

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

хронической миелоидной лейкемией (ХМЛ) при терапии ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) – иматинибом и нилотинибом, а также больных, не подвергавшихся такому лечению.

Исследовали клетки гемопоэтического компонента костного мозга системы гранулоцито-моноцитопоэза, стимулированного в культуре *in vitro* при помощи добавления в среду гранулоцито-макрофагального ростового фактора. Культивирование клеток *in vivo* осуществляли в специальных диффузионных камерах, помещенных в брюшную полость экспериментальных животных (мышей). Во всех вариантах экспериментов подсчитывали количество колоний и кластеров клеток в культурах, оценивали их морфологический состав и индекс созревания гранулоцитов.

Показано, что количество колоний клеток в культурах *in vitro* и *in vivo* у пациентов с оптимальным ответом на терапию иматинибом и нилотинибом было значительно ниже, чем у пациентов с приобретенной резистентностью к препаратам и у пациентов с впервые диагностированным ХМЛ. Кроме того, было обнаружено, что у пациентов, принимавших выше упомянутые ИТК, количество кластеров в полужидком агаре в культурах *in vivo* значительно превышало количество таковых в культурах клеток *in vitro*. Это может свидетельствовать о стимулирующем влиянии факторов микроокружения, имеющихся в организме животного-реципиента камер, на пролиферацию коммитированных клеток лейкемического клона с ограниченным пролиферативным потенциалом. Этот факт получил дополнительное подтверждение в выявленной разнице в индексе созревания гранулоцитов в культуральных системах *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: хроническая миелоидная лейкемия, таргетная (целевая) терапия, факторы микроокружения, культура клеток костного мозга в полужидком агаре *in vitro* и *in vivo*.

Согласно современным представлениям хроническая миелоидная лейкемия (ХМЛ) возникает вследствие клональной экспансии примитивных гемопоэтических клеток, что приводит к появлению потомства с иными функциональными характеристиками, отличными от нормального костного мозга [1]. Причиной экспансии является реципрокная транслокация $t(9;22)(q34;q11)$, вследствие которой образуется хромосома 22 с укороченным длинным плечом – так называемая Филадельфийская хромосома (Ph). На ней расположен онкоген BCR-ABL, продуктом которого является онкопротеин BCR-ABL-тирозинкиназа [2]. Она участвует в патогенезе заболевания путем повышения активности митогенов, нарушения межклеточных взаимодействий и подавления апоптоза. В конечном счете, повышенная

пролиферативная активность патологических клеток в сочетании с подавлением апоптоза приводит к неконтролируемой клеточной пролиферации и постепенному замещению нормальных клеток костного мозга на клетки лейкоемического клона [3].

В последние годы для терапии больных с ХМЛ были разработаны препараты таргетного (целевого) действия – ингибиторы тирозинкиназ (ИТК), такие как иматиниб и нилотиниб, способные влиять выборочно только на клетки, содержащие BCR-ABL-тирозинкиназу. Молекула иматиниба встраивается в так называемый АТФ-карман на поверхности BCR-ABL-тирозинкиназы, блокируя фосфорилирование субстрата и дальнейшую передачу митотического сигнала в клетке [4]. Однако лейкоемический клон отличается высокой нестабильностью генома и, со временем, у некоторых больных в гене BCR-ABL могут возникать вторичные мутации, которые приводят к изменению конформации АТФ-кармана одноименной тирозинкиназы. В связи с этим, иматиниб теряет способность блокировать пролиферацию такого клона клеток, и заболевание прогрессирует в фазу бластного криза [3]. Для решения этой проблемы были разработаны ИТК второй линии терапии, такие как нилотиниб, которые со значительно меньшей вероятностью формируют резистентность и непереносимость у пациентов. Однако и к нилотинибу у некоторых больных может возникать резистентность. Существует мнение, что в процессе формирования резистентности к ИТК могут участвовать и факторы микроокружения [5]. Культивирование клеток костного мозга в диффузионных камерах *in vivo* дает возможность определить влияние на клетки растворимых факторов микроокружения. Именно поэтому, целью нашей работы было сравнить результаты изучения морфофункциональной активности культивированных *in vitro* и *in vivo* клеток костного мозга пациентов, характеризующихся разными ответами на препараты первой и второй линии таргетной терапии – иматиниб и нилотиниб.

