

**ВЛИЯНИЕ БЕРБЕРИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА  
МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ  
С ДИФFUЗНОЙ В-КЛЕТОЧНОЙ КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМОЙ  
С РАЗЛИЧНЫМ ОТВЕТОМ НА ТЕРАПИЮ**

**Казанчян М. С. ORCID ID 0009-0001-7745-7768,  
Сагакянц А. Б. ORCID ID 0000-0003-0874-5261,  
Лысенко И. Б. ORCID ID 0000-0003-4457-3815,  
Филиппова С. Ю. ORCID ID 0000-0002-4558-5896,  
Бондаренко Е. С. ORCID ID 0000-0002-8522-1026,  
Межевова И. В. ORCID ID 0000-0002-7902-7278,  
Златник Е. Ю. ORCID ID 0000-0002-1410-122X,  
Гайсултанова Я. С. ORCID ID 0000-0003-2785-1721**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Ростов-на-Дону, Российская Федерация, e-mail: Marynekrasova@inbox.ru*

Изучение функционального состояния иммунокомпетентных клеток представляет интерес для поиска дополнительных предикторов ответа на лечение. Цель исследования – провести сравнительную оценку исходного иммунного статуса и функциональной активности мононуклеарных клеток периферической крови при воздействии берберина *in vitro* у пациентов с противоположным клиническим ответом на терапию (полный метаболический ответ и раннее прогрессирование с летальным исходом). В исследование включены два клинических случая впервые диагностированной лимфомы II стадии с сопоставимыми прогностическими характеристиками и различным исходом лечения. Иммунофенотипирование лейкоцитов периферической крови проводили методом проточной цитометрии с оценкой результатов на BD FACSCanto. Функциональную активность мононуклеарных клеток периферической крови оценивали *in vitro* методом колониеобразования при воздействии берберина в концентрациях 1, 2 и 4 мкМ в условиях базальной и митогенной (фитогемагглютинин 4 мкг/мл) стимуляции. Количественный анализ колоний выполняли с использованием автоматического клеточного анализатора Lionheart FX. Выявлены различия в субпопуляционном составе лимфоцитов и пролиферативном ответе клеток. Берберин оказывал дозозависимое стимулирующее влияние на колониеобразование, при этом пик ответа различался в зависимости от клинического исхода. Полученные данные свидетельствуют о возможной связи функционального состояния мононуклеарных клеток и их чувствительности к берберину с клиническим ответом при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме. Выявленные тенденции обосновывают целесообразность дальнейших исследований берберина как потенциального иммуномодулирующего агента.

Ключевые слова: диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома, вторичные метаболиты растений, берберин, мононуклеарные клетки периферической крови, иммуномодуляция.

**EFFECT OF BERBERINE ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERIPHERAL  
BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN PATIENTS WITH DIFFUSE LARGE B-CELL  
LYMPHOMA WITH DIFFERENT RESPONSES TO THERAPY**

**Kazanchyan M. S. ORCID ID 0009-0001-7745-7768,  
Sagakyants A. B. ORCID ID 0000-0003-0874-5261,  
Lysenko I. B. ORCID ID 0000-0003-4457-3815,  
Filippova S. Yu. ORCID ID 0000-0002-4558-5896,  
Bondarenko E. S. ORCID ID 0000-0002-8522-1026,  
Mezhevova I. V. ORCID ID 0000-0002-7902-7278,  
Zlatnik E. Yu. ORCID ID 0000-0002-1410-122X,  
Gaysultanova Ya. S. ORCID ID 0000-0003-2785-1721**

*Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Centre for Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, Russian Federation, e-mail: Marynekrasova@inbox.ru*

**Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is one of the most aggressive subtypes of non-Hodgkin lymphomas, in which a proportion of patients develop resistance to therapy. Investigation of the functional status of immunocompetent cells is of interest for identifying additional predictors of treatment response. Purpose of the study – to perform a comparative assessment of the baseline immune status and functional activity of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) following in vitro exposure to berberine in patients with opposite clinical outcomes (complete metabolic response and early progression with fatal outcome). The study included two clinical cases of newly diagnosed stage II lymphoma with comparable prognostic characteristics and different treatment outcomes. Immunophenotyping of peripheral blood leukocytes was performed by flow cytometry using a BD FACSCanto system. The functional activity of PBMCs was evaluated in vitro using a colony formation assay after exposure to berberine at concentrations of 1, 2, and 4  $\mu$ M under basal conditions and mitogenic stimulation (phytohemagglutinin, 4  $\mu$ g/mL). Quantitative colony analysis was carried out using the automated cell imaging system Lionheart FX. Differences in lymphocyte subpopulation composition and proliferative response were identified. Berberine exerted a dose-dependent stimulatory effect on colony formation, with the peak response varying depending on clinical outcome. The obtained data suggest a possible association between the functional status of PBMCs and their sensitivity to berberine with clinical response in DLBCL. The identified trends substantiate the need for further studies of berberine as a potential immunomodulatory agent.**

Keywords: diffuse large B-cell lymphoma, plant secondary metabolites, berberine, peripheral blood mononuclear cells, immunomodulation.

## **Введение**

Современная онкогематология продолжает сталкиваться с проблемой рефрактерности к стандартной терапии при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме (ДВКЛ). Несмотря на применение современных протоколов лечения, включающих иммунохимиотерапию, у 30–40 % пациентов развивается рецидив или резистентность к терапии [1]. Формирование неблагоприятного исхода связано не только с молекулярными особенностями опухолевых клеток, но и с состоянием иммунного микроокружения. Показано, что состав и функциональная активность иммунных клеток, включая Т-лимфоциты и НК-клетки, ассоциированы с прогнозом при ДВКЛ [2]. Нарушение противоопухолевого иммунного надзора способствует прогрессированию заболевания и снижению чувствительности к терапии.

Терапевтическое воздействие может быть направлено как на опухолевые клетки, так и на модуляцию иммунного ответа, способного привести к улучшению прогноза и повышению эффективности терапии [3]. В связи с этим одним из перспективных направлений является поиск подходов к целенаправленной регуляции функциональной активности иммунокомпетентных клеток. В настоящее время активно изучаются различные иммуномодулирующие агенты, среди которых особый интерес представляет берберин – природный алкалоид, демонстрирующий противоопухолевую активность в доклинических исследованиях [4, 5]. Известно, что берберин способен индуцировать апоптоз опухолевых клеток и подавлять их пролиферацию [6, 7]. В экспериментальных моделях ДВКЛ показано, что берберин способен усиливать противоопухолевый иммунный ответ [8]. Кроме того, описано его влияние на функциональную активность В- и Т-лимфоцитов [9].

В то же время влияние берберина на функциональные характеристики иммунокомпетентных клеток у пациентов с ДВКЛ изучено недостаточно. Исследование его

воздействия на мононуклеарные клетки периферической крови может способствовать выявлению новых предикторов ответа на терапию, разработке персонализированных подходов к лечению, а следовательно, улучшению клинических исходов у пациентов с ДВКЛ.

**Цель исследования** – провести сравнительную оценку исходного иммунного статуса и функциональной активности мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) при воздействии берберина *in vitro* у пациентов с ДВКЛ с противоположным клиническим ответом на терапию.

#### **Материал и методы исследования**

В основу исследования положен анализ двух клинических случаев впервые диагностированной ДВКЛ с идентичной стадией заболевания по классификации Ann Arbor и сопоставимыми значениями международного прогностического индекса (IPI), но принципиально различными клиническими исходами терапии первой линии: достижение полного метаболического ответа и раннее прогрессирование заболевания с летальным исходом.

Все пациенты прошли комплексное клиничко-лабораторное и инструментальное обследование в соответствии с действующими стандартами диагностики агрессивных В-клеточных лимфом. Терапия первой линии проводилась по схеме R-CHOP (ритуксимаб 375 мг/м<sup>2</sup>, циклофосфамид 750 мг/м<sup>2</sup>, доксорубин 50 мг/м<sup>2</sup>, винкристин 1,4 мг/м<sup>2</sup>, преднизолон 100 мг).

Был осуществлен забор периферической крови до начала химиотерапии с последующим проведением общего анализа крови на автоматическом гематологическом анализаторе Mindray BC-30s (Mindray, Китай), оценкой иммунного статуса методом проточной цитометрии, а также выделением мононуклеарных клеток из периферической крови и исследованием влияния берберина на их функциональные характеристики в опытах *in vitro*. Иммунофенотипирование лейкоцитов периферической крови проводили методом проточной цитометрии на цитофлуориметре BD FACSCanto (Becton Dickinson, USA) с использованием панелей моноклональных антител (табл. 1) в соответствии с инструкцией фирм-производителей по стандартному протоколу для данного типа исследований.

Таблица 1

Панели моноклональных антител

Панель	Набор моноклональных антител	Производитель моноклональных антител
--------	------------------------------	--------------------------------------

1	CD3 FITC / CD16+CD56 PE / CD45 PcP-Cy5.5 / CD4 PE-Cy7 / CD19 APC / CD8 APC-Cy7	BioLegend, USA
2	CD8 BV510 / Granzim B FITC / CD16 PE / HLA-DR PcP-Cy5.5 / CD 56 PE-Cy7 / Perforin APC / CD45 APC-Cy7	BD Biosciences, USA
3	CD3 BV421 / CD45 BV605 / CD279 FITC / CD127 PE / CD4 PE-Cy7 / CD25 APC-Cy7	BioLegend, USA

Примечание: составлена авторами на основе использованных материалов в ходе исследования

Вторым этапом работы в ходе экспериментальной части *in vitro* оценивалось влияние берберина на выделенные мононуклеарные клетки периферической крови. Кровь, собранную в пробирки с ЭДТА (Минимед, Россия), разводили неполной средой RPMI 1640 (Биолот, Россия) в соотношении 1:1 и наносили на фиколл 1,077 г/см<sup>3</sup> (Биолот, Россия), после чего центрифугировали 30 мин при 1275 g. Далее собирали кольцо мононуклеаров в приготовленные пробирки с буфером Дальбекко (Биолот, Россия) без ионов кальция и магния, содержащим 2 % фетальной коровьей сыворотки (Биолот, Россия), после чего центрифугировали 15 мин при 125 g. В полученной клеточной суспензии проводили подсчет количества живых клеток в камере Горяева с трипановым синим 0,4 % (Биолот, Россия). Пролиферативный ответ исследовали с помощью анализа колониеобразования. Известно, что под действием митогенного стимула Т-клетки образуют колонии, являющиеся потомками одной клетки [10].

Оценка количества и размера колоний является классическим подходом при анализе пролиферативной активности Т-клеток под действием различных факторов [11]. В данной работе применена модифицированная версия классического протокола, который предполагал использование агара. Мононуклеарные клетки высаживали по 10 тыс. клеток на лунку 96-луночного планшета в полной питательной среде (ППС) RPMI1640 (Биолот, Россия) с добавлением 10 % фетальной коровьей сыворотки (Gibco, США).

Предварительно был проведен подбор подходящих концентраций берберина (в данной работе результаты не представлены). В результате тестовых экспериментов было установлено, что при инкубации в течение 72 ч концентрации берберина выше 4 мкМ оказывают выраженное цитотоксическое действие на МНПК, в то время как диапазон 1–4 мкМ позволяет оценивать функциональные эффекты без значимого снижения жизнеспособности клеток. На основании полученных данных для дальнейших функциональных исследований МНПК *in vitro* были выбраны концентрации берберина 1, 2 и 4 мкМ как не оказывающие выраженного цитотоксического действия и позволяющие оценить его иммуномодулирующее влияние.

Для индукции пролиферативного ответа использовали фитогемагглютинин (ФГА) в концентрации 4 мкг/мл. Экспериментальные условия включали пробы без митогенной стимуляции (интактный контроль и МНПК с берберином в концентрациях 1, 2 и 4 мкМ) и пробы с митогенной стимуляцией (позитивный контроль – МНПК + ФГА, а также МНПК + ФГА в сочетании с берберином в концентрациях 1, 2 и 4 мкМ). Каждый вариант опыта выполняли в четырех технических повторах.

Культивирование проводили в течение 72 ч в условиях 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С. По окончании инкубации в лунки добавляли ядерный краситель Hoechst233342 (Sigma Aldrich, США) (1 мг/мл) с последующей документацией и количественным анализом колоний на автоматическом клеточном анализаторе Lionheart FX (BioTek, США). В исследовании определяли количество колоний (объект с диаметром, превышающим средний диаметр ядра одиночной клетки на изображении) на лунку и среднюю площадь колоний.

Для описания данных использовали среднее значение и стандартное отклонение. Ввиду ограниченного размера выборки (n = 2) статистическая обработка данных не проводилась. Интерпретация данных носит описательный и сравнительный характеры. Работа носит пилотный характер и направлена на выявление тенденций и формирование гипотез для последующих исследований на расширенной выборке.

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «НМИЦ онкологии» МЗ РФ (рег. № 3554742, <https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742/>).

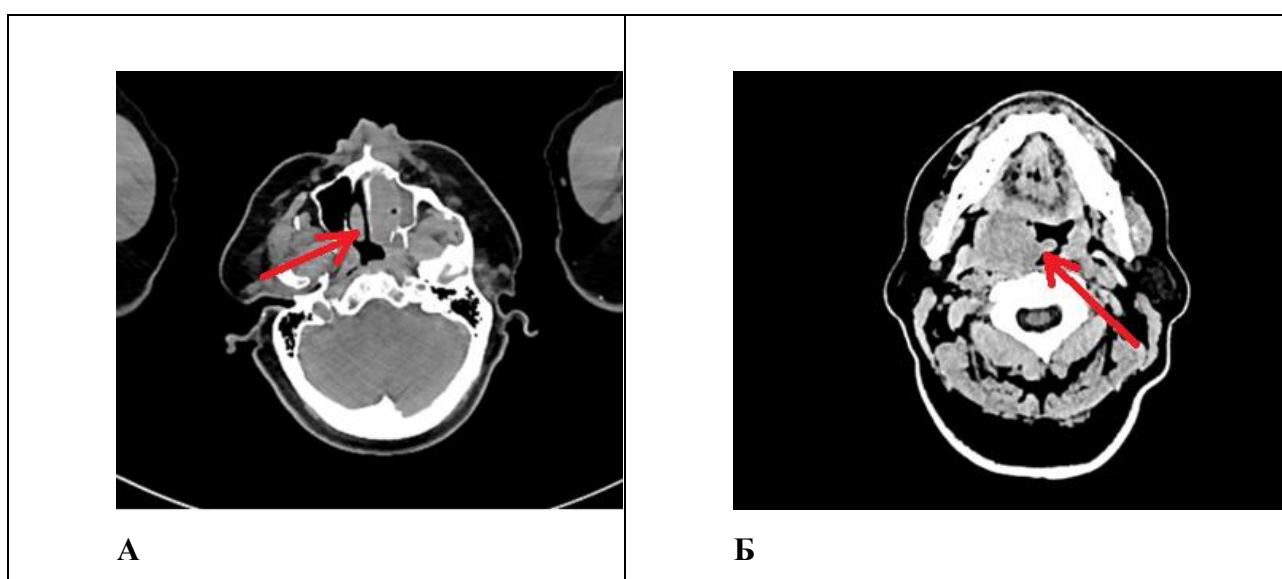
## **Результаты исследования и их обсуждение**

### ***Клинические характеристики обследованных***

**Пациент 1.** Мужчина, 69 лет. По данным обследования установлен диагноз ДВКЛ стадии ПАЕ: выявлено поражение левой верхнечелюстной пазухи, ячеек решетчатой кости слева и левой орбиты (рис. 1, А). ИГХ-исследование биоптата мягких тканях левой верхнечелюстной пазухи показало: CD20+, Vcl-2+, MUM1+/-, Vcl-6-/+, CD10-, CD23-, Cyclin D1-, индекс пролиферативной активности Ki-67 – 80 %. На основании профиля экспрессии (CD10-, Vcl-6-/+, MUM1+/-) опухоль отнесена к non-GCB подтипу. Сопутствующая патология: ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь III стадии, хроническая болезнь почек (ХБП) 3А стадии (расчетная скорость клубочковой фильтрации, рСКФ, по формуле СКД-ЕРІ – 48 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>), ожирение III степени. Перед началом терапии уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) был в пределах нормы (167 Е/л). После проведения шести курсов терапии по схеме R-СНОР (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон), по данным ПЭТ/КТ зарегистрирован полный метаболический ответ.

**Пациент 2.** Мужчина, 63 лет. По результатам обследования установлен диагноз ДВКЛ ПА стадии: выявлено поражение правой небной миндалины и лимфоузлов шеи (рис. 1, Б).

ИГХ-исследование биоптата лимфоузла шеи справа показало: CD20+, Vcl-2+, Vcl-6+/-, MuM1+, CD10-, c-MYC+/-, индекс пролиферации Ki-67 – ~95 %. Морфологическая и иммунофенотипическая характеристика соответствовала ДВКЛ высокой степени злокачественности (High-grade). Сопутствующая патология: ишемическая болезнь сердца, хроническая сердечная недостаточность I стадии (ФК 2), сахарный диабет 2 типа, ХБП смешанного генеза 4 стадии (СКФ по СКД-ЕРІ-27,1 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>). Перед началом терапии уровень ЛДГ был в пределах нормы (200 Е/л). Пациенту была назначена терапия первой линии по схеме R-CHOP. После проведения первого курса химиотерапии было отмечено раннее прогрессирование заболевания. В связи с резистентностью опухоли и развитием полиорганной недостаточности пациент скончался.



*Рис. 1. Аксиальный срез компьютерной томографии. Красной стрелкой отмечена область патологического очага. А – пациент 1; Б – пациент 2.*

*Примечание: составлен авторами по результатам данного исследования*

Сводные данные по пациентам представлены в табл. 2.

Таблица 2

Сравнительная характеристика пациентов с ДВКЛ

Характеристики	Пациент 1	Пациент 2
Возраст	69	63
Пол	мужской	мужской
Стадия	2ЕА	2А
PI	1	1
Подтип по данным ИГХ	non-GCB	High-grade

Ответ на терапию	Полный ответ	Прогрессирование
------------------	--------------	------------------

Примечание: составлена авторами на основе полученных данных в ходе исследования

Анализ показателей периферической крови, проведенный до начала химиотерапии, позволил выявить различия между пациентами. У пациента с благоприятным клиническим исходом отмечались более высокие исходные значения общего числа лейкоцитов, а также абсолютного содержания нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов. В то же время уровень нейтрофил-лимфоцитарного индекса был ниже по сравнению с пациентом с летальным исходом заболевания (табл. 3). Выявленные различия могут свидетельствовать о наличии количественных нарушений иммунной системы у пациента с прогрессирующим течением заболевания.

Таблица 3

Лабораторные данные пациентов до начала лечения

	RBC (10*12/л)	HGB (г/л)	WBC (10*9/л)	NEUT (10*9/л)	LYMPH (10*9/л)	MONO (10*9/л)	EO (10*9/л)	BASO (10*9/л)	NLR
Пациент 1	4,22	130	8,2	4,52	2,52	0,88	0,18	0,07	1,8
Пациент 2	5,29	140	6,08	4,1	1,43	0,4	0,08	0,03	2,9

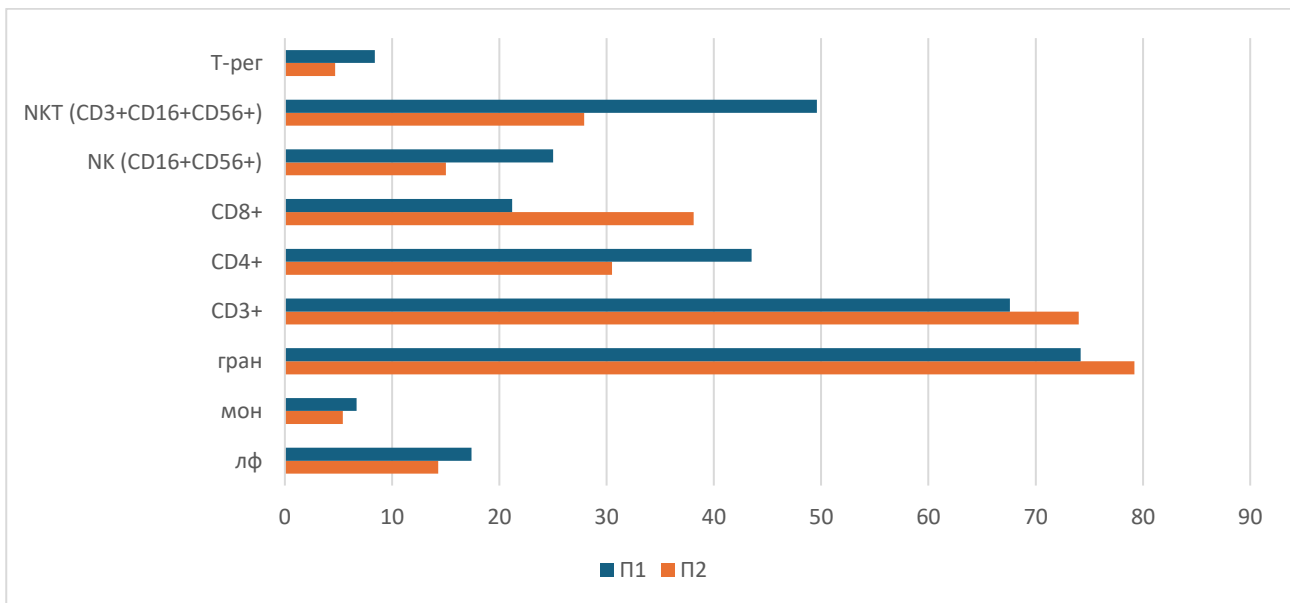
Примечание: RBC – эритроциты, HGB – гемоглобин, WBC – лейкоциты, NEUT – нейтрофилы, LYMPH – лимфоциты, MONO – моноциты, EO – эозинофилы, BASO – базофилы, NLR – нейтрофил-лимфоцитарный индекс.

Составлена авторами на основе полученных данных в ходе исследования

Сравнительный анализ исходного иммунного статуса пациентов продемонстрировал выраженные различия в субпопуляционном составе лейкоцитов периферической крови (рис. 2). У пациента с благоприятным клиническим исходом отмечалось повышение абсолютного и относительного содержания лимфоцитов, CD4<sup>+</sup>-клеток, NK- и NKT-клеток, а также T-регуляторных клеток и моноцитов. В то же время у пациента с неблагоприятным исходом преобладали гранулоциты и цитотоксические CD8<sup>+</sup>-клетки.

Выявленные различия могут отражать особенности формирования противоопухолевого иммунного ответа у пациентов с различным клиническим исходом заболевания. Преобладание гранулоцитов и функционально истощенных CD8<sup>+</sup>-клеток у пациента с неблагоприятным исходом может указывать на дисбаланс иммунной регуляции. Накопление гранулоцитарного звена и истощенных CD8<sup>+</sup>-клеток ассоциировано с формированием иммуносупрессивного опухолевого микроокружения, снижением эффективности противоопухолевого иммунного контроля и прогрессированием заболевания, что продемонстрировано, в частности, для ДВКЛ [12]. Аналогично CD8<sup>+</sup>-лимфоцитам, NK-

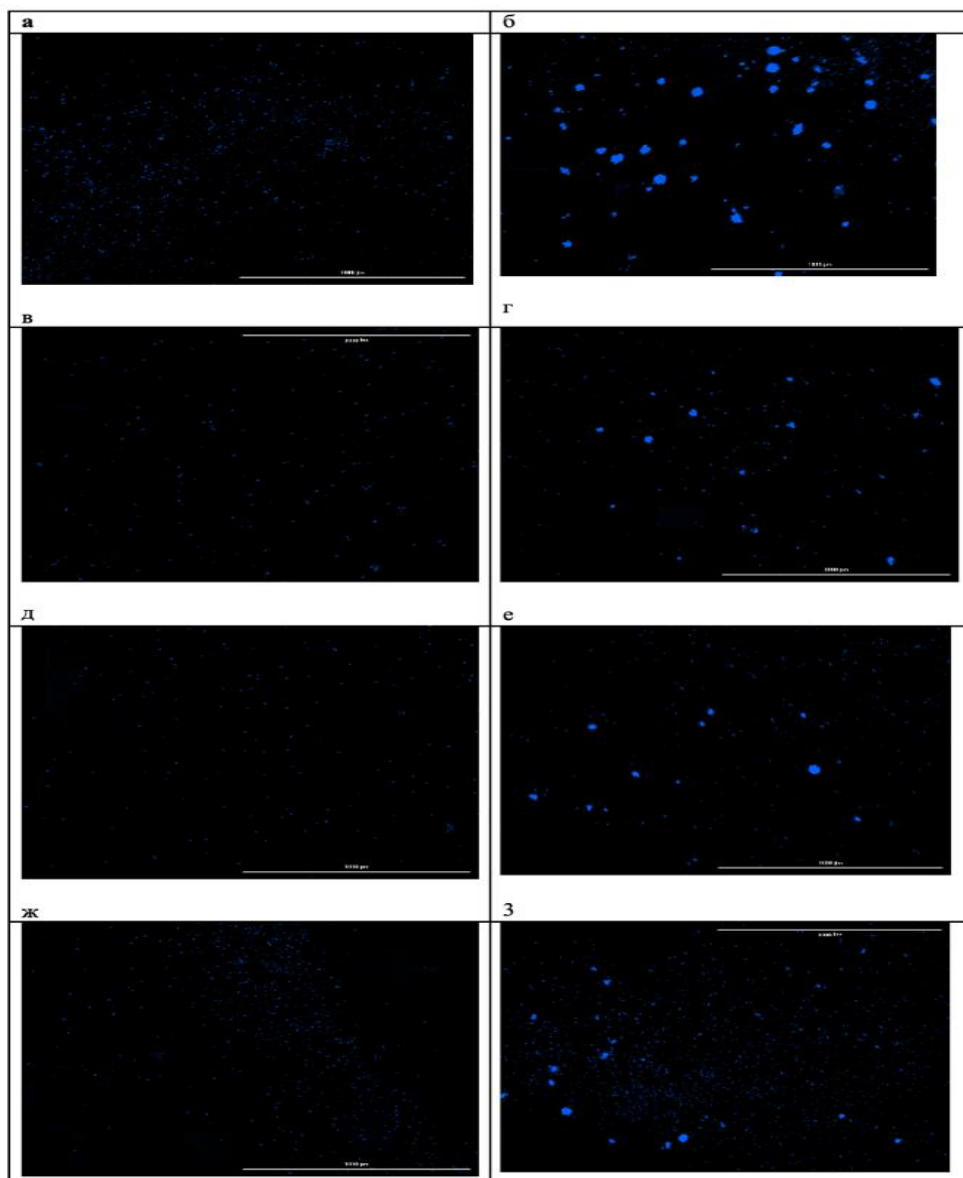
клетки в опухолевом микроокружении могут приобретать истощенный фенотип, что сопровождается снижением их цитотоксической активности и способствует иммунному уклонению опухоли [13]. Напротив, повышенное содержание CD4<sup>+</sup>-клеток, а также сохранность функциональной активности NK- и NKT-клеток, вероятно, отражают более сбалансированное взаимодействие врожденного и адаптивного звеньев иммунной системы и ассоциированы с более эффективным противоопухолевым иммунным надзором [14].



*Рис. 2. Инициальный иммунофенотип клеток периферической крови пациентов с ДВКЛ. Лф – лимфоциты, мон – моноциты, гран – гранулоциты, T-reg – T-регуляторные клетки.*

*Примечание: составлен авторами по результатам данного исследования*

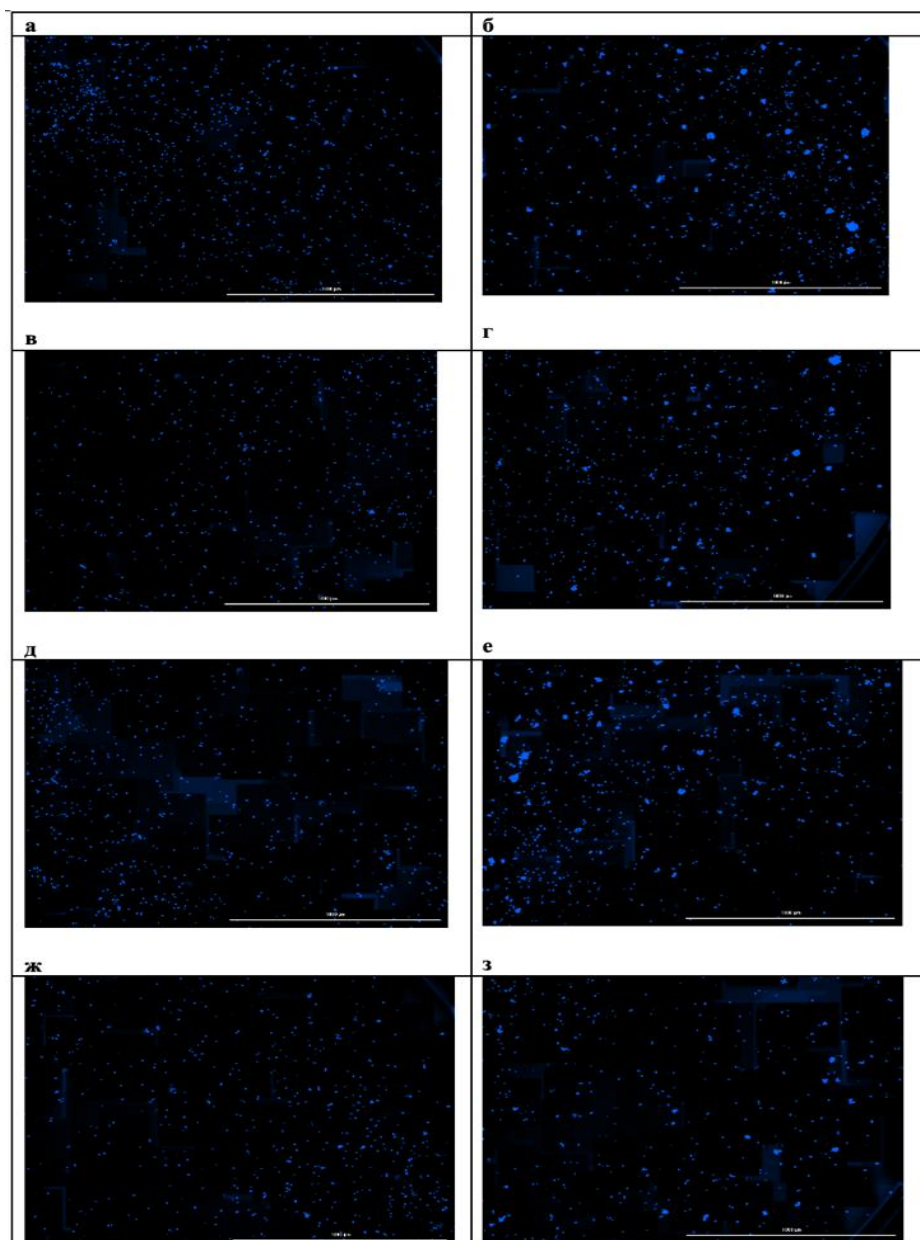
При исследовании чувствительности мононуклеарных клеток периферической крови к берберину *in vitro* было выявлено стимулирующее влияние берберина на их пролиферативную способность, проявлявшееся увеличением количества и площади формируемых колоний. При этом благоприятный клинический исход ассоциировался не с более высокой базальной колониеобразующей активностью, а с формированием более крупных колоний, что может отражать наличие лимфоцитарных клонов с более высоким пролиферативным и метаболическим потенциалом. Это позволяет предположить, что прогностическое значение может иметь не общее число клеток, а качественные характеристики клонального пролиферативного ответа (рис. 3, 4).



*Рис. 3. Микрофотографии образовавшихся колоний мононуклеарных клеток периферической крови пациента с благоприятным исходом:*

*а – контрольная проба, б – контрольная проба с добавлением ФГА, в – проба с добавлением 1 мкмоль/л берберина, г – проба с добавлением 1 мкмоль/л берберина и ФГА, д – проба с добавлением 2 мкмоль/л берберина, е – проба с добавлением 2 мкмоль/л берберина и ФГА, ж – проба с добавлением 4 мкмоль/л берберина, з – проба с добавлением 4 мкмоль/л берберина и ФГА.*

*Примечание: составлен авторами по результатам данного исследования*



*Рис. 4. Микрофотографии образовавшихся колоний мононуклеарных клеток периферической крови пациента с неблагоприятным исходом:*

*а – контрольная проба, б – контрольная проба с добавлением ФГА,*

*в – проба с добавлением 1 мкмоль/л берберина, г – проба с добавлением 1 мкмоль/л берберина и ФГА, д – проба с добавлением 2 мкмоль/л берберина, е – проба с добавлением 2 мкмоль/л*

*берберина и ФГА, ж – проба с добавлением 4 мкмоль/л берберина,*

*з – проба с добавлением 4 мкмоль/л берберина и ФГА.*

*Примечание: составлен авторами по результатам данного исследования*

У пациента с благоприятным клиническим ответом изначально отмечалась более низкая базальная колониеобразующая активность МНПК: количество колоний было на 56 % меньше по сравнению с пациентом с рефрактерным течением заболевания, однако их средняя

площадь превышала данный показатель на 22 %. Воздействие берберина в исследованных концентрациях вызывало дозозависимое усиление колониеобразующей способности МНПК у обоих пациентов, при этом наибольшая стимуляция наблюдалась при сочетанном применении берберина и фитогемагглютинаина, что свидетельствует о синергическом эффекте изучаемого соединения с митогенной стимуляцией (рис. 5, 6). Использование ФГА позволило оценить влияние берберина в условиях активированной иммунной реакции, что приближает модель *in vitro* к условиям реализации противоопухолевого иммунного ответа *in vivo*.

Кроме того, были выявлены индивидуальные различия в чувствительности МНПК к берберину: у пациента с полным ответом на терапию наибольшее увеличение количества колоний наблюдалось при концентрации 1 мкмоль/л, тогда как у пациента с неблагоприятным исходом пик пролиферативного ответа смещался на 2 мкмоль/л (рис. 5). Полученные различия могут объясняться особенностями метаболической и пролиферативной активности отдельных лимфоцитарных клонов. Более крупные колонии у пациента с благоприятным исходом могут отражать наличие клонов с высоким метаболическим потенциалом и способностью к интенсивному клеточному делению, тогда как большее число, но мелких колоний у пациента с неблагоприятным исходом может соответствовать функционально менее активным клональным линиям.

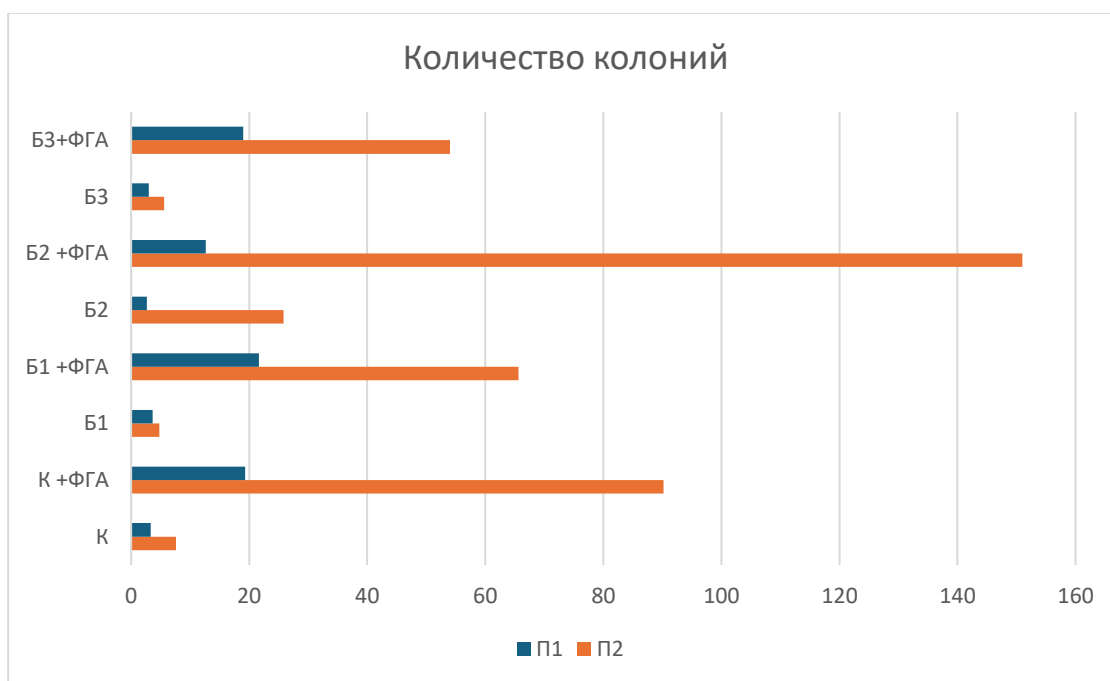
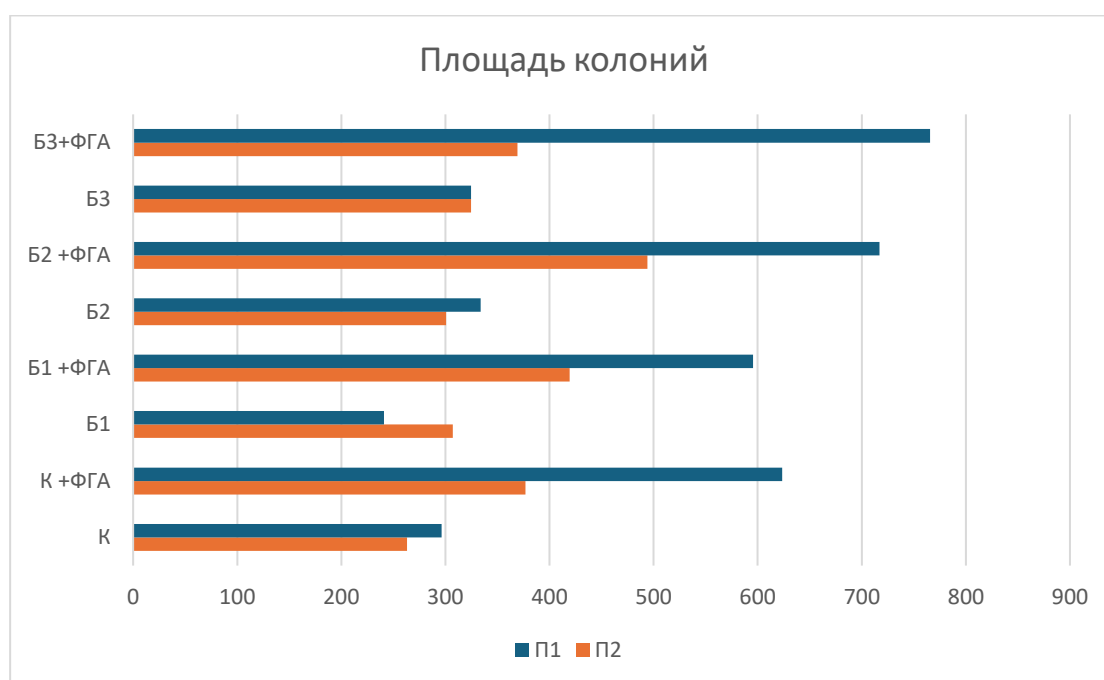


Рис. 5. Количество образовавшихся колоний мононуклеарных клеток периферической крови при добавлении различных концентраций берберина. К – контроль, К + ФГА – контроль + ФГА, Б1 – берберин 1 мкмоль, Б1 + ФГА – берберин 1 мкмоль + ФГА, Б2 – берберин 2 мкмоль, Б2 + ФГА – берберин 2 мкмоль + ФГА, Б3 – берберин 4 мкмоль, Б3 + ФГА – берберин 4 мкмоль + ФГА.

*Примечание: составлен авторами по результатам данного исследования*

Анализ средней площади колоний позволил оценить качественные характеристики пролиферативного ответа МНПК при воздействии берберина и его комбинаций с ФГА (рис. 6). У пациента с благоприятным клиническим исходом колонии отличались более крупными размерами, что указывает на наличие лимфоцитарных клонов с высоким пролиферативным и метаболическим потенциалом. Эти наблюдения подчеркивают, что размер колонии, а не только общее количество пролиферирующих клеток может быть важным показателем функциональной активности клеточных клонов и их потенциальной способности к эффективному противоопухолевому иммунному надзору.



*Рис. 6. Средняя площадь образовавшихся колоний мононуклеарных клеток периферической крови при добавлении различных концентраций берберина.*

*К – контроль, К + ФГА – контроль + ФГА, Б1 – берберин 1 мкмоль, Б1 + ФГА – берберин 1 мкмоль + ФГА, Б2 – берберин 2 мкмоль, Б2 + ФГА – берберин 2 мкмоль + ФГА, Б3 – берберин 4 мкмоль, Б3 + ФГА – берберин 4 мкмоль + ФГА.*

*Примечание: составлен авторами по результатам данного исследования*

Представленное описание двух случаев выявило различия в исходном иммунном статусе, функциональной активности мононуклеарных клеток периферической крови и их чувствительности к берберину *in vitro* у пациентов с противоположным клиническим ответом на терапию ДВКЛ. Следует отметить, что наблюдаемые различия могут быть связаны не только с воздействием берберина, но и с исходными биологическими различиями опухолевых

клеток, в частности с различными молекулярными подтипами [15]. Полученные данные соответствуют результатам других исследований, демонстрирующих важную роль иммунного микроокружения в патогенезе ДВКЛ и ответа на терапию [2, 16].

Выявленные иммунофенотипические различия, в частности более высокое содержание NK-клеток и соотношение CD4+/CD8+- лимфоцитов у пациента с благоприятным прогнозом, согласуются с литературными данными о важности клеточного иммунитета в контроле над опухолевым ростом при лимфопролиферативных заболеваниях [17, 18].

### **Заключение**

В работе на примере двух клинических случаев ДВКЛ показано, что функциональное состояние мононуклеарных клеток периферической крови и их реакция на иммуномодулирующее воздействие берберина *in vitro* могут различаться в зависимости от клинического исхода. Наблюдения указывают на потенциальную значимость качественных характеристик пролиферирующих клеток, таких как размер колоний и метаболический потенциал, а также исходного иммунного статуса для формирования эффективного противоопухолевого ответа. Полученные данные обосновывают необходимость дальнейших исследований на более широких выборках для подтверждения выявленных тенденций.

### **Список литературы**

1. He M. Y., Kridel R. Treatment resistance in diffuse large B-cell lymphoma // *Leukemia*. 2021. Vol. 35 (8). P. 2151–2165. DOI: 10.1038/s41375-021-01285-3.
2. Autio M., Leivonen S. K., Brück O., Karjalainen-Lindsberg M. L., Mustjoki S., Leppä S. Immune cell constitution in the tumor microenvironment predicts the outcome in diffuse large B-cell lymphoma // *Haematologica*. 2021. Vol. 106 (3). P. 718–729. DOI: 10.3324/haematol.2019.243626.
3. Ioannou N., Jain K., Ramsay A. G. Immunomodulatory drugs for the treatment of B cell malignancies // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22 (16). P. 8572. DOI: 10.3390/ijms22168572.
4. Xiong R. G., Huang S. Y., Wu S. X., Zhou D. D., Yang Z. J., Saimaiti A. et al. Anticancer effects and mechanisms of berberine from medicinal herbs: an update review // *Molecules*. 2022. Vol. 27 (14). P. 4523. DOI: 10.3390/molecules27144523.
5. Тимофеева С. В., Филиппова С. Ю., Чембарова Т. В., Гненная Н. В., Межевова И. В., Златник Е. Ю., Новикова И. А., Мироненко И. Н., Гончарова А. С., Дженкова Е. А. Антипролиферативные свойства нового растительного алкалоида в отношении клеточных культур колоректального рака // *Южно-Российский онкологический журнал*. 2025. Т. 6. № 4.

С. 16–25. URL: <https://www.srjoc.ru/jour/article/view/550> (дата обращения: 12.03.2026). DOI: 10.37748/2686-9039-2025-6-4-2.

6. Rauf A., Abu-Izneid T., Khalil A. A., Imran M., Shah Z. A., Emran T. B. et al. Berberine as a potential anticancer agent: A comprehensive review // *Molecules*. 2021. Vol. 26 (23). P. 7368. DOI: 10.3390/molecules26237368.

7. Златник Е. Ю., Енин Я. С., Буров О. Н., Бондаренко Е. С., Сагакянц А. Б., Кутилин Д. С., Дзигунова Ю. В., Ишопина О. Г., Шалашная Е. В., Ушакова Н. Д. Молекулярно-клеточные аспекты воздействия вторичных метаболитов барбариса обыкновенного и белокопытника гибридного на клеточную линию HeLa // *Research'n Practical Medicine Journal*. 2023. № 10 (4). С. 31–47. DOI: 10.17709/2410-1893-2023-10-4-3.

8. Ren S., Cai Y., Hu S., Wang J., Zhao Y., Ding Y. et al. Berberine exerts anti-tumor activity in diffuse large B-cell lymphoma by modulating c-myc/CD47 axis // *Biochemical Pharmacology*. 2021. Vol. 188. P. 4576. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114576.

9. Mohammadian Haftcheshmeh S., Musavi M., Lotfi S., Khosrojerdi A., Farshbaf A., Mohammadi A. et al. Berberine as a natural immunomodulator of B lymphocytes // *Inflammopharmacology*. 2025. Vol. 33 (8). P. 4191–4204. DOI: 10.1007/s10787-025-01852-5.

10. Lusila P., Toivonen A., Jarva H., Vettenranta K., Lehtimäki S., Kekäläinen E. FASCIA Method in the Assessment of Lymphocyte Mitogen Responses in the Laboratory Diagnostics of Primary Immunodeficiencies // *Journal of Clinical Immunology*. 2023. Vol. 43. P. 6561. DOI: 10.1007/s10875-022-01417-z.

11. Al-Hamaly M. A., Blackburn J. S. A high-throughput workflow for assessing self-renewal using colony formation assays // *Stem Cell Research*. 2025. Vol. 87. P. 13757. DOI: 10.1016/j.scr.2025.103757.

12. Zhu Q., Yang Y., Chen K., Zhang Q., Huang Y., Jian S. Diffuse large B-cell lymphoma: the significance of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes exhaustion mediated by TIM3/Galectin-9 pathway // *J. Transl Med*. 2024 Feb 18. Vol. 22 (1). P. 174. DOI: 10.1186/s12967-024-05002-3.

13. Jia H., Yang H., Xiong H., Luo K. Q. NK cell exhaustion in the tumor microenvironment // *Front. Immunol*. 2023. Vol. 14. P. 1303605. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1303605

14. Ikeda D., Oura M., Uehara A., Tabata R., Narita K., Takeuchi M., Machida Y., Matsue K. Prognostic relevance of tumor-infiltrating CD4+ cells and total metabolic tumor volume-based risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma // *Haematologica*. 2022. Vol. 109 (9). P. 2822–2832. DOI: 10.3324/haematol.2024.285038.

15. Гуськова Н. К., Селютин О. Н., Новикова И. А., Максимов А. Ю., Ноздричева А. С., Абакумова С. В. Морфологические и иммунофенотипические особенности моноклональной популяции В-лимфоцитов при хроническом лимфолейкозе // *Южно-Российский*

онкологический журнал. 2020. № 1 (3). С. 27–35. URL: <https://www.srjoc.ru/jour/article/view/47> (дата обращения: 01.04.2026). DOI: 10.37748/2687-0533-2020-1-3-3.

16. Cioroianu A. I., Stinga P. I., Sticlaru L., Cioplea M. D., Nichita L., Popp C. et al. Tumor microenvironment in diffuse large B-cell lymphoma: role and prognosis // *Analytical Cellular Pathology*. 2019. Vol. 2019. P. 8586354. DOI: 10.1155/2019/8586354.

17. Tamma R., Ranieri G., Ingravallo G., Annese T., Oranger A., Gaudio F. et al. Inflammatory cells in diffuse large B cell lymphoma // *Journal of Clinical Medicine*. 2020. Vol. 9 (8). P. 2418. DOI: 10.3390/jcm9082418.

18. Klanova M., Oestergaard M. Z., Trněný M., Hiddemann W., Marcus R., Sehn L. H. et al. Prognostic impact of natural killer cell count in follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy // *Clinical Cancer Research*. 2019. Vol. 25 (15). P. 4634–4643. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3270.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest:** The authors declare that there is no conflict of interest.

**Финансирование:** Исследование выполнено при финансовой поддержке государственного задания «Поиск натуральных и синтетических вторичных метаболитов растений, обладающих противоопухолевыми и иммунокорректирующими свойствами на моделях *in vitro* и *in vivo*», рег. № 124022100044-2 от 2024 г.

**Financing:** The study was carried out with the financial support of the state assignment “Search for natural and synthetic secondary plant metabolites with antitumor and immunocorrective properties in *in vitro* and *in vivo* models”, registration number 124022100044-2 from 2024.