АВВ	0,44		1,20	
	НВА	3,39		6,77	
	ЗИС			3,15	
BMP4	ДИ (от/до)	0,66	4,56	1,34	3,48
	АВВ	1,37		6,57	
	НВА	1,42		1,14	
	ЗИС			0,74	

Список литературы

1. Воробьев А.И. Руководство по гематологии /А.И.Воробьев// Медицина. – 1985.
2. Воробьев А.И. Патогенез и терапия лейкозов/ А.И.Воробьев, М.Д. Бриллиант //Медицина. – 1976.
3. Зайцев В.М. Прикладная медицинская статистика/ Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. // М: Фолиант. – 2006.
4. Лубкова О.Н. Экспрессия VCAM-1 на стромальных клетках из костного мозга больных миелодиспластическими синдромами / О.Н.Лубкова, Н.В.Цветаева, К.С.Момотюк, В.М.Белкин, Т.Е.Манакова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – N 1. – с. 17-20.
5. Манакова Т.Е. Дефект адгезии и хоминга кроветворных предшественников из костного мозга больных миелодисплазиями к стромальным клеткам из культур нормального костного мозга/ Т.Е.Манакова, Н.В.Цветаева, В.М.Белкин, К.С.Момотюк, Н.Д.Хорошко.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.– 2005. – N 1. – с. 11-14.
6. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени./ Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов//М: Бином. – 2009.
7. Савченко В.Г. Лечение острых лейкозов (Клинические исследования) / В.Г.Савченко, Е.Н. Паровичникова //МЕДпресс-информ. – 2004 . – с.224.
8. Савченко В.Г. Острые лейкозы / М.А. Волкова// Клиническая онкогематология. – Медицина. – 2008 . – с.409- 501.
9. Савченко В.Г. Программное лечение заболеваний системы крови: Сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови. /В.Г. Савченко.// М.: Практика. – 2012 . – с.1056.
10. Савченко В.Г. Лечение острых лимфобластных лейкозов взрослых в соответствии с модифицированным протоколом Германской группы по

изучению ОЛЛ (результаты одноцентрового исследования)/ В.Г.Савченко , Е.Н.Паровичникова, В.Г. Исаев.// Тер. Архив – 1997. – N 7. – с.3-10.

11. Савченко В.Г. Стратегия терапии острых миелоидных лейкозов/ В.Г.Савченко, Е.Н. Паровичникова, В.Г.Исаев, Р.А.Кучер //Тер. Архив. – 1992. – N 7 – с. 4-16.

12. Свинарева Д.А. Основные свойства мезенхимных стромальных клеток из костного доноров: поверхностные маркеры/ Д.А.Свинарева, И.Н.Шипунова, Ю.В.Ольшанская, К.С.Момотюк, Н.И.Дризе, В.Г.Савченко // Терапевтический архив. – 2010. – N 7 – с. 52-56.

13. Соколов АН. Лечение рецидивов и резистентных форм острых лейкозов. / А.Н.Соколов. // Диссертация на соискание степени кандидата медицинских наук. – 2000.

14. Чертков И.Л. Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение/ И.Л.Чертков, О.А.Гуревич // Медицина. - 1984. – 238 с.

15. Чертков И.Л. Схема кроветворения/ И.Л.Чертков, Н.И.Дризе, А.И.Воробьев. //Терапевтический архив. – 2006. – N 7. – с. 5-12

15. Aguayo A. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. / A. Aguayo, E. Estey, H. Kantarjian, T. Mansouri, C. Gidel, M. Keating, F. Giles, Z. Estrov, B. Barlogie, M. Albitar // Blood – 1999. – T. 94 – № 11 – 3717–21c.

16. Akiyama H. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. / H. Akiyama, M.-C. Chaboissier, J. F. Martin, A. Schedl, B. de Crombrugghe // Genes Dev. – 2002. – T. 16 – № 21 – 2813–28c.

17. Alison M.R. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. / M. R. Alison, R. Poulsom, R. Jeffery, A. P. Dhillon, A. Quaglia, J. Jacob, M. Novelli, G. Prentice, J. Williamson, N. A. Wright // Nature – 2000. – T. 406 – № 6793 – 257c.

18. Arai F. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. / F. Arai, A. Hirao, M. Ohmura, H. Sato, S.

Matsuoka, K. Takubo, K. Ito, G. Y. Koh, T. Suda // Cell – 2004. – Т. 118 – № 2 – 149–61с.

19. Arnulf B. Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. / B. Arnulf, S. Lecourt, J. Soulier, B. Ternaux, M.-N. Lacassagne, A. Crinquette, J. Dessoly, A.-K. Sciaini, M. Benbunan, C. Chomienne, J.-P. Fermand, J.-P. Marolleau, J. Larghero // Leukemia – 2007. – Т. 21 – № 1 – 158–63с.

20. Arranz L. Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. / L. Arranz, A. Sánchez-Aguilera, D. Martín-Pérez, J. Isern, X. Langa, A. Tzankov, P. Lundberg, S. Muntión, Y.-S. Tzeng, D.-M. Lai, J. Schwaller, R. C. Skoda, S. Méndez-Ferrer // Nature – 2014. – Т. 512 – № 7512 – 78–81с.

21. Augustin H.G. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. / H. G. Augustin, G. Y. Koh, G. Thurston, K. Alitalo // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2009. – Т. 10 – № 3 – 165–77с.

22. Ayala F. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. / F. Ayala, R. Dewar, M. Kieran, R. Kalluri // Leukemia – 2009. – Т. 23 – № 12 – 2233–41с.

23. Battula V.L. Connective tissue growth factor regulates adipocyte differentiation of mesenchymal stromal cells and facilitates leukemia bone marrow engraftment. / V. L. Battula, Y. Chen, M. da G. Cabreira, V. Ruvolo, Z. Wang, W. Ma, S. Konoplev, E. Shpall, K. Lyons, D. Strunk, C. Bueso-Ramos, R. E. Davis, M. Konopleva, M. Andreeff // Blood – 2013. – Т. 122 – № 3 – 357–66с.

24. Ben-Batalla I. Axl, a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia mediates paracrine crosstalk of leukemia cells with bone marrow stroma. / I. Ben-Batalla, A. Schultze, M. Wroblewski, R. Erdmann, M. Heuser, J. S. Waizenegger, K. Riecken, M. Binder, D. Schewe, S. Sawall, V. Witzke, M. Cubas-Cordova, M. Janning, J. Wellbrock, B. Fehse, C. Hagel, J. Krauter, A. Ganser, J. B. Lorens, W. Fiedler, P. Carmeliet, K. Pantel, C. Bokemeyer, S. Loges // Blood –

2013. – Т. 122 – № 14 – 2443–52с.

25. Berk L.C.J. van den Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. / L. C. J. van den Berk, A. van der Veer, M. E. Willemse, M. J. G. A. Theeuwes, M. W. Luijendijk, W. H. Tong, I. M. van der Sluis, R. Pieters, M. L. den Boer // Br. J. Haematol. – 2014.

26. Bianco P. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. / P. Bianco // Blood – 2011. – Т. 117 – № 20 – 5281–8с.

27. Bigildeev A.E. Clonal composition of human multipotent mesenchymal stromal cells. / A. E. Bigildeev, O. A. Zhironkina, I. N. Shipounova, N. V Sats, S. Y. Kotyashova, N. I. Drize // Exp. Hematol. – 2012. – Т. 40 – № 10 – 847–56.e4c.

28. Blau O. Bone marrow stromal cells in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. / O. Blau // Front. Biosci. (Landmark Ed. – 2014. – Т. 19 – 171–80с.

29. Blau O. Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. / O. Blau, C. D. Baldus, W.-K. Hofmann, G. Thiel, F. Nolte, T. Burmeister, S. Türkmen, O. Benlasfer, E. Schümann, A. Sindram, M. Molkentin, S. Mundlos, U. Keilholz, E. Thiel, I. W. Blau // Blood – 2011. – Т. 118 – № 20 – 5583–92с.

30. Borojevic R. Bone marrow stroma in childhood myelodysplastic syndrome: composition, ability to sustain hematopoiesis in vitro, and altered gene expression. / R. Borojevic, R. A. Roela, R. S. Rodarte, L. S. Thiago, F. S. Pasini, F. M. Conti, M. I. D. Rossi, L. F. L. Reis, L. F. Lopes, M. M. Brentani // Leuk. Res. – 2004. – Т. 28 – № 8 – 831–44с.

31. Boyerinas B. Adhesion to osteopontin in the bone marrow niche regulates lymphoblastic leukemia cell dormancy. / B. Boyerinas, M. Zafrir, A. E. Yesilkanal, T. T. Price, E. M. Hyjek, D. A. Sipkins // Blood – 2013. – Т. 121 – № 24 – 4821–31с.

32. Brandt J. Role of c-kit ligand in the expansion of human hematopoietic progenitor cells. / J. Brandt, R. A. Briddell, E. F. Srour, T. B. Leemhuis, R.

Hoffman // Blood – 1992. – Т. 79 – № 3 – 634–41с.

33. Brindle N.P.J. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. / N. P. J. Brindle, P. Saharinen, K. Alitalo // Circ. Res. – 2006. – Т. 98 – № 8 – 1014–23с.

