

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ БАЛАНС В КАЧЕСТВЕ КРИТЕРИЯ ДЛЯ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОГО УЧЕТА ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Тамашевский А. В., Гармаза Ю. М., Федуро Н.А., Пасюков В.В.

Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий МЗ РБ

Долгиновский тракт 160, г. Минск, 220053, РБ; e-mail: Tayzoe@mail.ru

Поступила в редакцию: 16.08.2021

Аннотация. Проведена оценка редокс-состояния лимфоцитов пациентов (взрослых и детей) с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) до и после воздействия на них лекарственных средств (флударабела, винкристина, дексаметазона и иматиниба) в концентрациях, близких к терапевтическим, а также определена их чувствительность к данным противоопухолевым химиопрепаратам. Установлено, что краткосрочное (2–3 ч) и долгосрочное (18–20 ч) воздействие исследуемых химиопрепаратов на лимфоциты пациентов с ОЛЛ приводит к разнонаправленному характеру изменения содержания активных форм кислорода в лейкозных клетках. Воздействие исследуемых химиопрепаратов на клетки детей при ОЛЛ приводит к увеличению содержания в них низкомолекулярных антиоксидантов (НА), в клетках условно здоровых доноров подобной тенденции не наблюдается. Обнаружено принципиальное различие роли НА в клетках условно здоровых доноров и пациентов с ОЛЛ в процессе метаболизма исследуемых лекарственных средств, причем в интактных клетках детей при ОЛЛ уровень содержания НА в среднем в 2 раза превышает таковой в клетках условно здоровых доноров. Индивидуальная чувствительность клеток пациентов с ОЛЛ при воздействии лекарственных средств характеризуется значительной вариабельностью, что указывает на необходимость персонализации их чувствительности к химиотерапевтическим воздействиям *ex vivo*. Более того, обнаружена определенная чувствительность клеток условно здоровых доноров к исследуемым химиопрепаратам (кроме иматиниба), что необходимо учитывать при использовании протоколов химиотерапии в процессе лечения конкретных пациентов. Для возможности персонализированного учета ответа клеток пациентов с ОЛЛ на химиотерапию можно использовать изменение их окислительно-восстановительного баланса в качестве прогностического показателя.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, активные формы кислорода, низкомолекулярные антиоксиданты, жизнеспособность клеток, противоопухолевые химиопрепараты.

В настоящее время острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) занимает ведущее место в структуре онкогематологической патологии в детском и подростковом возрасте. На его долю приходится 20% от всех злокачественных заболеваний [1] и 85% от всех лейкозов [2]. Оптимистичные результаты терапии *de novo* при ОЛЛ, полученные в конце 60-х годов прошлого столетия у детей и позволившие через 20 лет говорить об излечении более 50%, а к концу 90-х годов – уже о 80% пациентов [3], давали возможность полагать, что прогноз при ОЛЛ у взрослых будет в такой же степени благоприятным в плане ответа на терапию и длительности безрецидивной выживаемости, как и у детей. И в течение трех последних десятилетий многие группы исследователей, применяя программы химиотерапии различной интенсивности, пытаются воспроизвести у взрослых больных ОЛЛ эти результаты, которые можно назвать эталоном онкологической эффективности. Но, при этом, что полная ремиссия достигается в 70-80% случаев, лишь 30-40% больных переживают пятилетний рубеж без рецидива, т.е. только у 20-25% из общего числа заболевших можно говорить о выздоровлении [4]. Известно, что цитогенетические и молекулярные характеристики лейкозных клеток определяют прогноз заболевания. А тот факт, что у взрослых пациентов с ОЛЛ в 10 раз чаще определяются неблагоприятные хромосомные аномалии, возможно и объясняет малоудовлетворительные результаты лечения.

Рецидивы и резистентные формы регистрируются у взрослых больных ОЛЛ практически с той же частотой, как и при острых миелоидных лейкозах, составляя самую главную причину неудач в лечении. Терапия рефрактерных форм острых лимфобластных лейкозов основывается на принципах высокодозного воздействия, особенно, если речь идет о ранних рецидивах и резистентных вариантах ОЛЛ.

На основе изучения ферментов биотрансформации и транспортеров лекарственных препаратов, молекулярно-генетических предикторов ответа на терапию в настоящее время стал возможным более обоснованный выбор терапии, однако такие маркеры в полной мере не могут характеризовать ответ на конкретный набор химиопрепаратов, используемый для терапии онкогематологических заболеваний. Более адекватным для обоснования выбора протокола терапии является оценка индивидуальной лекарственной чувствительности *in vitro*.

Очевидно, что расширение спектра предсказательных диагностических технологий может способствовать прогнозированию ответа на терапию в организме с целью выбора адекватной стратегии лечения и ее мониторинга. Известно, что окислительный стресс играет особую роль в реализации токсического эффекта в лейкозных клетках, хотя базальный уровень свободных радикалов в клетках различных форм лейкозов и пациентов при одной и той же форме лейкоза характеризуются значительной гетерогенностью [5]. Это

неудивительно, так как двойственная роль активных форм кислорода (АФК) в физиологии и патологии клетки очевидна. Действительно, физиологические уровни АФК способны даже защитить клетку от апоптоза путем активации антиоксидантных механизмов.

С другой стороны, было продемонстрировано, что природное соединение, эффективно отключающее глутатион-зависимую антиоксидантную систему, способно убивать раковые клетки яичников, в которых обнаружена активация генерации АФК, под влиянием онкогенного сигнала *Ras*, но при этом проявляет низкую токсичность для незлокачественных эпителиальных клеток яичников с низким уровнем АФК [6]. На основе этих наблюдений авторы сделали вывод, что лейкозные клетки из-за значительного усиления в них генерации АФК, вероятно, будут также сильно зависеть от функционирования антиоксидантной системы для поддержания редокс-баланса и могут проявлять частичную чувствительность к подобному рода препаратам. Также было установлено, что лимфоциты здоровых людей более толерантны к подобной терапии из-за низкого базального уровня АФК и нормальной метаболической регуляции, что связывают с окислительным повреждением ДНК и с мутациями митохондриального ДНК в лейкозных клетках, в особенности у пациентов, перенесших терапию ДНК-разрушающими лекарственными препаратами [7,8]. Поскольку дыхательная цепь митохондрий является основным источником АФК вследствие бифуркации электронов от транспортных комплексов, предполагается, что дисфункция митохондриального дыхания может усиливать утечку электронов, приводящую к повышенному содержанию АФК в лейкозных клетках.

Было также установлено, что флударабел-резистентные клетки пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ) на поздней стадии заболевания с предшествующей терапией или с отключенным белком p53 имеют тенденцию к увеличению уровня АФК и они более чувствительны к соединениям, способным отключать глутатион-зависимую антиоксидантную систему или к его аналогам [9].

Таким образом, один из определяющих факторов клеточного ответа на экзогенные стимулы – окислительно-восстановительный баланс, благодаря жесткой регуляции внутриклеточного содержания АФК с помощью системы антиоксидантной защиты, способен выступать в качестве прогностического показателя устойчивости к лекарственным препаратам не только у пациентов с вновь диагностированным заболеванием, но и проследить изменение чувствительности к получаемой терапии.

В связи с этим актуальными являются оценка выживаемости лейкозных клеток различных типов на основе учета в них содержания АФК, что может лечь в основу доклинической лабораторной оценки индивидуальной лекарственной чувствительности клеток пациентов при лейкозах.

Несмотря на то, что гетерогенность ответа пациентов на терапию полностью не определяется вариантами взаимодействия клеток с лекарственными средствами вне организма, доклинический ответ клеток *in vitro* может исключить назначение неэффективных для конкретного пациента лекарственных средств, что является одним из способов предупреждения развития множественной лекарственной резистентности, а также использования редуцированной цитостатической нагрузки [10,11].

Цель работы – определить жизнеспособность клеток пациентов с ОЛЛ после воздействия лекарственных средств, применяемых при терапии в клинике и оценить их редокс-состояние для выявления критерия, подходящего для персонифицированного учета ответа лейкозных клеток на терапию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована периферическая кровь пациентов с диагнозом острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ, n=62), предоставленная УЗ «Минская областная клиническая больница», ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» и РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии. Периферическая кровь условно здоровых доноров (n=20) была предоставлена РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий МЗ РБ. Все образцы крови содержались в консерванте «гепарин».

Критериями включения в группу исследований пациентов с ОЛЛ являлись: начало индукционной терапии - внутри временного промежутка проведения исследования, диагноз ОЛЛ установлен на основании клинических данных, анализов периферической крови, результатов морфологического, цитохимического и иммунологического исследований клеток костного мозга. Критериями исключения из группы исследований пациентов с ОЛЛ являлись: тяжелый соматический статус пациента, который определяет возможность перенести химиотерапию, ОЛЛ – вторая злокачественная опухоль, отклонения от протокола, не обусловленные побочными действиями лечения и/или осложнениями течения заболевания, субъективные причины (например, отказ больных от интенсивной терапии и т.п.).

Периферические мононуклеарные клетки крови человека (ПМНК) изолировали в градиенте плотности гистопак-1077 путем центрифугирования крови (300×g, 30 мин) и последовательных отмывок в 10 мМ фосфатном буфере (PBS, pH 7,4). После выделения ПМНК помещали в коммерческую питательную среду RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМ L-глутамин. Клетки инкубировали в 96-ти луночных планшетах в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием CO₂ при температуре 37°C в течение 2–3 ч, 18–20 ч или 44 ч с лекарственными средствами, затем отмывали (300g) в 10 мМ PBS (pH 7,4) в течение 10 мин от химиопрепаратов и RPMI-1640 и использовали согласно экспериментальным протоколам.

В качестве лекарственных средств использовали химиопрепараты четырех различных классов в концентрациях, близких к терапевтическим: нуклеозидный аналог флударабел (**Flu**, 2,5 мкг/мл или 5 мкг/мл); винка-алкалоид винкристин (**Vincr**, 0,125 мкг/мл или 0,25 мкг/мл); ингибитор протеинтирозинкиназы иматиниб

(Imat, 2,5 мкг/мл или 5 мкг/мл), а также синтетический глюкокортикостероид дексаметазон (Dex, 2,5 мкг/мл или 5 мкг/мл).

Оценку уровня АФК в лимфоцитах пациентов с ОЛЛ проводили цитофлуориметрически с использованием флуоресцентного зонда 5-хлорометил-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (CM-H₂DCFDA) по интенсивности флуоресценции конечного продукта 5-хлорометил-2',7'-дихлорофлуоресцеин (CM-DCF) в FITC-Н канале. Известно, что CM-H₂DCFDA [12], прямо или косвенно способен окисляться с образованием флуоресцирующего продукта практически всеми основными АФК, образующимися в клетке в процессе ее жизнедеятельности [13], что позволяет использовать данный зонд для оценки изменения окислительно-восстановительного баланса. Итоговые результаты для данного метода представлены в виде отношения значений средней интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах после воздействия химиопрепарата (I_{ф.л}) к средней интенсивности флуоресценции CM-DCF в контрольных лимфоцитах (I_{ф.л.к}) (без воздействия химиопрепаратов), выраженного в процентах. При определении интенсивности флуоресценции CM-DCF в клетках пациентов с ОЛЛ учитывались только жизнеспособные лимфоциты, выделенные в отдельный регион по показателям бокового (SSC-Н) и прямого (FSC-Н) светорассеяния. Клетки, не меченные CM-H₂DCFDA, из анализа исключались. Все измерения проводились на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson) в FITC-Н канале.

Чувствительность ПМНК к лекарственным средствам определяли с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ теста). МТТ тест позволяет проводить сравнительную оценку метаболической (дегидрогеназной) активности митохондрий, степень которой коррелирует с жизнеспособностью клеток [14]. Итоговые данные представлены в виде отношения значений средней оптической плотности суспензии после воздействия химиопрепарата на клетки (D) к средней оптической плотности суспензии в контрольных клетках пациентов и условно здоровых доноров (D_к) (без воздействия химиопрепаратов), выраженного в процентах. Все измерения были выполнены на планшетном спектрофотометре Sunrise Microplate Reader (Tecan) при длине волны 540 нм.

Измерение содержания низкомолекулярных антиоксидантов (НА) в ПМНК условно здоровых доноров и пациентов с ОЛЛ проводили с помощью коммерческого набора "Antioxidant assay kit" (Sigma) согласно протоколу, предложенному разработчиками [15]. Спектрофотометрические измерения проводили на универсальном анализаторе Wallac 1420 VICTOR2 (Perkin Elmer) при длине волны 405 нм. Содержание НА в ПМНК определяли по эквиваленту концентрации TROLOX (водорастворимого аналога витамина Е) согласно уравнению, полученному из линейной регрессии калибровочной кривой.

Результаты экспериментов анализировали методами вариационной статистики с использованием параметрических и непараметрических критериев согласно характеру распределения выборки. Корреляционные зависимости оценивали с применением критерия Спирмена (r_s) в программе STATISTICA 8.0. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано [16], что существует связь между генерацией свободнорадикальных соединений на начальном этапе активации (не более 1 ч) противоопухолевыми препаратами *in vitro* лимфоцитов, выделенных из периферической крови пациентов с ХЛЛ и степенью их метаболической активности на конечном этапе альтерации (44 ч). В силу того, что ХЛЛ – это неоднородное заболевание с разнообразной клинической картиной [17], а молекулярные механизмы метаболизма в опухолевой клетке исследуемых лекарственных препаратов (Flu, Vincg, Dex и Imat) различны, то получение единичного клеточного ответа спустя определенный промежуток времени о степени образования свободнорадикальных соединений, к сожалению, может не служить адекватной оценкой вклада данного процесса в реализацию программы апоптоза по внутреннему митохондриальному пути. В связи с чем в данной работе была предпринята попытка определения содержания АФК в лейкозных клетках после краткосрочного (2-3 ч) и долгосрочного (18-20 ч) воздействия лекарственных средств *in vitro*.

Известно, что количество АФК, таких как супероксид-анион (O₂⁻), гидропероксил (H₂O₂) и гидроксил-радикал (•ОН) увеличивается в ответ на противоопухолевые лекарственные средства, что является важнейшим компонентом процесса апоптоза [18]. Интересным фактом является то, что АФК способны реагировать на резкие изменения физиологии умирающих клеток, преобразовывая поздние апоптотические стадии в некротическую гибель клетки [19,20]. Эти результаты подтверждают предположение, что внутриклеточный уровень АФК может определять судьбу клеток, включая чувствительность или устойчивость к противоопухолевым препаратам.

Выбранные нами лекарственные средства применяются в терапии различных злокачественных новообразований. Так, Vincg находит применение совместно с другими препаратами при терапии ХЛЛ [21], а также острого лимфобластного лейкоза у взрослых и детей [22]. Flu демонстрирует хорошие результаты при терапии острых лимфобластных лейкозов и неходжкинских лимфом [23]. Dex применяется при остром лимфобластном лейкозе в качестве индукционной терапии, а также при миелодиспластическом синдроме, ангиоиммунобластной злокачественной Т-клеточной лимфоме в комбинации с противоопухолевыми препаратами [24]. Imat способен селективно подавлять пролиферацию и вызывать апоптоз клеточных линий, позитивных по BCR/ABL, а также незрелых лейкозных клеток при хронической миелоидной лейкемии с положительной филадельфийской хромосомой и при остром лимфобластном лейкозе [25].

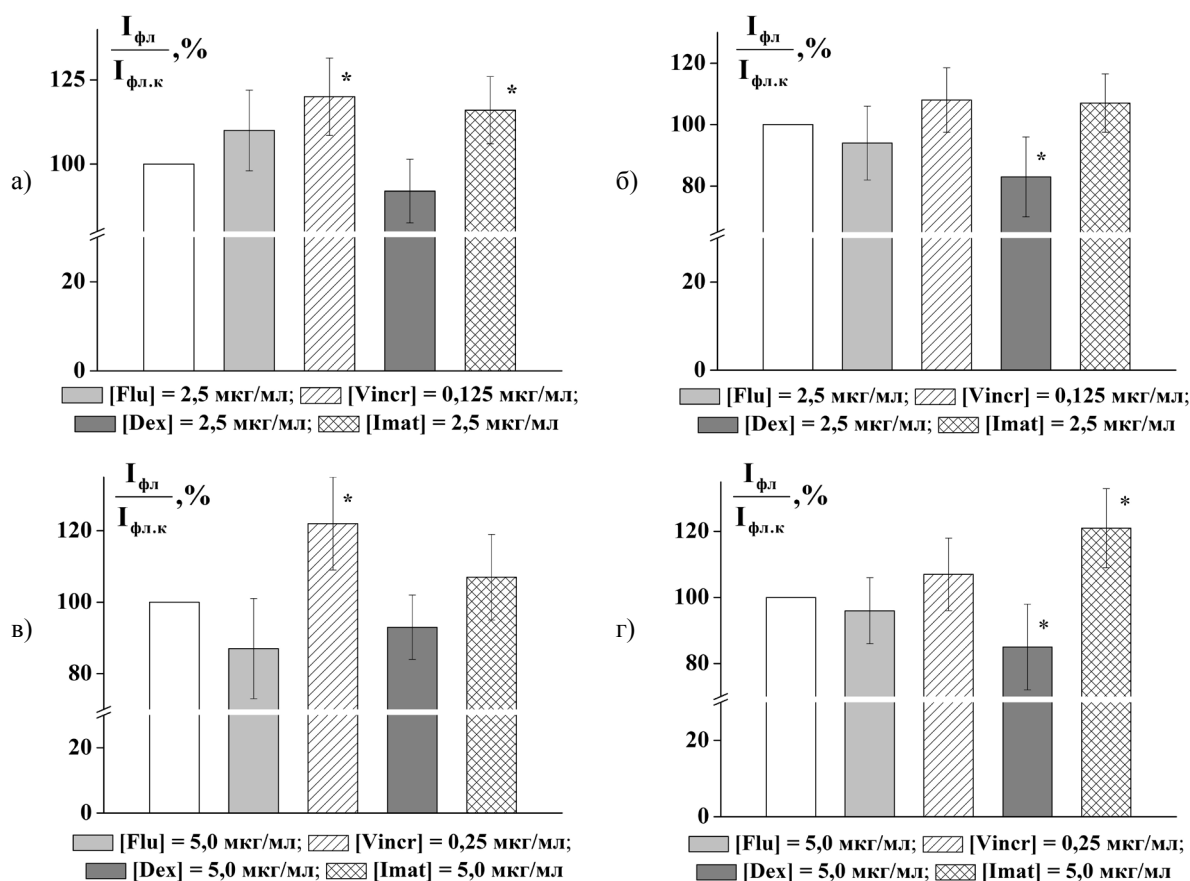
Различия результатов лечения в разных возрастных категориях детской популяции обусловлены отсутствием преемственности в лечении при переходе подростков с ОЛЛ из детской во взрослую онкогематологию и адаптированных для этого возраста терапевтических протоколов [26]. Таким образом, этот факт определил подход, при котором пациенты с ОЛЛ в возрасте до 16 лет составили первую (I) группу исследуемых (n=18), а пациенты старше этого возраста вошли во вторую (II) группу (n=44).

С целью выяснения вопроса о степени взаимосвязи между уровнем внутриклеточных свободнорадикальных соединений *in vitro* в лимфоцитах пациентов с ОЛЛ и количеством погибших клеток при действии лекарственных препаратов различной природы была оценена метаболическая активность клеток и их способность к раннему (через 2–3 ч) и позднему (через 18–20 ч) образованию свободнорадикальных соединений при действии лекарственных препаратов в концентрациях, близких к терапевтическим.

Как видно из рисунка 1а, после краткосрочного воздействия Flu и Dex наблюдалась тенденция к изменению интенсивности флуоресценции CM-DCF (для Flu – в среднем на 5–15% увеличение, для Dex – в среднем на 5–15% снижение) по сравнению с клетками, в среде инкубации которых отсутствовали лекарственные средства (контроль), однако полученные результаты статистически не достоверны. Воздействие Vincr и Imat в течение 2–3 ч приводило к статистически достоверному увеличению интенсивности флуоресценции CM-DCF в среднем на 10–25% по сравнению с контролем, что указывает на смещение окислительно-восстановительного баланса в лимфоцитах пациентов с ОЛЛ (I группа) в сторону “окислителей”, т.е. в клетках происходит накопление АФК.

Через 18–20 ч интенсивность флуоресценции CM-DCF в I-ой группе пациентов с ОЛЛ после воздействия Dex статистически достоверно снижалась в среднем на 15–25% по сравнению с контрольными клетками (рис. 1б), в то же время воздействие остальных химиопрепаратов не оказывало статистически значимого влияния на редокс-статус клеток по сравнению с контролем. Полученный результат указывает на накопление антиоксидантов в клетках пациентов с ОЛЛ (I группа) после долгосрочного воздействия Dex.

Краткосрочное воздействие Flu и Dex на в лимфоциты пациентов с ОЛЛ (II группа) в концентрациях, близких к терапевтическим, приводило к снижению интенсивности флуоресценции CM-DCF в среднем на 10–25% и 5–15% соответственно (для Imat наблюдалась тенденция к возрастанию интенсивности флуоресценции



I_{fl} – значение средней интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах после воздействия химиопрепарата; $I_{fl.k}$ – значение средней интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах в отсутствие химиопрепаратов (контроль); в качестве контроля принята величина интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах без воздействия лекарственных средств (100%); * – различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Рисунок 1. Интенсивность флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах пациентов с ОЛЛ I (а, б) и II (в, г) группы после краткосрочного (а, в) и долгосрочного (б, г) воздействия лекарственных средств *in vitro*

СМ-DCF в среднем на 5–10%) по сравнению с контролем, однако полученные результаты статистически не достоверны (рис. 1в). Инкубация клеток с Vincg в течение 2–3 ч приводила к статистически достоверному увеличению интенсивности флуоресценции СМ-DCF в среднем на 15–25% по сравнению с интактными лимфоцитами. Это свидетельствует о накоплении свободнорадикальных продуктов в лимфоцитах пациентов с ОЛЛ (II группа) после воздействия Vincg, что приводит к смещению окислительно-восстановительного баланса в клетках в сторону “окислителей”. Дальнейшее увеличение времени инкубации клеток II группы пациентов при ОЛЛ с Flu и Vincg (до 18–20 ч) приводило к восстановлению значений интенсивности флуоресценции СМ-DCF до контрольных значений (рис. 1г). В тоже время воздействие Dex и Imat в течение 18–20 ч приводило к статистически достоверному снижению/увеличению соответственно интенсивности флуоресценции СМ-DCF в среднем на 15–25% по сравнению с контролем, что указывает на накопление “восстановителей”/“окислителей” в лимфоцитах II группы пациентов при ОЛЛ (рис. 1г).

Стоит отметить, что краткосрочное воздействие (2–3 ч) Flu не оказывает влияния на редокс-статус лимфоцитов пациентов с ОЛЛ обеих групп, однако наблюдается тенденция как к накоплению АФК (группа I), так и к накоплению антиоксидантов (II группа). Vincg спустя 2–3 ч вызывает накопление продукции АФК как у детей, так и у взрослых при ОЛЛ, причем практически в равной степени. Краткосрочное воздействие Dex не оказывает влияния на окислительно-восстановительный баланс лимфоцитов пациентов с ОЛЛ обеих групп.

Долгосрочное воздействие (18–20 ч) Flu и Vincg не оказывает влияния на редокс-статус лимфоцитов пациентов с ОЛЛ обеих групп. Dex спустя 18–20 ч приводит к смещению окислительно-восстановительного баланса в сторону “восстановителей” (антиоксидантов) в лимфоцитах пациентов с ОЛЛ обеих групп, причем в равнозначной степени.

Краткосрочное воздействие (2–3 ч) Imat в концентрации, близкой к терапевтической, приводит к более существенному сдвигу окислительно-восстановительного баланса в сторону “окислителей” в лимфоцитах детей с ОЛЛ по сравнению с долгосрочным воздействием (спустя 18–20 ч). В свою очередь долгосрочное воздействие (18–20 ч) Imat в концентрации, близкой к терапевтической, на лимфоциты взрослых пациентов с ОЛЛ приводит к более существенному накоплению в них АФК по сравнению с краткосрочным воздействием (через 2–3 ч).

Таким образом, воздействие исследуемых противоопухолевых препаратов на лимфоциты пациентов с ОЛЛ (взрослых и детей) в концентрациях, близких к терапевтическим, приводит к разнонаправленному характеру изменения окислительно-восстановительного баланса в лейкозных клетках.

На рисунке 2 представлены результаты по чувствительности клеток пациентов с ОЛЛ и условно здоровых доноров к исследуемым лекарственным средствам, полученные с помощью МТТ-теста.

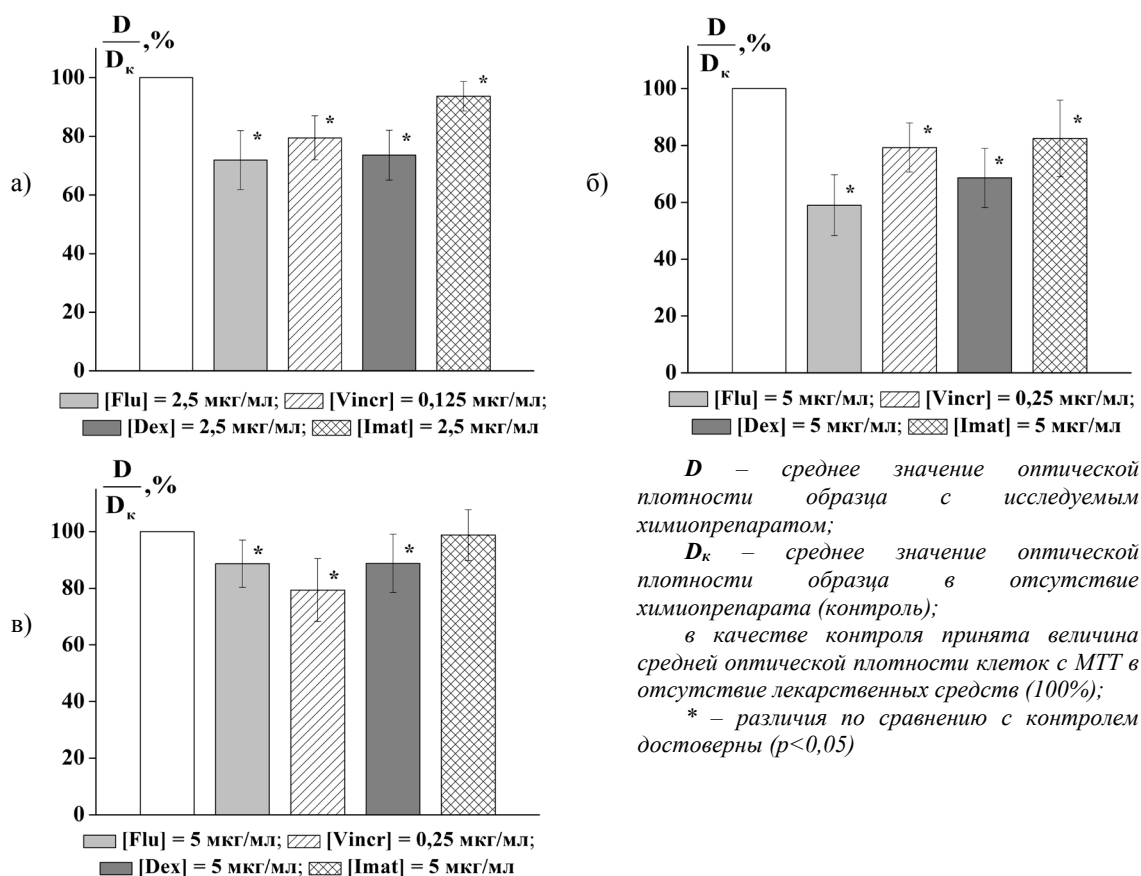


Рисунок 2. Метаболическая активность клеток пациентов с ОЛЛ I (а) и II (б) группы и условно здоровых доноров (в) после воздействия лекарственных средств *in vitro*

Установлено, что в I группе пациентов с ОЛЛ чувствительность клеток к Flu, Dex и Vincg находилась на среднем уровне и статистически достоверно отличалась от контрольных клеток (в среде инкубации которых отсутствовали противоопухолевые препараты) на 15-35% в сторону её увеличения (рис. 2а), что соответствовало снижению дегидрогеназной активности митохондрий клеток (их жизнеспособности) спустя 44 ч после воздействия химиопрепаратов. Воздействие Imat в течение 44 ч приводило к незначительному снижению жизнеспособности клеток I-ой группы пациентов с ОЛЛ в среднем на 5-10% по сравнению с контролем, но, тем не менее, данные статистически достоверны (рис. 2а).

При воздействии исследуемых противоопухолевых средств на клетки пациентов II группы в течение 44 ч наблюдалось статистически достоверное увеличение их чувствительности (рис. 2б), что соответствовало снижению жизнеспособности клеток по сравнению с контролем. Так, для Flu и Dex снижение жизнеспособности клеток пациентов с ОЛЛ II группы спустя 44 ч составило в среднем от 20 до 50% по сравнению с интактными клетками (контроль). Через 44 ч для Vincg и Imat количество погибших клеток было снижено и составило в среднем 10-30% относительно контроля (рис.2б).

Стоит отметить, что жизнеспособность клеток условно здоровых доноров после контакта с исследуемыми лекарственными средствами в концентрациях, соответствующим таковым для взрослых пациентов с ОЛЛ (II группа), также снижалась (рис. 2в). Причем для Flu, Vincg и Dex были зарегистрированы статистически достоверные отличия по сравнению с контролем в среднем на 10-30% (рисунок 2в). Данный факт свидетельствует о наличии базальной чувствительности в клетках условно здоровых доноров к исследуемым химиопрепаратам, что необходимо учитывать при использовании протоколов химиотерапии в процессе лечения конкретных пациентов.

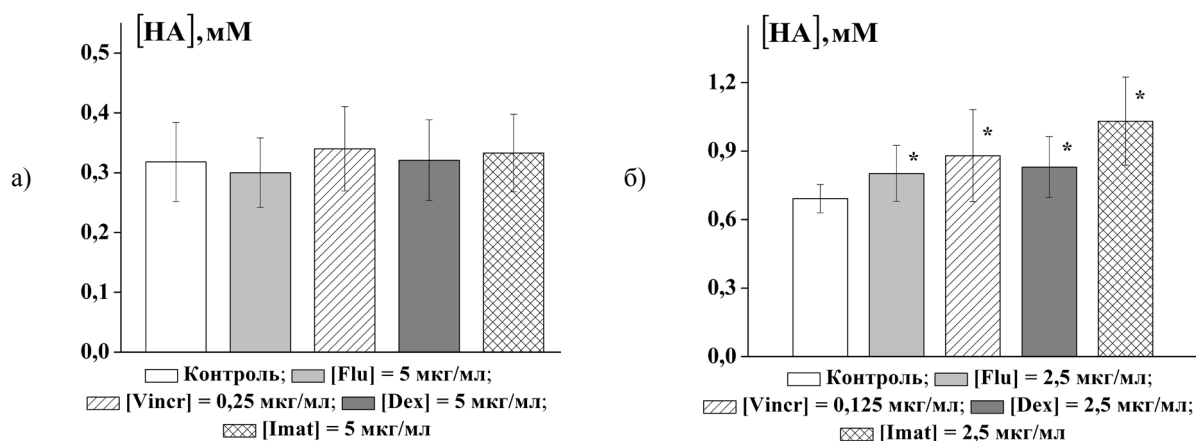
Таким образом, клетки детей с ОЛЛ обладают более низкой чувствительностью к Flu и Imat в концентрациях, близких к терапевтическим, по сравнению с лейкозными клетками взрослых. Причем для Flu и Imat чувствительность клеток взрослых по сравнению с клетками детей увеличена в среднем на 10–20%, что может объясняться более высокой концентрацией данных химиопрепаратов. Чувствительность же клеток пациентов с ОЛЛ к Dex и Vincg находится на одном уровне для обеих групп и сопоставима с таковой для клеток условно здоровых доноров.

Для установления степени взаимосвязи между способностью лимфоцитов пациентов с ОЛЛ к раннему (через 2–3 ч) и позднему (через 18–20 ч) образованию свободнорадикальных соединений *in vitro* и количеством погибших клеток спустя 44 ч при действии лекарственных препаратов различной природы был проведен корреляционный анализ между относительным изменением интенсивности флуоресценции CM-DCF и оптической плотностью клеточной суспензии с МТТ. Установлено, что между процентным содержанием жизнеспособных клеток пациентов с ОЛЛ I группы после воздействия исследуемых лекарственных средств и количеством в них АФК спустя 2–3 ч, существуют статистически достоверные прямые зависимости (критерий Спирмена r_s от 0,86 до 0,95), что свидетельствует о существенном вкладе всех исследуемых лекарственных средств в реализацию процессов апоптоза по внутреннему митохондриальному пути у детей с ОЛЛ. Статистически значимых зависимостей между относительным изменением интенсивности флуоресценции CM-DCF спустя 18-20 ч после воздействия лекарственных средств и оптической плотностью клеточной суспензии с МТТ спустя 44 ч у пациентов с ОЛЛ установить не удалось. Данный факт может указывать на значительные изменения в функционировании внутриклеточных эстераз (отвечают за перевод флуоресцентного зонда CM-H₂DCFDA в активную форму [12]) в лимфоцитах пациентов с ОЛЛ спустя 18–20 ч после воздействия исследуемых химиопрепаратов, что может приводить к чрезмерному снижению/увеличению CM-DCF внутри клеток и не отражать реальной картины по изменению продукции АФК.

С целью уточнения полученного результата был использован альтернативный метод (“тролокс-эквивалент антиоксидантной активности”) оценки редокс-статуса клеток пациентов с ОЛЛ после долгосрочного воздействия (18-20 ч) лекарственных средств. Он основан на количественном определении низкомолекулярных антиоксидантов в ПМНК спектрофотометрическим способом с использованием модельной системы “метмиоглобин-Н₂O₂-ABTS-тролокс” согласно уравнению, полученному из линейной регрессии калибровочной кривой [15].

В исследованной группе условно здоровых доноров содержание НА составило в среднем $0,32 \pm 0,13$ мМ, а в ПМНК пациентов с ОЛЛ I группы данный параметр был выше в 1,5–2,5 раза и составил в среднем $0,69 \pm 0,13$ мМ (рис. 3). Полученные результаты для ПМНК пациентов с ОЛЛ статистически достоверно отличались от клеток условно здоровых доноров и хорошо согласуются с предположениями об увеличенном содержании АФК в лейкозных клетках [7,8], т.к. это приводит к необходимости усиленного синтеза в них НА для возможности поддержания редокс-гомеостаза в диапазонах, превышающих физиологические.

Долгосрочное воздействие (18–20 ч) Flu и Dex на клетки пациентов с ОЛЛ (I группа) приводило к статистически достоверному увеличению в них НА в среднем на 10–25% по сравнению с интактными клетками, в среде инкубации которых отсутствовали лекарственные средства (контроль). В тоже время инкубация ПМНК пациентов с ОЛЛ (I группа) с Vincg и Imat в течение 18–20 ч приводила также к увеличению в них содержания НА в среднем на 30–55% по сравнению с контролем (рис. 3б). Стоит отметить, что в ПМНК условно здоровых доноров не наблюдалось статистически достоверных изменений в содержании НА относительно контроля после



Содержание низкомолекулярных антиоксидантов в нормальных и лейкозных клетках в отсутствие противоопухолевых средств в среде инкубации принято в качестве контроля; * – различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Рисунок 3. Содержание низкомолекулярных антиоксидантов в периферических мононуклеарных клетках условно здоровых доноров (а) и пациентов с ОЛЛ I-ой группы после воздействия противоопухолевых средств *in vitro*

инкубации с исследуемыми лекарственными средствами в течение 18–20 ч (рис. 3а), что свидетельствует об отсутствии изменений редокс-статуса в клетках условно здоровых доноров после воздействия данных лекарственных средств.

Для установления степени взаимосвязи между способностью ПМНК условно здоровых доноров и пациентов с ОЛЛ (I группа) к накоплению НА через 18–20 ч *in vitro* и количеством погибших клеток спустя 44 ч после воздействия лекарственных препаратов различной природы был проведен корреляционный анализ между содержанием НА и оптической плотностью клеточной суспензии с МТТ. Он выявил между процентным содержанием жизнеспособных клеток ПМНК условно здоровых доноров и количеством в них НА после воздействия исследуемых химиопрепаратов статистически достоверную обратную зависимость (критерий Спирмена r_s от -0,52 до -0,71). Проведение подобного анализа на клетках пациентов с ОЛЛ (I группа) позволило установить статистически достоверные прямые зависимости между содержанием НА и количеством жизнеспособных клеток (значение r_s от 0,54 до 0,85), что может указывать на способность лейкозных клеток при ОЛЛ к повышенному синтезу НА для предотвращения развития окислительного стресса, вызванного метаболизмом исследуемых лекарственных средств.

Полученный результат указывает на принципиальное различие роли антиоксидантов в ПМНК условно здоровых доноров и пациентов с ОЛЛ в процессе метаболизма лекарственных средств. Высокие коэффициенты корреляции свидетельствует о возможности использования абсолютной величины содержания НА в клетках пациентов с ОЛЛ *in vitro* в качестве прогностического маркера их чувствительности к исследуемым лекарственным соединениям.

Стоит отметить, что проведенный корреляционный анализ с использованием критерия Спирмена (r_s) между годом рождения пациентов I группы и чувствительностью их клеток к исследуемым противоопухолевым средствам выявил статистически значимую прямую зависимость. Причем для всех исследуемых лекарственных средств она колебалась в диапазоне значений r_s от 0,52 до 0,62, что свидетельствует о снижении чувствительности клеток детей с ОЛЛ ко всем исследуемым лекарственным средствам с уменьшением их возраста. Подобный корреляционный анализ, выполненный для пациентов с ОЛЛ II группы, выявил статистически значимую обратную зависимость. Для всех исследуемых лекарственных средств она колебалась в диапазоне значений r_s от -0,44 до -0,53, что указывает на снижение чувствительности клеток взрослых пациентов с ОЛЛ ко всем исследуемым лекарственным средствам с увеличением их возраста.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, краткосрочное и долгосрочное воздействие исследуемых противоопухолевых препаратов на лимфоциты пациентов с ОЛЛ (взрослых и детей) в концентрациях, близких к терапевтическим, приводит к разнонаправленному характеру изменения содержания АФК в лейкозных клетках. Наряду с этим, долгосрочное воздействие исследуемых химиопрепаратов приводит к увеличению содержания низкомолекулярных антиоксидантов в клетках детей при ОЛЛ, причем в клетках условно здоровых доноров не наблюдается статистически значимых изменений в содержании низкомолекулярных антиоксидантов по сравнению с контролем. Показано, что в интактных клетках детей при ОЛЛ уровень содержания низкомолекулярных антиоксидантов в среднем в 2 раза превышает таковой в периферических мононуклеарах условно здоровых доноров. Более того, обнаружено принципиальное различие роли низкомолекулярных антиоксидантов в периферических мононуклеарных клетках условно здоровых доноров и пациентов с ОЛЛ в процессе метаболизма исследуемых лекарственных средств.

Индивидуальная чувствительность клеток пациентов с ОЛЛ при воздействии одинаковых концентраций лекарственных средств, близких к терапевтическим, характеризуется значительной вариабельностью, что указывает на необходимость персонализации чувствительности клеток пациентов с данным заболеванием к химиотерапевтическим воздействиям *ex vivo*. Более того, была обнаружена определенная чувствительность клеток условно здоровых доноров к исследуемым химиопрепаратам (кроме иматиниба), что необходимо учитывать при использовании протоколов химиотерапии в процессе лечения конкретных пациентов. В качестве критерия для возможности персонализированного учета ответа клеток пациентов с ОЛЛ на терапию можно использовать изменение их окислительно-восстановительного баланса.

Список литературы / References:

1. Gaynor J, Chapman D, Little C, et al. A cause-specific hazard rate analysis of prognostic factors among 199 adults with acute lymphoblastic leukemia: the Memorial Hospital experience since 1969. *Journal of Clinical Oncology*, 1988, vol. 6, no. 6, pp. 1014-1030.
2. Schellong G., Potter R., Bramswig J. et al. High Cure Rates and Reduced Long-Term Toxicity in Pediatric Hodgkins Disease: The German -Austrian Multicenter Trial DAL-HD-90. *J. Clin. Oncol.*, 1999, vol.17, no. 12, pp. 3736-3744.
3. Brinkmann V., Geiger T., Alkan S. et al Interferon-alfa increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T-cells. *J. Exp. Med.*, 1993, vol. 178, pp. 1655-1663.
4. Jansen J.H., de Ridder M.C., Geertsma W.M. et al Complete remission of t(11;17) positive acute promyelocytic leukemia induced by all-transretinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 1999, vol. 94, no. 1, pp. 39-45.
5. Zhou F., Shen Q., Claret F. Novel roles of reactive oxygen species in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *J. Leuk. e Biol.*, 2013, vol. 3, no. 94, pp. 423-429.
6. Trachootham D. et al. Selective killing of oncogenic transformed cells through ROS-mediated mechanism by β -phenylethyl isothiocyanates. *Cancer Cell.*, 2006, vol. 10, pp. 241-252.
7. Carew J.S. et al. Increased mitochondrial biogenesis in primary leukemia cells: the role of endogenous nitric oxide and impact on sensitivity to fludarabine. *Leukemia*, 2004, vol. 18, pp. 1934-1940.
8. Hileman E.O. et al. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, vol. 53, pp. 209-219.
9. Trachootham D. et. al. Effective elimination of fludarabine-resistant CLL cells by PEITC through. *Blood*, 2008, vol. 112, no. 5, pp. 1912-1922.
10. Свириновский А.И. и др. Лекарственная чувствительность лейкозных клеток *ex vivo* и прогнозирование ответа пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом на терапию. *Здравоохранение*, 2010, № 3, с. 57-60. [Svirnovsky A.I. et al. Drug sensitivity of leukemic cells *ex vivo* and predicting the response of patients with chronic lymphocytic leukemia to therapy. *Healthcare*, 2010, no. 3, pp. 57-60. (In Russ.)]
11. Cramer P., Hallek M. Initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.*, 2016, № 43, vol. 2, pp. 241-250.
12. Haugland R.P. *Handbook of fluorescent probes and research products*. 9-nd Edition. USA: Molecular Probes Inc, 2002, 964 p.
13. Владимиров Ю.А. Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран митохондрий, некроз и апоптоз. *Биологические мембраны*, 2003, т. 19, № 5, с. 356-377. [Vladimirov Yu.A. Violation of the barrier properties of the inner and outer membranes of mitochondria, necrosis and apoptosis. *Biological membranes*, 2003, vol. 19, no. 5, pp. 356-377. (In Russ.)]
14. Veerman A., Pieters R. Annotation. Drug sensitivity assay in leukaemia and lymphoma. *Brit. J. Haem.*, 1990, vol. 74, no. 4, pp. 381-384.
15. Sigma Aldrich [Electronic resource] Antioxidant Assay Kit, 2012.
16. Тамашевский А.В. и др. Окислительный стресс в лимфоцитах при хроническом лимфоцитарном лейкозе, индуцированный противоопухолевыми препаратами. *Известия НАН Беларуси. Сер. биол. Наук*, 2010, № 3, с. 62-66. [Tamashevsky A.V. et al. Oxidative stress in lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia, induced by anticancer drugs. *Bulletin of the National Academy of Sciences of Belarus. Ser. biol. Nauk*, 2010, no. 3, pp. 62-66. (In Russ.)]
17. Свириновский А.И. Хронический лимфоцитарный лейкоз: парадигмы и парадоксы. Медицинские новости, 2008, № 13, с. 7-19. [Svirnovsky A.I. Chronic lymphocytic leukemia: paradigms and paradoxes. *Medical News*, 2008, no. 13, pp. 7-19. (In Russ.)]
18. Chandra J., Samali A., Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, vol. 29, pp. 323-333.
19. Barzilai A., Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*, 2004, vol. 3, pp. 1109-1115.
20. Fleury C., Mignotte B., Vayssiere J.L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, 2002, vol. 84, pp. 131-141.
21. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999, vol. 91, pp. 861-868.

22. Moore A., Pinkerton R. Vincristine: can its therapeutic index be enhanced? *Pediatr. Blood*, 2009, vol. 53, pp. 1180-1187.
23. Ricci F. et al. Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *Ther. Clin. Risk Manag.*, 2009, vol. 5, pp. 187-207.
24. Baptista M.J. et al. Differential gene expression profile associated to apoptosis induced by dexamethasone in CLL cells according to IGHV/ZAP-70 status. *Clin. Cancer Res.*, 2012, vol. 18, no. 21, pp. 5924-5933.
25. Lewandowski K. et al. B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia with 11q22.3 Rearrangement in Patient with Chronic Myeloid Leukemia Treated with Imatinib. *Case Rep. Med.*, 2016, p. 9806515.
26. Усс А.Л., Змачинский В.А. Лечение рецидивов и резистентных форм лимфомы Ходжкина. *Материалы VI Российской Онкологической конференции 6-28 ноября 2002 г. Москва*, с. 55-57. [Uss A.L., Zmachinsky V.A. Treatment of recurrent and resistant forms of Hodgkin's lymphoma. *Materials of the VI Russian Oncological Conference November 6-28, 2002 Moscow*, pp. 55-57. (In Russ.)]

REDOX BALANCE AS A CRITERION FOR RESPONSE TO PERSONALIZED CELL THERAPY FOR PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Tamashevski A.V., Harmaza Y.M., Feduro N.A., Pasiukov V.V.

Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies MH RB
Dolginovsky tract 160, Minsk, 220053, Belarus; e-mail: Tayzoe@mail.ru

Abstract. The redox state of lymphocytes of patients (adults and children) with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and their sensitivity was assessed before and after exposure to anticancer drugs (fludarabine, vincristine, dexamethasone, and imatinib) at concentrations close to therapeutic ones. It was found that alterations of reactive oxygen species level in leukemic cells after the short-term (2-3 h) and long-term (18-20 h) exposure to the studied drugs are differently directed. Affect of the investigated drugs on the children leukemic cells leads to an increase a cytosolic low molecular weight antioxidants (LMWA) content, but for donor's cells this tendency is not observed. A fundamental difference of LMWA participation in the studied anticancer drugs metabolism in donor's and patient's cells was found. Moreover, cytosolic LMWA level in intact ALL children's cells is an average 2 times higher than in donor's cells. The individual sensitivity of the leukemic cells under anticancer drugs exposure is characterized by significant variability. It indicates about necessary to personalize cells sensitivity to chemotherapeutic effects *ex vivo*. Moreover, a certain sensitivity of donor's cells to the studied anticancer drugs (except for imatinib) was found. It should be taken into account under using chemotherapy protocols during treatment of individual patient. For the possibility of personalized accounting of the cells response of ALL patients to chemotherapy, a change in their redox balance can be used as a prognostic indicator.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, reactive oxygen species, low molecular weight antioxidants, cell viability, anticancer drugs.