

МЕДИКАМЕНТОЗНАЯ КОРРЕКЦИЯ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ ЛИМФОМАМИ

Новосёлова К.А., Лысенко И.Б., Златник Е.Ю., Передреева Л.В., Капуза Е.А., Пушкарева Т.Ф., Новикова И.А., Козюк О.В.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63), e-mail: onko-sekretar@mail.ru

Проведена оценка влияния низких концентраций химио- и иммунопрепаратов *in vitro* на культуру клеток костного мозга больных лимфомами. С помощью аннексинового теста у 13 пациентов с впервые установленным диагнозом лимфомы и 17 больных с рецидивами лимфом, получавших лечение в отделении гематологии РНИОИ, установлено, что под воздействием низких концентраций химио- и иммунопрепаратов *in vitro* происходит неодинаковое усиление процессов апоптоза и некроза в пробах с пораженным и интактным костным мозгом. В целом отмечено снижение количества клеток в состоянии раннего апоптоза в культурах костного мозга больных рецидивами лимфом по сравнению с больными с впервые установленным диагнозом. Проведенное исследование выявило наличие апоптогенных свойств у препаратов, не предназначенных для индукции апоптоза, в частности у препарата пентоксифиллин. Полученные данные свидетельствуют о необходимости индивидуализации терапии лимфом.

Ключевые слова: лимфомы, аннексиновый тест, костный мозг.

MEDICAMENTOUS CORRECTION OF APOPTOTIC PROCESSES IN MARROW CELL CULTURE OF PATIENTS WITH LYMPHOMAS

Novoselova K.A., Lysenko I.B., Zlatnik E.Y., Peredreeva L.V., Kapuza E.A., Pushkareva T.F., Novikova I.A., Kozuk O.V.

Federal State Budgetary Institution «Rostov Cancer Research Institute» Ministry of Public Health (63, 14 Line, Rostov-on-Don, 344037), e-mail: onko-sekretar@mail.ru

Influence of low concentrations of chemo- and immune agents *in vitro* on marrow cell culture of patients with lymphomas has been assessed. Annexin test performed in 13 patients with primary lymphoma and 17 patients with recurrent lymphoma treated at hematologic department of Rostov Research Oncologic Institute showed that influence of low concentrations of chemo- and immune agents *in vitro* resulted in unequal strengthening of processes of apoptosis and necrosis in samples with affected and intact marrow. In general, decrease in number of cells at the state of early apoptosis in marrow cultures of patients with recurrent lymphomas was observed, in comparison with patients having primary diagnosis. The study revealed presence of apoptogenic properties in agents not intended for apoptosis induction, in particular, pentoxifylline. The results testify to necessary individualization in lymphoma treatment.

Key words: lymphomas, annexin test, bone marrow.

Введение

Изучение механизмов опухолевой прогрессии привело исследователей к выводу, что нарушение равновесия между процессами пролиферации и клеточной гибели является главной причиной формирования злокачественного новообразования. Разработка методов контроля апоптоза давно рассматривается как одно из ведущих направлений в онкологии. Прогрессия злокачественных лимфом, так же как и при многих других злокачественных новообразованиях, как правило, связана с устойчивостью патологических клеток к апоптозу [1–4]. Онкоген bcl 2, который локализуется на хромосоме 18, вовлекается в транслокацию t [14:18], встречающуюся в 68–85% случаев лимфом, и приводит к повышенной экспрессии

его продукта p25 bcl-2, этот белок, взаимодействуя с мембраной ядра, не дает возможности для повышения концентрации Ca^{2+} в ядре, что необходимо для деградации ДНК. Таким образом этот белок ингибирует апоптоз и тем самым формирует резистентность к противоопухолевой терапии [3; 5–7]. Большинство препаратов, применяемых в онкологии и гематологии, по механизму действия направлены на индукцию апоптоза. В нашем исследовании проведена оценка влияния низких концентраций цитостатиков и иммунопрепаратов на клетки костного мозга больных лимфомами с помощью аннексинового теста *in vitro*. Механизм аннексинового теста заключается в следующем: на ранней стадии апоптоза происходит изменение в плазматической мембране клетки, а именно транслокация мембранного фосфолипида – фосфатидилсерина с внутренней стороны плазматической мембраны на ее внешнюю сторону. Аннексин, Ca^{2+} -зависимый фосфолипид – связывающий протеин, имеющий высокую аффинность к фосфатидилсерину, связывается с клетками, экспрессирующими фосфатидилсерин. Аннексин может быть конъюгирован с флуорохромами, такой формат сохраняет высокую аффинность аннексина к фосфатидилсерину и таким образом используется для анализа апоптотических клеток. Поскольку транслокация фосфатидилсерина наблюдается на ранней стадии апоптоза (целостность клеточной мембраны сохранена), окрашивание клеток с помощью аннексин + флуорохром позволяет выявить раннюю стадию апоптоза. Оценка поздних стадий апоптоза, для которых характерно нарушение целостности клеточной мембраны, проводят с помощью витальных красителей (пропидиум йодид) [6; 8]. Проведение аннексинового теста позволило оценить, какого рода процесс (ранний апоптоз, поздний апоптоз или некроз) инициируется в клетках костного мозга под воздействием низких концентраций препаратов *in vitro*. Данная методика позволит в перспективе использовать полученные результаты для коррекции апоптотических процессов и индивидуализации терапии больных лимфомами в клинической практике.