34. Bruns I. Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells. / I. Bruns, R.-P. Cadeddu, I. Brueckmann, J. Fröbel, S. Geyh, S. Büst, J. C. Fischer, F. Roels, C. M. Wilk, F. A. Schildberg, A.-N. Hünerlitürkoglu, C. Zilkens, M. Jäger, U. Steidl, F. Zohren, R. Fenk, G. Kobbe, B. Brors, A. Czibere, T. Schroeder, A. Trumpp, R. Haas // Blood – 2012. – Т. 120 – № 13 – 2620–30с.

35. Burger J.A. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. / J. A. Burger, T. J. Kipps // Blood – 2006. – Т. 107 – № 5 – 1761–7с.

36. Buss E.C. Leukemia stem cells. / E. C. Buss, A. D. Ho // Int. J. cancer – 2011. – Т. 129 – № 10 – 2328–36с.

37. Calkoen F.G.J. Gene-expression and in vitro function of mesenchymal stromal cells are affected in juvenile myelomonocytic leukemia. / F. G. J. Calkoen, C. Vervat, E. Eising, L. S. Vijfhuizen, P.-B. A. C. ’t Hoen, M. M. van den Heuvel-Eibrink, R. M. Egeler, M. J. D. van Tol, L. M. Ball // Haematologica – 2015. – Т. 100 – № 11 – 1434–41с.

38. Calvi L.M. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche / L. M. Calvi, G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg, D. T. Scadden – 2003. – 841–846с.

39. Calvi L.M. Osteoblastic expansion induced by parathyroid hormone receptor signaling in murine osteocytes is not sufficient to increase hematopoietic stem cells. / L. M. Calvi, O. Bromberg, Y. Rhee, J. M. Weber, J. N. P. Smith, M. J. Basil, B. J. Frisch, T. Bellido // Blood – 2012. – Т. 119 – № 11 – 2489–99с.

40. Caplan A. Mesenchymal stem cells. / A. Caplan // J. Orthop. Res. –

1991. – Т. 9 – № 5 – 641–50с.

41. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells. / A. I. Caplan // J. Orthop. Res. – 1991. – Т. 9 – № 5 – 641–50с.

42. Carrara R.C. V Mesenchymal stem cells from patients with chronic myeloid leukemia do not express BCR-ABL and have absence of chimerism after allogeneic bone marrow transplant. / R. C. V Carrara, M. D. Orellana, A. M. Fontes, P. V. B. Palma, S. Kashima, M. R. Mendes, M. A. Coutinho, J. C. Voltarelli, D. T. Covas // Braz. J. Med. Biol. Res. – 2007. – Т. 40 – № 1 – 57–67с.

43. Castro-Malaspina H. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. / H. Castro-Malaspina, R. E. Gay, G. Resnick, N. Kapoor, P. Meyers, D. Chiarieri, S. McKenzie, H. E. Broxmeyer, M. A. Moore // Blood – 1980. – Т. 56 – № 2 – 289–301с.

44. Chandran P. Mesenchymal stromal cells from patients with acute myeloid leukemia have altered capacity to expand differentiated hematopoietic progenitors. / P. Chandran, Y. Le, Y. Li, M. Sabloff, J. Mehic, M. Rosu-Myles, D. S. Allan // Leuk. Res. – 2015. – Т. 39 – № 4 – 486–93с.

45. Chen J.-D. [ICAM-1 regulates differentiation of MSC to adipocytes via activating MAPK pathway]. / J.-D. Chen, F.-F. Xu, H. Zhu, X.-M. Li, B. Tang, Y.-L. Liu, Y. Zhang // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi – 2014. – Т. 22 – № 1 – 160–5с.

46. Chen Y. Study on fibroblast colony forming units derived from bone marrow of normal adults and untreated patients with acute nonlymphocytic leukemia. / Y. Chen, C. Y. Li, B. M. Wang, D. Shen, D. J. Yu // J. Tongji Med. Univ. – 1988. – Т. 8 – № 2 – 87–8с.

47. Chertkov J.L. Role of bone marrow stroma in hemopoietic stem cell regulation. / J. L. Chertkov, O. A. Gurevitch, G. A. Udalov // Exp. Hematol. – 1980. – Т. 8 – № 6 – 770–8с.

48. Choi K. Hemangioblast development and regulation. / K. Choi // Biochem. Cell Biol. – 1998. – Т. 76 – № 6 – 947–56с.

49. Colmone A. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. / A. Colmone, M. Amorim, A. L. Pontier, S. Wang, E. Jablonski, D. A. Sipkins // Science – 2008. – T. 322 – № 5909 – 1861–5c.

50. Conforti A. Biological, functional and genetic characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from pediatric patients affected by acute lymphoblastic leukemia. / A. Conforti, S. Biagini, F. Del Bufalo, P. Sirleto, A. Angioni, N. Starc, G. Li Pira, F. Moretta, A. Proia, B. Contoli, S. Genovese, C. Ciardi, M. A. Avanzini, V. Rosti, F. Lo-Coco, F. Locatelli, M. E. Bernardo // PLoS One – 2013. – T. 8 – № 11 – e76989c.

51. Corre J. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. / J. Corre, K. Mahtouk, M. Attal, M. Gadelorge, A. Huynh, S. Fleury-Cappellesso, C. Danho, P. Laharrague, B. Klein, T. Rème, P. Bourin // Leukemia – 2007. – T. 21 – № 5 – 1079–88c.

52. Detmer K. Lineage-restricted expression of bone morphogenetic protein genes in human hematopoietic cell lines. / K. Detmer, T. A. Steele, M. A. Shoop, H. Dannawi // Blood Cells. Mol. Dis. – T. 25 – № 5-6 – 310–23c.

53. Dias S. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. / S. Dias, M. Choy, K. Alitalo, S. Rafii // Blood – 2002. – T. 99 – № 6 – 2179–84c.

54. Dick J.E. Stem cell concepts renew cancer research. / J. E. Dick // Blood – 2008. – T. 112 – № 13 – 4793–807c.

55. Dick J.E. Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice. / J. E. Dick, M. Bhatia, O. Gan, U. Kapp, J. C. Wang // Stem Cells – 1997. – T. 15 Suppl 1 – 199–203; discussion 204–7c.

56. Dimitriou H. Properties and potential of bone marrow mesenchymal stromal cells from children with hematologic diseases. / H. Dimitriou, E. Linardakis, G. Martimianaki, E. Stiakaki, C. H. Perdikogianni, P. Charbord, M.

Kalmanti // Cytotherapy – 2008. – Т. 10 – № 2 – 125–33с.

57. Ding H. Recombinant human insulin-like growth factor-I accelerates recovery and reduces catabolism in rats with ischemic acute renal failure. / H. Ding, J. D. Kopple, A. Cohen, R. Hirschberg // J. Clin. Invest. – 1993. – Т. 91 – № 5 – 2281–7с.

58. Ding L. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. / L. Ding, T. L. Saunders, G. Enikolopov, S. J. Morrison // Nature – 2012. – Т. 481 – № 7382 – 457–62с.

59. Ding W. Platelet-derived growth factor (PDGF)-PDGF receptor interaction activates bone marrow-derived mesenchymal stromal cells derived from chronic lymphocytic leukemia: implications for an angiogenic switch. / W. Ding, T. R. Knox, R. C. Tschumper, W. Wu, S. M. Schwager, J. C. Boysen, D. F. Jelinek, N. E. Kay // Blood – 2010. – Т. 116 – № 16 – 2984–93с.

60. Dominici M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz // Cytotherapy – 2006. – Т. 8 – № 4 – 315–7с.

61. Donega V. Intranasal administration of human MSC for ischemic brain injury in the mouse: in vitro and in vivo neuroregenerative functions. / V. Donega, C. H. Nijboer, L. Braccioli, I. Slaper-Cortenbach, A. Kavelaars, F. van Bel, C. J. Heijnen // PLoS One – 2014. – Т. 9 – № 11 – e112339с.

62. Dong M. Role of transforming growth factor-beta in hematologic malignancies. / M. Dong, G. C. Blobe // Blood – 2006. – Т. 107 – № 12 – 4589–96с.

63. Døsen-Dahl G. Bone marrow stroma cells regulate TIEG1 expression in acute lymphoblastic leukemia cells: role of TGFbeta/BMP-6 and TIEG1 in chemotherapy escape. / G. Døsen-Dahl, E. Munthe, M. K. Nygren, H. Stubberud, M. E. Hystad, E. Rian // Int. J. Cancer – 2008. – Т. 123 – № 12 – 2759–66с.

64. Du Z. Sympathetic denervation-induced MSC mobilization in distraction osteogenesis associates with inhibition of MSC migration and osteogenesis by norepinephrine/adrb3. / Z. Du, L. Wang, Y. Zhao, J. Cao, T. Wang, P. Liu, Y. Zhang, X. Yang, X. Cheng, B. Liu, D. Lei // PLoS One – 2014. – T. 9 – № 8 – e105976c.

65. Eppert K. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. / K. Eppert, K. Takenaka, E. R. Lechman, L. Waldron, B. Nilsson, P. van Galen, K. H. Metzeler, A. Poeppl, V. Ling, J. Beyene, A. J. Canty, J. S. Danska, S. K. Bohlander, C. Buske, M. D. Minden, T. R. Golub, I. Jurisica, B. L. Ebert, J. E. Dick // Nat. Med. – 2011. – T. 17 – № 9 – 1086–93c.

66. Estey E. Acute myeloid leukaemia. / E. Estey, H. Döhner // Lancet (London, England) – 2006. – T. 368 – № 9550 – 1894–907c.

67. Ezaki K. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) and acute leukemia: in vitro proliferative response to IL-1 beta, IL-1 beta content of leukemic cells and treatment outcome. / K. Ezaki, M. Tsuzuki, I. Katsuta, F. Maruyama, H. Kojima, M. Okamoto, T. Nomura, M. Wakita, H. Miyazaki, R. Sobue // Leuk. Res. – 1995. – T. 19 – № 1 – 35–41c.

68. Fang B. Identification of human chronic myelogenous leukemia progenitor cells with hemangioblastic characteristics. / B. Fang, C. Zheng, L. Liao, Q. Han, Z. Sun, X. Jiang, R. C. H. Zhao // Blood – 2005. – T. 105 – № 7 – 2733–40c.

69. Ferrara F. Acute myeloid leukaemia in adults. / F. Ferrara, C. A. Schiffer // Lancet (London, England) – 2013. – T. 381 – № 9865 – 484–95c.

70. Fiedler W. Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. / W. Fiedler, U. Graeven, S. Ergün, S. Verago, N. Kilic, M. Stockschläder, D. K. Hossfeld // Blood – 1997. – T. 89 – № 6 – 1870–5c.

71. Fitter S. Suppression of PDGF-induced PI3 kinase activity by imatinib promotes adipogenesis and adiponectin secretion. / S. Fitter, K. Vandyke, S.

Gronthos, A. C. W. Zannettino // J. Mol. Endocrinol. – 2012. – Т. 48 – № 3 – 229–40с.

72. Flores-Figueroa E. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. / E. Flores-Figueroa, R. M. Arana-Trejo, G. Gutiérrez-Espíndola, A. Pérez-Cabrera, H. Mayani // Leuk. Res. – 2005. – Т. 29 – № 2 – 215–24с.

73. Flores-Figueroa E. Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells. / E. Flores-Figueroa, J. J. Montesinos, P. Flores-Guzmán, G. Gutiérrez-Espíndola, R. M. Arana-Trejo, S. Castillo-Medina, A. Pérez-Cabrera, E. Hernández-Estévez, L. Arriaga, H. Mayani // Leuk. Res. – 2008. – Т. 32 – № 9 – 1407–16с.

74. Fong Y.-C. BMP-2 increases migration of human chondrosarcoma cells via PI3K/Akt pathway. / Y.-C. Fong, T.-M. Li, C.-M. Wu, S.-F. Hsu, S.-T. Kao, R.-J. Chen, C.-C. Lin, S.-C. Liu, C.-L. Wu, C.-H. Tang // J. Cell. Physiol. – 2008. – Т. 217 – № 3 – 846–55с.

75. FORD C.E. Cytological identification of radiation-chimaeras. / C. E. FORD, J. L. HAMERTON, D. W. BARNES, J. F. LOUTIT // Nature – 1956. – Т. 177 – № 4506 – 452–4с.

76. Frenette P.S. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. / P. S. Frenette, S. Pinho, D. Lucas, C. Scheiermann // Annu. Rev. Immunol. – 2013. – Т. 31 – 285–316с.

77. Friedenstein A.J. Precursor cells of mechanocytes. / A. J. Friedenstein // Int. Rev. Cytol. – 1976. – Т. 47 – 327–59с.

78. Friedenstein A.J. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. / A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhjan, K. S. Lalykina // Cell Tissue Kinet. – 1970. – Т. 3 – № 4 – 393–403с.

79. Friedenstein A.J. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. / A. J. Friedenstein, J. F. Gorskaja, N. N. Kulagina // Exp.

Hematol. – 1976. – Т. 4 – № 5 – 267–74с.

80. Frisch B.J. Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia. / B. J. Frisch, J. M. Ashton, L. Xing, M. W. Becker, C. T. Jordan, L. M. Calvi // Blood – 2012. – Т. 119 – № 2 – 540–50с.

81. Garrido S.M. Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5). / S. M. Garrido, F. R. Appelbaum, C. L. Willman, D. E. Banker // Exp. Hematol. – 2001. – Т. 29 – № 4 – 448–57с.

82. Ge J. Stromal-derived factor-1 deficiency in the bone marrow of acute myeloid leukemia. / J. Ge, R. Hou, Q. Liu, R. Zhu, K. Liu // Int. J. Hematol. – 2011. – Т. 93 – № 6 – 750–9с.

83. GENGOZIAN N. Thymus specificity in lethally irradiated mice treated with rat bone marrow. / N. GENGOZIAN, I. S. URSO, C. C. CONGDON, A. D. CONGER, T. MAKINODAN // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1957. – Т. 96 – № 3 – 714–20с.

84. Gentles A.J. Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. / A. J. Gentles, S. K. Plevritis, R. Majeti, A. A. Alizadeh // JAMA – 2010. – Т. 304 – № 24 – 2706–15с.

85. Geyh S. Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. / S. Geyh, S. Oz, R.-P. Cadeddu, J. Fröbel, B. Brückner, A. Kündgen, R. Fenk, I. Bruns, C. Zilkens, D. Hermsen, N. Gattermann, G. Kobbe, U. Germing, F. Lyko, R. Haas, T. Schroeder // Leukemia – 2013. – Т. 27 – № 9 – 1841–51с.

86. Geyh S. Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. / S. Geyh, M. Rodríguez-Paredes, P. Jäger, C. Khandanpour, R.-P. Cadeddu, J. Gutekunst, C. M. Wilk, R. Fenk, C. Zilkens, D. Hermsen, U. Germing, G. Kobbe, F. Lyko, R. Haas, T. Schroeder // Leukemia – 2016. – Т. 30 – № 3 – 683–91с.

87. Gimble J.M. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. / J.

M. Gimble, A. J. Katz, B. A. Bunnell // Circ. Res. – 2007. – Т. 100 – № 9 – 1249–60с.

88. Goldman D.C. BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. / D. C. Goldman, A. S. Bailey, D. L. Pfaffle, A. Al Masri, J. L. Christian, W. H. Fleming // Blood – 2009. – Т. 114 – № 20 – 4393–401с.

89. Gosliga D. van Establishing long-term cultures with self-renewing acute myeloid leukemia stem/progenitor cells. / D. van Gosliga, H. Schepers, A. Rizo, D. van der Kolk, E. Vellenga, J. J. Schuringa // Exp. Hematol. – 2007. – Т. 35 – № 10 – 1538–49с.

90. Gunsilius E. Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. / E. Gunsilius, H. C. Duba, A. L. Petzer, C. M. Kähler, K. Grünewald, G. Stockhammer, C. Gabl, S. Dirnhofer, J. Clausen, G. Gastl // Lancet (London, England) – 2000. – Т. 355 – № 9216 – 1688–91с.

91. Guzman C.G. de Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation. / C. G. de Guzman, A. J. Warren, Z. Zhang, L. Gartland, P. Erickson, H. Drabkin, S. W. Hiebert, C. A. Klug // Mol. Cell. Biol. – 2002. – Т. 22 – № 15 – 5506–17с.

92.Hanoun M. Acute myelogenous leukemia-induced sympathetic neuropathy promotes malignancy in an altered hematopoietic stem cell niche. / M. Hanoun, D. Zhang, T. Mizoguchi, S. Pinho, H. Pierce, Y. Kunisaki, J. Lacombe, S. A. Armstrong, U. Dührsen, P. S. Frenette // Cell Stem Cell – 2014. – Т. 15 – № 3 – 365–75с.

93. Hazlehurst L.A. Reduction in drug-induced DNA double-strand breaks associated with beta1 integrin-mediated adhesion correlates with drug resistance in U937 cells. / L. A. Hazlehurst, N. Valkov, L. Wisner, J. A. Storey, D. Boulware, D. M. Sullivan, W. S. Dalton // Blood – 2001. – Т. 98 – № 6 – 1897–903с.

94. Hirschberg R. Mechanisms of insulin-like growth factor-I-induced

accelerated recovery in experimental ischemic acute renal failure. / R. Hirschberg, H. Ding // Miner. Electrolyte Metab. – 1998. – Т. 24 – № 4 – 211–9с.

95. Hong C.-S. Plasma exosomes as markers of therapeutic response in patients with acute myeloid leukemia. / C.-S. Hong, L. Muller, T. L. Whiteside, M. Boyiadzis // Front. Immunol. – 2014. – Т. 5 – 160с.

96. Hou Y. IL-8 enhances the angiogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by increasing vascular endothelial growth factor. / Y. Hou, C. H. Ryu, J. A. Jun, S. M. Kim, C. H. Jeong, S.-S. Jeun // Cell Biol. Int. – 2014. – Т. 38 – № 9 – 1050–9с.

97. Houlihan D.D. Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR-α. / D. D. Houlihan, Y. Mabuchi, S. Morikawa, K. Niibe, D. Araki, S. Suzuki, H. Okano, Y. Matsuzaki // Nat. Protoc. – 2012. – Т. 7 – № 12 – 2103–11с.

98. Houthuijzen J.M. The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression. / J. M. Houthuijzen, L. G. M. Daenen, J. M. L. Roodhart, E. E. Voest // Br. J. Cancer – 2012. – Т. 106 – № 12 – 1901–6с.

99. Hu W. p53 regulates maternal reproduction through LIF. / W. Hu, Z. Feng, A. K. Teresky, A. J. Levine // Nature – 2007. – Т. 450 – № 7170 – 721–4с.

100. Huan J. Coordinate regulation of residual bone marrow function by paracrine trafficking of AML exosomes. / J. Huan, N. I. Hornick, N. A. Goloviznina, A. N. Kamimae-Lanning, L. L. David, P. A. Wilmarth, T. Mori, J. R. Chevillet, A. Narla, C. T. Roberts, M. M. Loriaux, B. H. Chang, P. Kurre // Leukemia – 2015. – Т. 29 – № 12 – 2285–95с.

101. Huan J. RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes. / J. Huan, N. I. Hornick, M. J. Shurtleff, A. M. Skinner, N. A. Goloviznina, C. T. Roberts, P. Kurre // Cancer Res. – 2013. – Т. 73 – № 2 – 918–29с.

102. Huang Y. Effects of insulin-like growth factor-1 on the properties of mesenchymal stem cells in vitro. / Y. Huang, R. Qiu, W. Mai, J. Kuang, X. Cai, Y. Dong, Y. Hu, Y. Song, A. Cai, Z. Jiang // J. Zhejiang Univ. Sci. B – 2012. – Т. 13

– № 1 – 20–8с.

103. Ito S. Long term maintenance of myeloid leukemic stem cells cultured with unrelated human mesenchymal stromal cells. / S. Ito, A. J. Barrett, A. Dutra, E. Pak, S. Miner, K. Keyvanfar, N. F. Hensel, K. Rezvani, P. Muranski, P. Liu, J. J. Melenhorst, A. Larochelle // Stem Cell Res. – 2015. – Т. 14 – № 1 – 95–104с.

104. Iwamoto S. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. / S. Iwamoto, K. Mihara, J. R. Downing, C.-H. Pui, D. Campana // J. Clin. Invest. – 2007. – Т. 117 – № 4 – 1049–57с.

105. Jacamo R. Reciprocal leukemia-stroma VCAM-1/VLA-4-dependent activation of NF-κB mediates chemoresistance. / R. Jacamo, Y. Chen, Z. Wang, W. Ma, M. Zhang, E. L. Spaeth, Y. Wang, V. L. Battula, P. Y. Mak, K. Schallmoser, P. Ruvolo, W. D. Schober, E. J. Shpall, M. H. Nguyen, D. Strunk, C. E. Bueso-Ramos, S. Konoplev, R. E. Davis, M. Konopleva, M. Andreeff // Blood – 2014. – Т. 123 – № 17 – 2691–702с.

106. Jiang Y. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. / Y. Jiang, B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada, C. M. Verfaillie // Nature – 2002. – Т. 418 – № 6893 – 41–9с.

107. Jin L. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. / L. Jin, K. J. Hope, Q. Zhai, F. Smadja-Joffe, J. E. Dick // Nat. Med. – 2006. – Т. 12 – № 10 – 1167–74с.

108. Jin L. CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. / L. Jin, Y. Tabe, S. Konoplev, Y. Xu, C. E. Leysath, H. Lu, S. Kimura, A. Ohsaka, M.-B. Rios, L. Calvert, H. Kantarjian, M. Andreeff, M. Konopleva // Mol. Cancer Ther. – 2008. – Т. 7 – № 1 – 48–58с.

109. Jones D.L. No place like home: anatomy and function of the stem cell

niche / D. L. Jones, A. J. Wagers // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2008. – Т. 9 – № 1 – 11–21с.

110. Juarez J. Interaction of interleukin-7 and interleukin-3 with the CXCL12-induced proliferation of B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia. / J. Juarez, R. Baraz, S. Gaundar, K. Bradstock, L. Bendall // Haematologica – 2007. – Т. 92 – № 4 – 450–9с.

111. Kallioniemi A. Bone morphogenetic protein 4-a fascinating regulator of cancer cell behavior. / A. Kallioniemi // Cancer Genet. – 2012. – Т. 205 – № 6 – 267–77с.

112. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. / A. Keating // Cell Stem Cell – 2012. – Т. 10 – № 6 – 709–16с.

113. Kemp K. Alkylating chemotherapeutic agents cyclophosphamide and melphalan cause functional injury to human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. / K. Kemp, R. Morse, K. Sanders, J. Hows, C. Donaldson // Ann. Hematol. – 2011. – Т. 90 – № 7 – 777–89с.

114. Kersten C. BMP-6 inhibits human bone marrow B lymphopoiesis--upregulation of Id1 and Id3. / C. Kersten, G. Dosen, J. H. Myklebust, E. A. Sivertsen, M. E. Hystad, E. B. Smeland, E. Rian // Exp. Hematol. – 2006. – Т. 34 – № 1 – 72–81с.

115. Khurana S. A novel role of BMP4 in adult hematopoietic stem and progenitor cell homing via Smad independent regulation of integrin-α4 expression. / S. Khurana, S. Buckley, S. Schouteden, S. Ekker, A. Petryk, M. Delforge, A. Zwijsen, C. M. Verfaillie // Blood – 2013. – Т. 121 – № 5 – 781–90с.

116. Kiel M.J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. / M. J. Kiel, O. H. Yilmaz, T. Iwashita, O. H. Yilmaz, C. Terhorst, S. J. Morrison // Cell – 2005. – Т. 121 – № 7 – 1109–21с.

117. Kiel M.J. Supplemental Data SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem

Cells Supplemental Experimental Procedures CD150-Deficient Mice Immunofluorescence Analysis of HSC Localization in Tissue Se / M. J. Kiel, Ö. H. Yilmaz, T. Iwashita, O. H. Yilmaz, C. Terhorst, S. J. Morrison, M. Culture – 2003. – T. 1.

118. Kim J.-A. Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia. / J.-A. Kim, J.-S. Shim, G.-Y. Lee, H. W. Yim, T.-M. Kim, M. Kim, S.-H. Leem, J.-W. Lee, C.-K. Min, I.-H. Oh // Cancer Res. – 2015. – T. 75 – № 11 – 2222–31c.

119. Kim S.-J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. / S.-J. Kim, J. Letterio // Leukemia – 2003. – T. 17 – № 9 – 1731–7c.

120. Kim Y.-W. Defective Notch activation in microenvironment leads to myeloproliferative disease. / Y.-W. Kim, B.-K. Koo, H.-W. Jeong, M.-J. Yoon, R. Song, J. Shin, D.-C. Jeong, S.-H. Kim, Y.-Y. Kong // Blood – 2008. – T. 112 – № 12 – 4628–38c.

121. Klaus M. Reserves, functional, immunoregulatory, and cytogenetic properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with myelodysplastic syndromes. / M. Klaus, E. Stavroulaki, M.-C. Kastrinaki, P. Fragioudaki, K. Giannikou, M. Psyllaki, C. Pontikoglou, D. Tsoukatou, C. Mamalaki, H. A. Papadaki // Stem Cells Dev. – 2010. – T. 19 – № 7 – 1043–54c.

122. Klco J.M. Genomic impact of transient low-dose decitabine treatment on primary AML cells. / J. M. Klco, D. H. Spencer, T. L. Lamprecht, S. M. Sarkaria, T. Wylie, V. Magrini, J. Hundal, J. Walker, N. Varghese, P. Erdmann-Gilmore, C. F. Lichti, M. R. Meyer, R. R. Townsend, R. K. Wilson, E. R. Mardis, T. J. Ley // Blood – 2013. – T. 121 – № 9 – 1633–43c.

123. Kode A. Leukaemogenesis induced by an activating β-catenin mutation in osteoblasts. / A. Kode, J. S. Manavalan, I. Mosialou, G. Bhagat, C. V Rathinam, N. Luo, H. Khiabanian, A. Lee, V. V Murty, R. Friedman, A. Brum, D.

Park, N. Galili, S. Mukherjee, J. Teruya-Feldstein, A. Raza, R. Rabadan, E. Berman, S. Kousteni // Nature – 2014. – Т. 506 – № 7487 – 240–4с.

124. Kondo M. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors / M. Kondo // Immunol. Rev. – 2010. – Т. 238 – № 1 – 37–46с.

125. Kondo M. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. / M. Kondo, A. J. Wagers, M. G. Manz, S. S. Prohaska, D. C. Scherer, G. F. Beilhack, J. A. Shizuru, I. L. Weissman // Annu. Rev. Immunol. – 2003. – Т. 21 – 759–806с.

126. Konopleva M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. / M. Konopleva, S. Konoplev, W. Hu, A. Y. Zaritskey, B. V Afanasiev, M. Andreeff // Leukemia – 2002. – Т. 16 – № 9 – 1713–24с.

127. Konopleva M. The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells. / M. Konopleva, S. Zhao, W. Hu, S. Jiang, V. Snell, D. Weidner, C. E. Jackson, X. Zhang, R. Champlin, E. Estey, J. C. Reed, M. Andreeff // Br. J. Haematol. – 2002. – Т. 118 – № 2 – 521–34с.

128. Konopleva M.Y. Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. / M. Y. Konopleva, C. T. Jordan // J. Clin. Oncol. – 2011. – Т. 29 – № 5 – 591–9с.

129. Krampera M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. / M. Krampera, G. Pizzolo, G. Aprili, M. Franchini // Bone – 2006. – Т. 39 – № 4 – 678–83с.

130. Krause D.S. Differential regulation of myeloid leukemias by the bone marrow microenvironment. / D. S. Krause, K. Fulzele, A. Catic, C. C. Sun, D. Dombkowski, M. P. Hurley, S. Lezeau, E. Attar, J. Y. Wu, H. Y. Lin, P. Divieti-Pajevic, R. P. Hasserjian, E. Schipani, R. A. Van Etten, D. T. Scadden // Nat. Med. – 2013. – Т. 19 – № 11 – 1513–7с.

131. Krevvata M. Inhibition of leukemia cell engraftment and disease progression in mice by osteoblasts. / M. Krevvata, B. C. Silva, J. S. Manavalan, M. Galan-Diez, A. Kode, B. G. Matthews, D. Park, C. A. Zhang, N. Galili, T. L. Nickolas, D. W. Dempster, W. Dougall, J. Teruya-Feldstein, A. N. Economides, I. Kalajzic, A. Raza, E. Berman, S. Mukherjee, G. Bhagat, S. Kousteni // Blood – 2014. – T. 124 – № 18 – 2834–46c.

132. Kunisaki Y. Influences of vascular niches on hematopoietic stem cell fate. / Y. Kunisaki, P. S. Frenette // Int. J. Hematol. – 2014. – T. 99 – № 6 – 699–705c.

133. Kurtova A. V Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. / A. V Kurtova, K. Balakrishnan, R. Chen, W. Ding, S. Schnabl, M. P. Quiroga, M. Sivina, W. G. Wierda, Z. Estrov, M. J. Keating, M. Shehata, U. Jäger, V. Gandhi, N. E. Kay, W. Plunkett, J. A. Burger // Blood – 2009. – T. 114 – № 20 – 4441–50c.

134. Laar L. van de Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. / L. van de Laar, P. J. Coffer, A. M. Woltman // Blood – 2012. – T. 119 – № 15 – 3383–93c.

135. Lai W.-T. Fibroblast growth factor 2 (Fgf2) inhibits differentiation of mesenchymal stem cells by inducing Twist2 and Spry4, blocking extracellular regulated kinase activation, and altering Fgf receptor expression levels. / W.-T. Lai, V. Krishnappa, D. G. Phinney // Stem Cells – 2011. – T. 29 – № 7 – 1102–11c.

136. Lane S.W. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. / S. W. Lane, D. T. Scadden, D. G. Gilliland // Blood – 2009. – T. 114 – № 6 – 1150–7c.

137. Laperrousaz B. Primitive CML cell expansion relies on abnormal

levels of BMPs provided by the niche and on BMPRIb overexpression. / B. Laperrousaz, S. Jeanpierre, K. Sagorny, T. Voeltzel, S. Ramas, B. Kaniewski, M. Ffrench, S. Salesse, F. E. Nicolini, V. Maguer-Satta // Blood – 2013. – T. 122 – № 23 – 3767–77c.

138. Lapidot T. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. / T. Lapidot, C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri, J. E. Dick // Nature – 1994. – T. 367 – № 6464 – 645–8c.

139. Laurora S. Peroxisome proliferator-activated receptor ligands affect growth-related gene expression in human leukemic cells. / S. Laurora, S. Pizzimenti, F. Briatore, A. Fraioli, M. Maggio, P. Reffo, C. Ferretti, M. U. Dianzani, G. Barrera // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2003. – T. 305 – № 3 – 932–42c.

140. Lee O.-H. Expression of the receptor tyrosine kinase Tie2 in neoplastic glial cells is associated with integrin beta1-dependent adhesion to the extracellular matrix. / O.-H. Lee, J. Xu, J. Fueyo, G. N. Fuller, K. D. Aldape, M. M. Alonso, Y. Piao, T.-J. Liu, F. F. Lang, B. N. Bekele, C. Gomez-Manzano // Mol. Cancer Res. – 2006. – T. 4 – № 12 – 915–26c.

141. Lefebvre V. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. / V. Lefebvre, R. R. Behringer, B. de Crombrugghe // Osteoarthritis Cartilage – 2001. – T. 9 Suppl A – S69–75c.

142. Lefebvre V. Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. / V. Lefebvre, B. de Crombrugghe // Matrix Biol. – 1998. – T. 16 – № 9 – 529–40c.

143. Li H. Low/negative expression of PDGFR-α identifies the candidate primary mesenchymal stromal cells in adult human bone marrow. / H. Li, R. Ghazanfari, D. Zacharaki, N. Ditzel, J. Isern, M. Ekblom, S. Méndez-Ferrer, M. Kassem, S. Scheding // Stem cell reports – 2014. – T. 3 – № 6 – 965–74c.

144. Li L. Stem cell quiescence. / L. Li, R. Bhatia // Clin. Cancer Res. –

2011. – Т. 17 – № 15 – 4936–41с.

145. Lichtman M.A. Interrupting the inhibiton of normal hematopoiesis in myelogenous leukemia: a hypothetical approach to therapy. / M. A. Lichtman // Stem Cells – 2000. – Т. 18 – № 5 – 304–6с.

146. Lima M. de Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. / M. de Lima, I. McNiece, S. N. Robinson, M. Munsell, M. Eapen, M. Horowitz, A. Alousi, R. Saliba, J. D. McMannis, I. Kaur, P. Kebriaei, S. Parmar, U. Popat, C. Hosing, R. Champlin, C. Bollard, J. J. Molldrem, R. B. Jones, Y. Nieto, B. S. Andersson, N. Shah, B. Oran, L. J. N. Cooper, L. Worth, M. H. Qazilbash, M. Korbling, G. Rondon, S. Ciurea, D. Bosque, I. Maewal, P. J. Simmons, E. J. Shpall // N. Engl. J. Med. – 2012. – Т. 367 – № 24 – 2305–15с.

147. Liu K.-W. Platelet-derived growth factor signaling in human malignancies. / K.-W. Liu, B. Hu, S.-Y. Cheng // Chin. J. Cancer – 2011. – Т. 30 – № 9 – 581–4с.

148. Loges S. Analysis of concerted expression of angiogenic growth factors in acute myeloid leukemia: expression of angiopoietin-2 represents an independent prognostic factor for overall survival. / S. Loges, G. Heil, M. Bruweleit, V. Schoder, M. Butzal, U. Fischer, U. M. Gehling, G. Schuch, D. K. Hossfeld, W. Fiedler // J. Clin. Oncol. – 2005. – Т. 23 – № 6 – 1109–17с.

149. Lopez-Villar O. Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome. / O. Lopez-Villar, J. L. Garcia, F. M. Sanchez-Guijo, C. Robledo, E. M. Villaron, P. Hernández-Campo, N. Lopez-Holgado, M. Diez-Campelo, M. V Barbado, J. a Perez-Simon, J. M. Hernández-Rivas, J. F. San-Miguel, M.-C. del Cañizo // Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K – 2009. – Т. 23 – № 4 – 664–72с.

150. Mailloux A.W. Fibrosis and subsequent cytopenias are associated with basic fibroblast growth factor-deficient pluripotent mesenchymal stromal cells in large granular lymphocyte leukemia. / A. W. Mailloux, L. Zhang, L. Moscinski, J.

M. Bennett, L. Yang, S. J. Yoder, G. Bloom, C. Wei, S. Wei, L. Sokol, T. P. Loughran, P. K. Epling-Burnette // J. Immunol. – 2013. – Т. 191 – № 7 – 3578–93с.

151. Manabe A. Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. / A. Manabe, E. Coustan-Smith, F. G. Behm, S. C. Raimondi, D. Campana // Blood – 1992. – Т. 79 – № 9 – 2370–7с.

152. Matsunaga T. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. / T. Matsunaga, N. Takemoto, T. Sato, R. Takimoto, I. Tanaka, A. Fujimi, T. Akiyama, H. Kuroda, Y. Kawano, M. Kobune, J. Kato, Y. Hirayama, S. Sakamaki, K. Kohda, K. Miyake, Y. Niitsu // Nat. Med. – 2003. – Т. 9 – № 9 – 1158–65с.

153. McLean K. Human ovarian carcinoma–associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. / K. McLean, Y. Gong, Y. Choi, N. Deng, K. Yang, S. Bai, L. Cabrera, E. Keller, L. McCauley, K. R. Cho, R. J. Buckanovich // J. Clin. Invest. – 2011. – Т. 121 – № 8 – 3206–19с.

154. Meads M.B. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. / M. B. Meads, L. A. Hazlehurst, W. S. Dalton // Clin. Cancer Res. – 2008. – Т. 14 – № 9 – 2519–26с.

155. Melief S.M. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. / S. M. Melief, S. B. Geutskens, W. E. Fibbe, H. Roelofs // Haematologica – 2013. – Т. 98 – № 6 – 888–95с.

156. Melo J. V The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. / J. V Melo // Leukemia – 1996. – Т. 10 – № 5 – 751–6с.

157. Mendelson A. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. / A. Mendelson, P. S. Frenette // Nat. Med. – 2014.

– T. 20 – № 8 – 833–46c.

158. Méndez-Ferrer S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. / S. Méndez-Ferrer, T. V Michurina, F. Ferraro, A. R. Mazloom, B. D. Macarthur, S. A. Lira, D. T. Scadden, A. Ma'ayan, G. N. Enikolopov, P. S. Frenette // Nature – 2010. – T. 466 – № 7308 – 829–34c.

159. Méndez-Ferrer S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche / S. Méndez-Ferrer, T. V. Michurina, F. Ferraro, A. R. Mazloom, B. D. MacArthur, S. A. Lira, D. T. Scadden, A. Ma'ayan, G. N. Enikolopov, P. S. Frenette // Nature – 2010. – T. 466 – № 7308 – 829–834c.

160. Mikkola H.K.A. The search for the hemangioblast. / H. K. A. Mikkola, S. H. Orkin // J. Hematother. Stem Cell Res. – 2002. – T. 11 – № 1 – 9–17c.

161. Miraoui H. Fibroblast growth factor receptor 2 promotes osteogenic differentiation in mesenchymal cells via ERK1/2 and protein kinase C signaling. / H. Miraoui, K. Oudina, H. Petite, Y. Tanimoto, K. Moriyama, P. J. Marie // J. Biol. Chem. – 2009. – T. 284 – № 8 – 4897–904c.

162. Mirshahi P. Vasculogenic mimicry of acute leukemic bone marrow stromal cells. / P. Mirshahi, A. Rafii, L. Vincent, A. Berthaut, R. Varin, G. Kalantar, C. Marzac, O. A. Calandini, J.-P. Marie, C. Soria, J. Soria, M. Mirshahi // Leukemia – 2009. – T. 23 – № 6 – 1039–48c.

163. Morrison S.J. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. / S. J. Morrison, A. C. Spradling // Cell – 2008. – T. 132 – № 4 – 598–611c.

164. Mudry R.E. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. / R. E. Mudry, J. E. Fortney, T. York, B. M. Hall, L. F. Gibson // Blood – 2000. – T. 96 – № 5 – 1926–32c.

165. Muller-sieburg C.E. Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness / C. E. Muller-sieburg, R. H. Cho, L. Karlsson, J. Huang, H. B. Sieburg – 2004. – T. 103 – № 11 – 4111–4118c.

166. Nagao T. [Characteristics and functions of fibroblast colony forming cells in human bone marrow]. / T. Nagao, C. M. Hugo // [Rinshō ketsueki] Japanese J. Clin. Hematol. – 1983. – T. 24 – № 11 – 1455–63c.

167. Nasef A. Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. / A. Nasef, C. Mazurier, S. Bouchet, S. François, A. Chapel, D. Thierry, N.-C. Gorin, L. Fouillard // Cell. Immunol. – T. 253 – № 1-2 – 16–22c.

168. Naveiras O. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. / O. Naveiras, V. Nardi, P. L. Wenzel, P. V Hauschka, F. Fahey, G. Q. Daley // Nature – 2009. – T. 460 – № 7252 – 259–63c.

169. Nervi B. Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. / B. Nervi, P. Ramirez, M. P. Rettig, G. L. Uy, M. S. Holt, J. K. Ritchey, J. L. Prior, D. Piwnica-Worms, G. Bridger, T. J. Ley, J. F. DiPersio // Blood – 2009. – T. 113 – № 24 – 6206–14c.

170. Nifontova I. Sensitivity of mesenchymal stem cells and their progeny to medicines used for the treatment of hematoproliferative diseases. / I. Nifontova, D. Svinareva, T. Petrova, N. Drize // Acta Haematol. – 2008. – T. 119 – № 2 – 98–103c.

171. Nifontova I.N. Stromal clonogenic precursors of hemopoietic microenvironment and their rank in the hierarchy of mesenchymal stem cells. / I. N. Nifontova, D. A. Svinareva, N. J. Drize // Bull. Exp. Biol. Med. – 2008. – T. 145 – № 4 – 544–7c.

172. Nilsson S.K. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. / S. K. Nilsson, H. M. Johnston, J. A. Coverdale // Blood – 2001. – T. 97 – № 8 – 2293–9c.

173. Nilsson S.K. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. / S. K. Nilsson, H. M. Johnston, G. A. Whitty, B. Williams, R. J. Webb, D. T. Denhardt, I.

Bertoncello, L. J. Bendall, P. J. Simmons, D. N. Haylock // Blood – 2005. – Т. 106 – № 4 – 1232–9с.

174. Nishida S. Increased bone formation by intermittent parathyroid hormone administration is due to the stimulation of proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone marrow. / S. Nishida, A. Yamaguchi, T. Tanizawa, N. Endo, T. Mashiba, Y. Uchiyama, T. Suda, S. Yoshiki, H. E. Takahashi // Bone – Т. 15 – № 6 – 717–23с.

175. Nishihira S. High-cell density-induced VCAM1 expression inhibits the migratory ability of mesenchymal stem cells. / S. Nishihira, N. Okubo, N. Takahashi, A. Ishisaki, Y. Sugiyama, N. Chosa // Cell Biol. Int. – 2011. – Т. 35 – № 5 – 475–81с.

176. Notta F. Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. / F. Notta, C. G. Mullighan, J. C. Y. Wang, A. Poeppl, S. Doulatov, L. A. Phillips, J. Ma, M. D. Minden, J. R. Downing, J. E. Dick // Nature – 2011. – Т. 469 – № 7330 – 362–7с.

177. NOWELL P.C. The minute chromosome (Phl) in chronic granulocytic leukemia. / P. C. NOWELL // Blut – 1962. – Т. 8 – 65–6с.

178. NOWELL P.C. Growth and continued function of rat marrow cells in x-radiated mice. / P. C. NOWELL, L. J. COLE, J. G. HABERMEYER, P. L. ROAN // Cancer Res. – 1956. – Т. 16 – № 3 – 258–61с.

179. Nwajei F. The bone marrow microenvironment as niche retreats for hematopoietic and leukemic stem cells. / F. Nwajei, M. Konopleva // Adv. Hematol. – 2013. – Т. 2013 – 953982с.

180. Page C. Le BMP-2 signaling in ovarian cancer and its association with poor prognosis. / C. Le Page, M.-L. Puiffe, L. Meunier, M. Zietarska, M. de Ladurantaye, P. N. Tonin, D. Provencher, A.-M. Mes-Masson // J. Ovarian Res. – 2009. – Т. 2 – 4с.

181. Palma M. De Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of

pericyte progenitors. / M. De Palma, M. A. Venneri, R. Galli, L. Sergi Sergi, L. S. Politi, M. Sampaolesi, L. Naldini // Cancer Cell – 2005. – T. 8 – № 3 – 211–26c.

182. Peled A. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. / A. Peled, I. Petit, O. Kollet, M. Magid, T. Ponomaryov, T. Byk, A. Nagler, H. Ben-Hur, A. Many, L. Shultz, O. Lider, R. Alon, D. Zipori, T. Lapidot // Science – 1999. – T. 283 – № 5403 – 845–8c.

183. Perez-Atayde A.R. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. / A. R. Perez-Atayde, S. E. Sallan, U. Tedrow, S. Connors, E. Allred, J. Folkman // Am. J. Pathol. – 1997. – T. 150 – № 3 – 815–21c.

184. Perkins S. Stromal cell progeny of murine bone marrow fibroblast colony-forming units are clonal endothelial-like cells that express collagen IV and laminin. / S. Perkins, R. A. Fleischman // Blood – 1990. – T. 75 – № 3 – 620–5c.

185. Pietras E.M. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. / E. M. Pietras, M. R. Warr, E. Passegué // J. Cell Biol. – 2011. – T. 195 – № 5 – 709–20c.

186. Pittenger M.F. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. / M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, D. R. Marshak // Science – 1999. – T. 284 – № 5411 – 143–7c.

187. Planat-Benard V. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. / V. Planat-Benard, J.-S. Silvestre, B. Cousin, M. André, M. Nibbelink, R. Tamarat, M. Clergue, C. Manneville, C. Saillan-Barreau, M. Duriez, A. Tedgui, B. Levy, L. Pénicaud, L. Casteilla // Circulation – 2004. – T. 109 – № 5 – 656–63c.

188. Prata K. de L. Effects of high-dose chemotherapy on bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells isolated from lymphoma patients. / K. de L. Prata, M. D. Orellana, G. C. De Santis, S. Kashima, A. M. Fontes, R. de C. V. Carrara, P. V. B. Palma, L. Neder, D. T. Covas // Exp. Hematol. – 2010. – T. 38 –

№ 4 – 292–300.e4c.

189. Pricola K.L. Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. / K. L. Pricola, N. Z. Kuhn, H. Haleem-Smith, Y. Song, R. S. Tuan // J. Cell. Biochem. – 2009. – T. 108 – № 3 – 577–88c.

190. Qian X. Spondin-2 (SPON2), a more prostate-cancer-specific diagnostic biomarker. / X. Qian, C. Li, B. Pang, M. Xue, J. Wang, J. Zhou // PLoS One – 2012. – T. 7 – № 5 – e37225c.

191. Raaijmakers M.H.G.P. Myelodysplastic syndromes: revisiting the role of the bone marrow microenvironment in disease pathogenesis. / M. H. G. P. Raaijmakers // Int. J. Hematol. – 2012. – T. 95 – № 1 – 17–25c.

192. Raaijmakers M.H.G.P. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia / M. H. G. P. Raaijmakers, S. Mukherjee, S. Guo, S. Zhang, T. Kobayashi, J. A. Schoonmaker, B. L. Ebert, F. Al-Shahrour, R. P. Hasserjian, E. O. Scadden, Z. Aung, M. Matza, M. Merkenschlager, C. Lin, J. M. Rommens, D. T. Scadden // Nature – 2010. – T. 464 – № 7290 – 852–857c.

193. Raaijmakers M.H.G.P. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. / M. H. G. P. Raaijmakers, S. Mukherjee, S. Guo, S. Zhang, T. Kobayashi, J. A. Schoonmaker, B. L. Ebert, F. Al-Shahrour, R. P. Hasserjian, E. O. Scadden, Z. Aung, M. Matza, M. Merkenschlager, C. Lin, J. M. Rommens, D. T. Scadden // Nature – 2010. – T. 464 – № 7290 – 852–7c.

194. Ragab A.H. Bone marrow cultures in acute leukemia of childhood. / A. H. Ragab, M. S. Kennedy, H. W. Findley, V. K. Lui // Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol. – 1981. – T. 3 – № 4 – 419–24c.

195. Reikvam H. The cytokine-mediated crosstalk between primary human acute myeloid cells and mesenchymal stem cells alters the local cytokine network and the global gene expression profile of the mesenchymal cells. / H. Reikvam, A. K. Brenner, K. M. Hagen, K. Liseth, S. Skrede, K. J. Hatfield, Ø. Bruserud // Stem

Cell Res. – 2015. – Т. 15 – № 3 – 530–41с.

196. Ribatti D. Hemangioblast does exist. / D. Ribatti // Leuk. Res. – 2008. – Т. 32 – № 6 – 850–4с.

197. Robinson S.N. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. / S. N. Robinson, J. Ng, T. Niu, H. Yang, J. D. McMannis, S. Karandish, I. Kaur, P. Fu, M. Del Angel, R. Messinger, F. Flagge, M. de Lima, W. Decker, D. Xing, R. Champlin, E. J. Shpall // Bone Marrow Transplant. – 2006. – Т. 37 – № 4 – 359–66с.

198. Roela R.A. Gene stage-specific expression in the microenvironment of pediatric myelodysplastic syndromes. / R. A. Roela, D. M. Carraro, H. P. Brentani, J. H. L. Kaiano, D. F. Simão, R. Guarnieiro, L. F. Lopes, R. Borojevic, M. M. Brentani // Leuk. Res. – 2007. – Т. 31 – № 5 – 579–89с.

199. Rondeau G. Effects of different tissue microenvironments on gene expression in breast cancer cells. / G. Rondeau, P. Abedinpour, P. Desai, V. T. Baron, P. Borgstrom, J. Welsh // PLoS One – 2014. – Т. 9 – № 7 – e101160с.

200. Rosen J.M. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. / J. M. Rosen, C. T. Jordan // Science – 2009. – Т. 324 – № 5935 – 1670–3с.

201. Rothlein R. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. / R. Rothlein, M. L. Dustin, S. D. Marlin, T. A. Springer // J. Immunol. – 1986. – Т. 137 – № 4 – 1270–4с.

202. Rowley J.D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. / J. D. Rowley // Nature – 1973. – Т. 243 – № 5405 – 290–3с.

203. Sacchetti B. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. / B. Sacchetti, A. Funari, S. Michienzi, S. Di Cesare, S. Piersanti, I. Saggio, E. Tagliafico, S. Ferrari, P. G. Robey, M. Riminucci, P. Bianco // Cell – 2007. – Т. 131 – № 2 – 324–36с.

204. Schäffler A. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--

basic and clinical implications for novel cell-based therapies. / A. Schäffler, C. Büchler // Stem Cells – 2007. – Т. 25 – № 4 – 818–27с.

205. Schepers K. Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. / K. Schepers, E. M. Pietras, D. Reynaud, J. Flach, M. Binnewies, T. Garg, A. J. Wagers, E. C. Hsiao, E. Passegué // Cell Stem Cell – 2013. – Т. 13 – № 3 – 285–99с.

206. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. / R. Schofield // Blood Cells – 1978. – Т. 4 – № 1-2 – 7–25с.

207. Shipley J.L. Acute myelogenous leukemia. / J. L. Shipley, J. N. Butera // Exp. Hematol. – 2009. – Т. 37 – № 6 – 649–58с.

208. Sipkins D.A. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. / D. A. Sipkins, X. Wei, J. W. Wu, J. M. Runnels, D. Côté, T. K. Means, A. D. Luster, D. T. Scadden, C. P. Lin // Nature – 2005. – Т. 435 – № 7044 – 969–73с.

209. Sison E.A.R. The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting. / E. A. R. Sison, P. Brown // Expert Rev. Hematol. – 2011.

210. Sordi V. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. / V. Sordi, M. L. Malosio, F. Marchesi, A. Mercalli, R. Melzi, T. Giordano, N. Belmonte, G. Ferrari, B. E. Leone, F. Bertuzzi, G. Zerbini, P. Allavena, E. Bonifacio, L. Piemonti // Blood – 2005. – Т. 106 – № 2 – 419–27с.

211. Stier S. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. / S. Stier, Y. Ko, R. Forkert, C. Lutz, T. Neuhaus, E. Grünewald, T. Cheng, D. Dombkowski, L. M. Calvi, S. R. Rittling, D. T. Scadden // J. Exp. Med. – 2005. – Т. 201 – № 11 – 1781–91с.

212. Stöckl S. Sox9 modulates cell survival and adipogenic differentiation of multipotent adult rat mesenchymal stem cells. / S. Stöckl, R. J. Bauer, A. K.

Bosserhoff, C. Göttl, J. Grifka, S. Grässel // J. Cell Sci. – 2013. – T. 126 – № Pt 13 – 2890–902c.

213. Stöckl S. Sox9 Modulates proliferation and expression of osteogenic markers of adipose-derived stem cells (ASC). / S. Stöckl, C. Göttl, J. Grifka, S. Grässel // Cell. Physiol. Biochem. – 2013. – T. 31 – № 4-5 – 703–17c.

214. Straussman R. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. / R. Straussman, T. Morikawa, K. Shee, M. Barzily-Rokni, Z. R. Qian, J. Du, A. Davis, M. M. Mongare, J. Gould, D. T. Frederick, Z. A. Cooper, P. B. Chapman, D. B. Solit, A. Ribas, R. S. Lo, K. T. Flaherty, S. Ogino, J. A. Wargo, T. R. Golub // Nature – 2012. – T. 487 – № 7408 – 500–4c.

215. Sugino N. Early osteoinductive human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells support an enhanced hematopoietic cell expansion with altered chemotaxis- and adhesion-related gene expression profiles. / N. Sugino, Y. Miura, H. Yao, M. Iwasa, A. Fujishiro, S. Fujii, H. Hirai, A. Takaori-Kondo, T. Ichinohe, T. Maekawa // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2016. – T. 469 – № 4 – 823–9c.

216. Sugiyama T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. / T. Sugiyama, H. Kohara, M. Noda, T. Nagasawa // Immunity – 2006. – T. 25 – № 6 – 977–88c.

217. Sun Y. Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. / Y. Sun, J. Campisi, C. Higano, T. M. Beer, P. Porter, I. Coleman, L. True, P. S. Nelson // Nat. Med. – 2012. – T. 18 – № 9 – 1359–68c.

218. Suragani R.N.V.S. Transforming growth factor-β superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis. / R. N. V. S. Suragani, S. M. Cadena, S. M. Cawley, D. Sako, D. Mitchell, R. Li, M. V Davies, M. J. Alexander, M. Devine, K. S. Loveday, K. W. Underwood, A. V Grinberg, J.

D. Quisel, R. Chopra, R. S. Pearsall, J. Seehra, R. Kumar // Nat. Med. – 2014. – T. 20 – № 4 – 408–14c.

219. Tabe Y. Effects of PPARγ Ligands on Leukemia / Y. Tabe, M. Konopleva, M. Andreeff, A. Ohsaka, Y. Tabe, M. Konopleva, M. Andreeff, A. Ohsaka // PPAR Res. – 2012. – T. 2012 – 1–8c.

220. Tabe Y. PML-RARalpha is associated with leptin-receptor induction: the role of mesenchymal stem cell-derived adipocytes in APL cell survival. / Y. Tabe, M. Konopleva, M. F. Munsell, F. C. Marini, C. Zompetta, T. McQueen, T. Tsao, S. Zhao, S. Pierce, J. Igari, E. H. Estey, M. Andreeff // Blood – 2004. – T. 103 – № 5 – 1815–22c.

221. Takahashi Y. Effect of BMP4 on the growth and clonogenicity of human leukemia and lymphoma cells. / Y. Takahashi, T. Ishigaki, Y. Okuhashi, A. Ono, M. Itoh, N. Nara, S. Tohda // Anticancer Res. – 2012. – T. 32 – № 7 – 2813–7c.

222. Takakura N. Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis. / N. Takakura, X. L. Huang, T. Naruse, I. Hamaguchi, D. J. Dumont, G. D. Yancopoulos, T. Suda // Immunity – 1998. – T. 9 – № 5 – 677–86c.

223. Takakura N. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. / N. Takakura, T. Watanabe, S. Suenobu, Y. Yamada, T. Noda, Y. Ito, M. Satake, T. Suda // Cell – 2000. – T. 102 – № 2 – 199–209c.

224. Tanner J. Impairment of natural killer functions by interleukin 6 increases lymphoblastoid cell tumorigenicity in athymic mice. / J. Tanner, G. Tosato // J. Clin. Invest. – 1991. – T. 88 – № 1 – 239–47c.

225. Turzanski J. Interleukin-1beta maintains an apoptosis-resistant phenotype in the blast cells of acute myeloid leukaemia via multiple pathways. / J. Turzanski, M. Grundy, N. H. Russell, M. Pallis // Leukemia – 2004. – T. 18 – № 10 – 1662–70c.

226. Varnum-Finney B. The Notch ligand, Jagged-1, influences the

development of primitive hematopoietic precursor cells. / B. Varnum-Finney, L. E. Purton, M. Yu, C. Brashem-Stein, D. Flowers, S. Staats, K. A. Moore, I. Le Roux, R. Mann, G. Gray, S. Artavanis-Tsakonas, I. D. Bernstein // Blood – 1998. – T. 91 – № 11 – 4084–91c.

227. Venneri M.A. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. / M. A. Venneri, M. De Palma, M. Ponzoni, F. Pucci, C. Scielzo, E. Zonari, R. Mazzieri, C. Doglioni, L. Naldini // Blood – 2007. – T. 109 – № 12 – 5276–85c.

228. Verfaillie C.M. Biology of chronic myelogenous leukemia. / C. M. Verfaillie // Hematol. Oncol. Clin. North Am. – 1998. – T. 12 – № 1 – 1–29c.

229. Vianello F. Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. / F. Vianello, F. Villanova, V. Tisato, S. Lymperi, K.-K. Ho, A. R. Gomes, D. Marin, D. Bonnet, J. Apperley, E. W.-F. Lam, F. Dazzi // Haematologica – 2010. – T. 95 – № 7 – 1081–9c.

230. Vicente López Á. Mesenchymal stromal cells derived from the bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients show altered BMP4 production: correlations with the course of disease. / Á. Vicente López, M. N. Vázquez García, G. J. Melen, A. Entrena Martínez, I. Cubillo Moreno, J. García-Castro, M. R. Orellana, A. G. Z. González // PLoS One – 2014. – T. 9 – № 1 – e84496c.

231. Vicente López M.A. Low doses of bone morphogenetic protein 4 increase the survival of human adipose-derived stem cells maintaining their stemness and multipotency. / M. A. Vicente López, M. N. Vázquez García, A. Entrena, S. Olmedillas Lopez, M. García-Arranz, D. García-Olmo, A. Zapata // Stem Cells Dev. – 2011. – T. 20 – № 6 – 1011–9c.

232. Walkley C.R. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. / C. R. Walkley, G. H. Olsen, S. Dworkin, S. A. Fabb, J. Swann, G. A. McArthur, S. V Westmoreland, P. Chambon, D. T. Scadden, L. E. Purton // Cell – 2007. – T. 129 – № 6 – 1097–

110c.

233. Wang L. Notch-dependent repression of miR-155 in the bone marrow niche regulates hematopoiesis in an NF-κB-dependent manner. / L. Wang, H. Zhang, S. Rodriguez, L. Cao, J. Parish, C. Mumaw, A. Zollman, M. M. Kamoka, J. Mu, D. Z. Chen, E. F. Srour, B. R. Chitteti, H. HogenEsch, X. Tu, T. M. Bellido, H. S. Boswell, T. Manshouri, S. Verstovsek, M. C. Yoder, R. Kapur, A. A. Cardoso, N. Carlesso // Cell Stem Cell – 2014. – T. 15 – № 1 – 51–65c.

234. Williams L.T. Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. / L. T. Williams // Science – 1989. – T. 243 – № 4898 – 1564–70c.

235. Wöhrer S. Mesenchymal stem cells in patients with chronic myelogenous leukaemia or bi-phenotypic Ph+ acute leukaemia are not related to the leukaemic clone. / S. Wöhrer, W. Rabitsch, M. Shehata, R. Kondo, H. Esterbauer, B. Streubel, C. Sillaber, M. Raderer, U. Jaeger, C. Zielinski, P. Valent // Anticancer Res. – T. 27 – № 6B – 3837–41c.

236. Wu H. Epigenetic Regulation of Stem Cell Differentiation / H. Wu, Y. E. Sun // Pediatr. Res. – 2006. – T. 59 – 21R–25Rc.

237. Wynn R.F. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. / R. F. Wynn, C. A. Hart, C. Corradi-Perini, L. O'Neill, C. A. Evans, J. E. Wraith, L. J. Fairbairn, I. Bellantuono // Blood – 2004. – T. 104 – № 9 – 2643–5c.

238. Xu L. Celastrol inhibits lung infiltration in differential syndrome animal models by reducing TNF-α and ICAM-1 levels while preserving differentiation in ATRA-induced acute promyelocytic leukemia cells. / L. Xu, Y. Zheng, Y. Wang, Y. Yang, F. Cao, B. Peng, X. Xu, H. An, A. Zheng, D. Zhang, G. Uzan, Y. Yu // PLoS One – 2014. – T. 9 – № 8 – e105131c.

239. Xu Y. Lenalidomide overcomes suppression of human natural killer cell anti-tumor functions by neuroblastoma microenvironment-associated IL-6 and TGFβ1. / Y. Xu, J. Sun, M. A. Sheard, H. C. Tran, Z. Wan, W. Y. Liu, S.

Asgharzadeh, R. Sposto, H. W. Wu, R. C. Seeger // Cancer Immunol. Immunother. – 2013. – T. 62 – № 10 – 1637–48c.

240. Yang L. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. / L. Yang, R. M. Froio, T. E. Sciuto, A. M. Dvorak, R. Alon, F. W. Luscinskas // Blood – 2005. – T. 106 – № 2 – 584–92c.

241. Yin T. Review series The stem cell niches in bone / T. Yin, L. Li – 2006. – T. 116 – № 5 – 1195–1201c.

242. Zeng Z. Inhibition of CXCR4 with the novel RCP168 peptide overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias. / Z. Zeng, I. J. Samudio, M. Munsell, J. An, Z. Huang, E. Estey, M. Andreeff, M. Konopleva // Mol. Cancer Ther. – 2006. – T. 5 – № 12 – 3113–21c.

243. Zeng Z. Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. / Z. Zeng, Y. X. Shi, I. J. Samudio, R.-Y. Wang, X. Ling, O. Frolova, M. Levis, J. B. Rubin, R. R. Negrin, E. H. Estey, S. Konoplev, M. Andreeff, M. Konopleva // Blood – 2009. – T. 113 – № 24 – 6215–24c.

244. Zhang B. Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. / B. Zhang, Y. W. Ho, Q. Huang, T. Maeda, A. Lin, S.-U. Lee, A. Hair, T. L. Holyoake, C. Huettner, R. Bhatia // Cancer Cell – 2012. – T. 21 – № 4 – 577–92c.

245. Zhang H.-M. Influence of human bone marrow mesenchymal stem cells on proliferation of chronic myeloid leukemia cells. / H.-M. Zhang, L.-S. Zhang // Ai Zheng – 2009. – T. 28 – № 1 – 29–32c.

246. Zhang J. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. / J. Zhang, C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W.-G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina, L. Li // Nature – 2003. – T. 425 – № 6960 – 836–41c.

247. Zhao Z.-G. Phenotypic and functional comparison of mesenchymal

stem cells derived from the bone marrow of normal adults and patients with hematologic malignant diseases. / Z.-G. Zhao, Y. Liang, K. Li, W.-M. Li, Q.-B. Li, Z.-C. Chen, P. Zou // Stem Cells Dev. – 2007. – Т. 16 – № 4 – 637–48с.

248. Zhao Z.-G. Functional characteristics of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. / Z.-G. Zhao, W. Xu, H.-P. Yu, B.-L. Fang, S.-H. Wu, F. Li, W.-M. Li, Q.-B. Li, Z.-C. Chen, P. Zou // Cancer Lett. – 2012. – Т. 317 – № 2 – 136–43с.

249. Zhou B.O. Hematopoietic stem and progenitor cells regulate the regeneration of their niche by secreting Angiopoietin-1. / B. O. Zhou, L. Ding, S. J. Morrison // Elife – 2015. – Т. 4 – e05521с.

250. Zuk P.A. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. / P. A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim, M. H. Hedrick // Mol. Biol. Cell – 2002. – Т. 13 – № 12 – 4279–95с.