

М.П. Завелевич¹
Л.М. Куява¹
О.О. Фільченков¹
Н.М. Храновська²
А.Ф. Джалилов¹

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

²Національний інститут раку, Київ, Україна

Ключові слова: хронічний лімфолейкоз (В-ХЛЛ), флударабін, етопозид, кверцетин, цитотоксичність, апоптоз, каспаза-3, Bcl-2, CAS.

ВІДПОВІДЬ EX VIVO ЗЛОЯКІСНИХ КЛІТИН ПАЦІЄНТІВ ІЗ В-КЛІТИННИМ ХРОНІЧНИМ ЛІМФОЛЕЙКОЗОМ НА ПРОТИПУХЛИННІ ХІМІОПРЕПАРАТИ

Характерною особливістю лейкемічних клітин при В-клітинному хронічному лімфолейкозі (В-ХЛЛ) є здатність уникати апоптозу (Ап) внаслідок певних дефектів систем його реалізації. Важливим є пошук речовин, які можуть подолати пригнічення системи Ап при злоякісних лімфопрліферативних захворюваннях або модифікувати чутливість до індукції Ап різними чинниками. Метою дослідження було проаналізувати показники цитотоксичності та індукції Ап первинних культур злоякісних лімфоїдних клітин хворих на В-ХЛЛ при дії як стандартних хіміотерапевтичних засобів, так і флавоноїду кверцетину. Об'єкт і методи: у первинних культурах мононуклеарів периферичної крові хворих на В-ХЛЛ, інкубованих з кверцетином, флударабіну фосфатом або етопозидом, визначали відсоток загибелі клітин та рівень Ап методом проточної цитометрії та обчислювали значення індексу цитотоксичності (ІЦ) та апоптотичного індексу (АІ). Результати: продемонстровано значну гетерогенність відповіді культур В-ХЛЛ за ІЦ та АІ при дії флударабіну фосфату та етопозиду. Хоча в деяких випадках реєстрували значний ефект потенціювання цитотоксичності кверцетином при застосуванні як етопозиду, так і флударабіну фосфату, не виявлено статистично вірогідного ефекту по всьому масиву даних хворих на В-ХЛЛ, які були включені до дослідження. Висновки: злоякісні лімфоїдні клітини хворих на В-ХЛЛ характеризуються значною гетерогенністю ІЦ та АІ під впливом досліджених хіміопрепаратів, а також у їхній комбінації із флавоноїдом кверцетином. Можна припустити, що індукція Ап та модифікація цих ефектів хіміопрепаратами в культурі має радше індивідуальний, аніж систематичний характер. Загибель злоякісних клітин при В-ХЛЛ не завжди базується на механізмах Ап, що свідчить про дефектність систем реалізації Ап у цих клітинах.

ВСТУП

За сучасними уявленнями, В-клітинний хронічний лімфолейкоз (В-ХЛЛ), що є найпоширенішою формою гемобластозів (становить майже 30% усіх лейкозів), являє собою клінічно гетерогенне захворювання. Майже у 50% хворих на В-ХЛЛ не виявляють симптомів хвороби і встановлюють діагноз лише після більш ретельного аналізу природи лімфоцитозу. Деякі з факторів, що спричинюють гетерогенність біологічних ознак лейкемічних клітин при В-ХЛЛ (наявність мутованих або немуваних ділянок важких ланцюгів генів імуноглобулінів [1], експресія антигенів CD38 або ZAP-70 [2], мутації та делеції гена *p53* [3]), добре знані. Однак відомими на сьогодні факторами ця гетерогенність, вочевидь, не обмежується, про що свідчить значний розкид у показниках відповіді на одні й ті самі чинники — як *in vivo*, так і *in vitro* [4].

Характерною особливістю лейкемічних клітин при В-ХЛЛ є здатність до уникнення апоптозу (Ап) внаслідок тих чи інших дефектів внутрішньоклітинних систем його реалізації [5]. Однак така їх властивість при В-ХЛЛ визначається не лише генотиповими та фенотиповими характеристиками самих клітин, а й впливом з боку організму [6], оскільки в умовах культури *ex vivo* вилучені з організму лейкемічні клітини можуть зазнавати спонтанного Ап [7], який, у свою чергу, може блокуватися певними цитокінами [8].

Молекулярні механізми, задіяні в регуляції Ап при В-ХЛЛ, є досить складними і включають чимало факторів, серед яких одними з головних є білки родини Bcl-2 [9].

Цілком слушним є пошук можливих чинників ад'ювантної терапії пацієнтів із В-ХЛЛ з метою відновлення здатності лейкемічних клітин до повноцінної апоптотичної відповіді або модифікації чут-

ливості до індукції Ап у них [10]. Відомо, що, крім цитотоксичних протипухлинних препаратів, Ап може ініціюватися дією інших чинників. Останнім часом велику увагу приділяють синтетичним низькомолекулярним сполукам, що можуть бути специфічними інгібіторами антиапоптотичних білків, а також природним, відносно нетоксичним речовинам, які можуть слугувати неспецифічними індукторами та/або модифікаторами Ап [11]. Крім власне індукції Ап, специфічні інгібітори антиапоптотичних білків і подібні до них за структурою природні речовини, зокрема флавоноїди, як псевдосигнальні молекули можуть сенсibiliзувати резистентні лейкоемічні клітини до дії хімотерапевтичних засобів — індукторів Ап [12]. Флавоноїди мають низку особливостей щодо індукції Ап та диференціювання, зокрема, їм притаманна вибіркова активність стосовно лейкоемічних клітин. Флавоноїди є відносно нетоксичними в діапазоні концентрацій, при яких вони стимулюють диференціювання чи індують Ап лейкоемічних клітин. Внутрішньоклітинні мішені дії цих сполук на геномному та протеомному рівні залишаються мало вивченими, що пов'язано з численністю таких мішеней.

