



Тамашевский А.В.¹, Гармаза Ю.М.¹✉, Федуро Н.А.¹, Пасюков В.В.¹, Слобожанина Е.И.^{1,2}

¹ Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

² Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Состояние окислительно-восстановительного баланса в лимфоцитах периферической крови пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом как критерий персонифицированной оценки ответа их организма на проводимую лекарственную терапию

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Тамашевский А.В. – концепция, дизайн исследования, обзор литературы, проведение цитофлуориметрических исследований, анализ и статистическая обработка данных, написание текста статьи; Гармаза Ю.М. – проведение исследований по оценке редокс-статуса лимфоцитов, обзор литературы, анализ данных, написание текста статьи; Федуро Н.А. – выделение ПМНК из крови пациентов, постановка МТТ-теста; Пасюков В.В. – разработка критериев включения-исключения, сбор материала для исследования; Слобожанина Е.И. – руководство проектом, редактирование статьи.

Благодарность. Работа выполнена в рамках мероприятия 29 «Разработать технологию для экспресс-оценки степени повреждений лейкозных клеток, индуцированных терапевтическими факторами», реализуемого в ГП «Научно-технологии и техника», подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии – 2020» (2017–2019 гг.). Авторы благодарят врачей-гематологов Минской областной клинической больницы за предоставленные образцы крови пациентов с В-ХЛЛ согласно критериям включения-исключения, разработанным для реализации проекта.

Подана: 14.08.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: garmaza@yandex.com

Резюме

Цель. Определить жизнеспособность лимфоцитов периферической крови пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом (В-ХЛЛ) до и после проведения им химиотерапии и оценить значимость редокс-состояния их иммунокомпетентных клеток при метаболизме лекарственных препаратов для персонифицированного учета ответа организма на использованную схему лечения.

Материалы и методы. В работе использована периферическая кровь пациентов с диагнозом В-ХЛЛ (n=25). В качестве лекарственных средств были выбраны: нуклеозидный аналог флударабел (Flu, 5 мг/л); ингибитор протеинтирозинкиназы иматиниб (Imat, 5 мг/л), синтетический глюкокортикостероид дексаметазон (Dex, 5 мг/л), а также винка-алкалоид винкристин (VincR, 0,25 мг/л). Процентное содержание CD5⁺ лимфоцитов среди CD19⁺ клеток в суммарной популяции периферических мононуклеарных клеток (ПМНК) пациентов с В-ХЛЛ определяли цитофлуориметрически с использованием специфических моноклональных антител. Оценка уровня активных форм кислорода в ПМНК проводилась цитофлуориметрически с применением флуоресцентного зонда 5-хлорометил-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (CM-H₂DCFDA). Чувствительность ПМНК к лекарственным средствам определяли с помощью МТТ-теста.



Результаты. Проведена оценка редокс-состояния лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ до и после воздействия на них лекарственных средств в терапевтических концентрациях, а также определена их чувствительность к данным противоопухолевым химиопрепаратам. Полученные результаты свидетельствуют о снижении чувствительности клеток пациентов с В-ХЛЛ после полного курса химиотерапии к флударабелу, винкристину, дексаметазону и иматинибу по сравнению с клетками пациентов, не прошедших химиотерапию. Выявлено изменение редокс-статуса в клетках пациентов с В-ХЛЛ до проведения химиотерапии после воздействия исследуемых лекарственных средств по сравнению с группой пациентов после химиотерапии. Обнаружены высокая гетерогенность популяций клеток пациентов с В-ХЛЛ и значительная вариабельность в индивидуальной чувствительности к концентрациям противоопухолевых лекарственных средств, близким к терапевтическим, что свидетельствует о необходимости персонификации чувствительности клеток пациентов к химиотерапевтическим воздействиям *ex vivo* при выборе адекватной стратегии лечения конкретного пациента.

Заключение. Для возможности персонифицированного учета ответа клеток пациентов с В-ХЛЛ на химиотерапию в качестве прогностического показателя можно использовать изменение их редокс-состояния.

Ключевые слова: хронический В-лимфоцитарный лейкоз, активные формы кислорода, жизнеспособность клеток, лекарственная резистентность, противоопухолевые химиопрепараты

Tamashevski A.¹, Harmaza Yu.¹✉, Fiadura N.¹, Pasiukov V.¹, Slobozhanina E.^{1,2}

¹ Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Belarus

² Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Redox Reactions Balance in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Chronic B-Lymphocytic Leukemia as a Personalist Criterion for Assessment the Organism Response to Drug Therapy

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Tamashevski A. – concept, study design, literature review, cytofluorometric studies, analysis and statistical processing of data, text writing; Harmaza Yu. – conducting studies to assess the redox status of lymphocytes, literature review, data analysis, text writing; Fiadura N. – isolation of PMNC from the blood of patients, setting up the MTT test; Pasyukov V. – development of inclusion-exclusion criteria, collection of material for research; Slobozhanina E. – project management, article editing.

Acknowledgements. The work was carried out as part of activity 29 "Develop a technology for rapid assessment of the leukemia cells damage degree under inducing by therapeutic factors", implemented in the State Program "High-tech technologies and equipment", subprogram 1 "Innovative biotechnologies – 2020" (2017–2019). The authors thank the hematologists of the Minsk Regional Clinical Hospital for providing blood samples from patients with B-CLL according to the inclusion-exclusion criteria developed for the project.

Submitted: 14.08.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: garmaza@yandex.com

Abstract

Purpose. To determine the peripheral blood lymphocytes viability of patients with chronic B-lymphocytic leukemia (B-CLL) before and after chemotherapy and to estimate the significance of their immunocompetent cells redox balance under drugs metabolism for assessment the organism response to used treatment regimen.

Materials and methods. A peripheral blood of patients with B-CLL (n=25) was used. The following antitumor drugs have been chosen: nucleoside analog fludarabel (Flu, 5 mg/l); the protein tyrosine kinase inhibitor imatinib (Imat, 5 mg/l), the synthetic glucocorticosteroid dexamethasone (Dex, 5 mg/l), and the vinca alkaloid vincristine (Vincr, 0.25 mg/l). The percentage of CD5⁺ lymphocytes among CD19⁺ cells in the total population of B-CLL peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was determined by flow cytometry using special monoclonal antibodies. The level of reactive oxygen species in PBMCs was assessed using fluorescent probe 5-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA). The PBMCs sensitivity to antitumor drugs was determined using MTT test.

Results. The redox state of lymphocytes in patients with B-CLL was assessed before and after exposure to drugs in therapeutic concentrations and their sensitivity to these antitumor drugs was determined. The obtained results indicate about decrease in the cells sensitivity of B-CLL patients after a full course of chemotherapy to fludarabel, vincristine, dexamethasone and imatinib, compared with the cells of patients are not treated with chemotherapy. Alterations in the redox state of B-CLL patient's cells before chemotherapy after exposure to the studied drugs compared to the group of patients after chemotherapy was revealed. High heterogeneity of cell populations of B-CLL patients and significant



variability in individual sensitivity to anticancer drugs concentrations close to therapeutic ones were found. This indicates about importance of personalizing of the patient's cells sensitivity to ex vivo chemotherapeutic effects under choosing an adequate treatment strategy for certain patient.

Conclusion. Alterations in lymphocytes redox state can be used as a prognostic indicator for the possibility of personalized analysis of the response of B-CLL patient's cells to chemotherapy.

Keywords: chronic B-lymphocytic leukemia, reactive oxygen species, cell viability, drug resistance, anticancer drugs

■ ВВЕДЕНИЕ

Проблема первичной и приобретенной нечувствительности пациентов к проводимой химиотерапии актуальна из-за последствий, которые могут быть вызваны применением неэффективных лекарственных препаратов, – возможного развития осложнений и полной нечувствительности. Учитывая гетерогенность патофизиологических механизмов, обуславливающих развитие лейкозов, механизмов резистентности к терапии, даже не говоря о значительных колебаниях индивидуальной чувствительности опухолевых клеток к лекарственным препаратам, трудно выбрать оптимальную схему лечения отдельного пациента, основываясь на эмпирических фактах или статистических данных об эффективности терапии среднего пациента [1]. Лабораторный компонент персонализации терапии предполагает использование не только исходных структурных особенностей клеток (в частности мутаций) или выживаемости клеток после контакта с противолейкозными препаратами *in vitro*. Очевидно, что расширение спектра предсказательных диагностических технологий может способствовать прогнозированию ответа на терапию в организме с целью выбора адекватной стратегии терапии и ее мониторинга [1, 2].

Ранее было установлено, что по сравнению с интактными лимфоцитами доноров в клетках при хроническом лимфоцитарном лейкозе (ХЛЛ) наблюдается значительное увеличение уровня активных форм кислорода (АФК), что объясняют окислительным повреждением ДНК и мутациями митохондриальной ДНК (мтДНК), в особенности у пациентов, перенесших терапию ДНК-разрушающими лекарственными препаратами [3–5]. Поскольку дыхательная цепь митохондрий является основным источником генерации АФК вследствие бифуркации электронов от транспортных комплексов, предполагается, что дисфункция митохондриального дыхания может усиливать утечку электронов и запускать повышенную генерацию АФК [6]. Интересный факт состоит в том, что потеря p53, по-видимому, способствует мутациям в мтДНК и усилению продукции АФК в раковых клеточных линиях [7]. Несколько механизмов, включая митохондриальную дисфункцию и нарушения метаболизма, возможно, вносят вклад в формирование окислительного стресса на фоне повышенного уровня активных форм кислорода в клетках при хроническом лимфоцитарном лейкозе. С терапевтической точки зрения можно задать один важный вопрос: как использовать повышенный уровень АФК в клетках пациентов с ХЛЛ для разработки новых эффективных стратегий борьбы с данной патологией? Хотя увеличение

содержания АФК в раковых клетках часто рассматривают как неблагоприятное событие из-за их способности к запуску геномной нестабильности и клеточной пролиферации, они вместе с тем способны индуцировать гибель раковых клеток, что и является желаемым результатом химиотерапии [8, 9]. Это может служить основанием к использованию феномена индукции окислительного стресса в самих раковых клетках для разработки новых стратегий [9], которые помогут достичь токсического действия АФК против самих ХЛЛ-клеток с применением подходящих редокс-модулирующих лекарственных препаратов.

В работе [10] было продемонстрировано, что природное соединение β -фенилэтиллизотиоцианат эффективно отключает глутатион-зависимую антиоксидантную систему и предпочтительно убивает 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. На основе этих наблюдений авторы сделали вывод о том, что ХЛЛ-клетки из-за значительного усиления в них генерации АФК, вероятно, будут также сильно зависеть от функционирования антиоксидантной системы для поддержания редокс-баланса и эти клетки могут проявлять частичную чувствительность к такого рода препаратам. С другой стороны, установлено [3], что лимфоциты здоровых людей более толерантны к подобному лечению из-за низкого базального уровня АФК и нормальной метаболической регуляции. При этом показано, что флударабел-резистентные клетки пациентов с ХЛЛ на поздней стадии заболевания с предшествующей терапией или с отключенным белком p53 имеют тенденцию к увеличению уровня АФК и такие клетки, вероятно, будут чувствительны к β -фенилэтиллизотиоцианату или его аналогам [11].

Стоит отметить, что многие противоопухолевые препараты, применяемые в терапии лейкозов, могут инициировать в опухолевой клетке апоптотические процессы не только по внутреннему пути – с участием митохондрий, но и по внешнему – с участием рецепторов семейства фактора некроза опухолей. Однако сведения об этих процессах в доступной литературе противоречивы [5]. АФК, такие как супероксид-анион (O_2^-), H_2O_2 и гидроксил-радикал ($\cdot OH$), генерируются в ответ на противоопухолевые лекарственные препараты и также являются важными компонентами апоптоза [12]. Интересным фактом является то, что АФК могут реагировать на резкие изменения физиологии умирающих клеток, преобразовывая поздние апоптотические стадии в некротическую гибель клетки [13, 14]. Эти результаты указывают на то, что внутриклеточный уровень АФК может определять судьбу клеток, включая чувствительность или устойчивость к противоопухолевым препаратам.

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 [1, 15]. Таким образом, сравнение принятых в клинической практике методов определения выживаемости клеток *in vitro* (например, МТТ-тест) и подхода диагностики повреждений лейкозных клеток человека на основе учета их редокс-состояния после



воздействия лекарственных средств в терапевтических концентрациях позволит разработать основу доклинической лабораторной оценки индивидуальной лекарственной чувствительности клеток пациентов при лейкозах [16, 17].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение жизнеспособности лимфоцитов периферической крови пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом до и после проведения им химиотерапии и оценка значимости редокс-состояния их иммунокомпетентных клеток при метаболизме лекарственных препаратов для персонифицированного учета ответа организма на использованную схему лечения.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована периферическая кровь пациентов с диагнозом «хронический В-лимфоцитарный лейкоз» (В-ХЛЛ, $n=25$), предоставленная УЗ «Минская областная клиническая больница». От всех пациентов получены информированные согласия на участие в научных исследованиях. Образцы крови сохранялись в консерванте гепарин.

Критериями включения в группу пациентов являлось: наличие диагноза хронического В-лимфоцитарного лейкоза, доказанного по иммунофенотипу, наличие показаний к терапии (стадии В, С, стадия А с прогрессией), отсутствие тяжелой органной недостаточности и некурабельной инфекции. Критериями исключения из группы исследований были: наличие лимфомы из малых лимфоцитов, наличие второй опухоли на момент включения в протокол (кроме базалиомы кожи), химиотерапия по поводу второй опухоли, проведенная в течение 12 месяцев до начала терапии по поводу ХЛЛ, наличие острого гепатита и вирусного гепатита В, а также инфекционного заболевания, которое не может быть устранено на момент включения, наличие ВИЧ-инфекции, клиренс креатинина <30 мл/мин (противопоказание к назначению флуларабела), сердечная недостаточность III–IV класса по NYHA, недостаточность функции печени, невозможность проведения терапии в полном объеме, наличие синдрома Рихтера, анафилактические реакции в анамнезе на моноклональные антитела, мышинные белки и компоненты ритуксимаба.

Периферические мононуклеарные клетки крови (ПМНК) изолировали в градиенте плотности гистопак-1077. После выделения ПМНК помещали в коммерческую питательную среду RPMI-1640 (Gibco) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина («полная» RPMI 1640); инкубировали в 24- или 96-луночных планшетах в увлажненной атмосфере с 5% содержанием CO_2 при температуре 37°C в течение 2–3 ч, 18–20 ч или 44 ч с лекарственными средствами.

В качестве лекарственных средств использовали химиопрепараты 4 различных классов в концентрациях, близких к терапевтическим: нуклеозидный аналог флуларабел (Flu, 5 мг/л); ингибитор протеинтирозинкиназы иматиниб (Imat, 5 мг/л), синтетический глюкокортикостероид дексаметазон (Dex, 5 мг/л), а также винка-алкалоид винкристин (VincR, 0,25 мг/л). На рис. 1 представлены структурные формулы молекул используемых химиопрепаратов.

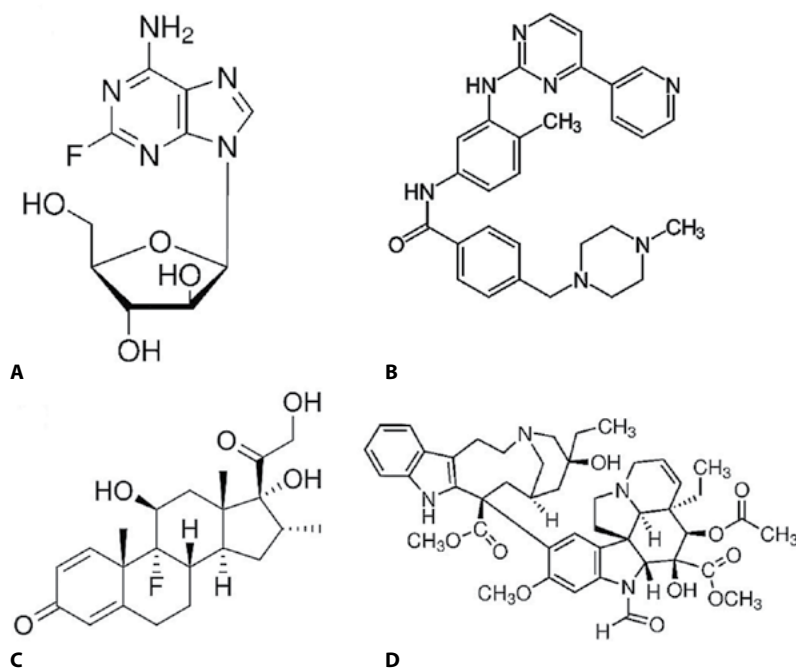


Рис. 1. Структурные формулы молекул цитостатических препаратов: А – флударабел (9-бета-D-Арабинофуранозил-2-фтор-9H-пурин-6-амин); В – иматиниб (4-[[4-Метил-1-пиперазинил]метил]-N-[4-метил-3-[[4-(3-пиридинил)-2-пиримидинил]амино]фенил]бензамид); С – дексаметазон (δ-1,9-α-фтор,16α-метил-гидрокортизон); D – винкристин (22-Оксовинкалейкобластин (в виде сульфата 1:1))

Fig. 1. Structural formulas of the cytostatic drugs molecules: A – fludarabine (9-beta-D-Arabinofuranosyl-2-fluoro-9H-purin-6-amine); B – imatinib (4-[[4-Methyl-1-piperazinyl]methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]phenyl]benzamide); C – dexamethasone (δ-1,9-α-fluoro,16α-methyl-hydrocortisone); D – vincristine (22-Oxovincal leukoblastine Sulfate)

Процентное содержание CD5⁺ лимфоцитов среди CD19⁺ клеток в суммарной популяции ПМНК пациентов с В-ХЛЛ определяли цитофлуориметрически по степени связывания с FITC-конъюгированными моноклональными антителами (МкАТ) CD5 (клон BL1a) и фикоэритрин-конъюгированными МкАТ CD19 (клон J3-119). Неспецифическое связывание контролировали с помощью соответственно IgG2a и IgG1.

Оценка уровня АФК в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ проводилась цитофлуориметрически с использованием флуоресцентного зонда 5-хлорометил-2',7'-дихлороди гидрофлуоресцеин диацетата (CM-H₂DCFDA) по интенсивности флуоресценции конечного продукта 5-хлорометил-2',7'-дихлорофлуоресцеин (CM-DCF) в FITC-Н канале. Итоговые данные на рисунках представлены в виде отношения значений средней интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах после воздействия химиопрепарата ($I_{\text{фл.к}}$) к средней интенсивности флуоресценции CM-DCF в контрольных лимфоцитах ($I_{\text{фл.к}}$) (без воздействия химиопрепаратов), выраженного в процентах. При определении интенсивности флуоресценции CM-DCF в клетках



пациентов с В-ХЛЛ учитывались только жизнеспособные лимфоциты, выделенные в отдельный регион по показателям бокового (SSC-H) и прямого (FSC-H) светорассеяния. Клетки, не окрашенные CM-H₂DCFDA, из анализа исключались.

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. 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 (D_к) (без воздействия химиопрепаратов), выраженного в процентах.

Все цитофлуориметрические измерения проводились на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson) в FITC-H и PE-H каналах, а спектрофотометрические – на планшетном спектрофотометре Sunrise Microplate Reader (Tecan).

Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрического критерия Уилкоксона. Корреляционные зависимости оценивали с применением критерия Спирмена (r_s) в программе STATISTICA 8.0. Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что CD5⁺ позитивные В-клетки (CD19⁺) составляют отдельную В-клеточную субпопуляцию. При рождении большинство В-лимфоцитов коэкспрессируют CD5, а взрослые CD5⁺ В-клетки составляют примерно одну пятую часть нормальных клеток периферической крови [18]. Таким образом, этот факт определил подход, при котором пациенты с ХЛЛ считаются в стадии фенотипической ремиссии: процентное содержание CD19⁺CD5⁺ клеток в крови не должно превышать 25% [19]. Для определения процентного содержания CD5⁺ лимфоцитов среди CD19⁺ клеток в суммарной популяции периферических мононуклеаров пациентов с ХЛЛ было выполнено иммунофенотипирование лимфоцитов всех отобранных пациентов (n=25). На рис. 2 представлены репрезентативные диаграммы распределения флуоресценции ПМНК пациентов с В-ХЛЛ, связавшихся с моноклональными антителами против кластеров дифференцировки лейкоцитов CD5 и CD19.

Полученные результаты позволили разделить пациентов с В-ХЛЛ на 2 группы. В первую группу вошли пациенты, среднее содержание CD19⁺CD5⁺ клеток у которых составило 3,1±2,5 (n=5). Эти пациенты прошли полный курс химиотерапии и находились в стадии ремиссии. Вторую группу составили пациенты, среднее содержание CD19⁺CD5⁺ клеток у которых составило 82,1±16,3 (n=20). У этих пациентов был диагностирован В-ХЛЛ, и их лечение не проводилось. Таким образом, результаты исследований по оценке уровня свободно-радикальных соединений до и после воздействия лекарственных средств, а также данные о чувствительности отобранных пациентов с В-ХЛЛ к воздействию исследуемых химиопрепаратов были разделены на 2 группы согласно процентному содержанию в них CD19⁺CD5⁺ клеток.

Известно, что выбранные нами лекарственные средства применяются в терапии различных злокачественных новообразований. Так, Vincr находит применение совместно с другими препаратами при терапии ХЛЛ, а также острого лимфобластного лейкоза у взрослых и детей [20]. Flu демонстрирует хорошие результаты при терапии

острых лимфобластных лейкозов и неходжкинских лимфом, но в основном они применяются при В-хроническом лимфоцитарном лейкозе [21]. Дех применяется при остром лимфобластном лейкозе в качестве индукционной терапии, а также при миелодиспластическом синдроме, ангиоиммунобластной злокачественной Т-клеточной лимфоме в комбинации с противоопухолевыми препаратами [22]. Иматиниб

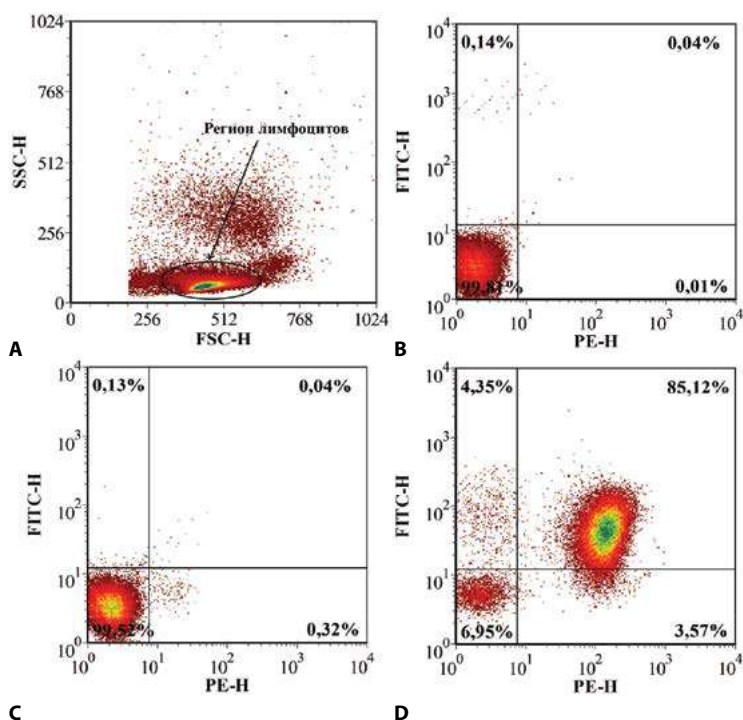


Рис. 2. Цитофлуориметрический анализ лимфоцитов периферической крови пациентов с В-ХЛЛ на содержание CD19⁺CD5⁺ клеток: А – распределение ПМНК пациентов с В-ХЛЛ по показателям прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; В – репрезентативная диаграмма распределения собственной флуоресценции клеток, попавших в «регион лимфоцитов» (по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции в канале PE-H в усл. ед., по оси ординат – интенсивность флуоресценции в канале FITC -H в усл. ед.); С – репрезентативная диаграмма распределения интенсивности флуоресценции IgG1-PE и IgG2a-FITC в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ (по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции IgG1-PE в усл. ед., по оси ординат – интенсивность флуоресценции IgG2a-FITC в усл. ед.); D – репрезентативная диаграмма распределения интенсивности флуоресценции CD19-PE и CD5-FITC в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ (по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции CD19-PE в усл. ед., по оси ординат – интенсивность флуоресценции CD5-FITC в усл. ед.)

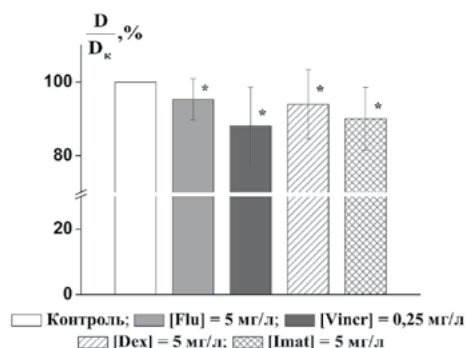
Fig. 2. Cytofluorimetric analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with B-CLL for the frequency of CD19⁺CD5⁺ cells: A – distribution of PBMCs of patients with B-CLL in terms of forward (FSC) and side (SSC) light scattering; B – a representative diagram of the distribution of intrinsic fluorescence of cells that have fallen into the "lymphocyte region" (abscissa – fluorescence intensity in the PE-H channel, a.u., ordinate – fluorescence intensity in the FITC-H channel, a.u.); C – representative diagram of distribution of IgG1-PE and IgG2a-FITC fluorescence intensity in lymphocytes of patients with B-CLL (abscissa shows IgG1-PE fluorescence intensity in a.u., ordinate shows IgG2a-FITC fluorescence intensity in a.u.); D – representative distribution diagram of CD19-PE and CD5-FITC fluorescence intensity in lymphocytes of patients with B-CLL (abscissa shows CD19-PE fluorescence intensity in a.u., ordinate shows CD5-FITC fluorescence intensity in a.u.)



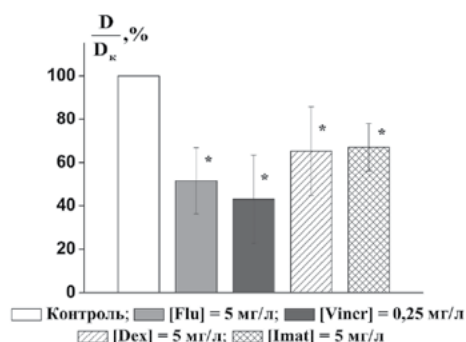
селективно подавляет пролиферацию и вызывает апоптоз клеточных линий, позитивных по BCR/ABL, а также незрелых лейкозных клеток при хронической миелоидной лейкемии с положительной филадельфийской хромосомой (Ph+) и при остром лимфобластном лейкозе [23].

На рис. 3 представлены результаты определения чувствительности клеток пациентов с В-ХЛЛ к исследуемым лекарственным средствам (флударабелу, винкристину, иматинибу, дексаметазону), полученные с помощью МТТ-теста.

Установлено, что в первой группе пациентов с В-ХЛЛ (n=5) чувствительность клеток к флударабелу, дексаметазону и иматинибу находилась на низком уровне и статистически достоверно отличалась от контрольных клеток (в среде инкубации которых отсутствовали противоопухолевые препараты) на 5–10% в сторону ее увеличения (рис. 3, А), что соответствовало снижению клеточной жизнеспособности спустя 44 ч после воздействия химиопрепаратов. Воздействие винкристина в течение 44 ч приводило к статистически достоверному снижению жизнеспособности клеток первой группы пациентов в среднем на 10–15% по сравнению с контролем (рис. 3, А). При воздействии исследуемых противоопухолевых средств на клетки пациентов второй группы (n=20) в течение 44 ч наблюдалось статистически достоверное увеличение их чувствительности (рис. 3, В), что соответствовало снижению жизнеспособности клеток по сравнению с контролем. Так, для флударабела и винкристина снижение жизнеспособности клеток пациентов с В-ХЛЛ второй группы спустя 44 ч составило в среднем 45–60% (рис. 3, В) по сравнению с интактными клетками (контролем). Через 44 ч для дексаметазона и иматиниба количество погибших клеток было немного снижено и составило в среднем 30–40% относительно контроля (рис. 3, В).



А



В

Рис. 3. Метаболическая активность клеток пациентов с В-ХЛЛ через 44 ч после воздействия лекарственных средств in vitro: А – первая группа пациентов с В-ХЛЛ; В – вторая группа пациентов с В-ХЛЛ. Величина средней оптической плотности лейкоэмических клеток с МТТ в отсутствие лекарственных средств принята за 100% (контроль); * различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Fig. 3. Metabolic activity of cells of patients with B-CLL after drug exposure during 44 h in vitro: А – group I of patients with B-CLL; В – II group of patients with B-CLL. The value of the average optical density of leukemic cells with MTT in the absence of drugs was taken as 100% (control); * differences compared to control are significant ($p < 0,05$)

Таким образом, клетки пациентов с В-ХЛЛ в стадии ремиссии (первая группа) обладают низкой чувствительностью к исследуемым лекарственным средствам в терапевтических концентрациях, по сравнению с лейкозными клетками второй группы (до проведения химиотерапии). Причем для флударабела и винкристина чувствительность клеток второй группы по сравнению с клетками первой группы была увеличена в среднем на 45%, а для дексаметазона и иматиниба – в среднем на 25–30%.

Проведенный корреляционный анализ с использованием критерия Спирмена (r_s) между процентным содержанием CD19⁺CD5⁺ клеток и чувствительностью этих клеток к исследуемым противоопухолевым средствам (MTT-тест) выявил статистически значимую обратную зависимость. Причем для флударабела, винкристина и иматиниба она оказалась достаточно сильная (r_s в диапазоне от $-0,87$ до $-0,91$ со статистической значимостью p от $0,0000003$ до $0,000005$). Это свидетельствует о достаточно большой эффективности выбранных для исследования лекарственных средств в отношении злокачественной субпопуляции CD19⁺CD5⁺.

С целью выяснения вопроса о степени взаимосвязи между уровнем внутриклеточных свободно-радикальных соединений *in vitro* в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ и количеством погибших клеток при действии лекарственных препаратов различной природы была оценена их способность к образованию свободно-радикальных соединений после краткосрочного (2–3 ч) и долгосрочного (18–20 ч) воздействия исследуемых химиопрепаратов в терапевтических концентрациях. На рис. 4 представлены результаты измерения интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ первой группы после воздействия флударабела, винкристина, дексаметазона и иматиниба в концентрациях, близких к терапевтическим.

Как следует из рассмотрения рис. 4, А, флударабел, винкристин и иматиниб через 2–3 ч не влияли на редокс-статус лимфоцитов первой группы по сравнению

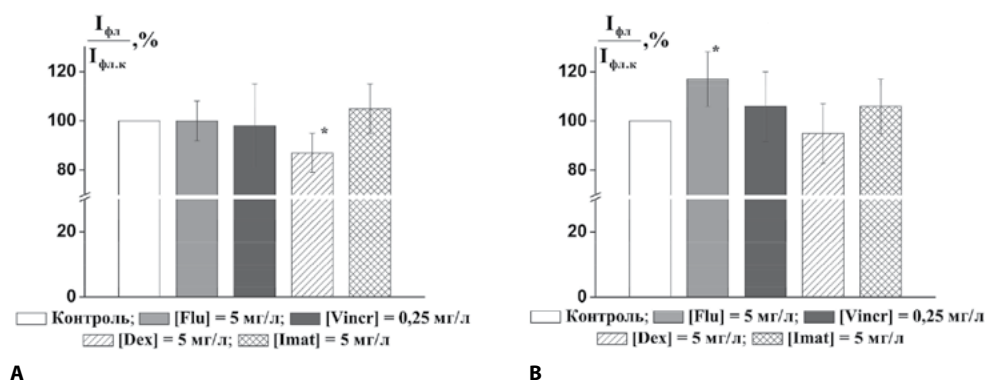


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ (первая группа) после краткосрочного (А) и долгосрочного (В) воздействия лекарственных средств *in vitro*. Величина интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах без воздействия лекарственных средств принята за 100% (контроль); * различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)
Fig. 4. Fluorescence intensity of CM-DCF in lymphocytes of patients with B-CLL (group I) after short-term (A) and long-term (B) exposure to drugs *in vitro*. The intensity of CM-DCF fluorescence in intact lymphocytes without drug exposure was taken as 100% (control); * differences compared to control are significant ($p < 0,05$)



с клетками, в среде инкубации которых отсутствовали лекарственные средства (контроль). Дексаметазон, в свою очередь, в среднем на 10–15% приводил к статистически достоверному снижению интенсивности флуоресценции CM-DCF по сравнению с таковой в контроле, что указывает на смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону восстановителей (антиоксидантов). Через 18–20 ч интенсивность флуоресценции CM-DCF в первой группе пациентов после воздействия флударабела статистически достоверно возрастала в среднем на 10–20% по сравнению с контрольными клетками (рис. 4, В), в то же время воздействие винкристина, дексаметазона и иматиниба не оказывало статистически значимого влияния на редокс-статус клеток по сравнению с контролем без химиопрепаратов. Полученные результаты указывают на накопление АФК в клетках пациентов с В-ХЛЛ (первая группа) после воздействия флударабела в течение 18–20 ч.

На рис. 5 представлены результаты измерения интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ до проведения химиотерапии (вторая группа) после воздействия тех же лекарственных средств в концентрациях, близких к терапевтическим. Как видно из рис. 5, А, воздействие флударабела и винкристина через 2–3 ч приводило к незначительному возрастанию интенсивности флуоресценции CM-DCF – в среднем на 5–10% по сравнению с контролем, причем для винкристина данное увеличение интенсивности флуоресценции CM-DCF было статистически значимым. Это свидетельствует о накоплении свободно-радикальных продуктов в клетках второй группы пациентов с В-ХЛЛ после воздействия винкристина, что вызывало смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону окислителей. Дальнейшее увеличение времени инкубации (до 18–20 ч) клеток второй группы пациентов при В-ХЛЛ с флударабелом и винкристином приводило к восстановлению (для флударабела) значений интенсивности флуоресценции CM-DCF к контрольным значениям (рис. 5, В) и статистически достоверному увеличению (для винкристина) интенсивности флуоресценции CM-DCF в среднем на 10–30% по сравнению с клетками, в среде инкубации которых отсутствовали лекарственные средства (рис. 5, В).

Инкубация лимфоцитов пациентов при В-ХЛЛ с дексаметазоном и иматинибом в течение 2–3 ч обуславливала статистически достоверное увеличение АФК в среднем на 20–45% и 40–80% по сравнению с контрольными клетками соответственно (рис. 5, А). Через 18–20 ч инкубации лейкозных клеток (вторая группа) с дексаметазоном и иматинибом интенсивность флуоресценции CM-DCF также статистически достоверно превышала контрольные значения в среднем на 10–30% и 5–15% (рис. 5, В), что указывает на смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону окислителей.

Таким образом, краткосрочное воздействие (2–3 ч) флударабела не оказывало влияния на редокс-статус клеток пациентов с В-ХЛЛ обеих групп. Винкрестин спустя 2–3 ч также не оказывал влияния на редокс-статус клеток пациентов с В-ХЛЛ, но только в стадии ремиссии, в клетках второй группы он индуцировал накопление АФК. Краткосрочное воздействие дексаметазона приводило к смещению окислительно-восстановительного баланса в клетках пациентов с В-ХЛЛ, причем для первой группы – в сторону восстановителей (антиоксидантов), а для второй группы – в сторону окислителей. Долгосрочное воздействие флударабела (18–20 ч) не оказывало влияния на редокс-статус клеток пациентов с В-ХЛЛ (вторая группа), но приводило к накоплению свободно-радикальной продукции у пациентов в стадии ремиссии (первая

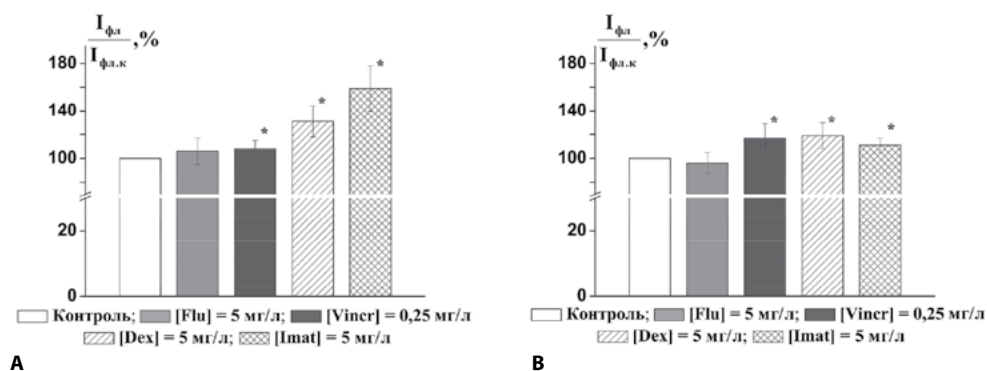


Рис. 5. Интенсивность флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ (вторая группа) после краткосрочного (А) и долгосрочного (В) воздействия лекарственных средств *in vitro*. Величина интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах без воздействия лекарственных средств принята за 100% (контроль); * различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)
Fig. 5. Fluorescence intensity of CM-DCF in lymphocytes of patients with B-CLL (group II) after short-term (A) and long-term (B) exposure to drugs in vitro. The intensity of CM-DCF fluorescence in intact lymphocytes without drug exposure was taken as 100% (control); * differences compared to control are significant ($p < 0,05$)

группа). Винкристин и дексаметазон через 18–20 ч не приводили к изменению редокс-статуса в клетках пациентов с В-ХЛЛ в стадии ремиссии и усиливали продукцию свободных радикалов в клетках пациентов с ХЛЛ второй группы. Как краткосрочное, так и долгосрочное воздействие иматиниба в концентрации, близкой к терапевтической, на клетки пациентов с В-ХЛЛ в стадии ремиссии не приводило к изменению их редокс-статуса. Инкубация лейкозных клеток второй группы с иматинибом индуцировала в них накопление АФК, причем краткосрочное воздействие приводило к более существенному сдвигу окислительно-восстановительного баланса (в сторону окислителей) в этих клетках по сравнению с долгосрочным воздействием.

Ранее было показано [16, 17], что существует связь между генерацией свободно-радикальных соединений на начальном этапе активации *in vitro* (не более часа) лимфоцитов, выделенных из периферической крови пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом, противоопухолевыми препаратами и степенью их метаболической активности на конечном этапе альтерации. В силу того, что В-ХЛЛ – это неоднородное заболевание с разнообразной клинической картиной [24], а молекулярные механизмы метаболизма исследуемых лекарственных препаратов в опухолевых клетках различны, получение через определенный промежуток времени единичного клеточного ответа о степени образования свободно-радикальных соединений, к сожалению, может не являться адекватной оценкой вклада этого процесса в реализацию программы апоптоза по внутреннему митохондриальному пути [25]. При этом стоит отметить, что проведенный корреляционный анализ выявил статистически значимую обратную зависимость (r_s от $-0,36$ до $-0,45$) между степенью образования свободно-радикальных соединений в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ в течение 2–3 ч после воздействия исследуемых лекарственных средств и процентом погибших клеток спустя 44 ч экспозиции с ними *in vitro*. Следовательно, период, в течение которого в лейкозных клетках происходит образование свободно-радикальных



соединений под влиянием воздействия исследуемых лекарственных средств (независимо от их природы), предшествует запуску процессов, приводящих к гибели лимфоцитов при хроническом В-лимфоцитарном лейкозе.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о снижении чувствительности клеток пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом к флударабелу, винкристину, дексаметазону и иматинибу после проведения полного курса химиотерапии по сравнению с клетками пациентов, не прошедших химиотерапию.

Выявлено смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону окислителей в клетках пациентов с В-ХЛЛ до проведения химиотерапии после краткосрочного и долгосрочного воздействия винкристина (в среднем на 5–25%), дексаметазона (в среднем на 15–55%) и иматиниба (в среднем на 10–75%) по сравнению с группой пациентов после химиотерапии (стадия ремиссии). Стоит отметить, что после долгосрочного воздействия флударабела в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ до проведения химиотерапии происходит сдвиг редокс-баланса в сторону антиоксидантов в среднем на 10–20% по сравнению с лимфоцитами пациентов, находящихся в стадии ремиссии.

Обнаружена значительная вариабельность индивидуальной чувствительности клеток пациентов с В-ХЛЛ при воздействии лекарственных средств в концентрациях, близких к терапевтическим, что указывает на необходимость принимать во внимание индивидуальную чувствительность *ex vivo* клеток пациентов к химиотерапевтическим воздействиям.

Выявленное изменение редокс-статуса лимфоцитов пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом открывает возможности прогнозирования персонализированной оценки эффективности проводимого им химиотерапевтического лечения.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Svirnovski A.I. Tumor cell resistance to therapeutic factors as medicobiological problem. *Medicinskie Novosti*. 2011;9:30–38. (in Russian)
2. Svirnovski A., Pasiukov V., Kravchenko D., et al. Clonal evolution of leukemia cells and chemoresistance. *Medical and Biological Problems of Life Activity*. 2017;(1):24–28. (in Russian)
3. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020;21(7):363–383. doi: 10.1038/s41580-020-0230-3
4. D'Arena G., Seneca E., Migliaccio I., et al. Oxidative stress in chronic lymphocytic leukemia: still a matter of debate. *Leuk. Lymphoma*. 2019;60(4):867–875. doi: 10.1080/10428194.2018.1509317
5. Domka K., Goral A., Firczuk M. cROSSing the line: between beneficial and harmful effects of reactive oxygen species in B-cell malignancies. *Front. Immunol.* 2020;11:1538. doi: 10.3389/fimmu.2020.01538
6. Jitschin R., Hofmann A.D., Bruns H., et al. Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(17):2663–72. doi: 10.1182/blood-2013-10-532200
7. Achanta G., Sasaki R., Feng L., et al. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *EMBO J.* 2005;24(19):3482–3492. doi: 10.1038/sj.emboj.7600819
8. Weinberg F., Ramnath N., Nagrath D. Reactive oxygen species in the tumor microenvironment: an overview. *Cancers*. 2019;11(8):1191. doi: 10.3390/cancers11081191
9. Yosifov D.Y., Idler I., Bhattacharya N., et al. Oxidative stress as candidate therapeutic target to overcome microenvironmental protection of CLL. *Leukemia*. 2020;34(1):115–127. doi: 10.1038/s41375-019-0513-x
10. Trachootham D., Zhou Y., Zhang H., et al. Selective killing of oncogenic transformed cells through ROS-mediated mechanism by β -phenylethyl isothiocyanates. *Cancer Cell*. 2006;10(3):241–252. doi: 10.1016/j.ccr.2006.08.009
11. Trachootham D., Zhang H., Zhang W., et al. Effective elimination of fludarabine-resistant CLL cells by PEITC through. *Blood*. 2008;112(5):1912–1922. doi: 10.1182/blood-2008-04-149815
12. Nakamura H., Takada R. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Sci.* 2021;112(10):3945–3952. doi: 10.1111/cas.15068

13. Chao M.-R., Evans M.D., Hu C.-W., et al. Biomarkers of nucleic acid oxidation – A summary state-of-the-art. *Redox Biol.* 2021;42:101872. doi: 10.1016/j.redox.2021.101872
14. Picard M., Shiriha O.S. Mitochondrial signal transduction. *Cell Metab.* 2022;34(11):1620–1653. doi: 10.1016/j.cmet.2022.10.008
15. Cramer P., Hallek M. Initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.* 2016;43(2):241–250. doi: 10.1053/j.seminoncol.2016.02.005
16. Tamashevski A.V., Slobozhanina E.I., Svirnovski A.I., et al. Oxidative stress in lymphocytes at chronic lymphocytic leukemia induced by anticancer drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series.* 2010;3:62–66. (in Russian)
17. Tamashevski A.V., Harmaza Y.M., Slobozhanina E.I., Svirnovski A.I. The transport activity of P-glycoprotein upon a change of the redox balance in lymphocytes of patients with chronic B-lymphocytic leukemia. *Biophysics.* 2016;61(6):971–978. doi: 10.1134/S0006350916060257
18. Maloum K., Sutton L., Baudet S., et al. Novel flow-cytometric analysis based on BCD5+ subpopulations for the evaluation of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2002;119(4):970–975. doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03956.x
19. Ghia P., Rawstron A. Minimal residual disease analysis in chronic lymphocytic leukemia: a way for achieving more personalized treatments. *Leukemia.* 2018;32(6):1307–1316. doi: 10.1038/s41375-018-0109-x
20. Moore A., Pinkerton R. Vincristine: can its therapeutic index be enhanced? *Pediatr. Blood Cancer.* 2009;53(7):1180–1187. doi: 10.1002/pbc.22161
21. Ricci F., Tedeschi A., Morra E., et al. Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2009;5(1):187–207. doi: 10.2147/tcrm.s3688
22. Baptista M.J., Muntañola A., Calpe E., 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;18(21):5924–5933. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2771
23. Lewandowski K., Gniot M., Lewandowska M., et al. B-Cell chronic lymphocytic leukemia with 11q22.3 rearrangement in patient with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *Case Rep. Med.* 2016;9806515. doi: 10.1155/2016/9806515
24. Svirnovski A.I. Biological properties of leukemia cells and clinical phenotype in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology and transfusiology.* 2010;1:25–31. (in Russian)
25. Svirnovski A.I. Morphological, immunological and molecular genetic aspects of making diagnostic and therapeutic decisions under chronic lymphocytic leukemia. *Medical News.* 2010;9:6–12. (in Russian)