

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СУПЕРНАТАНТА НЕЙРОГЕННЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ И ПРЕПАРАТА ГАЛАВИТ НА КУЛЬТУРЫ ГЛИОБЛАСТОМ ЧЕЛОВЕКА

Л.Д. Любич, В.М. Семенова, Л.П.Стайно, А.Я. Главацкий

ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова НАМН Украины»

seveme22@rambler.ru

Лечение больных со злокачественными глиомами головного мозга остается одной из нерешенных и актуальных проблем современной нейроонкологии. Одним из направлений, активно разрабатываемых для оптимизации лечения этих больных, является поиск препаратов, способных стимулировать противоопухолевый иммунитет и тормозить пролиферацию опухоли.

Целью работы является сравнительная оценка эффекта воздействия супернатанта прогениторных нейроклеток (СНК) из фетального мозга крысы 14-х суток гестации и иммуномодулятора с противоопухолевыми свойствами галавита на клетки глиобластом человека в первичных суспензионных и диссоциированных культурах.

СНК или галавит добавляли к суспензии клеток из образцов опухоли (глиобластомы человека, n=14). Через 24 ч инкубации суспензионных культур с препаратом определяли количество жизнеспособных клеток, цитотоксический индекс (ЦИ), количество апоптических клеток (PI+, CD95+), экспрессию антигенов CD25, HLA-ABC HLA-DR. СНК или галавит добавляли также в диссоциированные культуры глиобластом человека. Через 24 и 48 ч инкубации анализировали цитологические препараты культур с учетом митотического индекса (МИ).

В суспензионных культурах глиобластом установлен дозозависимый цитотоксический эффект воздействия СНК и галавита на 50–70% образцов из ткани глиобластом. Под влиянием СНК и галавита наблюдалась также тенденция к нарастанию популяции клеток в терминальной стадии апоптоза (PI+) и увеличению количества CD95+ клеток (несущих FAS-рецептор апоптоза), что может указывать на проапоптотическое влияние этих препаратов на клетки злокачественных глиом.

В диссоциированных культурах глиобластом после инкубации с СНК и галавитом наблюдались признаки дозозависимого цитотоксического воздействия этих препаратов (ретракция и разрежение зоны роста, дистрофия, некробиоз опухолевых клеток, достоверное снижение МИ), нарастающие при увеличении длительности инкубации культур с препаратом.

Таким образом, показано, что СНК из фетального мозга крысы и иммуномодуляторный препарат галавит оказывают сходный цитотоксический эффект при воздействии на опухолевые клетки глиобластом человека в первичных суспензионных и диссоциированных культурах.

Ключевые слова: супернатант нейрогенных клеток крысы, галавит, первичные культуры глиобластом человека, цитотоксический индекс, митотический индекс.

Лечение больных со злокачественными глиомами головного мозга остается одной из нерешенных и актуальных проблем современной нейроонкологии. Одним из направлений, активно разрабатываемых для оптимизации лечения этих больных, является поиск препаратов, направленных на стимуляцию противоопухолевого иммунитета и торможение пролиферации опухолей.

Актуальным подходом в противоопухолевой терапии злокачественных глиом головного мозга является использование нейральных прогениторных клеток (НПК) и их продуктов, которые, как известно, могут проявлять противоопухолевые свойства [1–3]. В предыдущих исследованиях установлено противоопухолевое воздействие супернатанта нейрогенных прогениторных клеток крысы (СНК) на первичные диссоциированные культуры глиом человека [4], а также на ткань перивентрикулярной злокачественной глиомы 101.8А головного мозга крыс [5].

Целью данной работы является сравнительная оценка воздействия супернатанта прогениторных нейроклеток (СНК) крысы 14-х суток гестации (Е14) и препарата галавит на клетки глиобластом человека в первичных суспензионных и диссоциированных культурах. Медикаментозный препарат галавит (5-амино-1,2,3,4-тетрагидрофалазин-1,4-диенонатриевая соль) обладает противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами и широко используется в общей онкологии [6, 7]. В работе Л.И. Примушко с соавторами [8] показано, что галавит может оказывать также прямое цитотоксическое и антипролиферативное воздействие на клетки злокачественных глиом *in vitro*.

Материал и методы

Материалом для культивирования служили фрагменты глиобластом головного мозга, удаленных у больных во время оперативного вмешательства (n=14). Гистологическая верификация диагноза у больных проведена согласно Международной классификации опухолей ЦНС [9]. СНК получали из ткани фетального мозга крыс 14-х суток гестации [4]. Нативную ткань мозга в физиологическом растворе освобождали от оболочек, переносили в среду DMEM (Sigma, Германия) и механически диссоциировали многократным

пипетированием. Жизнеспособность клеток в суспензии определяли в стандартном цитотоксическом тесте с 0,2% трипановым синим (Merch, Германия). К полученной клеточной суспензии (концентрация $6,0 \times 10^6$ клеток/мл) добавляли конканавалин А (10 мкг/мл) и инкубировали 2 ч в CO₂-инкубаторе при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и постоянной влажности 95% и 5% CO₂. После инкубации клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин, отмывали в среде DMEM, добавляли свежую среду DMEM и инкубировали в тех же условиях в течение 24 час. После инкубации клетки вторично осаждали центрифугированием 5 мин при 1500 об/мин, отбирали супернатант, определяли в нем концентрацию белка, стандартизировали до концентрации 0,1 мг/мл, аликвотировали и сохраняли при температуре $-20 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Получение первичных суспензионных культур глиобластом. Ткань опухоли, доставленную из операционной, промывали в растворе CMF («Sigma», Германия), освобождали от сосудов и оболочек, измельчали микроножницами в CMF и механически диссоциировали многократным пипетированием. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин, отмывали в среде DMEM, к осадку клеток добавляли свежую среду DMEM и ресуспендировали. Жизнеспособность клеток в суспензиях определяли в стандартном цитотоксическом тесте с 0,2% трипановым синим (Merch, Германия) [10].

Изучение воздействия препаратов в суспензионных культурах глиобластом. Препарат СНК и галавит (ЗАТ «ЦСМ «МЕДИКОР», Москва, РФ) в концентрациях 0,02 и 0,10 мг/мл добавляли к суспензии свежевыделенных клеток ($2,0 \times 10^6$), которые в объеме 2 мл среды инкубировали в стеклянных биологически инертных центрифужных пробирках при периодическом встряхивании в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе при температуре $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, постоянной влажности 95% и 5% CO₂. Выбор таких концентраций препаратов базировался на результатах предыдущих исследований, в которых был установлен цитотоксический эффект СНК и галавита на клетки опухолей головного мозга в этих концентрациях [4, 8]. До и после инкубации с препаратом в суспензии определяли содержание жизнеспособных клеток, апоптических клеток (PI+, CD95+ -клеток) и экспрессию антигенов CD25, HLA-ABC HLA-DR.

Цитотоксическое воздействие СНК и галавита на опухолевые клетки оценивали путем подсчета жизнеспособных клеток в камере Горяева до и после их инкубации с препаратом и вычисляли по формуле цитотоксический индекс (ЦИ) [8]:

$$ЦИ = \frac{ЖКи - ЖКи+П}{ЖКи} \times 100\%,$$

где ЖКи - количество жизнеспособных клеток в исходной суспензии, ЖКи+П - количество жизнеспособных клеток в суспензии после инкубации с препаратом (СНК или галавитом).

Апоптотические PI+клетки определяли с помощью цитофлуориметрического метода с использованием пропидиума йодида (PI) (0,05 мг/мл) согласно рекомендациям Пинегина [11].

Экспрессию антигенов CD25 (альфа-цепь рецептора к IL-2), CD95 (FAS-рецептор), HLA-ABC и HLA-DR (антигены гистосовместимости I и II класса) на опухолевых клетках определяли с помощью непрямого иммунофлуоресцентного метода с использованием моноклональных антител (ТОВ «Сорбент», Москва, РФ). Эти показатели анализировали до и после инкубации культур с препаратами на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (США) согласно рекомендациям Пинегина [11].

Первичные диссоциированные культуры глиобластом получали по протоколу, представленному в книге Божкова с соавт. [10]. Ткань опухоли освобождали от сосудов и оболочек, измельчали микроножницами в растворе CMF и механически диссоциировали многократным пипетированием. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин, отмывали в среде DMEM, к осадку клеток добавляли свежую среду DMEM и ресуспендировали. Свежевыделенные клетки в количестве 1×10^6 наносили на покровные адгезивные стекла, покрытые полиэтиленгликолем (Sigma, Германия) и помещенные в чашки Петри, и культивировали в среде 199 и DMEM (1:1) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 400 мг глюкозы и 0,2 ед/мл инсулина (объем питательной среды составлял 2 мл). Культуры клеток содержали в CO₂-инкубаторе (37°C, 95% влажности и 5% CO₂) и прижизненно наблюдали в инвертированном микроскопе (Биолам П-3, ЛОМО, СПб).

Изучение воздействия препаратов в диссоциированных культурах глиобластом.

Для исследования отбирали культуры с равномерной зоной роста (на 6–8-е сут), добавляли препарат (СНК или галавит, 0,02 и 0,10 мг/мл) и инкубировали в течение 24 и 48 ч. В каждом случае анализировали контрольные и опытные культуры (без добавления препарата и после 24 и 48 ч инкубации с препаратом). Для морфологического исследования культуры фиксировали 10% формалином, окрашивали гематоксилином Караччи. Микроскопическое исследование и фотодокументирование цитологических препаратов культур проводили на светооптическом фотомикроскопе Axiophot (“OPTON”, Германия) с объект-микрометром (“Carl Zeiss”, Германия), аттестованном для калибровки увеличения изображений при морфометрических исследованиях (объектив X40, окуляр X10, переходник X2). В

сравнительном аспекте в опытных и контрольных культурах анализировали общую архитектуру зоны роста, фенотипические особенности опухолевых клеток, митотическую активность, а также содержание клеток с признаками цитотоксического повреждения. Митотический индекс (МИ) определяли путем подсчета митозов в 3-х наблюдениях каждого образца в 10 случайно выбранных полях зрения микроскопа (X400). В каждом препарате подсчитывали 1000 клеток. МИ высчитывали по формуле:

$$\text{МИ} = \frac{\text{количество делящихся клеток}}{1000} \times 100 \, \%.$$

Статистическую обработку цифровых данных проводили с использованием пакета программ "Statistica 6,0". Статистическую значимость отличий оценивали с помощью критерия Краскела-Уоллиса и U-критерия Манна-Уитни, значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке характера воздействия тестируемых препаратов на опухолевые клетки глиобластом в суспензионных культурах установлено, что с повышением концентрации СНК с 0,02 до 0,10 мг/мл наблюдалось увеличение доли образцов глиобластом (с 50,0% до 66,7%), в которых регистрировались признаки цитотоксического воздействия СНК на опухолевые клетки. Однако значимых различий в зависимости от концентрации препарата между средними показателями ЦИ не выявлено: ЦИ составлял 25,8–33,6% (рис. 1). Более существенными оказались индивидуальные различия ЦИ в исследованных образцах глиобластом с колебаниями в пределах от 8,2 до 65,5%. В части образцов глиобластом обнаружено отсутствие цитотоксического эффекта, из них в 50,0% – при тестировании концентрации СНК 0,02 мг/мл, в 33,3% – при тестировании СНК 0,10 мг/мл соответственно.

При тестировании галавита в суспензионных культурах его цитотоксическое воздействие в обеих исследованных концентрациях обнаружено в среднем в 70% образцов опухолей с колебаниями ЦИ от 13,3 до 82,7%. При этом средние значения ЦИ при воздействии галавита в концентрациях 0,02 и 0,10 мг/мл составили 28,3 и 43,0% соответственно (рис.1). В 30% суспензионных культур клетки глиобластом оказались нечувствительными к воздействию галавита в обеих концентрациях. При суммарной оценке статистически значимых различий между средними показателями цитотоксичности СНК и галавита в суспензионных культурах глиобластом не выявлено (по данным множественных сравнений с использованием критерия

Краскела-Уоллиса и сравнений независимых групп с использованием U-критерия Манна-Уитни).

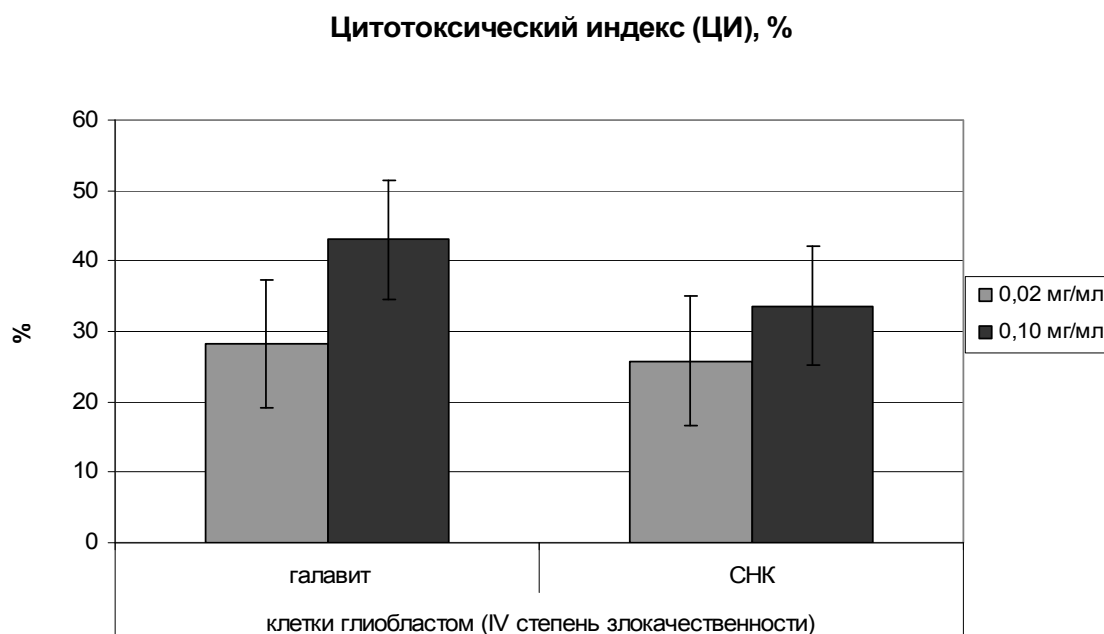


Рис.1. Цитотоксическое влияние галавита и СНК крысы на клетки глиобластом. По оси ординат представлены значения цитотоксического индекса в процентах.

В то же время в суспензионных культурах глиобластом оба тестируемых препарата (СНК и галавит) проявляли тенденцию к проапоптотическому воздействию, поскольку под влиянием обоих препаратов в клеточной суспензии увеличивалось количество PI+ клеток (в среднем на 2–6%) и доли CD95+ клеток (в среднем на 2–3 %) (рис.2).

Как известно, экспрессия CD95+ свидетельствует лишь о готовности к апоптозу, а пропидиум йодид (PI) выявляет гиподиплоидные клетки на терминальных стадиях апоптоза и некробиоза клеток при частичной утрате ДНК [11]. Таким образом, оба исследованных препарата демонстрировали тенденцию к проапоптотическому влиянию на клетки глиобластом, увеличивая количество CD95+ клеток, несущих FAS-рецептор, отражающий готовность к апоптозу, и PI+ клеток в терминальной стадии апоптоза.

Под влиянием СНК прослеживалась также тенденция к дозозависимому увеличению содержания CD25+ клеток, несущих альфа-цепь рецептора IL-2 (IL-2RA), по мере возрастания концентрации СНК (рис.2). Под влиянием галавита (0,10 мг/мл) количество CD25+ клеток в суспензионных культурах глиобластом также возрастало. Такое нарастание доли клеток,

экспрессирующих CD25, в культурах глиобластом, может иметь неоднозначную трактовку. С одной стороны, экспрессия IL-2RA отражает активированное состояние клеток и их способность пролиферировать в ответ на стимул от IL-2. С другой стороны, IL-2RA является одним из 8 генов с иммунной функцией, ассоциированных с клетками глиобластомы [12].

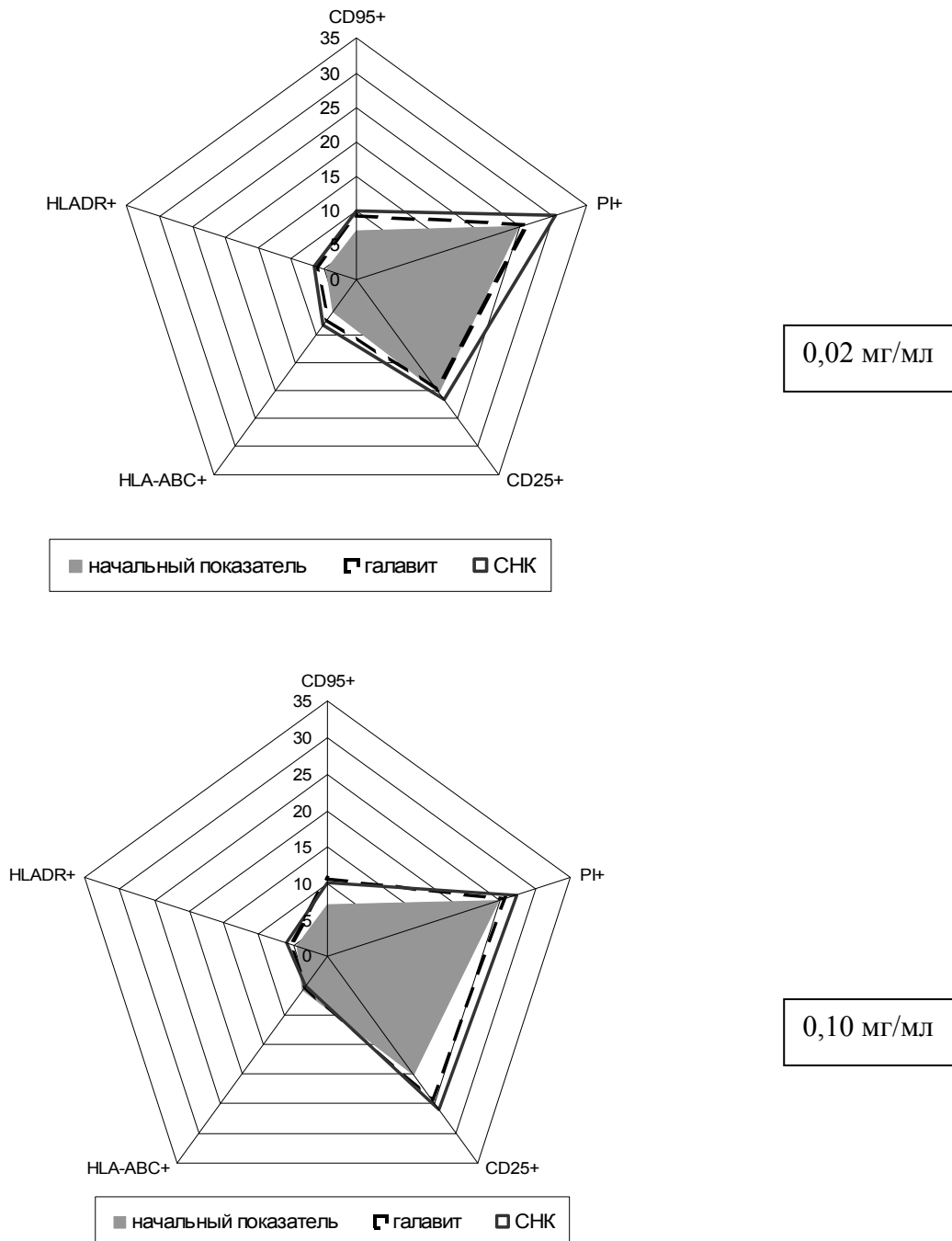


Рис. 2. Соотношение изученных маркеров на клетках глиобластом (%).

В наших опытах установлено также, что под влиянием обоих препаратов в концентрации 0,02 мг/мл содержание HLA-ABC+ и HLA-DR+ клеток в суспензионных культурах глиобластом

несколько увеличивалось (рис. 2). Это может быть связано с тем, что при глиомах, особенно злокачественных, происходит частичная или полная утрата экспрессии антигенов I и/или II класса HLA [13,14], коррелирующая со степенью злокачественности опухолей, что является одной из причин отсутствия противоопухолевой активности CD4+ Т-лимфоцитов. С нашей точки зрения, возрастание экспрессии антигенов гистосовместимости клетками глиобластом под влиянием исследованных препаратов может способствовать распознаванию клеток опухоли иммунокомпетентными клетками. При этом статистически значимых различий между средними показателями содержания PI+, CD95+, CD25+, HLA-ABC+ и HLA-DR+ клеток в суспензионных культурах глиобластом под влиянием СНК и галавита не обнаружено (по данным множественных сравнений с использованием критерия Краскела-Уоллиса и сравнений независимых групп с использованием U-критерия Манна-Уитни). Это может указывать на сходный однонаправленный характер цитотоксического воздействия исследованных препаратов на опухолевые клетки глиобластом в суспензионных культурах.

Изучение влияния препаратов на опухолевые клетки глиобластом в диссоциированных культурах.

В контрольных наблюдениях в диссоциированных культурах клетки глиобластом формировали обширную зону роста с преобладанием плотноклеточных разрастаний недифференцированных опухолевых клеток с признаками ядерного полиморфизма и наличием атипичных одноядерных и многоядерных клеток. В таких участках зоны роста культур часто встречались делящиеся клетки на разных стадиях митотического цикла. Среди митозов преобладали патологические формы: моноцентрическая метафаза, отщепление хромосом, рассеивание хромосом в метафазе, полая метафаза (К-митоз). Средний показатель митотической активности (МИ) составлял $3,84 \pm 0,08\%$, что отображает высокий уровень пролиферативной активности этих опухолей соответственно их гистоструктуре и гистобиологическим свойствам *in vivo*. В то же время местами зона роста культур включала участки более дифференцированных длинноотростчатых опухолевых клеток ромбовидной, униполярной, треугольной формы, образующих сетевидные структуры, характерные для роста дифференцированных астроцитов в условиях культивирования. Это отражает способность части клеток культивированных глиобластом к спонтанной астроглиальной дифференцировке и подтверждает астроцитарный генез большинства из них *in vivo*.

В культурах глиобластом, инкубированных с СНК (0,02 мг/мл) в течение 24 ч, зарегистрирован цитотоксический эффект воздействия препарата в виде разрежения и

фрагментации зоны роста с появлением поврежденных опухолевых клеток, нередко в терминальной стадии разрушения. В нефрагментированных участках зоны роста этих культур зафиксировано снижение МИ до $1,91 \pm 0,14\%$. При увеличении срока инкубации этих культур с СНК (0,02 мг/мл) до 48 ч доля поврежденных клеток нарастала, что сопровождалось снижением МИ до $0,73 \pm 0,10\%$ (рис. 3).

Повышение концентрации СНК (0,1 мг/мл) при удлинении срока инкубации культур с препаратом до 48 ч вызывало появление обширных участков опустошения в зоне роста культур в связи с десквамацией погибших клеток. Нарастало также содержание дистрофированных пикноморфных опухолевых клеток с округленной цитоплазмой и пикноморфными ядрами. На подложке оставались лишь небольшие комплексы неповрежденных клеток с единичными митозами (МИ составлял $0,28 \pm 0,04\%$).

В опытной серии культур с тестированием галавита также наблюдался эффект его дозозависимого цитотоксического влияния на опухолевые клетки глиобластом. Так, после 24-часовой инкубации культур с галавитом в концентрации 0,02 мг/мл в зоне роста культур обнаружено появление участков разрежения и фрагментации клеточных массивов за счет десквамации части клеток. Повышение концентрации препарата до 0,10 мг/мл и срока инкубации культур с препаратом до 48 ч вызывало еще большее нарастание признаков цитотоксических изменений в опухолевых клетках культур. На цитологических препаратах таких культур в преобладающем большинстве опухолевых клеток определялись различные стадии дистрофических и некробиотических изменений (округление цитоплазмы с редукцией отростков, пикноморфные ядра, деструкция цитоплазмы).

Таким образом, после инкубации диссоциированных культур глиобластом с СНК или галавитом наблюдались признаки дозозависимого цитотоксического влияния этих препаратов в виде дистрофических и некробиотических изменений в подавляющем большинстве опухолевых клеток на фоне дисконфлексации зоны роста культур. При увеличении концентрации тестируемых препаратов и срока инкубации с ними культур до 48 ч МИ дозозависимо достоверно снижался в сравнении с контрольными образцами (рис. 3). Важно отметить, что характер и направленность цитотоксических изменений в культивируемых клетках глиобластом после воздействия СНК и галавита оказались сходными. При этом степень снижения МИ в культурах под влиянием галавита в концентрации 0,02 мг/мл оказалась существенно выше по сравнению с воздействием СНК в той же концентрации. Однако при увеличении концентрации препаратов до 0,10 мг/мл статистически значимых

различий между показателями МИ после воздействия СНК и галавита не было зафиксировано.

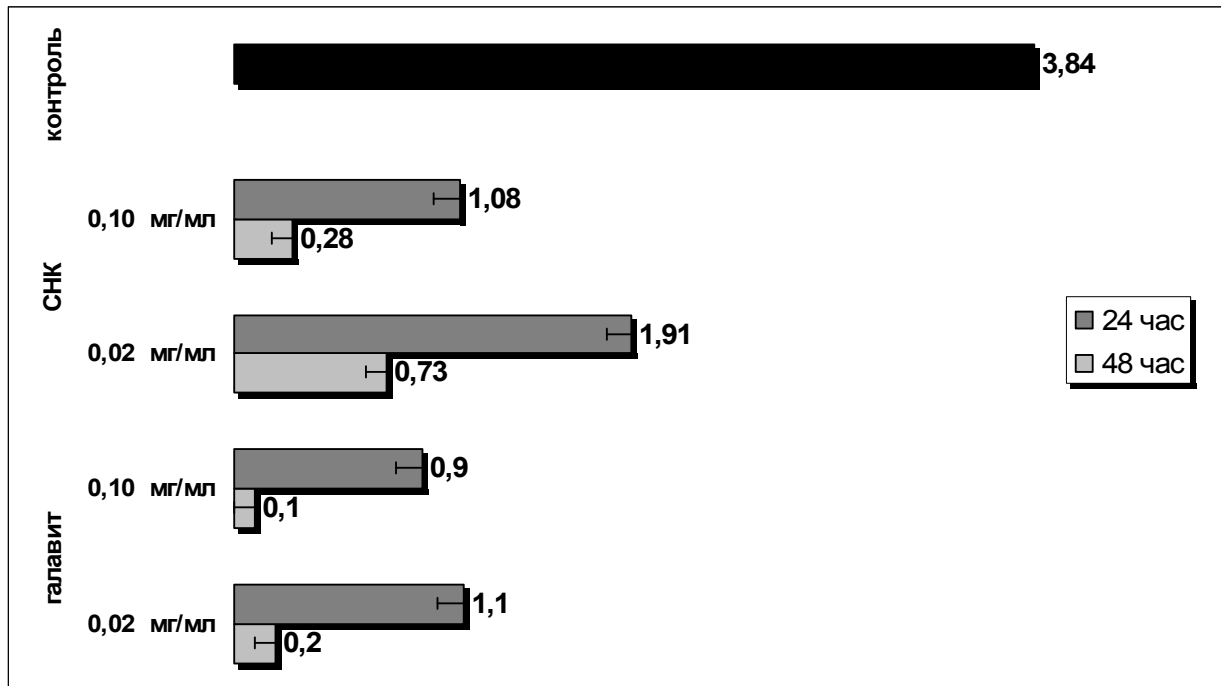


Рис. 3. Динамика изменения митотического индекса (%) в диссоциированных культурах глиобластом человека после инкубации с СНК и галавитом.

Суммируя полученные результаты, можно утверждать, что как СНК из фетального мозга крысы, так и иммуномодуляторный препарат галавит выявляют однонаправленное цитотоксическое воздействие на опухолевые клетки глиобластом человека как в суспензионных, так и в диссоциированных культурах. Правомерно предположить, что такие свойства этих препаратов обусловлены их способностью к проапоптотическому и антимитотическому влиянию. Оба исследованных препарата имели тенденцию к проапоптотическому воздействию на клетки глиобластом в суспензионных культурах, увеличивая количество CD95+ клеток, несущих FAS-рецептор, отображающий готовность к апоптозу, и PI+ клеток в терминальной стадии апоптоза; а также демонстрировали статистически значимое антимитотическое влияние в диссоциированных культурах глиобластом.

Некоторые различия степени влияния на опухолевые клетки исследованных препаратов в суспензионных и диссоциированных культурах глиобластом можно объяснить разным характером и способами оценки воздействия препаратов в каждом из этих методов. В суспензионных (24 ч) культурах опухолевых клеток при подсчете жизнеспособных и PI+ клеток

регистрируется прямое цитотоксическое и опосредованное проапоптотическое влияние препарата с выявлением клеток в необратимой терминальной стадии апоптоза. В отличие от суспензионных культур в диссоциированных культурах формируется гистотипическая динамическая зона роста из опухолевых клеток, наиболее адаптированных к новым условиям существования вне организма, и обладающих высоким пролиферативным потенциалом. При тестировании воздействия препаратов на опухолевые клетки в опытных культурах глиобластом в сравнении с контрольными создается возможность наблюдать пространственные и локальные изменения как в общей архитектонике зоны роста, так и в цитоструктуре ее отдельных клеток, а также в сравнительном аспекте оценить особенности миграционной и митотической активности опухолевых клеток с учетом характера их повреждения. Таким образом, способ тестирования особенностей прямого воздействия СНК и галавита на опухолевые клетки глиобластом в диссоциированных культурах существенно дополняет результаты, полученные в суспензионных культурах глиобластом при исследовании противоопухолевых свойств этих препаратов в эксперименте.

Необходимо подчеркнуть, что часть образцов глиобластом в суспензионных культурах оказалась нечувствительной к тестируемым концентрациям СНК и галавита, что отражает гетерогенность этих опухолей и различия их индивидуальной чувствительности к этим препаратам. Анализ полученных результатов обосновывает актуальность дальнейших исследований, направленных на изучение в клинических условиях влияния этих препаратов на рост глиом головного мозга различной степени злокачественности у нейроонкологических больных. Для решения этой научной проблемы необходима предварительная доклиническая оценка индивидуальной чувствительности этих опухолей к воздействию тестируемых препаратов *in vitro* с целью подбора их оптимальной дозы для клинического применения.

Список литературы

1. **Achanta P., Sedora Roman N.I., Quiñones-Hinojosa A.** Gliomagenesis and the use of neural stem cells in brain tumor treatment. *Anticancer Agents Med.Chem.* 2010,10 (2): 121–130.
2. **Bovenberg M.S., Degeling M.H., Tannous B.A.** Advances in stem cell therapy against gliomas. *Trends Mol.Med.* 2013, 19 (5): 281–291.
3. **Kim S.U.** Neural stem cell-based gene therapy for brain tumors. *Stem Cell Rev.* 2011, 7(1): 130–140.
4. **Семенова В.М., Любич Л.Д., Лисяный Н.И, Главацкий А.Я., Стайно Л.П.** Исследование биологических свойств супернатанта прогениторных нейроклеток крыс на культурах глиом головного мозга. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 27. Спб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011: 58–68.

5. Лісяний М.І., Любич Л.Д., Хохлов А.Г. Дослідження протипухлинної дії прогеніторних нейроклітин (НК) при експериментальній гліомі головного мозку у щурів. Імунологія та алергологія. 2008, (3): 61–66.
6. Подколзин А.А., Гришина Т.И. Галавит. Клиническое использование и механизмы действия. М.: Внешторгиздат, 2002: 104 с.
7. Vel'sher L.Z., Gabuniia Z.R., Grishina T.I., Germanov A.B., Biakhov M.Iu., Korobkova L.I., Platonov D.A., Argun V.M., Budnenkov A.G., Gens G.P. Galavit-induced change of immunologic parameters in patients with non-small lung cancer. *Vopr.Onkol.* 2009, 55 (1): 51–55.
8. Примушко Л.І., Семенова В.М., Лісяний О.М. Дослідження протипухлинної дії імуномодельючого препарату галавіт. *Укр.нейрохірург.журнал.* 2007, (1): 32–36.
9. Louis D.N., Ohgak H., Wiestler O.D. WHO classification of tumours of the central nervous system. Lyon: International agency for research on cancer, 2007: 312p.
10. Божкова В.П., Викторов И.В., Брежестовский Л.А., Буравлев В.М., Шунгская В.Е. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы. М.: Наука, 1988: 317 с.
11. Пинегин Б.В. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. Пособие для врачей-лаборантов. М., 2001: 48–53.
12. Schwartzbaum J.A., Xiao Y., Liu Y., Tsavachidis S., Berger M.S., Bondy M.L., Chang J.S., Chang S.M., Decker P.A., Ding B., Hepworth S.J., Houlston R.S., Hosking F.J., Jenkins R.B., Kosel M.L., McCoy L.S., McKinney P.A., Muir K., Patoka J.S., Prados M., Rice T., Robertson L.B., Schoemaker M.J., Shete S., Swerdlow A.J., Wiemels J.L., Wiencke J.K., Yang P., Wrensch M.R. Inherited variation in immune genes and pathways and glioblastoma risk. *Carcinogenesis.* 2010, 10: 1770–1777.
13. Facoetti A., Nano R., Zelini P., Morbini P., Benericetti E., Ceroni M., Campoli M., Ferrone S. Human leukocyte antigen and antigen processing machinery component defects in astrocytic tumors. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11 (23): 8304–8311.
14. Huang H., Hara A., Homma T., Yonekawa Y., Ohgaki H. Altered expression of immune defense genes in pilocytic astrocytomas. *J.Neuropathol Exp.Neurol.* 2005, 64 (10): 891–901.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ IN VIVO И IN VITRO КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ МИЕЛОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИЕЙ ПРИ ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ

И.А. Свеженцева, Д.И. Билько, И.З. Руссу, Н.М. Билько

Центр молекулярных и клеточных исследований Национального университета

«Киево-Могилянская академия», Киев, Украина, iilona@ukr.net

В настоящей работе была проведена оценка морфофункциональной активности культивируемых в полужидком агаре *in vitro* и *in vivo* клеток костного мозга пациентов с