У багатьох дослідженнях вивчали можливість сенсibiliзації флавоноїдами та іншими сполуками, що належать до поліфенолів, апоптогенної дії хімотерапевтичних агентів. Так, М. Russo та співавтори [13] показали, що кверцетин *in vitro* значно підвищує рівень Ап лейкоемічних клітин хворих на В-ХЛЛ у разі індукції флударабіном, рекомбінантним лігандом TRAIL або антитілами проти CD95, що супроводжується активацією каспаз-9 та -3. Ця сама група дослідників продемонструвала посилення флавоноїдами ефективності індукції Ап різними чинниками в перещеплюваних лініях лейкоемічних клітин лімфоїдного та мієлоїдного генезу [14]. Ресвератрол і кверцетин посилюють Ап, спричинений флударабіном у клітинах В-ХЛЛ [15] або в перещеплюваній лінії клітин В-ХЛЛ [16]. У наших попередніх дослідженнях ресвератрол і кверцетин сприяли апоптотичній загибелі клітин лімфоми людини лінії Namalwa [17].

Накопичена на сьогодні інформація щодо біологічної різноманітності В-ХЛЛ потребує детального аналізу імунофенотипу популяції лейкоемічних клітин. При цьому можна припускати, що рівень спонтанного/індукованого Ап і резистентність до тих чи інших впливів (як цитотоксичних, так і проапоптотичних) можуть бути однією з фенотипових/генотипових ознак цих клітин.

Основна мета роботи полягала в аналізі цитотоксичної відповіді та індукції Ап *ex vivo* в первинних культурах мононуклеарів периферичної крові хворих на В-ХЛЛ під впливом протипухлинних хімотерапевтичних препаратів із різними механізмами дії, зокрема флударабіну фосфату і етопозиду, та модифікації їхніх ефектів флавоноїдом кверцетином.

Дослідження проводили в первинних культурах мононуклеарів периферичної крові хворих на В-ХЛЛ, які були детально охарактеризовані за фенотипом у відділі імуноцитохімії та онкогематології ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Клітини виділяли з гепаринізованої крові в односкладовому градієнті фіколу-верографіну густиною 1,077 г/л, відмивали, підраховували із забарвленням трипановим синім. Клітини культивували за загальноприйнятими методиками у суспензії при +37 °С в атмосфері, що містила 5% CO₂, в поживному середовищі RPMI-1640 з додаванням 10% сироватки ембріонів великої рогатої худоби («Сангва», Україна), 2 ммоль/л L-глутаміну та 40 мкг/мл гентаміцину. Життєздатність клітин у різні терміни культивування визначали за забарвленням досліджуваних препаратів трипановим синім. Імуноцитохімічне дослідження клітин виконували з використанням авідин-біотинного комплексу з лужною фосфатазою як ферментною міткою (LSAB^{AP}-метод) та панелі моноклональних антитіл (МкАТ) до диференціальних антигенів В-клітин.

За даними життєздатності клітин обчислювали індекс цитотоксичності (ІЦ):

$$ІЦ = \frac{\text{мертві клітини в досліді (\%)} - \text{мертві клітини в контролі (\%)}}{\text{мертві клітини в контролі (\%)}}$$

У роботі застосовували такі лікарські препарати: флударабіну фосфат, що є одним із похідних пуринових нуклеозидів, та етопозид, який належить до групи інгібіторів ДНК-топоізомерази II. Флавоноїд кверцетин («Sigma», США) використовували як модифікатор Ап. Флударабіну фосфат розчиняли у воді, аліквотували та ліофілізували. Для дослідів використовували одержані аліквоти, які зберігали при температурі 4 °С. Проміжні розведення етопозиду виконували на ростовому середовищі. Стоковий розчин кверцетину готували на етанолі. Препарати вносили в середовище з клітинами не пізніше ніж через тиждень після ініціювання первинної культури. У попередніх експериментах визначали прийнятні концентрації кожного з препаратів. Кінцеві концентрації препаратів у первинних культурах В-ХЛЛ становили: флударабіну фосфату — 10 мкмоль/л, етопозиду — 5 мкмоль/л, кверцетину — 40 мкмоль/л.

Вміст гіподиплоїдних клітин визначали методом проточної цитометрії за I. Nicoletti та співавторами [18]. Для проведення цитометричного аналізу клітини інкубували у розчині пропідію йодиду («Sigma», робоча концентрація 5 мкг/мл) з 0,1% цитрату натрію та 0,1% тритону X-100 з додаванням 250 мкг/мл РНКази А. Флуоресценцію клітин оцінювали, використовуючи проточний цитометр BD[™] FACSCalibur («Becton Dickinson», США) та програму CellQuest («BD Bioscience Pharmingen», США).

