

УДК 616-006.441:615.28:615-08-059

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМ С ПОРАЖЕНИЕМ КОСТНОГО МОЗГА МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Пушкарева Т. Ф., Лысенко И. Б., Новикова И. А., Козюк О. В., Новоселова К. А.

ФГБУ «РНИОИ Министерства здравоохранения РФ» 344037, г. Ростов-на-Дону, 14-линия, 63, e-mail: [onko-sekretar@mail.ru](mailto:onko-sekretar@mail.ru)

Одним из важных патогенетических механизмов онкогенеза является нарушение механизма программируемой гибели клетки – апоптоз. Поэтому актуальной задачей является изучение прогностической значимости уровня экспрессии Bcl-2 в клетках для выбора стратегии химиотерапии. Современные протоколы химио- и/или иммунотерапии могут приводить к полной элиминации опухолевых клеток, что позволяет констатировать у больного отсутствие минимальной резидуальной болезни. Определение остаточного опухолевого клона и экспрессия Bcl-2 методом проточной цитофлюориметрии позволило выявить следующее – у больных, которым была проведена системная химиотерапия, резидуальный опухолевый клон уменьшился в 5,1 раза в сравнении с содержанием опухолевых клеток до начала терапии ( $p \leq 0,05$ ). Среди больных, получавших аутомиелохимиотерапию, опухолевый клон на этапах лечения уменьшился в 8,8 раза, от количества опухолевых клеток до начала лечения ( $p \leq 0,05$ ). Кроме того, нами отмечена достоверная разница показателя процентного содержания опухолевых клеток в группах больных после проведения СХТ и АМХТ. Изучение клеток, экспрессирующих антиген bcl-2 до начала терапии и после проведения 2 курса системной химиотерапии и аутомиелохимиотерапии показало, что до начала терапии процент клеток, экспрессирующих bcl-2, был равен  $43,8 \pm 2,7\%$ , а после 2 курса терапии отмечено значительное снижение таких клеток.

Ключевые слова: неходжкинские лимфомы, костный мозг, апоптоз, аутомиелохимиотерапия, минимальная резидуальная болезнь.

## EFFECTIVENESS OF THERAPY OF NON-HODGKIN LYMPHOMA WITH BONE MARROW LESION BY FLOW CYTOMETRY

Pushkareva T. F., Lysenko I. B., Novikova I. A., Kozuk O. V., Novoselova K. A.

Federal State Budget Institution "Rostov Research Oncologic Institute" Ministry of Health of Russia

One of the important mechanisms of onco.. is the violation of programmed cell's death – apoptosis. That's why the actual task is the study of predictive level's significance of expressing bcl-2 in the cells in order to choose strategy of chemotherapy. Modern reports of chemo- and/or immunotherapy can lead to total elimination of tumor cells, that let ascertain patient's absence minimal residual disease. The determination of left tumor clone and экспрессии Bcl-2 by the method of flow cytometry let figure out next - the residual tumor clone of patients, what were examined with a system chemotherapy, decreased in 5,1 comparing with content tumor cells before therapy ( $p \leq 0,05$ ). The tumor clone among the patients who got the automieliolohimioterapia, decreased in 8.8 comparing with the amount of tumor cells before the treatment started ( $p \leq 0,05$ ). Besides, the reliable distinction of exponent of percentile content of tumor cells in the groups of patients after caring out СХТ и АМХТ was remarked. The cell's study, expressing antigen bcl-2, before therapy and after carrying out 2 courses of system chemotherapy and automieliolohimioterapia showed that the percentage of cells expressing bcl-2 before the therapy was equal to  $43,8 \pm 2,7\%$ , after 2 courses of the significant decrease of those cells was remarked.

Key words: non-Hodgkin's lymphomas, bone marrow, apoptosis, automieliolohimioterapia, minimal residual disease.

Учение о лимфопролиферативных заболеваниях (ЛПЗ) – пожалуй, самая обширная часть гематологии и внутренних болезней. Поскольку клетки, составляющие иммунную систему, являются широко распространенными и обладают значительной функциональной гетерогенностью, ЛПЗ могут возникать фактически в любом органе и иметь различные гистологические черты, клинические проявления и прогноз. Во всем мире наблюдается рост частоты неходжкинских лимфом (НХЛ). Утрата контроля над пролиферацией, вызванная