Цель исследования – изучить влияние низких концентраций цитостатиков и иммунопрепаратов на апоптоз клеток костного мозга у больных лимфомами.

Материал и методы

В исследование вошли 30 пациентов с лимфомами, наблюдавшихся в отделении онкогематологии ФГБУ «РНИОИ Министерства здравоохранения и социального развития РФ». Больным было проведено общеклиническое обследование, включающее все общепринятые методы диагностики онкогематологических заболеваний. Всем пациентам выполнялась пункция костного мозга. Для оценки апоптоза клеток костного мозга под действием низких концентраций цитостатиков и иммунопрепаратов *in vitro* проводили

аннексиновый тест, для чего пунктат костного мозга в объеме 1–2 мл помещали в пробирку с гепаринизированной средой. Клетки костного мозга обрабатывали следующими препаратами, разведенными изотоническим раствором хлорида натрия в концентрации 10^6 /мл: дексаметазон, кладрибин, бортезомиб, ритуксимаб, иммуноглобулин, пентоксифиллин. В качестве контроля использовали аспират костного мозга с эквивалентным объемом гепаринизированной среды. Длительность инкубации с препаратами и со средой при 37 °С составила 45 минут. Все пациенты были разбиты на 2 клинические группы: больные с впервые установленным диагнозом лимфомы и больные с рецидивами лимфом. В исследуемые клинические группы вошли пациенты с лимфомами, как без поражения костного мозга, так и с вовлечением костного мозга в патологический процесс.

Результаты

Первую клиническую группу составили 13 пациентов с впервые установленным диагнозом лимфомы. Большинство больных на момент диагностики имели IV (69% – 9 пациентов) стадию заболевания. Поражение костного мозга выявлено у 8 пациентов первой клинической группы (61,5% наблюдений). Всем больным установлен диагноз неходжкинская лимфома. Отмечено преобладание лимфом высокой степени злокачественности. Результаты аннексинового теста, позволяющего оценить апоптотические процессы в культуре клеток костного мозга больных первой клинической группы, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Апоптотическая и некротическая гибель культуры клеток костного мозга больных с впервые установленным диагнозом лимфомы под влиянием низких концентраций химио- и иммунопрепаратов *in vitro*.

Больные с впервые установленным диагнозом	С поражением костного мозга			Без поражения костного мозга		
	Ранний апоптоз	Поздний апоптоз	Некроз	Ранний апоптоз	Поздний апоптоз	Некроз
Контроль	9,9±0,8	3,3±0,8 *	0	7,6±1,0	6±0,7	1,4±0,3
Бортезомиб	24,3±1,7 *#	17,6±1,8 #	11,4±1,8 #	17,6±2,4 #	21,2±1,7 #	9,6±0,9 #
Дексаметазон	23,6±1,9 #	28,1±2,6 *#	14,7±2,1 #	23,5±2,1 #	21,8±1,6 #	13,5±1,8 #
Кладрибин	19,1±1,3 #	16,4±1,9 *#	6,9±0,9 *	21,4±2,8 #	22±1,4 #	15±1,8 #
Иммуноглобулин человека нормальный	14,4±1,5 #	8,3±1,01 #	3,4±1,2	11,6±1,5 #	7,8±0,4 #	1,8±0,9
Пентоксифиллин	15,5±0,5 #	18±2,0 #	7,5±0,5 *#	12±1,9 #	13±1,6 #	2,7±0,5

Ритуксимаб	20,4±1,7 #	19,8±1,4 #	9,4±2,8 #	18,6±1,8 #	20,8±2,4 #	13,6±1,9 #
------------	---------------	---------------	--------------	---------------	---------------	---------------

статистически достоверные отличия от контроля;

* статистически достоверные отличия по отношению к группе первичных больных лимфомами без поражения костного мозга.