За даними щодо відсотка гіподиплоїдних клітин у популяції обчислювали апоптотичний індекс (АІ):

$$AI = \frac{\text{гіподиплоїдні клітини в досліді (\%)} - \text{гіподиплоїдні клітини в контролі (\%)}}{\text{гіподиплоїдні клітини в контролі (\%)}}$$

Для дослідження вмісту активної каспази-3 у клітинах використовували систему Caspase-3, Active Form, mAb Apoptosis Kit: FITC («BD Biosciences Pharmingen»). Після оброблення препаратами клітини відмивали забуференим фосфатним розчином і фіксували на льоду в пермеабілізуючому буфері, що містив сапонін та параформальдегід. Відмиті клітини обробляли МкАТ проти активної форми каспази-3 (клон С92–605). Після інкубації з антитілами та відмивання клітини піддавали аналізу за допомогою проточної цитометрії.

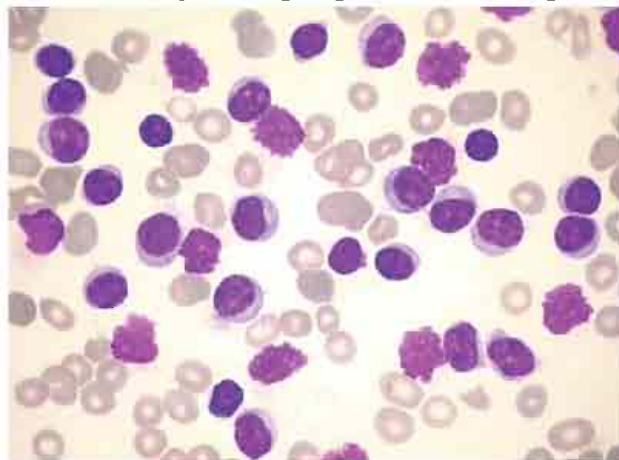
Для визначення вмісту білків Bcl-2 і CAS у лізатах бластних клітин, отриманих із крові хворих на В-ХЛЛ, використовували метод імуноблотингу. Білки розділяли електрофорезом у 12% поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію, після чого їх переносили на PVDF-мембрани Immobilon-P («Millipore», США), які обробляли МкАТ проти Bcl-2 (клон 7, 1:500) або CAS (клон 24, 1:1000) фірми «BD Biosciences Pharmingen». Антитіла проти бета-актину («Sigma», клон AC-15, 1 мкг/мл) використовували для контролю рівномірності навантаження доріжок гелю. Вторинними антитілами були анти-мишачі IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому («Promega», США). Імунореактивні смуги на блотах виявляли за допомогою системи реагентів для посилення хемілюмінесценції («Amersham Pharmacia», Велика Британія).

Статистичну обробку результатів дослідження виконували за допомогою стандартного пакета статистичних програм «Statistica for Windows 6.0» («StatSoft Inc.», США). Для виявлення відмінностей між вибірками було застосовано непараметричний *U*-критерій Манна — Уїтні. Значення $p \geq 0,05$ вважали статистично невірними. Дані значень ІЦ та AI у досліджуваних вибірках представляли графічно за допомогою коробчастих діаграм.

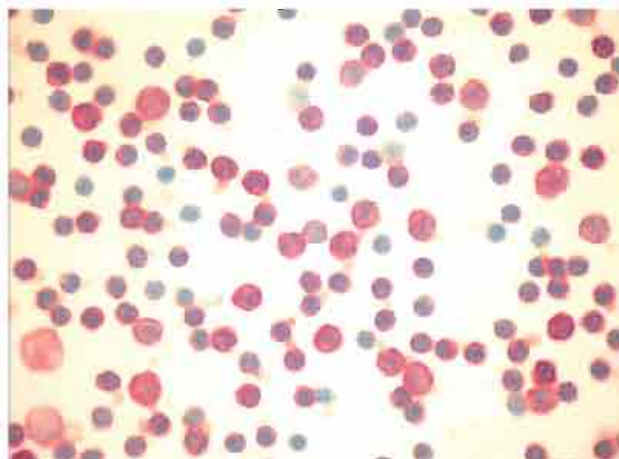
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримано 26 первинних культур лімфоцитів хворих, які мали морфологічні та імунофенотипові (CD19⁺ CD5⁺ CD10⁻ CD23⁺ CD20⁺ CD43⁺) ознаки В-ХЛЛ (рис. 1). Значний рівень загибелі клітин на 1-шу добу після початку культивування відзначали у 5 випадках. Ці культури було вилучено із загального аналізу. Виключали також 3 культури, позитивні за CD38. У решті культур у ранні терміни культивування (1–2-га доба) рівень спонтанного Ап був низьким (не більше 10%). Аналізували також 2 культури, одержані з периферичної крові хворих, у яких виявлено лімфоцитоз без ознак моноклональності та діагноз В-ХЛЛ не підтверджено. Відносно висока життєздатність клітин у культурі зберігалася впродовж щонайменше 1 міс з початку культивування.