последствиями транслокаций хромосомного материала, открывает путь к неоплазии, но сама по себе недостаточна для злокачественной трансформации. Имеющиеся данные свидетельствуют, что для окончательного становления автономной пролиферации клеток (опухоли) необходимо наличие еще как минимум одного случайного неблагоприятного события. Одним из важных патогенетических механизмов онкогенеза является нарушение механизма программируемой гибели клетки – апоптоз. В результате многочисленных экспериментов к настоящему времени сложилось впечатление, что решение, жить или умереть клетке, принимается на уровне семьи Bcl-2 на основании относительного преобладания активных супрессоров или промоторов апоптоза [8,10]. Этот белок экспрессируется на ряде гемопоэтических клеток, на малигнизированном и несвязанном с опухолью эпителии. Ген Bcl-2 выполняет уникальную среди онкогенов млекопитающих функцию в качестве негативного регулятора апоптоза. Впервые это было обнаружено при изучении хромосомных транслокаций, типичных для лимфом. Кроме того, Bcl-2 связан со стволовыми клетками, коммитирующими дифференцировку и морфогенез. Уменьшение концентрации Bcl-2 приводит клетки к апоптозу. С другой стороны, сверхэкспрессия Bcl-2 защищает клетки от смерти, но это не приводит к бессмертию нормальные клетки и не является причиной опухолевой трансформации таких клеток. Определяющее значение блокады апоптоза для прогрессии неоплазии было доказано для многих злокачественных новообразований. Рак молочной железы, рак толстого кишечника и другие солидные неоплазии отличались торможением программированной клеточной гибели за счет сверхэкспрессии протеинов антиапоптотической группы bcl-2, bcl-x1 [9].

Противоопухолевая терапия гемобластозов за последние десятилетия достигла значительных успехов: повысилось число полных ремиссий, увеличилась безрецидивная выживаемость больных, описаны случаи выздоровления [4]. Это связано с использованием эффективных программ полихимиотерапии (ПХТ), в которых используются определенные сочетания противоопухолевых препаратов с различным механизмом действия и токсическим профилем, а также с внедрением молекулярно-биологических методов верификации опухолевого клона, что делает возможным проведение направленного лечения [1; 2]. Вместе с тем имеется ряд проблем, сдерживающих полноценное и максимально эффективное использование программной ПХТ: во-первых, это выраженная токсичность многокурсовой химиотерапии; во-вторых, это формирование в опухоли множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) – приобретение опухолевыми клетками перекрестной резистентности к цитостатикам с разными механизмами действия и внутриклеточными мишенями [7]. Эти две проблемы могут усугублять друг друга и значительно снижать эффективность лечения. Попытка преодоления химиорезистентности при диссеминированных опухолях путем

высокодозной полихимиотерапии с трансплантацией или без трансплантации костного мозга, для нивелирования токсичности, увеличило процент объективных ответов, но не улучшило качество и продолжительность жизни больных.

Под минимальной резидуальной болезнью (МРБ) понимают популяцию опухолевых клеток, персистирующую в организме после достижения клинко-гематологической ремиссии. Мишенью при исследовании МРБ является клоноспецифичная характеристика лейкоэмических клеток, позволяющая достоверно выявить и количественно охарактеризовать небольшую опухолевую популяцию на фоне избытка нормальных форменных элементов крови или костного мозга.

Создание и внедрение в практику новых химио- и иммунотерапевтических препаратов увеличило число полных ответов на проводимую терапию. Современные методы проточной цитофлуориметрии и ПЦР, основанные на характерных особенностях иммунофенотипа опухолевых клеток, позволяют выявить 1 опухолевую клетку среди 1000–100000 лейкоцитов. Современные протоколы химио- и/или иммунотерапии могут приводить к полной элиминации опухолевых клеток, что позволяет констатировать у больного наличие МРБ-негативной ремиссии. Уровень экспрессии Vc1-2 в опухолевых клетках может в значительной мере предопределять их высоко резистентный или высокочувствительный фенотип. Поэтому актуальной задачей является изучение прогностической значимости уровня экспрессии Vc1-2 в клетках для выбора стратегии химиотерапии и разработка возможных подходов по преодолению лекарственной устойчивости, обусловленной гиперэкспрессией Vc1-2. У большинства исследователей не вызывает сомнений, что прогнозирование опухолевой прогрессии и изучение чувствительности опухолевых клонов к цитостатическому воздействию во многом зависит от глубинных сдвигов в регуляции клеточного цикла и апоптоза, происходящих в опухолевой клетке [3;5]. Применение клеток костного мозга в качестве компонента аутобиотерапии обосновано их естественной противоопухолевой активностью, гемостимулирующим действием и продукцией биологически активных веществ, воздействующих на кроветворные и лимфоидные ткани [6]. В РНИОИ получен значительный опыт лечения больных с солидными новообразованиями методом аутомиелохимиотерапии (АМХТ). При лечении больных с неходжкинскими лимфомами данный метод не использовался. Используемый нами метод аутомиелохимиотерапии предусматривает экспозицию химиопрепаратов с костномозговой взвесью больных. Операцию эксфузии КМ в количестве 100 – 150 мл проводили под местной анестезией после премедикации из задней половины крыла подвздошной кости. Полученную аутомиеловзвесь инкубировали с химиопрепаратом группы антрациклинов в термостате при

t 37 °C в течение 40 минут. Затем вводили внутривенно капельно через систему для переливания крови в течение 1 часа.