Из таблицы 1 видно, что обработка препаратами *in vitro* культуры клеток костного мозга первичных больных лимфомами способствовала повышению количества клеток, находящихся в состоянии как раннего апоптоза, так и позднего апоптоза и некроза. В культуре клеток пораженного злокачественным процессом костного мозга количество клеток в состоянии раннего апоптоза максимально при инкубации с препаратами бортезомиб, ритуксимаб и дексаметазон; различия статистически достоверны по отношению к контролю ($p < 0,05$). В культуре не пораженного костного мозга процент таких клеток повышался при инкубации с препаратами дексаметазон и кладрибин. При сравнении показателей апоптоза и некроза в культурах клеток пораженного и интактного костного мозга больных первой клинической группы выявлено, что показатели спонтанного раннего апоптоза в пробах пораженного костного мозга превышали таковые показатели в пробах интактного костного мозга в 1,3 раза. В культуре клеток интактного костного мозга преобладали процессы позднего апоптоза и некроза. При исследовании индуцированного апоптоза выявлено, что препарат бортезомиб преимущественно инициировал ранний апоптоз в культуре клеток пораженного костного мозга по сравнению с культурой интактного костного мозга. В культуре клеток интактного костного мозга ранний апоптоз инициировался преимущественно при инкубации с препаратом кладрибин, а бортезомиб и ритуксимаб повышали количество клеток, находящихся в состоянии позднего апоптоза и некроза. Клетки костного мозга первичных больных лимфомами с поражением костного мозга и без поражения костного мозга, инкубированные с препаратом иммуноглобулин, демонстрировали повышение показателей как раннего апоптоза, так и позднего апоптоза и некроза по сравнению с контролем. Обработка костного мозга препаратом пентоксифиллин в культуре клеток пораженного костного мозга приводила к повышению количества клеток, находившихся в раннем и позднем апоптозе. В целом показатели индуцированного пентоксифиллином апоптоза и некроза превышали таковые в пробе интактного костного мозга.

Во вторую клиническую группу вошли 12 пациентов с рецидивами лимфом. Всем больным было проведено специфическое лечение, в 50% случаев комбинированное (химиотерапия в сочетании с лучевой терапией). Результат первичного лечения оценивался ретроспективно по критериям ВОЗ: полная ремиссия, частичная ремиссия, стабилизация или

прогрессирование основного процесса. Рецидив развивался у 20% больных, достигших полной ремиссии, 40% больных, достигших частичной ремиссии, и 40% больных, достигших стабилизации процесса. Рецидив с поражением костного мозга отмечался в 50% наблюдений (6 человек из 12). В таблице 2 представлены результаты аннексинового теста в культуре клеток костного мозга больных рецидивами лимфом под воздействием низких концентраций химио- и иммунопрепаратов *in vitro*.

Таблица 2 – Апоптотическая и некротическая гибель культуры клеток костного мозга больных рецидивами лимфом под воздействием низких концентраций химио- и иммунопрепаратов *in vitro*.

Больные с рецидивами лимфом	С поражением костного мозга			Без поражения костного мозга		
	Ранний апоптоз	Поздний апоптоз	Некроз	Ранний апоптоз	Поздний апоптоз	Некроз
Контроль	7,8±1,5	4,5±0,7	1,8±1,1	5,5±1,8	2,8±0,5	0
Бортезомиб	14,8±1,6 *#	15,8±3,9 *#	8,3±4,2 *#	21±3,4 #	22±1,5 #	14,3±4,5 #
Дексаметазон	17,5±0,5 #	16±0,8 *#	11,5±1,9 *#	18,8±2,7 #	28,3±1,9 #	21,3±2,0 #
Кладрибин	18,3±2,6 #	18±2,5 *#	19,5±1,7 #	24,7±3,3 #	24,3±1,5 #	14±1,7 #
Имуноглобулин человека нормальный	9,5±1,9 #	11±1,4 *#	4,3±0,8 *#	11±0,6 #	5,4±0,9	0,4±0,2
Пентоксифиллин	8,2±1,4	7,3±0,4	2,3±0,8	16,3±2,0 #	13,3±1,3 #	7,3±1,3 #
Ритуксимаб	15,5±1,7 *#	20,3±3,1 #	13±3,18 *#	24,3±2,2 #	15±1,6 #	6,3±0,7 #

статистически достоверные отличия по отношению к контролю;

* статистически достоверные отличия по отношению к группе больных рецидивами лимфом без поражения костного мозга.

