СВЄЖЕНЦЕВА ІЛОНА ОЛЕКСАНДРІВНА. Назва дисертаційної роботи: "МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА КЛІТИН ЕРИТРОЇДНОЇ ТА ГРАНУЛОЦИТО-МАКРОФАГАЛЬНОЇ ЛАНОК ГЕМОПОЕЗУ ПАЦІЄНТІВ З ХРОНІЧНОЮ МІЄЛОЇДНОЮ ЛЕЙКЕМІЄЮ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН IN VITRO ТА IN VIVO ПРИ ТЕРАПІЇ ІНГІБІТОРАМИ ТИРОЗИНКІНАЗ"

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

Свєженцева Ілона Олександрівна

УДК576.3:616.155.392]:577.112.387](043.3)

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА КЛІТИН ЕРИТРОЇДНОЇ

ТА ГРАНУЛОЦИТО-МАКРОФАГАЛЬНОЇ ЛАНОК ГЕМОПОЕЗУ

ПАЦІЄНТІВ З ХРОНІЧНОЮ МІЄЛОЇДНОЮ ЛЕЙКЕМІЄЮ

У КУЛЬТУРІ КЛІТИН IN VITRO ТА IN VIVO

ПРИ ТЕРАПІЇ ІНГІБІТОРАМИ ТИРОЗИНКІНАЗ

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Науковий керівник

Білько Денис Іванович

кандидат біологічних наук

Київ 2016

2

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 5

ВСТУП 6

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 12

1.1. Характеристика лейкемічних стовбурових клітин та клітинпопередників при хронічній мієлоїдній лейкемії

12

1.2 Молекулярні механізми лейкозогенезу 21

1.3. Роль мікрооточення у процесах лейкозогенезу при хронічній

мієлоїдній лейкемії

26

1.4. Характеристика інгібіторів тирозинкіназ першого та другого

покоління (іматинібу та нілотинібу)

29

1.5. Аналіз застосування методів первинної культури гемопоетичних

клітин для дослідження індивідуальних особливостей стану

кісткового мозку пацієнтів при хронічній мієлоїдній лейкемії

37

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 44

2.1. Об′єкти та матеріали дослідження 44

2.2. Зaбiр тa пiдгoтувaння мaтерiaлу дo пoдaльшoгo дoслiдження 45

2.3. Культивувaння клiтин in vitro у нaпiврiдкoму aгaрi 46

2.4. Культивувaння клiтин in vitro у метилцелюлозі 46

2.5. Культивувaння клiтин у суспензiйнiй культурi in vitro 48

2.6. Культивувaння клiтин in vivo у нaпiврiдкoму aгaрi 49

2.7. Стaтистичнa oбрoбкa результaтiв дoслiдження 51

РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИХ

ХАРАКТЕРИСТИК КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ЕРИТРОЇДНОЇ

ТА ГРАНУЛОЦИТО-МАКРОФАГАЛЬНОЇ ЛАНОК ГЕМОПОЕЗУ

ПАЦІЄНТІВ ІЗ РІЗНИМ ХАРАКТЕРОМ ВІДПОВІДІ НА

52

3

ТЕРАПІЮ ІНГІБІТОРАМИ ТИРОЗИНКІНАЗ ПЕРШОГО ТА

ДРУГОГО ПОКОЛІННЯ

3.1. Дослідження функціональної активності клітин-попередників

еритроїдної ланки гемопоезу у зразках кісткового мозку із

хронічною мієлоїдною лейкемією у разі терапії препаратами

групи інгібіторів тирозинкіназ першого та другого покоління

52

3.2. Визначення функціональної активності гранулоцитомакрофагальних клітин-попередників при ХМЛ у разі різного

характеру відповіді на терапію препаратами групи інгібіторів

тирозинкіназ першого та другого покоління

59

3.3. Дослідження прогностичного значення функціональної

активності клітин кісткового мозку пацієнта для оцінки

подальшого развитку лейкемічного клону при застосуванні

препаратів групи інгібіторів тирозинкіназ

71

3.4 Визначення впливу хіміотерапевтичних препаратів, що

застосовувалися перед початком терапії препаратами групи

інгібіторів тирозинкіназ, на функціональну активність клітин

кісткового мозку при ХМЛ

79

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ФАКТОРІВ МІКРООТОЧЕННЯ НА КЛІТИНИ

ЕРИТРОЇДНОЇ ТА ГРАНУЛОЦИТО-МАКРОФАГАЛЬНОЇ

ЛАНОК ГЕМОПОЕЗУ ПРИ ТЕРАПІЇ ІНГІБІТОРАМИ

ТИРОЗИНКІНАЗ ПЕРШОГО ТА ДРУГОГО ПОКОЛІННЯ

91

4.1. Дослідження впливу факторів нормального мікрооточення на

морфофункціональну активність клітин еритроїдної ланки

гемопоезу при ХМЛ за умови культивування у гелевих

дифузійних камерах in vivo

92

4

4.2. Дослідження впливу факторів нормального мікрооточення на

морфофункціональну активність клітин гранулоцитомакрофагальної ланки гемопоезу при ХМЛ за умови

культивування у гелевих дифузійних камерах in vivo

101

4.3 Морфофункціональні характеристики клітин кісткового при

хронічній мієлоїдній лейкемії у разі терапії інгібіторами

тирозинкіназ першого та другого покоління за умов наявності та

відсутності у культуральному середовищі цитокінів та ростових

факторів

114

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ 144

ВИСНОВКИ 158

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 160

5

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГСК – гемoпoетичнi стoвбурoвi клiтини;

ГМ-КСФ – гранулоцито-макрофагальний колонієстимулюючий фактор;

ЕКУ – ефективнiсть кoлoнiєутвoрення;

ІТК – інгібітори тирозинкіназ;

КУО-ГМ – колонієутворюючі одиниці гранулоцито-макрофагальні;

КУО-Е – колонієутворюючі одиниці еритроїдні;

КлО-ГМ – кластероутворюючі одиниці гранулоцито-макрофагальні;

ЛСК – лейкемічна стoвбурoвa клiтинa;

МСК – мезенхiмaльнi стoвбурoвi клiтини;

ХМЛ – хрoнiчнa мiєлoїднa лейкемiя;

ABL - abelson murine leukemia;

BCR – break-point cluster region;

CD – клaстери диференцiювaння;

Iл – iнтерлейкiн;

PBS – phosphate buffer solution;

Ph – Фiлaдельфiйськa хрoмoсoмa;

Ph+

клітини – клітини, що містять Філадельфійську хромосому;

SI – Sokal index – індекс Сокаля;

RPMI – 1640 – Roswell Park Memorial Institute medium.

6

ВСТУП

Актуальність теми. Лейкемічна стовбурова клітина (ЛСК) та її найближчі

нащадки – клітини-попередники, відіграють важливу роль у патогенезі

гемобластозів [47, 89]. Вважається, що причиною виникнення хронічної

мієлоїдної лейкемії (ХМЛ) є трансформація гемопоетичної стовбурової клітини

[68, 136, 209]. Підтвердженням існування ЛСК є також той факт, що

Філадельфійську хромосому виявляють не лише в гранулоцито-макрофагальних, а

й у еритроїдних клітинах кісткового мозку [97, 187]. У наявних дослідженнях

представлені дані, що свідчать про походження як еритроїдної, так і гранулоцитомакрофагальної ланок гемопоезу від спільної, меншою мірою комітованої

клітини-попередника мієлоїдного ряду [5, 8]. Незважаючи на це прийнято

вважати, що ХМЛ – це захворювання, яке характеризується підвищенням

кількості гранулоцито-макрофагальних клітин у кістковому мозку пацієнтів [59].

Однак, існує велика кількість суперечливих даних стосовно ролі еритроїдної

ланки гемопоезу у патогенезі ХМЛ [110, 151, 156]. Крім того, до кінця не

з’ясовано роль факторів мікрооточення в процесах проліферації та

диференціювання клітин-попередників [52, 66, 67, 93].

ХМЛ була першим онкологічним захворюванням, причину виникнення якого

чітко пов’язали з молекулою-мішенню – тирозинкіназою BCR-ABL [154, 158]. Це

і призвело до відкриття препаратів таргетної дії – інгібіторів тирозинкіназ (ІТК),

які замість тотального знищення всіх клітин кісткового мозку, діють вибірково,

лише на клітини лейкемічного клона [117, 163, 207]. Однак, з часом вони можуть

набувати резистентності до препаратів. Було встановлено, що однією з можливих

причин стійкості була поява мутацій у геномі ЛСК та ранніх клітин-попередників,

які в подальшому призводили до нечутливості клітин лейкемічного клону до ІТК

[72, 75, 81, 118]. Оскільки ще до кінця не встановлено механізму формування

7

резистентності до ІТК як на молекулярному, так і на клітинному рівнях, виникає

необхідність проведення експериментальних досліджень для встановлення впливу

ІТК на морфофункціональну активність гемопоетичних стовбурових клітин та

ранніх клітин-попередників як гранулоцито-макрофагальної, так і еритроїдної

ланок гемопоезу. Це дозволить суттєво поглибити знання щодо значимості

еритроїдних клітин-попередників у патогенезі ХМЛ та розвитку стійкості

лейкемічного клона до терапії ІТК. Враховуючи вище викладене, ми вважали за

доцільне дослідити морфофункціональні характеристики гемопоетичних клітин

пацієнтів на різних етапах лікування при терапії ІТК в культурах іn vivo та in vitro.

Зв'язок роботи з науковими напрямками, програмами, планами, темами.

Робота виконана в рамках науково-дослідної програми Національного

університету «Києво-Могилянська академія» «Морфофункціональна оцінка пулу

стовбурових клітин при хронічній мієлоїдній лейкемії в культурі клітин in vitro»

2014 – 2016 рр. (№ держреєстрації 0114U001804).

Мета дослідження. Метою роботи було визначення морфофункціональних

характеристик клітин еритроїдної та гранулоцито-макрофагальної ланок

гемопоезу пацієнтів з хронічною мієлоїдною лейкемією в культурі клітин in vitro

та in vivo при терапії інгібіторами тирозинкіназ.

Задачі дослідження.

1. Охарактеризувати морфофункціональні характеристики клітинпопередників еритропоезу пацієнтів з хронічною мієлоїдною лейкемією при

терапії інгібіторами тирозинкіназ.

2. Провести порівняльний аналіз клоногенної активності гранулоцитомакрофагальних клітин-попередників пацієнтів із різним характером відповіді

лейкемічного клону на терапію інгібіторами тирозинкіназ у напіврідкому агарі in

vitro.

8

3. Визначити прогностичне значення результатів культивування еритроїдних

та гранулоцито-макрофагальних клітин-попередників кісткового мозку пацієнтів

при порівнянні з загальноприйнятим прогностичним фактором – індексом Сокаля,

що дозволить здійснювати тривалий прогноз відповіді клітин лейкемічного клону

на застосування препаратів таргетної дії.

4. Оцінити вплив попередньго застосування хіміотерапевтичних препаратів

на зміну функціональної активності клітин-попередників кісткового мозку

пацієнтів при терапії ІТК.

5. Визначити вплив комплексу розчинних факторів нормального

мікрооточення на показники морфофункціональної активності гемопоетичних

клітин-попередників кісткового мозку пацієнтів при терапії інгібіторами

тирозинкіназ у культурі клітин in vivo.

6. Оцінити здатність мононуклеарів кісткового мозку пацієнтів з хронічною

мієлоїдною лейкемією до факторнезалежної проліферації у суспензійній культурі

клітин in vitro.

Об'єкт дослідження – клітини кісткового мозку пацієнтів з хронічною

мієлоїдною лейкемією.

Предмет дослідження – морфофункціональна характеристика клітин

гранулоцито-макрофагальної та еритроїдної ланки кровотворення при хронічній

мієлоїдній лейкемії.

Методи дослідження – культуральні, цитологічні, статистичні, світлова

мікроскопія.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано, що при ХМЛ

за умов застосування ІТК відбуваються зміни функціональної активності не лише

клітин гранулоцито-макрофагальної, а й еритроїдної ланки гемопоезу. Виявлено,

що при набутті стійкості до ІТК, клітини лейкемічного клону характеризуються

здатністю до проліферації та диференціювання в гранулоцито-макрофагальному і

9

еритроїдному напрямках в суспензійній культурі клітин in vitro незалежно від

наявності гранулоцито-макрофагального фактора та еритропоетину у

культуральному середовищі. За допомогою застосування оригінальної моделі

дослідження еритроїдних клітин-попередників у дифузійних камерах in vivo

вперше встановлено вплив розчинних факторів мікрооточення на еритроїдні

клітини-попередники при ХМЛ. Виявлено, що при ХМЛ клітини-попередники

гранулоцито-макрофагальної ланки гемопоезу, незважаючи на здатність до

диференціювання, є нечутливими до розчинних факторів нормального

мікрооточення, а еритроїдні клітини-попередники характеризуються

пригніченням еритропоетин-незалежної проліферації в культурі клітин in vivo.

Вперше отримано достовірне підтвердження прогностичного значення

функціональної активності клітин кісткового мозку пацієнта при її порівнянні з

визнаним прогностичним фактором – індексом Сокаля.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані в роботі

експериментальні дані можуть бути використані як додаткові критерії діагностики

та прогнозування подальшого перебігу ХМЛ у разі терапії ІТК в культурі in vitro з

метою вчасної корекції лікувальної схеми.

Результати розробок автора використовуються у навчальному процесі

підготовки фахівців кафедри лабораторної діагностики біологічних систем в

Національному університеті «Києво-Могилянська академія».

Особистий внесок здобувача полягає у самостійному здійсненні автором

аналізу літературних джерел, обґрунтуванні актуальності теми , розробки схеми

проведення досліджень, формуванні мети та основних задач досліджень (за участі

наукового керівника). Автором власноруч проведено культивування

гемопоетичних клітин in vitro, у дифузійних камерах in vivo, здійснено вилучення

індивідуальних колоній-клонів, їх забарвлення та мікроскопічне дослідження,

опрацьовано виписки з медичних карток пацієнтів. Разом із науковим керівником

10

інтерпретовано та узагальнено результати досліджень, сформульовано висновки

роботи, підготовано до друку наукові праці.

Верифікація діагнозу проведена спеціалістами відділу онкогематології та

транспланталогії Інституту клінічної радіології ДУ «Національний нaукoвий

центр рaдiaцiйнoї медицини НAМН Укрaїни», цитогенетичні дослідження клітин

кісткового мозку пацієнтів здійснені к.б.н., с.н.с. лабораторії імуногенетики

Дмитренко Іриною Віталіївною.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи

доповідались на: XV Ювілейній всеросійській медико-біологічній конференції

молодих дослідників (з міжнародною участю) «Фундаментальна наука та клінічна

медицина – людина та її здоров′я» (Санкт-Петербург, 2012); VII Міжнародній

конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2012);

VII симпозіумі наук про життя (Лейпциг, 2012); Тижні клітинних технологій

(Київ, 2013); ХХ симпозіумі в Вілседе (Вілседе, 2014); ІІІ міжнародній науковій

конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та

прикладні дослідження в біології» (Донецьк, 2014); ХІІ Міжнародній науковій

конференції студентів та аспірантів «Шевченківська весна: науки про життя»

(Київ, 2014) – друге місце за усну доповідь; Х міжнародній науковій конференції

студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2014) – перше місце за

кращу усну доповідь; IV Міжнародному симпозіумі клітинної біології (Ужгород,

2014); ХІ міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і

поступ біології» (Львів, 2015), XIV міжнародній науковій конференції студентів,

аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна» (Київ, 2016).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 19 наукових праць, з них

8 статей, 5 з яких у спеціалізованих виданнях, рекомендованих ДАК України (2 з

них індексуються наукометричною базою SCOPUS), 2 у іноземних виданнях, 1 у

11

іншому виданні та 10 тез доповідей в матеріалах міжнародних і національних

конгресів та конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація виконана на 188 сторінках

друкованого тексту і складається із вступу, чотирьох розділів – огляд літератури,

матеріали і методи досліджень, результати досліджень, обговорення результатів

досліджень, висновків та списку використаних джерел (217 найменувань, з них

183 – латиницею та 34 – кирилицею).

ВИСНОВКИ

Удисертаційнійроботінаосновідослідженняморфофункціональних

характеристикклітинеритроїдноїтагранулоцитомакрофагальноїланок

гемопоезувизначеноособливостізмінипроліфераціїтадиференціюванняклітинпопередниківмієлоїдноїланкикровотворенняуразінабуттяклітинами

лейкемічногоклонустійкостідотерапіїінгібіторамитирозинкіназ

Встановленощопринабуттіклітинамилейкемічногоклонустійкостідо

іматинібутанілотинібувідбуваєтьсяпідвищеннякількостіяк

гранулоцитомакрофагальнихтакіеритроїднихколоній

Прианалізірезультатівморфологічногодослідженнявнутрішньогоскладу

клітиннихагрегатіввиявленощознабуттямстійкостіклітин

лейкемічногоклонудоіматинібутанілотинібувідбуваєтьсяпідвищення

кількостіранніхформнелишегранулоцитомакрофагальнихай

еритроїднихклітинпопередників

Виявленоздатністьклітинеритроїдноїланкигемопоезудоеритропоетиннезалежноїпроліфераціївкультуріклітинзаумовнаявностіу

культуральномусередовищіфетальноїтелячоїсироватки

Результатипорівняльногоаналізуклоногенноїактивностіеритроїднихта

гранулоцитомакрофагальнихклітинкістковогомозкупацієнтівз

оптимальноювідповіддюнатерапіюіматинібомтанілотинібомсвідчать

провищуефективністьвпливунілотинібунаранніклітинипопередники

кістковогомозкуприХМЛ±еритроїднихі±гранулоцитомакрофагальнихта±еритроїднихі±гранулоцитомакрофагальнихколонійвідповідно

Урезультатіпорівняльногоаналізуколонієутворюючоїактивності

гемопоетичнихклітинпопередниківпацієнтівприХМЛіз



загальновизнанимпрогностичнимкритерієм–індексомСокаля

продемонстрованощоклоногеннаактивністьгранулоцитомакрофагальноїланкигемопоезуатакожеритропоетиннезалежне

формуванняеритроїднихколонійможутьслугуватидодатковим

прогностичнимфакторомдляоцінкивідповідіклітинлейкемічногоклону

натерапіюІТК

Встановленощозастосуванняхіміотерапевтичнихпрепаратівперед

терапієюІТКтакихякбусульфантагідроксикарбамідбільшемісяців

сприяєпідвищеннюколонієутворюючоїактивностіеритроїднихта

гранулоцитомакрофагальнихклітинпопередниківщонесприятливо

впливаєнаперебіглейкемічногопроцесу

Показанощорозчинніфакторинормальногомікрооточенняневпливають

напроліфераціютадиференціюваннягранулоцитомакрофагальних

клітинпопередниківнезалежновідхарактерувідповідінатерапіюІТК

однакпригнічуютьеритропоетиннезалежнеформуванняеритроїдних

колоній

Виявленощоуразістійкостіклітинлейкемічногоклонудоіматинібута

нілотинібунаявністьусуспензійнійкультурігранулоцитомакрофагальногоколонієстимулюючогофактораневпливаєна

проліфераціютадиференціюванняклітинщоможебутидодатковим

факторомоцінкивідповідіклітинлейкемічногоклонунатерапіюІТК