Целью нашего исследования стало изучение экспрессии bcl-2 у больных неходжкинскими лимфомами с поражением костного мозга до и на этапах лечения.

#### Материалы и методы

Исследование было проведено у 40 первичных больных с НХЛ с поражением костного мозга до начала химиотерапии и после 2 курсов. Основная группа – 20 больных, которым проводилась АМХТ и контрольная группа, получавших стандартную ПХТ – 20 пациентов; средний возраст пациентов составил 56 лет; соотношение мужчин и женщин было 1:1. Вариант лимфомы устанавливали в соответствии с классификацией ВОЗ 2001. По течению НХЛ с поражением костного мозга выделили группы агрессивных и индолентных лимфом. После проведения 2 курсов химиотерапии был оценен остаточный опухолевый клон и экспрессия Bcl-2. Костный мозг в количестве 0, 5–1 мл забирался в пробирки Vacutainer (BD, USA) с сухим ЭДТА. Для выявления остаточного опухолевого клона в каждой пробирке набирали не менее 500000 клеток. Проводился подбор оптимальной комбинации антител для каждого случая оценки резидуальной болезни в соответствии с первичным иммунофенотипом. Диагностическая панель в зависимости от конкретного случая включала маркеры основных линий дифференцировки – В-линейные (CD19, CD20, CD22, CD23, CD79a, CD79b, FMC7, sIgM, Kappa s/cyt, Lambda s/cyt), Т-линейные (CD2, CD1a, CD3s/cyt, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16+56+, TCR $\alpha/\beta$ , TCR $\gamma/\delta$ ) и линейно-неограниченные (CD10, CD38, CD43, CD45, CD34, HLA-DR, ki-67, bcl-2). Клетки (не менее 2 × 10 в 6) были инкубированы при комнатной температуре в темноте 20 минут. Подготовка проб была осуществлена по методике окрашивание-лизис-отмывка. Лизирование и отмывку с использованием FACS Lyse и CellWash (все BD, USA) проводили с использованием прибора Lyse-Washassistant. Анализ антигенной экспрессии был проведен на проточном цитометре FACSCantoII (BectonDickinson, USA).

#### Результаты

При анализе образцов костного мозга пациентов на этапе верификации диагноза, т.е. до начала терапии, было выявлено, что процент опухолевых клеток костного мозга (лимфоцитарный, лимфоцитарно-бластоидный тип) находился в пределах от 41,6 % до 95 %, в среднем составив 76,9±1,7 %. При этом у больных с агрессивными лимфомами процент опухолевого поражения костного мозга в 1,3 раза превосходил этот показатель больных с индолентными лимфомами. Так, процент опухолевого поражения костного мозга при агрессивных лимфомах (лимфоцитарно-бластоидный тип) составил 80,6±4,2 %, тогда как при индолентных – 61,5±3,7 %, (p≤0,05). После проведения 2 курса АМХТ и СХТ отмечено

значительное снижение содержания опухолевых клеток в исследуемых образцах костного мозга. Так, у больных, которым была проведена СХТ, резидуальный опухолевый клон был в 5,1 раза меньше этого показателя в сравнении с содержанием опухолевых клеток до начала терапии ( $p \leq 0,05$ ). Более выраженное снижение содержания опухолевых клеток было в группе больных после проведения АМХТ, что в 8,8 раза меньше количества опухолевых клеток до начала лечения ( $p \leq 0,05$ ). Кроме того, нами отмечена достоверная разница показателя процентного содержания опухолевых клеток в группах больных после проведения СХТ и АМХТ. Так, в группе больных после проведения АМХТ процент опухолевых клеток составил  $8,7 \pm 2,9$  %, что было в 1,7 раза ниже аналогичного показателя в группе СХТ, где средний процент опухолевых клеток был  $15,1 \pm 0,8$  % ( $p \leq 0,05$ ). В каждой из изучаемых групп нами отмечено наличие МРБ-негативных образцов костного мозга после проведения 2 курса химиотерапии. Так, в группе больных, получавших системную химиотерапию после окончания 2 курса терапии МРБ-негативный статус был зарегистрирован у 6 пациентов, что составило 30 %. Больных с полным ответом на проводимую аутомиелохимиотерапию после окончания 2 курса терапии было в 1,5 раза больше, в сравнении с группой СХТ. Так, МРБ-негативный статус в группе АМХТ после 2 курса был зарегистрирован у 9 больных. Нами было изучено содержание в костномозговой взвеси клеток, экспрессирующих антиген bcl-2 на этапах до начала терапии и после проведения 2 курса системной химиотерапии и аутомиелохимиотерапии. Так, в группе до начала терапии процент клеток, экспрессирующих bcl-2, был равен  $43,8 \pm 2,7$  %. По окончании 2 курса терапии в каждой из исследуемых групп на фоне значительного снижения процента опухолевых клеток отмечено также снижение клеток, экспрессирующих антиген bcl-2. Наиболее выраженное снижение процента клеток произошло в группе больных, получавших АМХТ, что в 7,4 раза ниже этого показателя в группе до начала лечения, тогда как в группе больных, получавших СХТ, процент клеток только в 2,2 раза ниже в сравнении с показателем до начала терапии. Так, среднее содержание клеток, экспрессирующих антиген bcl-2, в группе СХТ после проведения 2 курса составило  $19,9 \pm 0,8$  %, тогда как в группе больных, которым проводилась АМХТ, этот показатель в 3,4 раза ниже, в среднем составив  $5,9 \pm 0,3$  % ( $p \leq 0,05$ ).

Содержание опухолевых клеток и клеток, экспрессирующих bcl-2, в среднем среди изучаемых групп отражено в табл.1

Показатели содержания в костном мозге опухолевых клеток и клеток, экспрессирующих bcl-2, в группах сравнения

	До начала терапии	АМХТ	СХТ

% содержание опухолевых клеток	76,9±1,7	8,7±2,9*°	15,1±0,8*
% клеток, экспрессирующих bcl-2	43,8±2,7	5,9±0,3*°	19,9±0,8*

Примечания: \* – отличия показателей достоверны по отношению к группе до начала терапии; ° – отличия показателей достоверны по отношению к группе СХТ

Как видно из таблицы, в группе больных после проведения АМХТ процент опухолевых клеток составил 8,7±2,9 %, что в 1,7 раза ниже аналогичного показателя в группе СХТ, где средний процент опухолевых клеток был 15,1±0,8 %, а среднее содержание клеток, экспрессирующих антиген bcl-2, в группе контроля после проведения 2 курса СХТ составило 19,9 ±0,8 %, тогда как в группе больных, которым проводилась АМХТ, этот показатель в 3,4 раза ниже, в среднем составил 5,9 ±0,3 % .

По нашему мнению, достоверная разница в уменьшении резидуального опухолевого клона в группах после проведения СХТ и АМХТ может быть связана со снижением ингибирующего влияния bcl-2 на механизмы апоптотической гибели опухолевых клеток по типу блока процессов негативной активации, приводящих к клеточной пролиферации.

Таким образом, изучение экспрессии bcl-2 у больных неходжкинскими лимфомами с поражением костного мозга до и на этапах лечения методом проточной цитофлуориметрии позволяет оценить эффективность проводимой терапии у данной категории пациентов.

### Список литературы

1. Имянитов Е. Н., Моисеенко В. М. Применение молекулярно-генетического анализа для выбора противоопухолевой терапии // Вопр. онкол. – 2008. – Т. 54. – № 2. – С. 121-132.
2. Ляхович В. В., Вавилин В. А., Гришанова А. Ю., Гуляева Л. Ф., Коваленко С. П. Геномная медицина и новые подходы к диагностике и лечению онкозаболеваний // Бюлл. СО РАМН. – 2004. – Т. 112. – № 2. – С. 2026.
3. Олейник Е. К., Донников М. Ю., Олейник В. М. Система апоптоза Fas-FasL в онкогенезе // Иммунология. – 2004. – № 4. – С. 251-255.
4. Поспелова Т. И., Нечунаева И. Н. Типы метаболизма при гемобластозах: научное издание НГМА, Новосибирск. – С. 2004-231.
5. Райхлин Н. Т., Райхлин А. Н. Регуляция и проявления апоптоза в физиологических условиях и в опухолях // Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Под ред. С. И. Петрова и Н. Т. Райхлина. – Казань: Титул, 2004. – С. 350-366.

6. Соловьева А.Ю. Аутомиелотрансфузия и эритропоэтин в профилактике и коррекции анемии у больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения: автореферат дис... канд. мед. наук /А. Ю. Соловьева. – М., 1999. – С.25.
7. Ставровская А. А. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – № 1. – С. 112-126.
8. Bellido M., Capello D., Altes A. et al. Bcl-6 p53 mutations in lymphomas carrying the Bcl-2/Jh rearrangement / Haematologica 2002; 87(9): 908-17.
9. Coiffier B., Thieblemont C., Felman P., et al. Indolent nonfollicular lymphomas: characteristics, treatment, and outcome // Semin. Hematol. – 1999. – V. 36. – P. 198-208.
10. Oltvai Z., Korsmeyer S. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. Cell 1994; 79:189-92.

**Рецензенты:**

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

Николаева Н. В., д.м.н., ассистент кафедры онкологии Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону.