

## ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТОК К ПРОТИВОЛЕЙКЕМИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ *IN VITRO*

О.С. Татарина, Е.Ю. Осипова, С.А. Румянцев

ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава, Москва

Контакты: Елена Юрьевна Осипова e\_ossipova@mail.ru

*В настоящем исследовании изучено влияние аллогенных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга доноров на лейкемические клетки пациентов. В ходе работы исследовалось действие на чувствительность к противолейкемическим препаратам *in vitro* и способность лейкемических клеток к спонтанному и индуцированному цитарабином апоптозу. Было показано, что МСК снижают чувствительность лейкемических клеток миелоидного ряда к даунорубину. Однако МСК не оказывали статистически значимого влияния на уровни спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза лейкемических клеток.*

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, чувствительность к противолейкемическим препаратам, лейкемические клетки, спонтанный апоптоз, индуцированный цитарабином апоптоз

### INFLUENCE OF ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS ON LEUKEMIC CELLS *IN VITRO* SENSITIVITY TO ANTILEUKEMIC DRUGS

O.S. Tatarinova, E.Yu. Osipova, S.A. Romyantsev

Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

*In present study influence of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) on patients' leukemic cells is investigated. Influence on *in vitro* sensitivity to antileukemic drugs and spontaneous and cytarabine-induced apoptosis of leukemic cells was studied. It has been shown that MSC reduce myeloid leukemic cells sensitivity to daunorubicine. However, MSC did not statistically significant influence on spontaneous and cytarabine-induced apoptosis of leukemic cells.*

**Key words:** mesenchymal stem cells, antileukemic drug sensitivity, leukemic cells, spontaneous apoptosis, cytarabine-induced apoptosis

#### Введение

Метод трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК), как аутологичных, так и аллогенных, в последние годы все чаще используется в клинической практике для ускорения приживления кроветворных предшественников при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), благодаря способности МСК продуцировать цитокины и ростовые факторы, необходимые для пролиферации и дифференцировки кроветворных предшественников [1, 2] и для профилактики и терапии иммунологических осложнений ТГСК, таких как реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и отторжение трансплантата [3]. Эффективность данного метода связана с тем, что МСК обладают иммуносупрессивными свойствами, способны оказывать антипролиферативное воздействие на лимфоциты, ингибировать активацию и ответ Т-клеток и клеток памяти [4, 5].

Согласно данным литературы, совместное культивирование стромальных клеток костного мозга и лейкемических клеток различных культуральных линий, а также клеток доноров, может приводить к сниже-

нию пролиферации лейкемических клеток [6–11], увеличению количества лейкемических клеток в фазе G0/G1, уменьшению количества клеток в фазах S [6, 7, 9] и G2/M [8]. В соответствии с результатами некоторых работ, стромальные клетки костного мозга, наоборот, могут способствовать пролиферации лейкемических клеток [12]. Однако мнения исследователей сходятся на том, что стромальные клетки костного мозга обладают способностью снижать уровни спонтанного (индуцированного бессывороточной средой) [12, 13] и индуцированного химиопрепаратами апоптоза [7–9, 13–15]. Механизм данного действия может быть связан с повышением экспрессии генов антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и Bcl-XL в лейкемических клетках [8, 9, 13], снижением активности каспазы 3 типа в лейкемических клетках [9, 16], повышением активности фосфокиназы Akt [17].

Таким образом, стромальные клетки костного мозга могут препятствовать спонтанному и индуцированному химиопрепаратами апоптозу лейкемических клеток, что может приводить к снижению чувствительности лейкемических клеток к химиопрепа-

ратам *in vitro*. Было показано, что чувствительность *in vitro* коррелирует с клиническим ответом на химиотерапию, безрецидивной и бессобытийной выживаемостью пациентов, больных лейкозом [18–21].

Целью данной работы было определение влияния аллогенных МСК костного мозга доноров на чувствительность лейкоэмических клеток пациентов к противолейкемическим препаратам *in vitro* и способность лейкоэмических клеток пациентов к спонтанному и индуцированному цитарабином апоптозу.

### Материалы и методы

#### Материал исследования

**Лейкемические клетки.** В работе были использованы лейкоэмические клетки, выделенные при помощи градиентного центрифугирования из образцов костного мозга пациентов в возрасте от 6 месяцев до 17 лет с впервые диагностированными нелечеными острыми лейкозами. В соответствии с диагнозом пациентов образцы костного мозга и выделенные из них лейкозные клетки были разделены на 3 основные группы (табл. 1).

Таблица 1. Количество исследованных образцов костного мозга больных различными вариантами острого лейкоза

Вариант лейкоза (группа)	n, количество образцов
ВП-ВП ОЛЛ	15
ОМЛ	9
Т-ОЛЛ	4

Первая – группа В-клеточных острых лимфобластных лейкозов (В-ОЛЛ), 2-я – группа острых миелоидных лейкозов (ОМЛ), 3-я – группа Т-клеточных острых лимфобластных лейкозов (Т-ОЛЛ).

Лейкемические клетки, использованные для определения уровней апоптоза, на группы не подразделяли.

**МСК костного мозга.** В работе были использованы МСК, выделенные из образцов костного мозга здоровых доноров. Культивирование МСК костного мозга проводили рутинным способом. Клетки высаживали на 24-луночные планшеты в концентрации  $25 \times 10^3$  на лунку для эксперимента с определением чувствительности лейкоэмических клеток к противоопухолевым препаратам, а также во флаконы площадью  $25 \text{ см}^2$  в концентрации  $200 \times 10^3$  для определения уровней апоптоза лейкоэмических клеток.

#### Методы исследования

За основу метода для определения чувствительности лейкоэмических клеток к противолейкемическим препаратам был взят МТТ-анализ по методике лаборатории онкогематологии и иммунологии госпиталя Свободного Университета Ам-

стердама [21, 22], в который были внесены изменения. В ходе эксперимента производили инкубацию бластных клеток костного мозга на подложке из МСК и без подложки из МСК с различными разведениями химиопрепаратов в течение 4 сут. В ходе исследования тестировали препараты, относящиеся к различным группам противоопухолевых препаратов, используемых для лечения злокачественных клональных заболеваний крови: цитарабин (цитозар), метилпреднизолон, даунорубин. В последующем определяли полулетальную концентрацию (LC50) для каждого препарата и производили статистический анализ значений LC50. Для оценки средних значений LC50 использовалась медиана, для определения достоверности различий между двумя группами (при воздействии МСК и в отсутствие воздействия МСК) применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Статистическая компьютерная обработка полученного материала проводилась при помощи пакета программ Microsoft Excel и Statistica 8.0. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Кроме того, производилась оценка выживаемости лейкозных клеток (определение доли живых клеток) в лунках платы с МСК без химиопрепаратов. В качестве контрольных лунок использовались лунки платы без МСК и без химиопрепаратов, в которых значение выживаемости клеток принимали за 1.

Для определения уровней спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза лейкоэмических клеток использовали окрашивание конъюгатом аннексина-V с флуорохромом (изотиоцианатом флуоресцеина, FITC) и йодистым пропидием (propidium iodide, PI) с последующим анализом при помощи проточной цитофлуориметрии. Для индукции апоптоза лейкоэмические клетки инкубировали в течение 24 часов в следующих условиях:

- в среде RPMI-1640 – для определения уровня спонтанного апоптоза:
  - на подложке из МСК,
  - без подложки из МСК;
- в растворе цитозара с концентрацией  $0,0025 \text{ мг/мл}$  в среде RPMI-1640 – для определения уровня индуцированного апоптоза:
  - на подложке из МСК,
  - без подложки из МСК.

После окрашивания Annexin V-FITC Kit (Bender MedSystems GmbH) производили анализ клеток при помощи проточного цитофлуориметра FACScan, оценивая интенсивность зеленой флуоресценции FITC-аннексина V (FL1, 530 нм) и красной флуоресценции йодистого пропидия (FL2, в интервале от 564 до 606 нм). В качестве «негативного контроля» использовали неокрашенные клетки. При помощи программы CellQuest Pro выстраивалась точечная

диаграмма распределения популяций клеток. Выделяли 4 кластера: жизнеспособные клетки AnV-/PI- (в левом нижнем квадранте), ранние апоптотические клетки AnV+/PI- (правый нижний квадрант), некротические или поздние апоптотические клетки – последующая стадия апоптоза *in vitro* AnV+/PI+ (правый верхний квадрант) и некротические клетки AnV-/PI+ (левый верхний квадрант) (рис. 1).

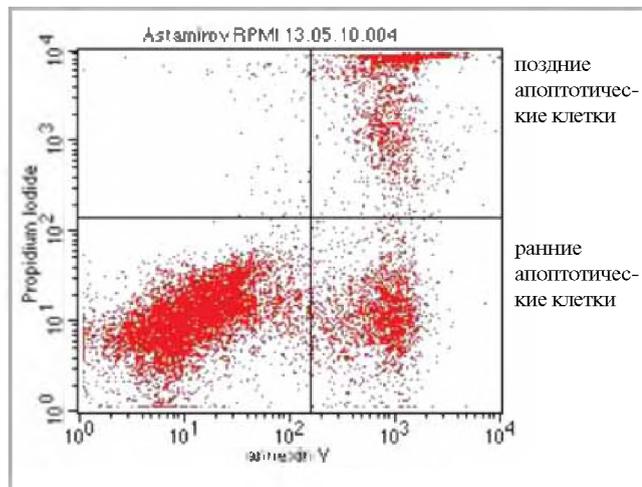


Рис. 1. Гистограмма распределения лейкоэмических клеток при окрашивании аннексином-V-FITC и йодистым пропидием

Группу сравнения для оценки результатов составили образцы лейкоэмических клеток до инкубации (0 часов). В каждой группе лейкоэмических

клеток с одинаковыми условиями инкубации рассчитывали общую долю апоптотических клеток (суммарное количество ранних и поздних апоптотических клеток). Для оценки скорости и динамики накопления апоптотических клеток был разработан оригинальный показатель – коэффициент накопления апоптотических клеток (Капо). Показатели раннего и позднего спонтанного апоптоза в группе сравнения принимались за 1, в исследуемых группах коэффициент Капо рассчитывался как отношение доли апоптотических клеток после 24 часов инкубации в различных условиях к доле апоптотических клеток в группе сравнения. Для определения достоверности различий уровней спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза (раннего и суммарного) между двумя группами (при воздействии МСК и в отсутствие воздействия МСК) применяли критерий Вилкоксона для парных сравнений. Статистическая компьютерная обработка полученного материала проводилась при помощи пакета программ Microsoft Excel и Statistica 8.0. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение**

Результаты статистической обработки данных чувствительности лейкоэмических клеток, полученных в группах В-ОЛЛ, ОМЛ и Т-ОЛЛ, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Показатели выживаемости при культивировании лейкоэмических клеток с МСК и без них

Препарат	Значения LC50 (медиана)		p
	– МСК	+ МСК	
<b>В-ОЛЛ (n=15)</b>			
Цитозар	1,02	1,95	0,205
Даунорубин	0,28	0,85	0,206
Метилпреднизолон	123,03	38,71	0,949
Выживаемость в контроле (медиана)		153,46%	–
<b>ОМЛ (n=9)</b>			
Цитозар	0,60	0,59	0,895
Даунорубин	0,31	1,42	0,009
Метилпреднизолон	166,04	250	0,212
Контроль (медиана)	–	118,66%	–
<b>Т-ОЛЛ (n=4)</b>			
Цитозар	6,85	1,03	0,375
Даунорубин	0,58	0,66	0,663
Метилпреднизолон	125,09	167,02	0,767
Выживаемость в контроле (медиана)	–	141,51%	–

В нашем исследовании было выявлено увеличение медианы LC50 цитозара при инкубации с МСК клеток В-ОЛЛ приблизительно в 2 раза (следовательно, снижение чувствительности лейкозных клеток под действием МСК). Ввиду того, что в данном случае  $p > 0,05$ , эти результаты не являются статистически значимым. В группе ОМЛ было обнаружено незначительное снижение медианы LC50 цитозара при инкубации с МСК, данный результат не был статистически значимым. В группе Т-ОЛЛ было выявлено снижение концентрации цитарабина при инкубации с МСК больше чем в 6 раз, а следовательно, повышение чувствительности лейкозных клеток к цитарабину под действием МСК. Данный результат был статистически незначимым.

Наблюдалось увеличение медиан LC50 даунорубина при инкубировании с МСК во всех группах лейкоэмических клеток. В группе ОМЛ результат был статистически значимым ( $p < 0,05$ ).

Чувствительность лейкоэмических клеток из группы В-ОЛЛ к метилпреднизолону под действием МСК повышалась. В группах ОМЛ и Т-ОЛЛ наблюдалось незначительное превышение медианы при инкубировании с МСК. Во всех случаях результаты были статистически незначимыми ( $p > 0,05$ ).

При оценке лейкозных клеток в контроле при культивировании с МСК было выявлено повышение выживаемости в сравнении с контролем без МСК во всех 3 группах (рис. 2).

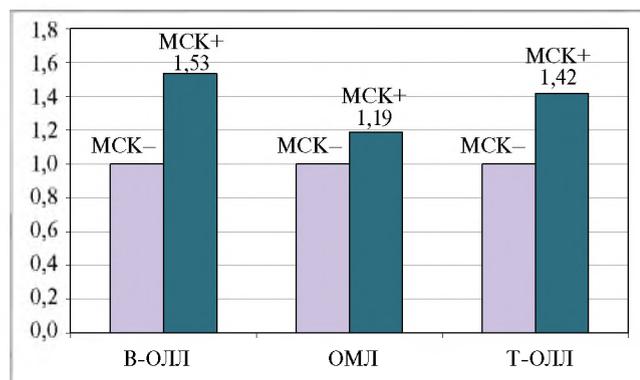


Рис. 2. Изменение выживаемости лейкозных клеток в лунках без противолейкемических препаратов под действием МСК (левые столбцы – контрольные лунки платы без МСК, правые столбцы – лунки платы с МСК)

Результаты, полученные при определении уровня спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза при инкубации лейкоэмических клеток в различных условиях, представлены в таблице 3, гистограммы – на рисунках 3 и 4.

На основании представленных в таблице 3 результатов можно сделать выводы о том, что при определении уровней суммарного спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза отмечалось снижение доли апоптотических клеток под действием МСК, в сравнении с клетками, инкубированными без подложки из МСК. Это подтверж-

Таблица 3. Уровни спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза лейкозных клеток

Условия	Медиана, %	Капо	p
RPMI – МСК 24 часа ранний апоптоз	5,33		1,0
RPMI + МСК 24 часа ранний апоптоз	5,63		1,0
RPMI – МСК 24 часа суммарный апоптоз	28,79	2,09	0,67
RPMI + МСК 24 часа суммарный апоптоз	38,11	2,02	0,67
Цитарабин – МСК 24 часа ранний апоптоз	7,55		0,14
Цитарабин + МСК 24 часа ранний апоптоз	8,64		0,14
Цитарабин – МСК 24 часа суммарный апоптоз	57,60	3,02	0,22
Цитарабин + МСК 24 часа суммарный апоптоз	55,48	2,71	0,22
Группа сравнения 0 часов	8,50	1	

дают значения Капо. Данные наблюдения иллюстрируют рисунки 5 и 6.

При определении статистической значимости различий уровней спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза (раннего и суммарного) между двумя группами (при воздействии МСК и в отсутствии воздействия МСК) при помощи критерия Вилкоксона для парных сравнений не было получено статистически значимых различий.

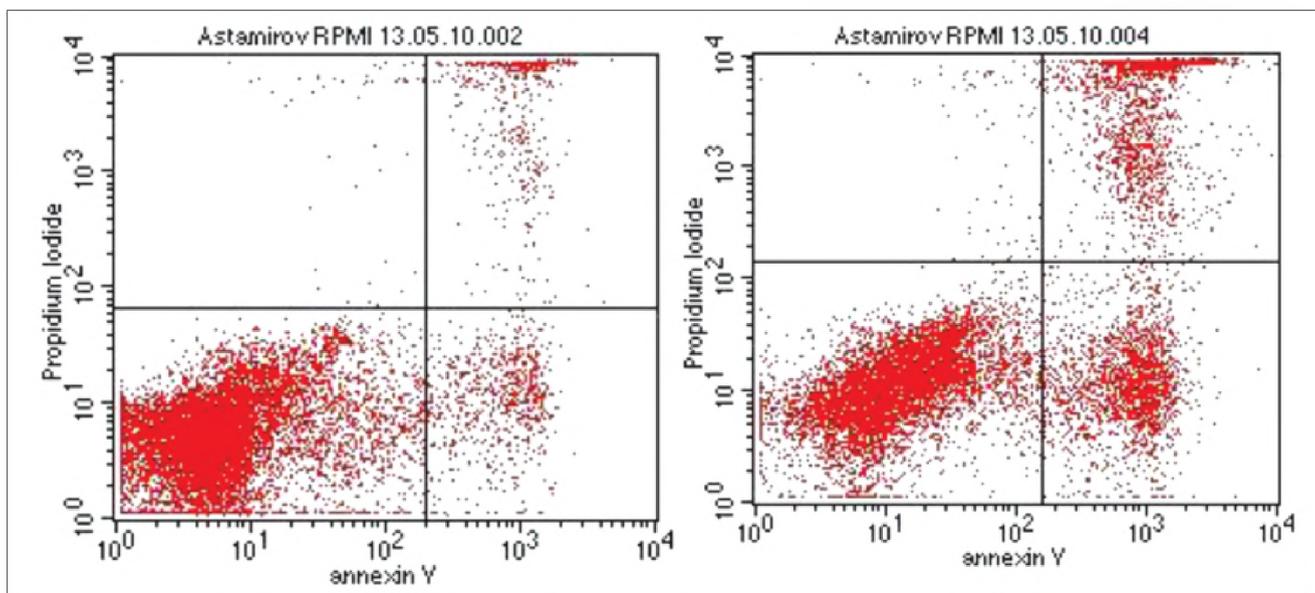


Рис. 3. Гистограммы распределения лейкоэмических клеток после инкубирования в течение 24 часов в среде RPMI без подложки из МСК (слева) и на подложке из МСК (справа). В левом нижнем квадранте – жизнеспособные клетки AnV-/PI-, в правом нижнем квадранте – ранние апоптотические клетки AnV+/PI-, в правом верхнем квадранте – некротические или поздние апоптотические клетки, последующая стадия апоптоза *in vitro* AnV+/PI+, в левом верхнем квадранте – некротические клетки AnV-/PI+

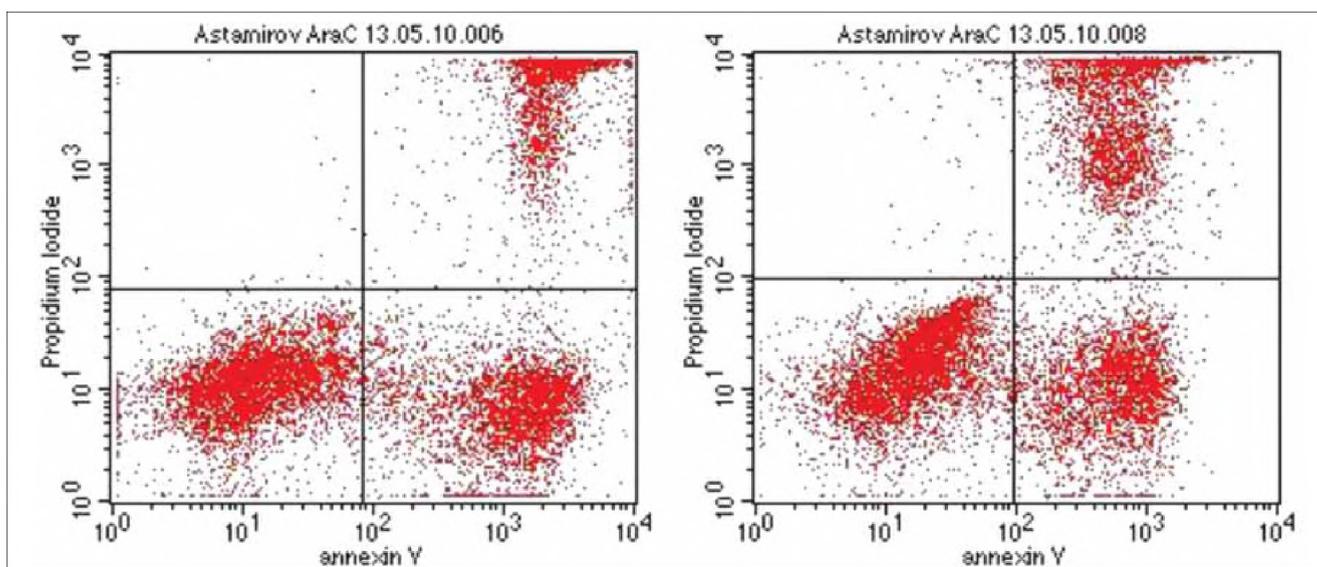


Рис. 4. Гистограмма распределения лейкоэмических клеток после инкубирования в течение 24 часов в растворе цитарабина без подложки из МСК (слева) и на подложке из МСК (справа)

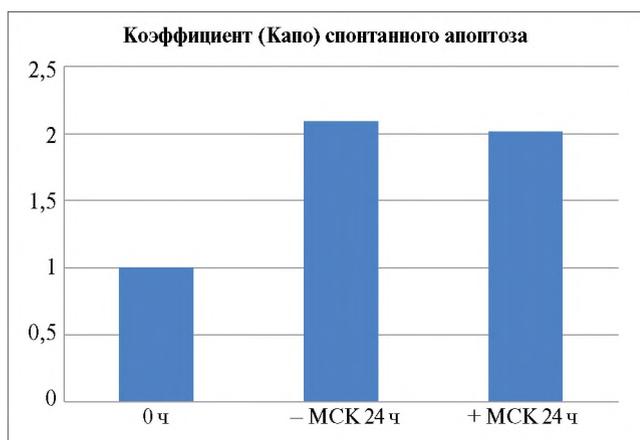


Рис. 5. Коэффициенты спонтанного апоптоза; крайний левый столбец – группа сравнения

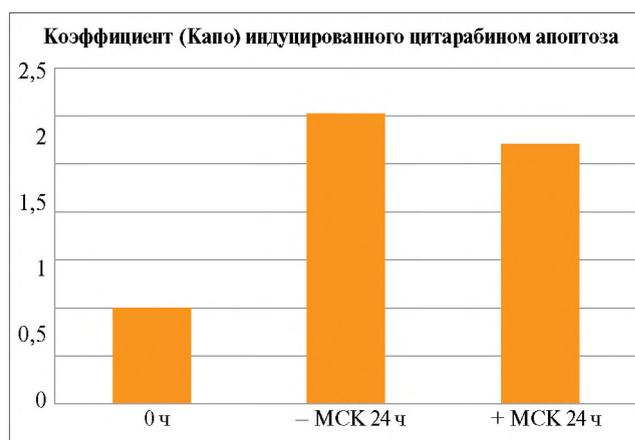


Рис. 6. Коэффициенты индуцированного цитарабином апоптоза

**Заключение**

В ходе проведенного нами исследования было показано, что МСК костного мозга доноров могут оказывать влияние на чувствительность лейкемических клеток пациентов к противолейкемическим препаратам *in vitro*: статистически значимо снижают чувствительность лейкемических клеток миелоидного ряда к даунорубицину и способствуют выживаемости всех групп лейкемических клеток. Однако в нашем исследовании аллогенные МСК костного мозга не оказывали статистически

значимого влияния на уровни спонтанного и индуцированного цитарабином апоптоза лейкемических клеток, что расходится с данными других исследователей [7–9, 12–15]. Несомненно, что все более широкое применение трансплантации МСК в клинической практике, особенно у онкогематологических пациентов, диктует необходимость проведения широкомасштабных исследований для дальнейшего изучения механизмов влияния МСК на кроветворные клетки, в частности, на лейкемические клетки.

**Л и т е р а т у р а**

- Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells *in vitro*: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996;166:585–92.
- Cheng L., Qasba P., Vanguri P., Thiede M.A. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol* 2000;184:58–69.
- Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B., Götherström C., Hassan M., Uzunel M., Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party hematopoietical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439–41.
- Rasmusson I., Ringdén O., Sundberg B., Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 2003;76:1208–13.
- Le Blanc K., Rasmusson I., Götherström C., Seidel C., Sundberg B., Sundin M., Rosendahl K., Tammik C., Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2004;60:307–15.
- Liang R., Huang G.S., Chen X.Q., Wang Z., Feng J.L., Zhang W.P., Guo Y., Yang G.Y. Effects of human fibroblastoid stromal cell line on proliferation of HL-60 cells and expression of VEGF. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2003;11(5):476–9.
- Lin Y.M., Bu L.M., Yang S.J., Gao S., Zhang G.Z. Influence of human mesenchymal stem cells on cell proliferation and chemosensitivity of K562 cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2006;14(2):308–12.
- Lin Y.M., Zhang G.Z., Leng Z.X., Lu Z.X., Bu L.S., Gao S., Yang S.J. Study on the bone marrow mesenchymal stem cells induced drug resistance in the U937 cells and its mechanism. *Chin Med J (Engl)* 2006;119(11):905–10.
- Liang R., Huang G.S., Wang Z., Chen X.Q., Bai Q.X., Zhang Y.Q., Dong B.X., Wang W.Q. Effects of human bone marrow stromal cell line (HFCL) on the proliferation, differentiation and apoptosis of acute myeloid leukemia cell lines U937, HL-60 and HL-60/VCR. *Int J Hematol* 2008;87(2):152–66.
- Zhu Y., Sun Z., Han Q., Liao L., Wang J., Bian C., Li J., Yan X., Liu Y., Shao C., Zhao R.C. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia* 2009. Jan 15. doi: 10.1038/leu.2008.384.
- Ding Y., Lu H., Lu S.F., Lu R.N., Liu P., Wu Y.J., Li J.Y. Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells on proliferation and apoptosis of k562 cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2009;17(1):137–40.
- Manabe A., Coustan-Smith E., Behm F.G., Raimondi S.C., Campana D. Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1992;79(9):2370–7.
- Konopleva M., Konoplev S., Hu W., Zaritsky A.Y., Afanasiev B.V., Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* 2002;16(9):1713–24.
- Mudry R.E., Fortney J.E., York T., Hall B.M., Gibson L.F. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood* 2000;96(5):1926–32.
- Garrido S.M., Appelbaum F.R., Willman C.L., Banker D.E. 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). *Exp Hematol* 2001;29(4):448–57.
- Fortney J.E., Zhao W., Wenger S.L., Gibson L.F. Bone marrow stromal cells regulate caspase 3 activity in leukemic cells during chemotherapy. *Leuk Res* 2001;25(10):901–7.
- Wang L., Fortney J.E., Gibson L.F. Stromal cell protection of B-lineage acute lymphoblastic leukemic cells during chemotherapy requires active Akt. *Leuk Res* 2004;28(7):733–42.
- Астрелина Т.А., Осипова Е.Ю., Румянцев С.А., Сторожаков Г.И., Короткова Н.В., Владимирская Е.Б. Клиническое значение чувствительности лейкемических клеток к химиотерапии при остром лимфобластном лейкозе у детей по результатам МТТ-теста *ex vivo*. *Гематол и трансфузиол* 2002;6:21–4.
- Hongo T., Shuhei Yajima, Minoru Sakurai, Yasuo Horikoshi and Ryoji. *In vitro* drug sensitivity testing can predict induction failure and early relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997;89(8):2959–65.
- Janka-Schaub G.E., Harms D.O., den Boer M.L., Veerman A.J., Pieters R. *In vitro* drug resistance as independent prognostic factor in the study COALL-O5-92 Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia; two-tiered classification of treatments based on accepted risk criteria and drug sensitivity profiles in study COALL-06-97. *Klin Padiatr* 1999;211(4):233–8.
- Kaspers G.J.L., Veerman A.J.P., Pieters R., Van Zantwijk C.H., Smets L.A., Van Wering E.R., Van Der Does-Van Den Berg A. *In vitro* cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997;90:2723–9.
- Veerman A.J.P., Pieters R. Drug sensitivity assays in leukemia and lymphoma. *Br J Haematol* 1990;74:381–4.