Материал и методы

Изучали клетки из пунктатов костного мозга пациентов с ХМЛ в хронической фазе заболевания, получающих препараты иматиниб и нилотиниб в качестве первой и второй линии терапии, соответственно. В зависимости от ответа на лечение, пациентов разделили на группы: первая – с впервые диагностированным ХМЛ (n=3); вторая – с резистентностью к иматинибу (n=9); третья – с резистентностью к нилотинибу (n=7); четвертая – с оптимальным ответом на иматиниб (n=8) и пятая – с оптимальным ответом на нилотиниб (n=6). При резистентности к препаратам у больных наблюдалась гематологическая ремиссия, а цитогенетическая ремиссия (отсутствие в костном мозге клеток, имеющих Ph-хромосому)

была либо частичной, либо ее не было. Изолированные клетки костного мозга параллельно культивировали *in vitro* и *in vivo* в полужидком агаре.

Суспензию клеток получали путем центрифугирования пунктатов костного мозга пацетнов при 500 G в градиенте плотности Hystopaque (1,077 г/мл) (Sigma, США). Суть методики состоит в том, что эритроидная масса и многоядерные клетки при центрифугировании оседают на дно пробирки, а мононуклеары костного мозга формируют белое кольцо на границе фаз сыворотка-Hystopaque [6]. Кольцо отбирали с помощью автоматической пипетки и трижды промывали в растворе PBS (Sigma, США). С помощью камеры Горяева под инвертированным микроскопом (Zeiss, Германия) подсчитывали количество клеток в полученной суспензии. Подсчет соотношения мертвых и живых клеток осуществляли с помощью стандартного теста с трипановым синим (Sigma, США)

Культивирование *in vitro* производили в культуральной среде RPMI-1640 (Sigma, США) с добавлением 0,33 % бактоагара (Difco, США), 20 % фетальной телячьей сыворотки (Sigma, США), гранулоцито-макрофагального колониестимулирующего ростового фактора GM-CSF (Sigma, США) в концентрации 50 нг/мл и антибиотиков (50 МЕ/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина). Культивирование осуществляли в 24-луночной планшете (Nunc, США) при температуре 37°C, абсолютной влажности и атмосфере с содержанием 5% CO₂. Длительность культивирования составляла 14 дней. Именно на этот день наблюдалась наиболее активная пролиферация гранулоцито-макрофагальных клеток-предшественников костного мозга человека при ХМЛ [7]. Учет колоний и клонов производился под инвертированным микроскопом (Nikon, Япония).

Культивирование *in vivo*. Суспензию для культивирования готовили на основе среды RPMI-1640 (Sigma, США), с добавлением 0,33 % бактоагара (Difco, США), 10 % фетальной телячьей сыворотки (Sigma, США) и антибиотиков (50 МЕ/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина). Готовой суспензией клеток наполняли внутреннюю полость гелевых диффузионных камер, которые были изготовлены из прозрачного, биоинертного полимерного материала [8]. Камеры помещали в брюшную полость мышей линии СВА, за сутки до культивирования обработанных циклофосфамидом в дозе 200 мг/кг веса животного. Это способствовало угнетению активности иммунной системы мышей-реципиентов камер и дополнительному выделению факторов роста и цитокинов, способных оказать позитивное влияние на процессы пролиферации и дифференцировки гранулоцито-макрофагальных клеток-предшественников. Для анестезии перед операцией животным вводили 1%-ный

раствор тиопентала натрия. Культивирование длилось 14 дней. После этого животных выводили из опыта путем цервикальной дислокации позвонков, камеры извлекали и изучали под инвертированным микроскопом (Nikon, Япония).

Оценку кластеро- и колониобразующей активности клеток производили путем подсчета количества клеточных агрегатов. За кластер принимали клеточный агрегат, в составе которого было не больше 40 клеток, а за типичную колонию – агрегат, в состав которого входило более 40 клеток (рис. 1).

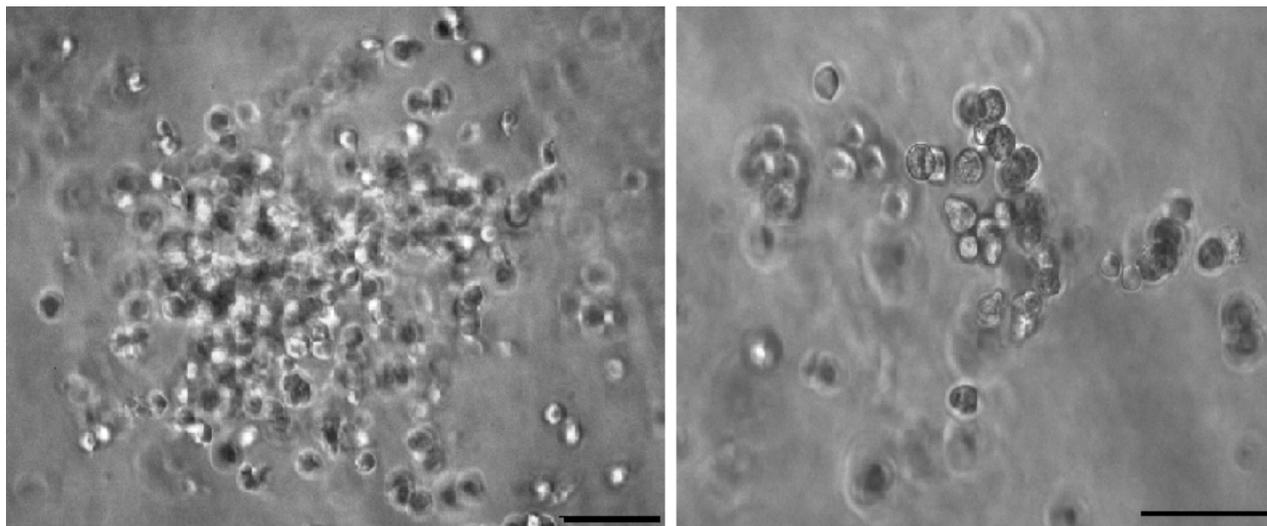


Рис. 1. Типы клеточных агрегатов в культурах костного мозга пациентов с ХМЛ на 14-е сутки культивирования в системе *in vivo*. Фотографии сделаны с неокрашенных клеток под инвертированным микроскопом. Масштабная линейка – 50 мкм.

Изучение морфологических особенностей клеток в культуре. Препараты из клеточных колоний готовили с помощью цитоцентрифуги (Shandon, Великобритания). Для этого при помощи автоматической пипетки под инвертированным микроскопом (Zeiss, Германия) изымали отдельные клеточные агрегаты и переносили в кювету цитоцентрифуги, добавляя 35 мкл среды RPMI-1640 для вымывания клеток с кюветы. С целью лучшего распластывания клеточных агрегатов на предметном стекле и возможности визуализации морфологии отдельных клеток колонии препараты центрифугировали при 250 G. После этого предметные стекла высушивали в вытяжном шкафу.

Для окрашивания клеток на препаратах использовали метод Паппенгейма. Для этого клетки сначала фиксировали 96%-ным этиловым спиртом в течении 5 минут. Далее на стекла наносили краситель Май-Грюнвальда на 45 с, потом, не смывая красителя, добавляли такое же количество воды и окрашивали препараты еще 45 с. По окончании времени окрашивания стекла аккуратно промывали дистиллированной водой и на 35 с окунали в раствор

Романовского-Гимза. После окрашивания препараты высушивали в вытяжном шкафу и изучали под инвертированным микроскопом (Leika, Германия). Подсчет клеток в каждом препарате производили следующим образом: отсчитывали по линии Миандра 100 клеток в поле зрения и среди них определяли количество бластных клеток, промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных клеток, а также макрофагов (зрелых клеток моноцитопозза). Моноцитобласты и промоноциты (клетки моноцитарно-макрофагального звена кроветворения) после культивирования в полужидком агаре трудно морфологически отличить от ранних клеток гранулоцитарного звена кроветворения.

Определяли индекс созревания гемопоэтических клеток костного мозга гранулоцито- и моноцитопозза в культурах *in vitro* и *in vivo* по формуле: $I = N/D$, где I – индекс созревания

клеток костного мозга; N – сумма недифференцированных клеток (бласты, промиелоциты, миелоциты и метамиелоциты); D – сумма зрелых клеток (палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, а также макрофаги).

Статистический анализ выполнен с использованием теста Манна-Уитни для сравнения двух групп непараметрических выборок. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ колониеобразующей активности гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников костного мозга пациентов с впервые диагностированным ХМЛ и с резистентностью к иматинибу в культурах *in vitro* и *in vivo* показал, что между количеством колоний в этих культурах статистически достоверной разницы не было (рис. 2). Так, у больных с впервые диагностированным ХМЛ количество колоний в диффузионной камере *in vivo* достигало $53,4 \pm 2,1$, а у пациентов с резистентностью к иматинибу насчитывалось $52 \pm 3,5$ колоний. В свою очередь, у пациентов с приобретенной резистентностью к нилотинибу, функциональная активность гемопоэтических клеток была достоверно ниже и составляла около $44 \pm 2,7$ колоний в культуральной системе *in vitro* и $36,9 \pm 2,1$ колоний *in vivo*. У пациентов с оптимальным ответом на терапию препаратами иматиниб и нилотиниб количество колоний в полужидком агаре *in vitro* достоверно отличалось и составило $21,0 \pm 1,8$ и $19 \pm 3,7$, соответственно. Следует отметить, что в случае пациентов с оптимальным ответом на терапию ИТК количество колоний в культуральной системе *in vivo* было достоверно выше,

чем количество таковых в полужидком агаре *in vitro* и достигало $31,2 \pm 1,8$ и $27,4 \pm 2,6$ для пациентов, принимавших иматиниб и nilотиниб, соответственно.

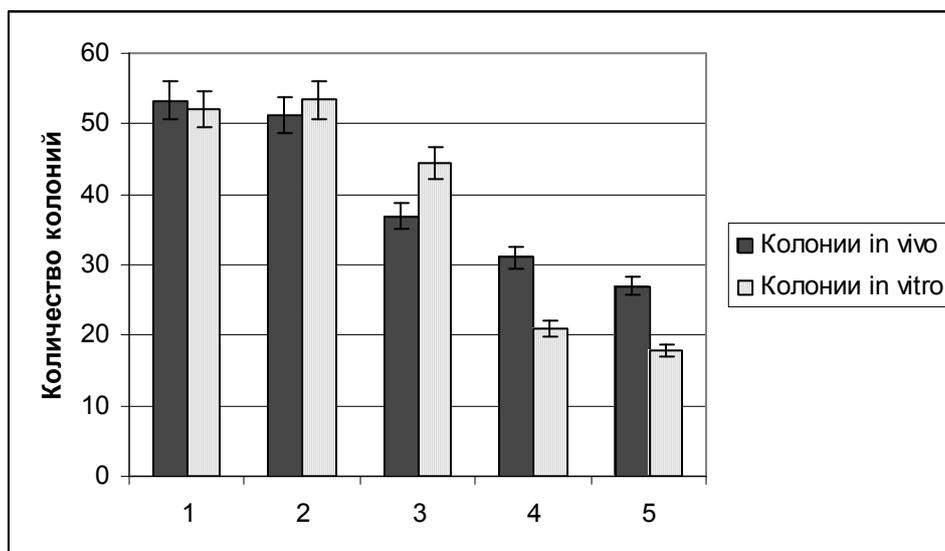


Рис. 2. Показатели колониеобразующей активности клеток костного мозга в культурах *in vitro* и *in vivo* пациентов с ХМЛ: 1 – пациенты с впервые диагностированной ХМЛ; 2 – с резистентностью к иматинибу; 3 – с резистентностью к nilотинибу; 4 – с оптимальным ответом на иматиниб; 5 – с оптимальным ответом на nilотиниб.

Это может объясняться тем, что в костном мозге больных с оптимальным ответом на терапию ИТК преобладают нормальные клетки, которые при культивировании в диффузионных камерах *in vivo* чувствительны к цитокинам и ростовым факторам, которые присутствуют в организме мыши и отсутствуют при культивировании в культуральной системе *in vitro* [9].

Количество кластеров в двух культуральных системах существенно отличалось (рис. 3). Так, в культуре *in vitro* у пациентов с впервые диагностированной ХМЛ кластерообразующая активность достигала $87 \pm 4,7$ единиц. В культуре *in vivo* их количество было значительно меньше и составило $75 \pm 2,1$. У пациентов с приобретенной резистентностью к иматинибу и nilотинибу количество кластеров в культуре клеток *in vivo* достоверно превышало количество кластеров у пациентов с впервые диагностированной ХМЛ и составляло $83 \pm 2,2$ и $91 \pm 4,4$, соответственно. Однако в этих группах пациентов количество кластеров в культуре *in vitro* было значительно ниже по сравнению с пациентами, которые не принимали препараты ИТК.

У больных с оптимальным ответом на терапию ИТК количество кластеров как в культуре *in vitro*, так и в культуре *in vivo* было значительно ниже по сравнению с пациентами, у которых развилась резистентность к препаратам. У больных с оптимальным ответом на иматиниб количество кластеров в культуре *in vivo* было выше, чем в культуре *in vitro* и составило $64 \pm 1,8$ и $48 \pm 0,3$ агрегатов. В свою очередь, у пациентов с оптимальным ответом на

нилотиниб количество кластеров в культуре *in vivo* составляло $59 \pm 1,7$ единиц, а *in vitro* - $16 \pm 4,3$. Можно предположить, что у пациентов, принимавших ИТК в качестве терапии, в костном мозге накапливались кластерообразующие опухолевые клетки с ограниченным пролиферативным потенциалом, которые в культуре *in vivo* активировались цитокинами и факторами роста, вырабатываемыми организмом-реципиентом камер.

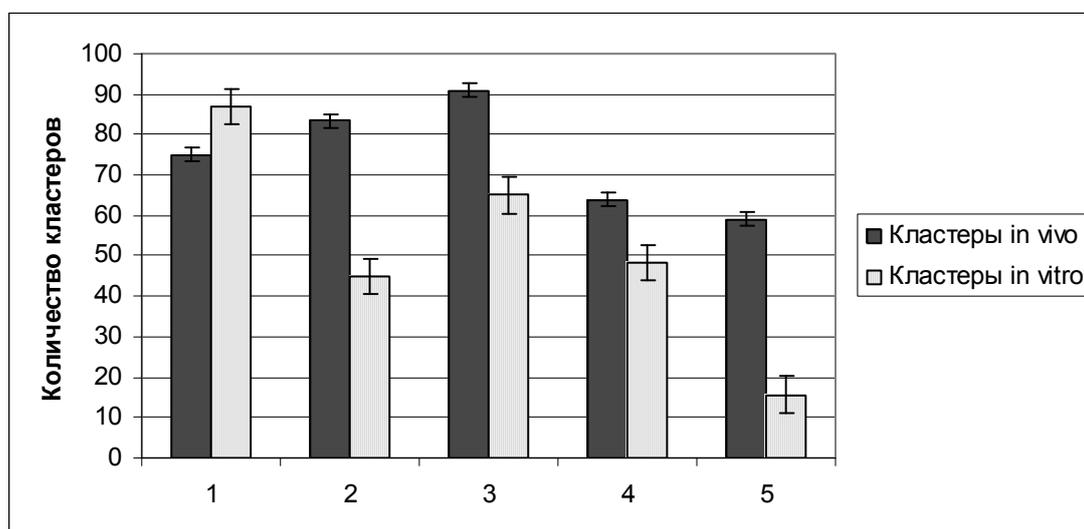


Рис. 3. Показатели кластерообразующей активности клеток костного мозга пациентов с ХМЛ в культурах *in vitro* и *in vivo*: 1 – пациенты с впервые диагностированным ХМЛ; 2 – с резистентностью к иматинибу; 3 – с резистентностью к nilotinibu; 4 – с оптимальным ответом на иматиниб; 5 – с оптимальным ответом на nilotinиб.

Данные литературы свидетельствуют о том, что при культивировании в полужидком агаре клеток костного мозга больных ХМЛ наблюдается накопление миелоцитов [10]. В работе Гриневой с соавторами [11] было показано, что при прогрессировании ХМЛ одновременно с высокой пролиферативной активностью гемопозитических клеток лейкомиического клона наблюдается нарушение их созревания и уменьшение количества сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилов. Влияние ИТК на процесс дифференцировки клеток костного мозга еще до конца не изучено. Сравнение клеточного состава колоний в полужидком агаре при культивировании костного мозга *in vitro* и *in vivo* даёт возможность изучить фракцию коммитированных клеток, которые способны дифференцироваться под действием ростовых факторов и цитокинов в организме мыши-реципиента диффузионных камер [8].

Мы изучали морфологию колоний культивированных клеток на окрашенных по Паппенгейму препаратах и подсчитывали относительное количество (долю в процентах) клеток на разных стадиях созревания гранулоцитов и моноцитов. В культурах клеток пациентов, которым диагноз был поставлен первично (табл. 1), и пациентов с

резистентностью к терапии препаратами ИТК (табл.2) наблюдалось повышенное по сравнению с больными 4-й и 5-й групп количество ранних клеток-предшественников как в системе *in vitro*, так и *in vivo*. Исключением были культуры костного мозга пациентов, которые получали терапию препаратом нилотиниб – этих больных количество бластов в культуре клеток *in vivo* почти в 2 раза превышало их количество в культуре *in vitro*.

Таблица 1.

Клеточный состав колоний клеток костного мозга в культуральных системах *in vitro* и *in vivo* больных с впервые диагностированным ХМЛ

Клетки	Доля клеток <i>in vitro</i> , %	Доля клеток <i>in vivo</i> , %
Бластные клетки	18,2 ± 2,8	16 ± 3,1
Промиелоциты	13 ± 4,2	13 ± 1,3
Миелоциты	20 ± 2,3	21 ± 2,7
Метамиелоциты	29 ± 3,2	24,3 ± 1,9
Палочкоядерные клетки	22 ± 5,1	14 ± 3,4
Сегментоядерные клетки	10,5 ± 5,6	20,6 ± 2,4
Макрофаги	3,5 ± 0,3	6,3 ± 1,4

Кроме того, у пациентов, которые в качестве таргетной терапии принимали иматиниб, количество менее дифференцированных клеток как в культурах *in vitro*, так и в культурах *in vivo* превышало количество таковых в культурах клеток больных, которые принимали нилотиниб.

Результаты исследования индекса созревания гранулоцитов и моноцитов показали, что у пациентов с впервые диагностированным ХМЛ этот показатель в системах *in vitro* и *in vivo* составлял $2,2 \pm 0,1$. При этом у пациентов, которые в качестве терапии принимали нилотиниб, в культуре клеток *in vitro* индекс созревания гранулоцитов превышал таковой в культуре *in vivo* независимо от характера ответа на терапию препаратом (табл. 3). Однако, у пациентов, которые в качестве терапии принимали иматиниб, индекс созревания в культуре клеток *in vivo* был значительно выше, чем в культуре *in vitro*. Можно предположить, что в костном мозге пациентов, которые принимали нилотиниб, количество клеток, чувствительных к цитокинам и ростовым факторам в системе *in vivo* было выше, чем у пациентов, которые в качестве таргетной терапии принимали иматиниб.

Таблица 2.
Клеточный состав колоний клеток костного мозга в культуральных системах *in vitro* и *in vivo* пациентов с ХМЛ с разным характером ответа на терапию ИТК

Клетки	Доля клеток <i>in vitro</i> , %		Доля клеток <i>in vivo</i> , %	
	Иматиниб	Нилотиниб	Иматиниб	Нилотиниб
Пациенты с оптимальным ответом на терапию ИТК				
Бластные клетки	9,6 ± 2,3	6,6 ± 1,8	7,0 ± 2,7	6,7 ± 3,2
Промиелоциты	11,3 ± 5,3	16,0 ± 3,7	11,0 ± 2,3	16,0 ± 1,8
Миелоциты	19,6 ± 6,3	17,9 ± 1,7	16,3 ± 2,6	18,6 ± 4,2
Метамиелоциты	21,0 ± 3,1	24,3 ± 4,8	23,0 ± 1,4	23,6 ± 3,1
Палочкоядерные клетки	11,7 ± 2,1	14,2 ± 2,5	12,0 ± 1,9	13,6 ± 3,3
Сегментоядерные клетки	8,0 ± 0,5	15,7 ± 1,7	7,1 ± 2,1	15,6 ± 2,2
Макрофаги	2,3 ± 0,1	3,2 ± 0,3	4 ± 0,2	3,6 ± 0,1
Пациенты с резистентностью к терапии ИТК				
Бластные клетки	12,2 ± 2,2	8,3 ± 0,9	19,1 ± 1,8	16,2 ± 2,1
Промиелоциты	18,0 ± 1,4	20,1 ± 2,1	16,0 ± 3,2	17,3 ± 0,9
Миелоциты	16,0 ± 2,3	16,7 ± 2,4	19,2 ± 3,4	18,0 ± 1,8
Метамиелоциты	23,5 ± 1,8	20,7 ± 1,9	21,1 ± 2,6	19,3 ± 5,3
Палочкоядерные клетки	12,3 ± 2,5	17,6 ± 0,9	11,6 ± 1,3	15,0 ± 3,7
Сегментоядерные клетки	7,0 ± 0,3	8,3 ± 0,7	8,2 ± 2,1	9,3 ± 1,2
Макрофаги	4,1 ± 0,2	5,7 ± 0,4	2,3 ± 0,1	2,1 ± 0,4

Таблица 3.

Значения индекса созревания гранулоцитов и моноцитов костного мозга в культуральных системах *in vitro* и *in vivo* пациентов с ХМЛ, которые получали терапию препаратами ИТК

Группы пациентов	Культура клеток <i>in vitro</i>		Культура клеток <i>in vivo</i>	
	нилотиниб	иматиниб	нилотиниб	Иматиниб
Резистентность к терапии	2,4±0,3	1,8±0,1	2,1±0,1	2,3±0,1
Оптимальный ответ на терапию	2,3±0,1	2,5±0,2	2,0±0,1	3,1±0,1

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в культурах клеток костного мозга пациентов с ХМЛ, которые в качестве таргетной терапии принимали как иматиниб, так и

нилотиниб, преобладают дифференцированные клетки – гранулоциты и макрофаги. Их созревание может активироваться цитокинами, которые вырабатываются организмом животного-реципиента камер. В свою очередь, у пациентов, у которых ХМЛ был диагностирован впервые, различия в значениях индекса созревания в культуральных системах *in vitro* и *in vivo* не наблюдалось. Это может свидетельствовать о том, что ИТК, такие как иматиниб и nilотиниб, способствуют элиминации нечувствительных к цитокинам и ростовым факторам клеток лейкемического клона, а нормальные клетки костного мозга пациентов получают возможность пролиферировать и дифференцироваться. В свою очередь, у пациентов с впервые диагностированным ХМЛ в костном мозге преобладали нечувствительные к цитокинам и ростовым факторам клетки лейкемического клона, у которых процессы пролиферации преобладали над процессами дифференцировки, способствуя накоплению ранних форм клеток гранулоцито- и моноцитопоза.

Дальнейшее изучение влияния факторов микроокружения на пролиферацию и созревание культивируемых клеток костного мозга с использованием молекулярных методов исследования позволит пролить свет на клеточные и молекулярные механизмы пролиферации и дифференцировки клеток костного мозга больных ХМЛ с разным характером ответа на терапию препаратами ИТК.

Список литературы

1. **Al-Achar W., Wafa A., Moassas A. , Klein E., Liehr T.** Multiple copies of BCR-ABL fusion gene on two isodicentric Philadelphia chromosomes in an imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia patient. *Oncology letters*, 2013, 5: 1579–1582.
2. **Bacco A. D., Keeshan K., Mckenna S. L., Cotter T. G.** Molecular Abnormalities in Chronic Myeloid Leukemia: Deregulation of Cell Growth and Apoptosis. *The Oncologist*, 2000, 5: 405–415.
3. **Deininger M., Goldman J. M., Melo J. V.** The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2000, 96: 3343–3356.
4. **Bing Z. Carter, Duncan D. Mak, Jorge Cortes, Michael Andreeff** The elusive CML stem cell: does it matter and how do we eliminate it? *Semin Hematol*. Author manuscript; available in PMC 2011, October 1.
5. **Mughal A., Muhammad H., Khan A. M., Saleem S., Umah R., Saleem M.** Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors- current status Mughal et al. *Infectious Agents and Cancer*, 2013, 8: 23.
6. **Helgason C.D., Miller Helgason C.L.** Basic cell culture protocols, third edition. Human Press, 2012, 290: 364.
7. **Жалейко І.О., Білько Д.І., Дягіль І.С., Білько Н.М.** Порівняльна оцінка морфофункціональної активності клітин кісткового мозку пацієнтів при хронічній мієлоїдній лейкемії у разі терапії препаратами групи інгібіторів тирозинкіназ першого та другого покоління. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина*, 2014, 2 (5): 104–109.

8. **Білько Н. М.** Патент України № 2692. Спосіб виготовлення камери для культивування клітин / від 15.04.1994. Офіційний бюлетень «Промислова власність», 1994, 5: 218.

9. **Mayani H., Flores-Figueroa E., Chavez-Gonzalez A.** In vitro biology of human myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 2009, 33: 624–637.

10. **Corbin A. S., Agarwal A., Loriaux M., Cortes J., Deininger M., Druker B.J.** Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J. Clin. Invest.*, 2011, 121: 396–409.

11. **Гринева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., Шмаров Д.А., Сарычева Т.Г. Тимофеев А.М., Найденова Н.М., Боровкова Т.В., Саркисян Г.П., Гавричкова А.Р., Колосова Л.Ю., Колошейнова Т.И., Ковалева Л.Г., Воронцова А.В., Туркина А.Г.** Различия в пролиферации и дифференцировке Ph⁺ клеток от индивидуальных больных ХМЛ в суспензионной культуре. Ph⁺ клетки с высокой скоростью пролиферации. *Экспериментальная онкология*, 2009, 8: 53–68.

КЛЕТКИ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА В КУЛЬТУРЕ: КЛОНИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛОНАЛЬНЫХ ЛИНИЙ

***Н.П. Терюкова, И.В. Воронкина, Л.В. Смагина, В.А. Иванов**

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *npter@yandex.ru

Асцитная гепатома Зайдела крыс является метастатической опухолью, или, точнее, этапом метастатического каскада, и может быть использована в качестве перспективной модели при изучении клеточных механизмов опухолевой прогрессии и метастазирования. Работа проведена на двух культивируемых *in vitro* линиях гепатомы Зайдела с разным уровнем цитодифференцировки и туморогенности – монослойной и суспензионной, представленной флолирующими многоклеточными островками. Для выявления в составе этих клеточных линий субпопуляций, обладающих опухолеиницирующим потенциалом и/или способностью к инвазии и метастазированию, проведено клонирование клеток с помощью метода предельных разведений. Показано, что обе клеточные линии формируют три типа клонов, которые отличаются по форме колоний и пролиферативному потенциалу, причем при клонировании клеток суспензионной линии впервые обнаружено образование сферических клонов в полной ростовой среде. Получены 8 клональных линий гепатомы Зайдела, из которых только клетки сферического клона и двух голоклонов при внутрибрюшинном введении беспородным крысам индуцировали развитие асцитной формы опухоли. Впервые установлено, что клетки монослойной и суспензионной линий и их клонов отличаются по характеру экспрессии адгезионной молекулы эпителиальных клеток (EpcAM) – маркера стволовых клеток печени и