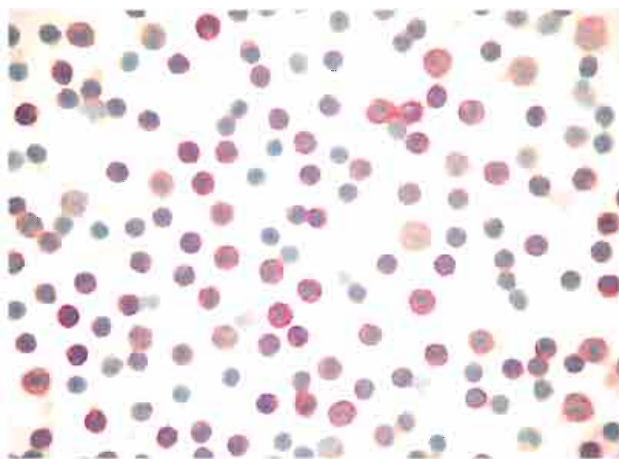
Аналіз чутливості клітин В-ХЛЛ до дії хіміопрепаратів і модифікатора Ап (кверцетин) виконували впродовж 1-го тижня з моменту початку вирощування первинної культури. Схему послідовності внесення досліджуваних препаратів наведено на рис. 2.



a



b



v

Рис. 1. Клітини периферичної крові хворого на В-ХЛЛ: а — морфологія клітин, забарвлених за Май — Грюнвальдом; б — експресія CD19; в — експресія CD23. 36. 1000

Типові профілі розподілу клітин за вмістом ДНК у культурах В-ХЛЛ представлено на рис. 3. Як бачимо з наведених даних, відразу після початку культивування рівень Ап був низьким, клітини були практично повністю заблоковані у фазі G₀/G₁. Через кілька діб куль-

тивування в культурах виявлено спонтанний Ап, рівень якого варіював у значних межах (від 10 до 35%). Відсоток спонтанної загибелі клітин у більшості випадків не збігався з рівнем спонтанного Ап (дані не наведено).

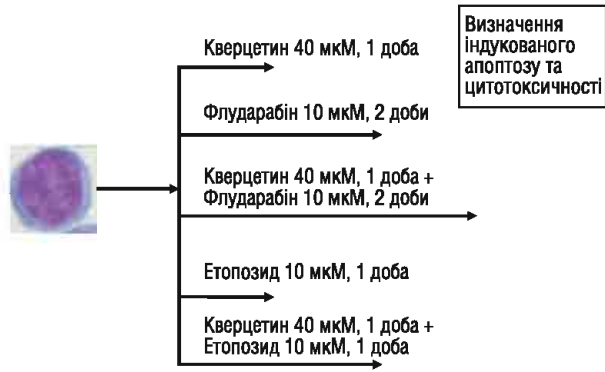


Рис. 2. Схема послідовності внесення препаратів

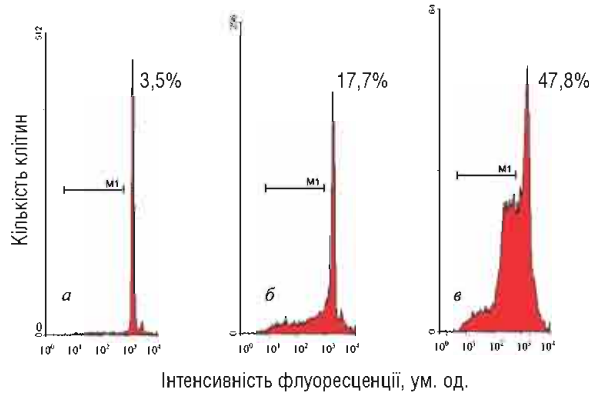


Рис. 3. Типові профілі розподілу клітин В-ХЛЛ за вмістом ДНК: а — 1-ша доба культивування; б — 4-га доба культивування; в — індуція апоптозу під дією флударабіну фосфату. М1 — зона гістограми, яка відповідає субпопуляції клітин із гіподиплоїдним вмістом ДНК

При визначенні чутливості культур В-ХЛЛ до дії флударабіну фосфату чи етопозиду продемонстровано значну гетерогенність відповіді. Розподіл значень ІЦ, АІ та статистичні параметри вибірок при дії на культури В-ХЛЛ флударабіну фосфату чи етопозиду, як без попередньої інкубації з кверцетином, так і заздалегідь оброблених кверцетином, подано на рис. 4.

Позитивні середні значення як ІЦ, так і АІ свідчать про те, що в більшості випадків при культивуванні за наявності кверцетину, етопозиду чи флударабіну фосфату життєздатність лейкемічних клітин знижувалася, а фракція гіподиплоїдних клітин зростала. Разом з тим ІЦ й АІ у досліджуваній вибірці характеризувалися значним розкидом, що свідчить про суттєву неоднорідність індивідуальної відповіді на застосовані чинники. Середнє значення ІЦ коливалося від 1,05 до 2,56, у той час як середнє значення АІ знаходилося в діапазоні від 0,15 до 0,37. Таким чином, в усіх досліджуваних групах середні значення ІЦ були значно вищими за середні значення АІ. Невідповідність чисельних значень ІЦ та АІ можна пояснити відносно невеликим внеском Ап у загальний показник клітинної загибелі при В-ХЛЛ. Відмінності рівнів ІЦ й АІ між досліджуваними групами в більшості випадків не були статистично вірогідні-

ми за критерієм Манна — Уїтні. У культурах мононуклеарів периферичної крові хворих, у яких не підтверджено клонального лімфопроліферативного процесу (загалом 2 культури), загибелі клітин чи індукованого Ап при дії будь-якого з досліджуваних цитотоксичних чинників або флавоноїду виявлено не було.

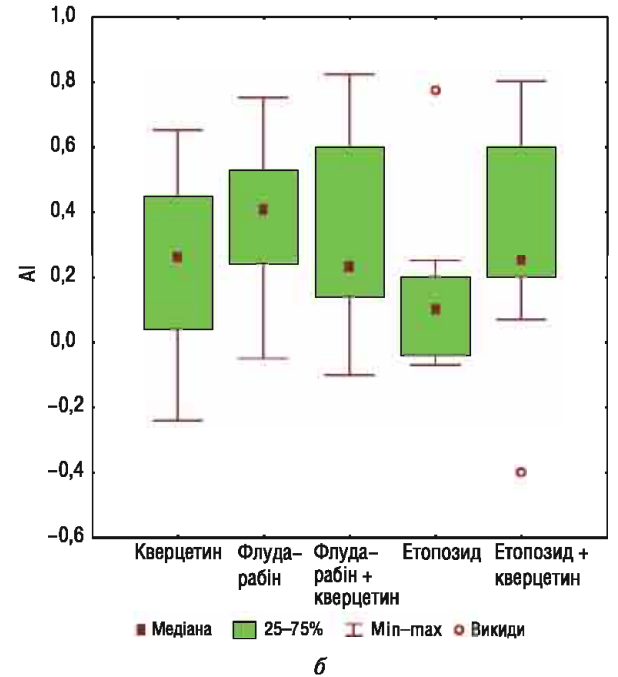
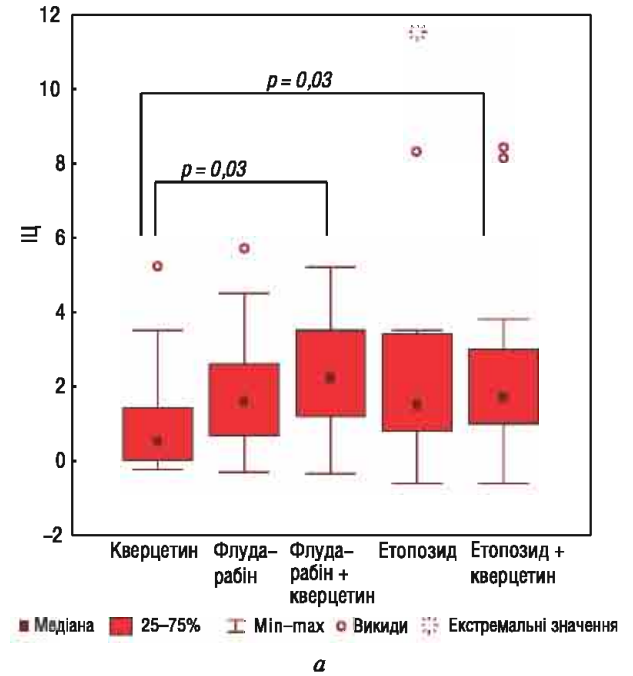


Рис. 4. Розподіл значень ІЦ (а), АІ (б) та статистичні параметри вибірок (медіана, квартиль, мінімальні та максимальні значення, викиди та екстремальні значення) при дії на культури В-ХЛЛ флударабіну фосфату чи етопозиду як без, так і з попередньою інкубацією з кверцетином

У деяких випадках відзначали ефект потенціювання цитотоксичності та індукції Ап кверцетином при застосуванні етопозиду (4 з 16 культур В-ХЛЛ) або флударабіну фосфату (2 з 16 культур В-ХЛЛ) (рис. 5). При цьому індукція Ап супрово-

джувалася збільшенню частки клітин, в яких виявляли активну форму каспази-3 (рис. 6).

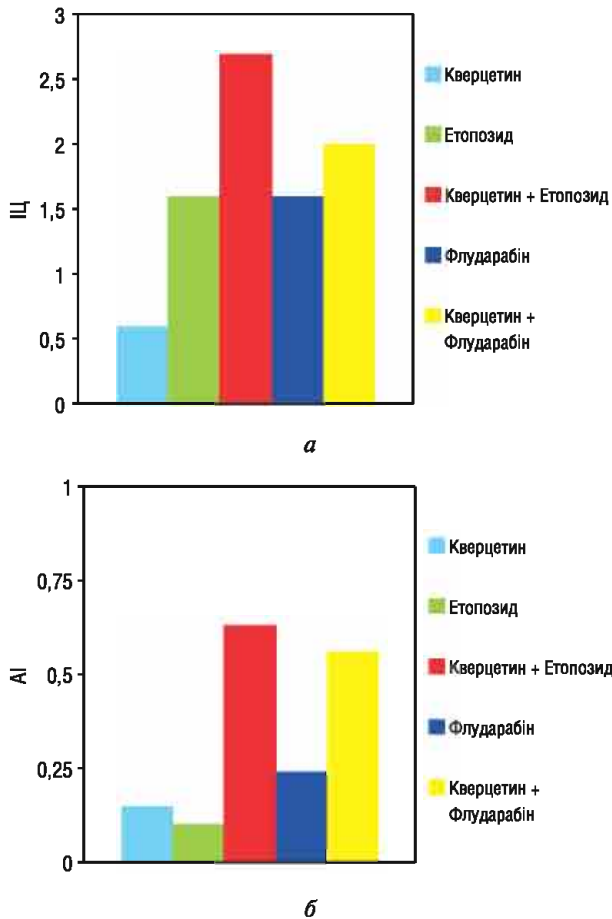


Рис. 5. Значення PI (а) та AI (б) в культурі клітин хворого на В-ХЛЛ після дії етопозиду чи флударабіну, а також зазначених препаратів після попередньої інкубації з кверцетином

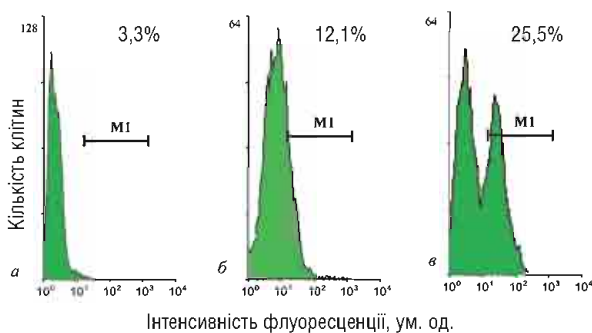


Рис. 6. Типові профілі вмісту популяції клітин з активною формою каспази-3 у хворого на В-ХЛЛ із позитивною апоптотичною відповіддю: а — контроль; б — клітини, інкубовані з кверцетином; в — клітини, інкубовані з етопозидом. M1 — зона гістограми, яка відповідає субпопуляції клітин з активною формою каспази-3

Методом імуноблотингу проведено аналіз рівня білків Bcl-2 і CAS у лізатах мононуклеарів периферичної крові з хворих на В-ХЛЛ (рис. 7), у яких попередньо виявлено індукцію Ап при дії етопозиду чи кверцетину та етопозиду. З'ясувалося, що індукція Ап етопозидом супроводжується значним зниженням вмісту антиапоптотичного білка CAS

(практично до рівня, що не підлягає детекції). Картина не змінювалася в клітинах, попередньо інкубованих із кверцетином. В усіх трьох випадках дія етопозиду суттєво не впливала на рівень антиапоптотичного білка Bcl-2.

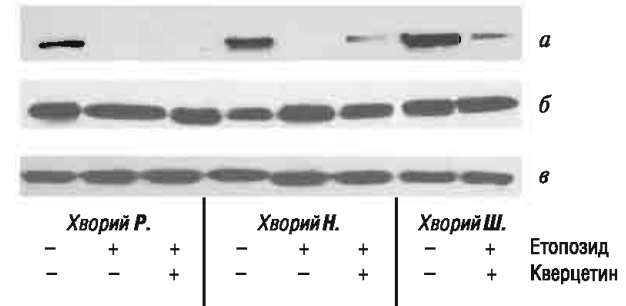


Рис. 7. Імуноблотинг білків лізатів бластних клітин хворих на В-ХЛЛ із МкАТ проти CAS або Bcl-2: а — CAS (100 кДа); б — Bcl-2 (26 кДа); в — бета-актин (контроль навантаження)

Неоднорідність відповіді лейкемічних клітин хворих на В-ХЛЛ *ex vivo* на ті самі цитотоксичні засоби може бути відзеркаленням особливостей біології лейкемічних клітин при цій формі лейкемії, що й спричинює суттєві індивідуальні відмінності клінічної відповіді на терапію при В-ХЛЛ. Хоча визначення індивідуальної чутливості до лікарських препаратів широко застосовується для індивідуалізації терапії солідних новоутворень, в літературі немає однозначного погляду на доцільність попереднього встановлення *in vitro* чутливості до хіміопрепаратів клітин В-ХЛЛ. Так, одні автори зазначають повну відсутність кореляції між чутливістю *in vitro* до лікарських засобів клітин В-ХЛЛ та клінічною відповіддю [19], в той час як в інших роботах таку кореляцію продемонстровано [4]. Існують і певні розбіжності даних щодо діапазону параметрів відповіді на цитотоксичні засоби в культурі В-ХЛЛ і можливості модифікації цієї відповіді за допомогою речовин різної хімічної природи.