При исследовании спонтанного апоптоза и некроза больных второй клинической группы выявлено преобладание раннего апоптоза как в культуре пораженного костного мозга, так и интактного. По сравнению с пробами костного мозга больных первой клинической группы показатели раннего апоптоза (спонтанного и индуцированного) второй клинической группы были ниже. При сравнении показателей апоптоза и некроза в культурах клеток пораженного и интактного костного мозга больных второй клинической группы выявлено, что показатели спонтанного апоптоза и некроза в пробах пораженного костного мозга превышали таковые показатели в пробах интактного костного мозга. Обработка препаратами *in vitro* культуры клеток костного мозга больных рецидивами лимфом способствовала повышению количества клеток, находящихся в состоянии как раннего

апоптоза, так и позднего апоптоза и некроза. При исследовании индуцированного раннего апоптоза выявлено, что показатели в культуре клеток пораженного костного мозга ниже, чем в культуре интактного. Под воздействием препарата бортезомиб в культуре клеток пораженного костного мозга и интактного преимущественно повышалось количество клеток, находящихся в раннем и позднем апоптозе. Дексаметазон в пробах с пораженным костным мозгом в большей степени инициировал ранний апоптоз, а в пробах с интактным костным мозгом – поздний апоптоз и некроз. Кладрибин в культуре клеток пораженного костного мозга инициировал преимущественно некроз, а в пробах с интактным – ранний и поздний апоптоз. Ритуксимаб проявлял активность как индуктор гибели клеток путем позднего апоптоза в пробах с пораженным костным мозгом, путем раннего апоптоза в пробах с интактным костным мозгом. Клетки костного мозга больных рецидивами лимфом с поражением костного мозга и без поражения костного мозга, инкубированные с препаратом иммуноглобулин, демонстрировали повышение показателей раннего апоптоза, и в меньшей степени позднего апоптоза и некроза. Обработка культуры клеток пораженного костного мозга препаратом пентоксифиллин приводила к преимущественному повышению клеток, находившихся в раннем апоптозе, но в целом это повышение было невелико по сравнению с контролем. Показатели индуцированного пентоксифиллином апоптоза в пробах с пораженным костным мозгом были ниже таковых в пробах с интактным.

Выводы

В результате проведенного исследования спонтанного апоптоза *in vitro* выявлено снижение количества клеток в состоянии раннего апоптоза в культурах костного мозга больных рецидивами лимфом, по сравнению с больными с впервые установленным диагнозом, в 1,3 раза в пробах с пораженным костным мозгом и в 1,4 раза – с интактным. Эти данные свидетельствуют об ухудшении прогноза течения заболевания при рецидивах лимфом. Под воздействием низких концентраций химио- и иммунопрепаратов *in vitro* происходит неодинаковое усиление процессов апоптоза и некроза в пробах с пораженным и интактным костным мозгом у больных обеих клинических групп. Проведенное исследование выявило наличие апоптогенных свойств у препаратов, не предназначенных для индукции апоптоза. Полученные данные свидетельствуют о необходимости индивидуализации химиотерапии лимфом, а также о возможности использования ряда препаратов в рамках сопроводительной терапии с целью повышения эффективности цитостатиков.

Список литературы

1. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Программированная клеточная смерть (апоптоз) // Российский онкологический журнал. – 1996. – № 1. – С. 58–61.

2. Гервас П.А. и др. Влияние полиморфизма генов апоптоза и репарации на эффективность неoadъювантной химиотерапии злокачественных новообразований // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – № 4 (34). – С. 41–47.
3. Головкин А.С. [и др.] Пути изучения роли апоптоза при гемобластозах (обзор литературы) // Детская онкология. – 2007. – № 2. – С. 3–12.
4. Ильин Д.А. Проявления спонтанного апоптоза в культуре злокачественных клеток // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – Приложение № 1.
5. Ковынев И.Б. [и др.] Апоптоз и механизмы опухолевой прогрессии неходжкинских злокачественных лимфом // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – Приложение № 3.
6. Лысенко И.Б. Онкогематологические заболевания и новые возможности их терапии (на модели Ростовской области) : автореф. дис. ... докт. мед. наук. – Ростов н/Д, 2006.
7. Рыжов С.В., Новиков В.В. Молекулярные механизмы апоптотических процессов // Российский биотерапевтический журнал. – № 3. – Т. 1. – С. 27–33.
8. Van Engeland M., Nieland L.J.W., Ramaekers F.C.S. et al. Annexin V – affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphate – idylserine exposure // Cytometry. – 1998. – Vol. 31. – P. 1-9.

Рецензенты

Николаева Н.В., д.м.н., врач-гематолог отделения гематологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздравсоцразвития России, ассистент кафедры онкологии Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону.

Каймакчи О.Ю., д.м.н., ассистент кафедры онкологии Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону.