

© Коллектив авторов, 2015 г.
УДК 612-119-089.843-06-08.276.2

**И. С. Моисеев, Е. А. Бурмина,
Ю. А. Тараканова, Ю. Р. Залялов,
А. Г. Смирнова, О. В. Пирогова,
С. Н. Бондаренко, Б. В. Афанасьев**

ЛЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕФРАКТЕРНОЙ РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА» ПОСЛЕ ТРАНСПЛАН- ТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ПО- МОЩЬЮ НИЗКИХ ДОЗ ИНТЕР- ЛЕЙКИНА-2

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова; Институт детской гематологии и трансплантологии имени Р. М. Горбачевой, Санкт-Петербург

ВВЕДЕНИЕ

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) — эффективный метод лечения широкого спектра онкогематологических и наследственных заболеваний, тем не менее ее применение ограничено иммунологическими осложнениями, возникающими после трансплантации, в первую очередь, острой и хронической реакцией «трансплантат против хозяина» (хрРТПХ) [14]. ХрРТПХ возникает после 100-го дня трансплантации и чаще всего после отмены иммуносупрессивной терапии, приблизительно у 30–50 % пациентов в зависимости от источника трансплантата и типа донора [4, 6].

Развитие хронической РТПХ часто ассоциировано со значительной морбидностью из-за поражения органов мишеней, частыми госпитализациями и снижением качества жизни. Тяжелые формы хрРТПХ могут приводить к летальным исходам [3, 8]. Стандартом лечения хронической РТПХ является длительная терапия глюкокортикостероидными гормонами (ГКС) в высоких дозах [13]. Тем не менее часть пациентов не отвечают на ГКС, либо отмечается возврат хрРТПХ после их отмены. Данная группа пациентов представляет наибольшие трудности для практического гематолога, так как возможности лечения таких пациентов крайне ограничены, а риск смерти от РТПХ высокий.

В основе развития хрРТПХ лежит нарушение центральной иммунологической толерантности, смещение баланса Т-клеточных популяций в сторону цитотоксических лимфоцитов, сокращение популяции Т-регуляторных клеток (Трег) и дисба-

ланс В-клеточного звена иммунитета [2, 15]. В пре-клинических моделях было показано, что низкие дозы интерлейкина-2 (ИЛ-2) при использовании в течение не менее 8 недель приводили к экспансии популяции Трег-клеток, что приводило к подавлению аллореактивной цитотоксичности и коррекции дисбаланса популяций Т-клеток [11].

В пилотном исследовании в Dana-Farber Cancer Institute было показано, что использование доз ИЛ-2 в дозе от 0,3 до 3 млн МЕ/м² ежедневно у пациентов с ГКС-рефрактерной формой хрРТПХ позволило снизить дозы ГКС на 60 % в среднем, а у некоторых полностью их отменить [9, 10]. Однако остается неизвестной оптимальная дозировка, частота применения и необходимая длительность терапии, поэтому в нашем центре мы провели исследование новой схемы назначения ИЛ-2 в небольшой группе пациентов с рефрактерной хрРТПХ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 16 пациентов после алло-ТГСК с рефрактерной формой РТПХ в возрасте от 16 до 51 года (медиана 22 года). Все пациенты или их законные представители дали информированное согласие на терапию ИЛ-2. Терапия проводилась в соответствии нормативами приказа Министерства здравоохранения РФ об оказании медицинской помощи пациентам, которым выполняется трансплантация костного мозга. Классификация тяжести хрРТПХ проводилась в соответствии с консенсусом Национального института Здоровья (NIH) [7]. У 11 пациентов перед началом лечения имела место тяжелая хрРТПХ, у 5 — средней степени тяжести. 6/16 пациентов на момент включения продолжали получать ГКС, у 4 была возвратная форма хрРТПХ. Не считая системных ГКС, 25 % пациентов ранее получали 1 системный препарат для лечения хрРТПХ, 62,5 % — 2 препарата, 12,5 % — 3 препарата. Этими препаратами были ингибиторы кальциневрина, ингибиторы mTOR, ингибиторы тирозин-киназ, микофенолатамофетил, анти-CD20-моноклональные антитела. Вовлечение кожи имелось у 100 % пациентов, слизистых — у 62,5 %, глаз — у 68,7 %, желудочно-кишечного тракта — у 50 %, печени — у 37,5 %, суставов — у 31,2 %, половых органов — у 12,5 %. У 8 наблюдался облитерирующий бронхиолит (ОБ) со средним процентом объема форсированного выдоха — 54 % от должного (диапазон 25–77 %). Медиана индекса Карновского составляла 80 %, т. е. «нормальная активность с усилием» (диапазон 60–90 %). Полная характеристика группы представлена в таблице. Степень тяжести хрРТПХ и частота вовлечения систем и органов представлены на рис. 1.

Пациенты получали ИЛ-2 (Ронколейкин, «Биотех», Россия) по 1 млн МЕ подкожно 3 раза в неделю, минимум 2 месяца, либо до констатации прогрес-

Характеристика группы пациентов

Пациент	Возраст, лет	Д-з	Донор	Длительность хрРТПХ до ИЛ-2, мес.	Тяжесть хрРТПХ	Тип хрРТПХ	ГКС до ИЛ-2	ОБ	Кол-во вовлеченных органов	Длительность терапии ИЛ-2, мес.
1. В.У.	26	ОМЛ	Нерод	8	Тяж.	Возвратная	Да	Да	5	1,2
2. Г.И.	20	ОЛЛ	Нерод	9	Тяж.	Рефрактерная	Нет	Нет	5	1,7
3. К.З.	17	ОЛЛ	Нерод	11	Среднетяж.	Рефрактерная	Нет	Нет	4	2
4. Н.Д.	16	АФанк	Нерод	34	Среднетяж.	Возвратная	Нет	Да	5	3
5. А.В.	22	ТАА	Гапло	77	Тяж.	Рефрактерная	Нет	Да	2	6
6. П.М.	51	ОМЛ	Нерод	12	Тяж.	Возвратная	Да	Да	5	6
7. К.К.	20	ОМЛ	Нерод	1	Среднетяж.	Рефрактерная	Да	Нет	3	4,7
8. С.М.	22	ХМЛ	Гапло	26	Среднетяж.	Рефрактерная	Нет	Да	3	5,3
9. Б.В.	51	ОМЛ	Нерод	3	Среднетяж.	Рефрактерная	Да	Нет	5	2
10. П.О.	34	ХМЛ	Нерод	2	Тяж.	Рефрактерная	Нет	Нет	4	1
11. Н.М.	16	ОМЛ	Нерод	0	Тяж.	Рефрактерная	Нет	Да	2	1,3
12. М.Н.	40	ММ	Нерод	16	Тяж.	Рефрактерная	Да	Нет	3	2
13. К.А.	18	ОМЛ	Нерод	24	Тяж.	Рефрактерная	Да	Да	8	1,5
14. К.М.	23	ОЛЛ	Нерод	14	Тяж.	Возвратная	Нет	Да	7	4,7
15. П.О.	43	ОМЛ	Нерод	9	Тяж.	Рефрактерная	Нет	Нет	2	3
16. Ч.М.	20	ОМЛ	Нерод	6	Тяж.	Рефрактерная	Нет	Нет	3	8

Примечание: Д-з – диагноз; ОМЛ – острый миелобластный лейкоз; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ХМЛ – хронический миелолейкоз; ТАА – тяжелая апластическая анемия; ММ – множественная миелома; Афанк – анемия Фанкони; нерод – неродственный донор; гапло – гаплоидентичный донор; ОБ – облитерирующий бронхиолит.

сирования хрРТПХ и необходимости другой терапии. Медиана длительности терапии составила 2,5 месяца (диапазон 1 – 8 месяцев).

Ответ на лечение оценивался на основании клинической оценки лечащего врача (частичный ответ, полный ответ или отсутствие ответа) и критериям NIH (объективный ответ) [10]. Параметрами объективного ответа по NIH было уменьшение суммы баллов тяжести хронической РТПХ или улучшение индекса Карновского. «Любым объективным ответом» считалось либо уменьшение суммы баллов тяжести хрРТПХ, либо улучшение индекса Карновского. Статистическая обработка данных проводилась в программном пакете «SPSSv.17». Для оценки достоверности различий использовалась непараметрическая статистика – тесты Манна – Уитни и Крускал – Уоллиса. Достоверными считались различия при $p < 0,05$. Для оценки общей выживаемости, трансплантационной летальности и частоты рецидивов использовался метод Каплан – Майера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Медиана наблюдения за пациентами после начала лечения составила 14 месяцев (диапазон 2,5 – 31 месяц). За время наблюдения частичный клинический ответ по заключению лечащего врача наблюдался у 5 пациентов, полный ответ – у 2 пациентов. Таким образом, частота клинического ответа составила 44 %. Важно отметить, что у 2 пациентов с полным ответом удалось отменить все системные и топические препараты для лечения хрРТПХ, и возврата клинической симптоматики не отмечалось.

Уменьшение суммы баллов тяжести хрРТПХ наблюдалось у 37,5 % пациентов, медиана изменения –

0 баллов (диапазон от – 8 до + 5 баллов). Улучшение индекса Карновского отмечалось у 25 % пациентов, медиана изменения – 0 % (диапазон от – 20 до + 20 %). «Любой объективный ответ» наблюдался у 44 % (7) пациентов, что совпало с клинической оценкой ответа. Уровень функции легких в исследуемой группе показал разнонаправленную динамику: среднее изменение – 2 %, диапазон от – 22 до + 17 %. Ни у одного пациента с ОБ не отмечалось уменьшение степени тяжести РТПХ легких, хотя у $\frac{3}{8}$ пациентов отмечалось улучшение по другим вовлеченным органам, что можно объяснить отсутствием регресса фиброза в легких после его возникновения. В 3 из 6 случаев на фоне терапии удалось полностью отменить системные ГКС с медианой отмены в 2,5 месяца. Результаты лечения отдельных пациентов представлены в схематической форме на рис. 2.

За время лечения в исследуемой группе наблюдались в среднем 1 эпизод оппортунистической

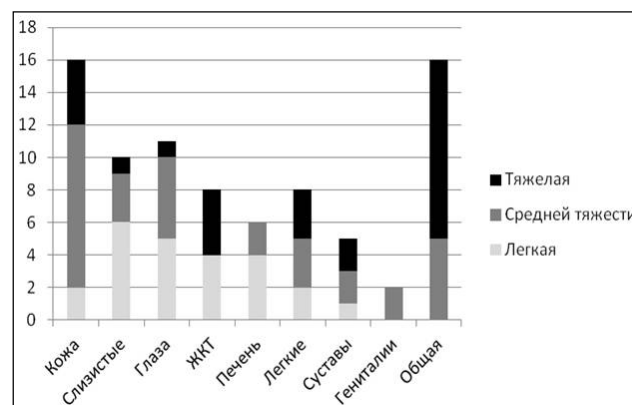


Рис. 1. Степень тяжести хрРТПХ и частота вовлечения систем и органов (по количеству пациентов)

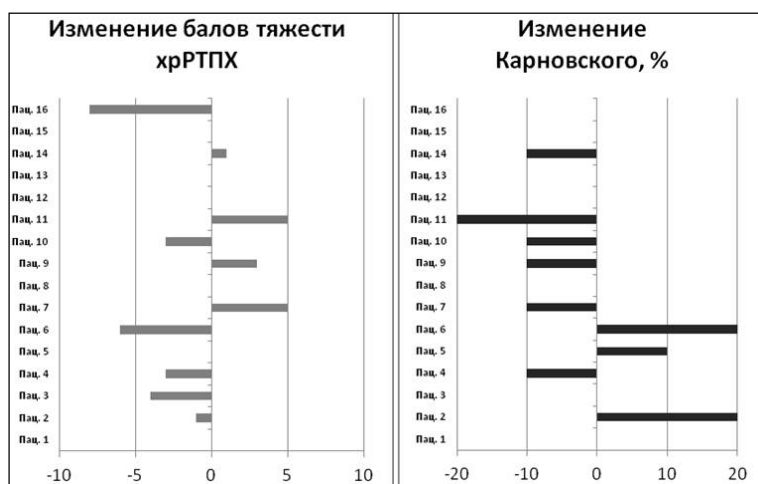


Рис. 2. Объективный ответ на лечение по пациентам: уменьшение количество баллов тяжести хрРТПХ и увеличение Карновского — положительный ответ на лечение

бактериальной инфекции (диапазон 0–3), требующей системного назначения антибиотиков; от 0 до 2 эпизодов оппортунистической вирусной инфекции (медиана 0), от 0 до 1 эпизода оппортунистической инвазивной грибковой инфекции (медиана 0). Подобная частота инфекционных осложнений является характерной для больных с тяжелой хрРТПХ, которая сама по себе ассоциирована со значительным иммунодефицитом. Из побочных эффектов самым частым была болевая реакция на введение (у 88 % пациентов). Эпизодов клинически значимой органной токсичности не зафиксировано.

Учитывая небольшой размер исследуемой группы, клинических предикторов ответа на терапию выявлено не было. В анализе оценивались изначальная тяжесть хрРТПХ, количество вовлеченных органов, предшествующая длительность течения

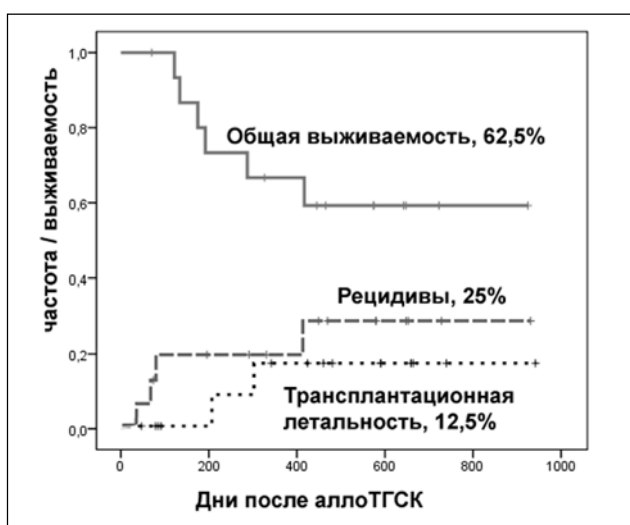


Рис. 3. Выживаемость пациентов с рефрактерной хрРТПХ на фоне терапии ИЛ-2

РТПХ, вовлеченные органы, длительность терапии ($p > 0,05$). Однако наблюдалась статистическая тенденция, что пациенты без системных ГКС на момент начала ИЛ-2 отвечали лучше ($6/10$ ответов), чем пациенты, получавшие ГКС ($1/6$ ответов, $p = 0,08$).

Общая выживаемость в исследуемой группе с медианой наблюдения 14 месяцев составила 62,5 %, 12,5 % пациентов составили группу трансплантационной летальности и 25 % умерли в рецидиве основного заболевания (рис. 3).

Несмотря на невысокий процент ответа, результаты нашего предварительного исследования являются крайне обнадеживающими, учитывая, что пациенты в данной группе до ИЛ-2 получили несколько типов терапии и имели сохраняющиеся проявления хрРТПХ средне-

тяжелой степени. В целом эффективность терапии была сопоставима с ранее опубликованным исследованием [9]. Важным результатом было то, что использование более низких доз и меньшая кратность введения (3 раза в неделю по сравнению с ежедневным введением) не приводили к уменьшению вероятности ответа.

Обращает на себя внимание, что часть пациентов отвечает на терапию ИЛ-2 значительно лучше, в то время как у других пациентов отмечается прогрессия РТПХ. Однако отсутствие клинических предикторов ответа требует проведения скрининга потенциальных биомаркеров РТПХ, которые позволили бы выделить группу пациентов с наибольшей вероятностью ответа. Перспективным может быть определение базового уровня ИЛ-2 [5], других биомаркеров, например, В-клеточного активирующего маркера (BAFF), CXCL10 и CXCL11 [1]. Также возможно, что информативным будет исследование перед началом терапии уровня фосфорилированного STAT5, так как именно через этот сигнальный путь происходит сдвиг в сторону обычных (Tcon) CD4+ и деплеция Трег-клеток [11].

Исследование было проведено на небольшой группе пациентов, поэтому отмечалась только статистическая тенденция увеличения вероятности ответа у пациентов, которые не получали системные ГКС. Необходимо с осторожностью относиться к этим данным, так как пациенты на терапии ГКС могли иметь более агрессивное течение РТПХ, хотя у этого наблюдения есть и биологическое обоснование. ГКС угнетают пролиферацию одновременно всех популяций Т-клеток, включая как цитотоксические Т-лимфоциты, так и Трег-клетки [12]. В свете этих данных перспективным является проведение терапии ИЛ-2 в первой линии терапии у пациентов в группе высокого риска развития тя-

желой хрРТПХ и трансплантационной летальности [3], в комбинации с препаратами, которые не угнетают экспансию Трег, как ГКС или ингибиторы кальциневрина, а, наоборот, усиливают, как, например, сиролимус [16]. Хотя подобный подход требует проверки в проспективных исследованиях.

Таким образом, в данном исследовании мы показали, что часть пациентов с рефрактерной хронической РТПХ может иметь хороший ответ на терапию низкими дозами ИЛ-2, однако иммунологическая характеристика этой группы и оптимальная комбинация с другими препаратами требуют проведения дальнейших проспективных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmed S. S., Wang X. N., Norden J. et al. Identification and validation of biomarkers associated with acute and chronic graft versus host disease // Bone Marrow Transplant. — 2015. — № 14. doi: 10.1038/bmt.2015.191. [Epub ahead of print].
2. Allen J. L., Fore M. S., Wooten J. et al. B cells from patients with chronic GVHD are activated and primed for survival via BAFF-mediated pathways // Blood. — 2012. — Vol. 20. — № 120 (12). — P. 2529–2536.
3. Ayuk F., Veit R., Zabelina T. et al. Prognostic factors for survival of patients with newly diagnosed chronic GVHD according to NIH criteria // Ann. Hematol. — 2015. — № 94 (10). — P. 1727–1732.
4. Bensinger W. I., Martin P. J., Storer B. et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers // N. Engl. J. Med. — 2001. — № 18. — P. 344 (3). — P. 175–181.
5. Brkic S., Tsoi M. S., Mori T. et al. Cellular interactions in marrow-grafted patients. III. Normal interleukin 1 and defective interleukin 2 production in short-term patients and in those with chronic graft-versus-host disease // Transplantation. — 1985. — № 39 (1). — P. 30–35.
6. Eapen M., Logan B. R., Confer D. L. et al. Peripheral blood grafts from unrelated donors are associated with increased acute and chronic graft-versus-host disease without improved survival // Biol. Blood Marrow. Transplant. — 2007. — № 13 (12). — P. 1461–1468.
7. Filipovich A. H., Weisdorf D., Pavletic S. et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report // Biol. Blood Marrow Transplant. — 2005. — № 11 (12). — P. 952–956.
8. Fiuza-Luces C., Simpson R. J., Ramirez M. et al. Physical function and quality of life in patients with chronic GvHD: a summary of preclinical and clinical studies and a call for exercise intervention trials in patients // Bone Marrow. Transplant. — 2015. — Sep 14. doi: 10.1038/bmt.2015.195. [Epub ahead of print].
9. Koreth J., Matsuoka K., Kim H. T. et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease // N. Engl. J. Med. — 2011. — Vol. 1. — № 365 (22). — P. 2055–2066.
10. Lee S. J., Wolff D., Kitko C. et al. Measuring therapeutic response in chronic graft-versus-host disease. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: IV. The 2014 Response Criteria Working Group report // Biol. Blood Marrow. Transplant. — 2015. — № 21 (6). — P. 984–999.
11. Matsuoka K., Koreth J., Kim H. T. et al. Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease // Sci. Transl. Med. — 2013. — Vol. 3. — № 5 (179). — P. 179ra43.
12. Miroux C., Morales O., Ouaguia L. et al. Corticosteroids do not reverse the inhibitory effect of cyclosporine on regulatory T-cell activity in contrast to mycophenolate mofetil // Transplant. Proc. — 2012. — № 44 (9). — P. 2834–2839.
13. Ruutu T., Gratwohl A., de Witte T. et al. Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice // Bone Marrow Transplant. — 2014. — № 49 (2). — P. 168–173.
14. Vigorito A. C., Campregher P. V., Storer B. E. et al. Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD // Blood. — 2009. — Vol. 16. — № 114 (3). — P. 702–708.
15. Vogtenhuber C., Bucher C., Highfill S. L. et al. Constitutively active Stat5b in CD4+ T cells inhibits graft-versus-host disease lethality associated with increased regulatory T-cell potency and decreased T effector cell responses // Blood. — 2010. — Vol. 22. — № 116 (3). — P. 466–474.
16. Zhang P., Tey S. K., Koyama M. et al. Induced regulatory T cells promote tolerance when stabilized by rapamycin and IL-2 in vivo // J. Immunol. — 2013. — Vol. 15. — № 191 (10). — P. 5291–303.

РЕЗЮМЕ

И. С. Моисеев, Е. А. Бурмина, Ю. А. Тараканова, Ю. Р. Залялов, А. Г. Смирнова, О. В. Пирогова, С. Н. Бондаренко, Б. В. Афанасьев

Лечение хронической рефрактерной реакции «трансплантат против хозяина» после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с помощью низких доз интерлейкина-2

Хроническая реакция «трансплантат против хозяина» (хрРТПХ) — тяжелое осложнение аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллотГСК). Пациенты с рефрактерной формой хрРТПХ имеют ограниченные опции лечения и плохой прогноз. В пилотном исследовании мы оценили эффективность терапии интерлейкином-2 (ИЛ-2) по 1 млн МЕ 3 р./неделю у 16 пациентов с этим осложнением после аллотГСК. Согласно критериям Национального института здоровья (NIH), 11 пациентов имели тяжелую хрРТПХ, 5 — средней степени тяжести, и до начала терапии они получили от 1 до 3 линий лечения хрРТПХ. Медиана длительности лечения ИЛ-2 составила 2,5 месяца (диапазон 1–8). Частота клинического ответа составила 44 %, у 2 пациентов отмечен полный регресс РТПХ. Улучшение индекса Карновского или уменьшение суммы баллов хрРТПХ, т. е. объективный ответ, также наблюдалось у 44 % пациентов. Общая выживаемость в исследуемой группе с медианой наблюдения в 14 месяцев составила 62,5 %; 12,5 % пациентов составили группу трансплантационной летальности и 25 % умерли в рецидиве основного заболевания.

Ключевые слова: аллогенная ТГСК, хроническая реакция «трансплантат против хозяина», облитерирующий бронхолит, интерлейкин-2.

SUMMARY

I. S. Moiseev, E. A. Burmina, Y. A. Tarakanova, Y. R. Zalyalov, A. G. Smirnova, O. V. Pirogova, S. N. Bondarenko, B. V. Afanashev

Treatment of refractory chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with low-dose interleukin-2

Refractory chronic graft-versus-host disease (cGVHD) is the complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HCT) that significantly impacts quality of life, may be associated with morbidity and mortality and has limited

treatment options. 16 adult pts (median age 22, range 16–51 y.o.) with refractory cGVHD were enrolled. 6 pts were on steroids upon inclusion. 11 patients had severe (NIH) cGVHD, 6 – moderate, and have received 1–3 anti-cGVHD treatments before IL-2. Pts received IL-2 sc injections 1 MIU 3 times a week. Median duration of treatment was 2.5 moths (range 1–8 months). Partial clinical response was observed in 5 pts, complete response in 2 pts with overall response of 44 %. There

was an improvement of Karnofsky in 25 % of pts, reduction in NIH severity scores in 37.5 % of and any objective response also in 44 % of pts. With median follow-up of 14 months overall survival was 62.5 %, non-relapse mortality was 12.5 % (2 pts), 25 % of patients had a relapse of underlying disease.

Keywords: allogeneic HSCT, chronic graft-versus-host disease, bronchiolitis obliterans, interleukin-2.

© Коллектив авторов, 2015 г.
УДК 616-006.446-036.11:616.419

**И. М. Бархатов, Н. Ю. Цветков,
А. И. Шакирова, Д. С. Романюк,
О. Г. Смыкова, Л. С. Зубаровская,
Б. В. Афанасьев**

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

Кафедра гематологии, трансфузиологии и трансплантологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова; Институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р. М. Горбачевой, Санкт-Петербург

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, основной причиной развития онкогематологических заболеваний является наличие генетических aberrаций, обуславливающих морфологические и функциональные особенности опухолевой популяции. Вместе с тем имеются данные о выявлении опухолевых маркеров в популяции стромальных клеток костного мозга [2, 5, 7].

Таким образом, современное понимание лейкемогенеза может включать изучение не только роли специфических генетических мутаций, но и влияния клеточного окружения, в котором происходит пролиферация и развитие гемопоэтических стволовых клеток, так называемых костно-мозговых ниш [8, 13], представленных клетками стромального микроокружения. Роль стромальных клеток костного мозга в регуляции гемопоэза была впервые описана в 60-х гг. XX в. в ходе оригинальной работы А. Я. Фриденштейна [6]. Клетки стромы костного мозга представлены несколькими типами, среди которых наиболее изученной и перспективной с клинической точки зрения является популяция мезенхимных стволовых клеток (МСК), обладающих способностью подавлять иммунные конфликты при

аллогенной трансплантации [10]; замещать и восстанавливать функции поврежденных негемопоэтических тканей [12], поддерживать кроветворение при котрансплантации с гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК) [9], что выражается в воздействии на пролиферацию и дифференцировку ГСК различных ростков, включая миелоидные и лимфоидные предшественники.

Таким образом, изучение функции стромальных клеток в аспекте возможного участия в патогенезе онкогематологических заболеваний представляется актуальным.

Целью работы явилась сравнительная оценка пролиферативного потенциала стромальных клеток костного мозга (СККМ) от пациентов с острыми лейкозами и здоровых доноров при культивировании *in vitro* их способности к поддержанию нормального гемопоэза и к дифференцировке клеток, а также анализ генно-экспрессионного профиля стромальных клеток костного мозга.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование был включен материал 10 пациентов с диагнозом «острый лейкоз» (7 пациентов с острым миелоидным лейкозом, 1 пациент с острым лимфобластным лейкозом и 1 пациент с ювенильным миеломоноцитарным лейкозом) в возрасте от 0 до 45 лет острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), а также 7 здоровых доноров в возрасте от 23 до 45 лет. После проведения миелоэкспузии проводилась селекция ядродержащих клеток с последующей эксплантацией на культуральную поверхность с культуральной средой αMEM, содержащей 20 % сыворотки, а также антибиотики (пенициллин (100 U/ml), стрептомицин (100 mg/ml) (*Gibco*). Культивирование проводили в стерильных закрытых чашках при температуре 37 °C в условиях абсолютной влажности и 5 % CO₂ в воздухе. Все варианты культур исследовались в 2 повторах. Для оценки пролиферативных характеристик СККМ проводился анализ колониеобразующих единиц фибробластов (CFU-f) — колонии на 10 суток в чашке фиксировали 96%-м этиловым спиртом в течение 30 мин и окрашивали краской Романовского в разведении 1:10 в течение 30–40 мин. При анализе колонии дифференцировали как большие (более 20 клеток) и малые (менее 20 клеток).