Завданням цього дослідження було визначити рівень цитотоксичності та індукції Ап клітин В-ХЛЛ *ex vivo* при дії як стандартних хімотерапевтичних засобів, так і флавоноїду кверцетину, що є одним з відомих модифікаторів біологічної відповіді. Результати роботи свідчать про те, що в більшості випадків лейкемічні клітини хворих на В-ХЛЛ чутливі в культурі до дії флударабіну чи етопозиду. При цьому цитотоксичний ефект превалює над індукцією Ап. Значне переважання значення PI над AI демонструє, що індуквана або спонтанна загибель клітин при В-ХЛЛ не завжди включає апоптотичні механізми, навіть у системі *ex vivo*, де впливи мікрооточення нівелюються. Це узгоджується з відомими даними щодо дефектності систем реалізації Ап у цих клітинах. Разом з тим часта відсутність вірогідної різниці між середніми значеннями PI та AI при дії цитотоксичних засобів і самого лише кверцетину змушує засумніватися у тому, що за такою відповіддю в культурі можна адекватно судити про ефективність

впливу певного препарату *in vivo*. Очевидно, в культурі лейкемічних клітин хворих на В-ХЛЛ в умовах вивільнення з-під впливу мікрооточення в більшості випадків виявляється притаманна клітинам здатність як до спонтанного, так і до індукованого Ап. У 25% культур В-ХЛЛ при застосуванні етопозиду та в 12,5% — при застосуванні флударабіну фосфату визначали значне зростання ІЦ або АІ, що може свідчити про виявлену дійсно підвищену чутливість культур до зазначених цитотоксичних агентів.

Індукція Ап у чутливих до дії хіміопрепаратів культурах В-ХЛЛ супроводжувалася активацією каспази-3. Ця ефекторна каспаза, як відомо, активується ініціаторними каспазами-8 та -9, які беруть участь у реалізації так званих рецепторного та мітохондріального апоптотичних шляхів [20]. Тому більшість авторів розглядають утворення активної форми каспази-3 як надійний маркер Ап. У низці робіт продемонстровано, що в лейкемічних клітинах хворих на В-ХЛЛ у відповідь на дію протипухлинних препаратів відбувається активація саме каспази-3 [13, 15, 21]. Водночас зареєстровано випадки, коли перебіг Ап вказаних клітин відбувається без залучення каспаз (наприклад [21]). Наші дані не виключають того, що каспазозалежний механізм загибелі клітин не є єдиним у відповіді лейкемічних клітин хворих на В-ХЛЛ на цитотоксичний вплив.

У нашому дослідженні дія етопозиду чи кверцетину з етопозидом на лейкемічні клітини не супроводжувалася змінами рівня антиапоптотичного білка Bcl-2. Інші дослідники також не виявили змін рівнів білків родини Bcl-2 після інкубації клітин хворих на В-ХЛЛ із флударабіном [19] або кладрибіном [21]. Відомо, що білки родини Bcl-2 є одними з основних регуляторів Ап при В-ХЛЛ [9]. У деяких роботах відзначено підвищення рівнів Bcl-2 при В-ХЛЛ порівняно з нормальними лімфоїдними клітинами, що асоціювалося з гіршим прогнозом захворювання [22], хоча дані про вміст Bcl-2 слід враховувати в поєднанні з даними про вміст інших білків родини Bcl-2.

Дослідження білків, залучених до процесів ініціації та реалізації Ап у клітинах хворих на В-ХЛЛ, не обмежуються лише білками родини Bcl-2. У наших дослідженнях ми оцінювали зміни вмісту асоційованого з мікротрубочками білка CAS, що може перешкоджати загибелі пухлинних клітин, спричиненої різними факторами [23]. Відомо, що в клітинах багатьох злоякісних новоутворень, включаючи гемобластози, визначають високий рівень експресії CAS, і цей білок бере участь у регуляції відповіді пухлинних клітин на хіміотерапію [24]. Ми вперше продемонстрували, що культивування клітин хворих на В-ХЛЛ з етопозидом призводило до практично повного пригнічення експресії цього антиапоптотичного білка.

Таким чином, в злоякісних лімфоїдних клітинах хворих на В-ХЛЛ, які не експресували CD38, значення цитотоксичності та апоптотичної відповіді

при дії етопозиду або флударабіну фосфату значно варіюють. Хоча в окремих індивідуальних випадках відзначено суттєву відповідь лейкемічних клітин В-ХЛЛ на застосовані хіміотерапевтичні засоби і потенціювання ефекту кверцетином, великий розкид результатів і розбіжності між відсотком загибелі клітин та індукцією в них Ап не дозволили продемонструвати статистично вірогідного ефекту за всім масивом даних хворих на В-ХЛЛ, які були залучені до дослідження. Складається враження, що індукція Ап хіміопрепаратами та його модифікація в культурі має радше індивідуальний, аніж систематичний характер. Питання доцільності тестування чутливості *in vitro* при В-ХЛЛ потребує подальшого вивчення із визначенням кореляції між чутливістю клітин *in vitro* та клінічною відповіддю.

ВИСНОВКИ

1. Злоякісні лімфоїдні клітини хворих на В-ХЛЛ характеризуються значною гетерогенністю цитотоксичної відповіді та індукції Ап *ex vivo* під впливом хіміопрепаратів, а також їхньої комбінації з флавоноїдом кверцетином.

2. Цитотоксичний ефект при дії флударабіну фосфату чи етопозиду превалює над індукцією Ап. Таким чином, індукована або спонтанна загибель клітин при В-ХЛЛ не завжди базується на механізмах Ап, що узгоджується з даними щодо дефектності систем реалізації Ап в цих клітинах.

3. Індукція Ап і модифікація ефектів хіміопрепаратів флавоноїдом у культурах клітин хворих на В-ХЛЛ має радше індивідуальний, аніж систематичний характер. При цьому в окремих випадках виявляють значну чутливість первинних культур В-ХЛЛ до етопозиду чи флударабіну фосфату.

4. Індукція Ап у чутливих до дії хіміопрепаратів культурах В-ХЛЛ супроводжується активацією каспази-3. При цьому вміст білка Bcl-2 не змінюється, а експресія CAS суттєво знижується.

Робота виконана у рамках цільової програми наукових досліджень відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України «Функціональна геноміка і метаболоміка в системній біології» (№ 0112U002192).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94** (6): 1848–54.
2. Morabito F, Mangiola M, Oliva B, et al. Peripheral blood CD38 expression predicts survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2001; **25** (11): 927–32.
3. Абраменко ІВ, Завгородня АВ, Балап ВІ і др. Індукція р53-зависимого апоптоза под действием ионизирующего излучения в лимфоидных клетках больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом. *Онкология* 2008; **10** (2): 225–9.
4. Zolnierczyk JD, Borowiak A, Blonski JZ, et al. *In vivo* and *ex vivo* responses of CLL cells to purine analogs combined with alkylating agent. *Pharmacol Rep* 2013; **65** (2): 460–75.
5. Robertson LE, Plunkett W. Apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1993; **11** (2): 71–3.

6. Bomstein Y, Yuklea M, Radnay J, *et al.* The antiapoptotic effects of blood constituents in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2003; **70** (5): 290–5.
7. Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, *et al.* Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukemia cells following their culture *in vitro*. *Br J Haematol* 1989; **71** (3): 343–50.
8. Ghamlouch H, Ouled-Haddou H, Damaj G, *et al.* A combination of cytokines rescues highly purified leukemic CLL B-cells from spontaneous apoptosis *in vitro*. *PLoS One* 2013; **8** (3): e60370.
9. Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* 2005; **114** (4): 441–9.
10. Hartmann TN, Pleyer L, Desch P, *et al.* Novel therapeutic approaches to chronic lymphocytic leukemia based on recent biological insights. *Discov Med* 2009; **8** (42): 157–64.
11. Hamblin T. Natural products and the treatment of leukemia. *Leuk Res* 2006; **30** (6): 649–50.
12. Spagnuolo C, Russo M, Bilotto S, *et al.* Dietary polyphenols in cancer prevention: the example of the flavonoid quercetin in leukemia. *Ann NY Acad Sci* 2012; **1259**: 95–103.
13. Russo M, Spagnuolo C, Volpe S, *et al.* Quercetin induced apoptosis in association with death receptors and fludarabine in cells isolated from chronic lymphocytic leukaemia patients. *Br J Cancer* 2010; **103** (5): 642–8.
14. Russo M, Nigro P, Rosiello R, *et al.* Quercetin enhances CD95- and TRAIL-induced apoptosis in leukemia cell lines. *Leukemia* 2007; **21** (5): 1130–3.
15. Podhorecka M, Halicka D, Klimek P, *et al.* Resveratrol increases rate of apoptosis caused by purine analogues in malignant lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 2011; **90** (2): 173–83.
16. Gokbulut AA, Apohan E, Baran Y. Resveratrol and quercetin-induced apoptosis of human 232B4 chronic lymphocytic leukemia cells by activation of caspase-3 and cell cycle arrest. *Hematology* 2013; **8** (3): 144–50.
17. Фільченко АА, Завелевич МП, Храновська НН и др. Апоптоз злокачественных лимфоидных клеток человека Namalwa при действии ресвератрола и кверцетина. *Укр биохим журн* 2006; **78** (4): 112–9.
18. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, *et al.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991; **139** (2): 271–9.
19. Kitada S, Andersen J, Akar S, *et al.* Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with *in vitro* and *in vivo* chemoresponses. *Blood* 1998; **91** (9): 3379–89.
20. Philchenkov AA. Caspases as regulators of apoptosis and other cell functions. *Biochemistry (Mosc)* 2003; **68** (4): 365–76.
21. Pérez-Galán P, Marzo I, Giraldo P, *et al.* Role of caspases and apoptosis-inducing factor (AIF) in cladribine-induced apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002; **16** (10): 2106–14.
22. Faderl S, Keating MJ, Do KA, *et al.* Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* 2002; **16** (6): 1045–52.
23. Brinkmann U, Brinkmann E, Gallo M, *et al.* Role of CAS, a human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1, in toxin and tumor necrosis factor mediated apoptosis. *Biochemistry* 1996; **35** (21): 6891–9.
24. Tai CJ, Hsu CH, Shen SC, *et al.* Cellular apoptosis susceptibility (CSE1L/CAS) protein in cancer metastasis and chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; **29** (1): 110.

EX VIVO RESPONSE IN MALIGNANT CELLS OF B-CLL PATIENTS EXPOSED TO ANTICANCER DRUGS

M.P. Zavelevich, L.M. Kuiava, A.A. Philchenkov, N.M. Khranovska, A.F. Jalilov

Summary. *Avoiding of apoptosis (Ap) due to the defects in its effector systems is a characteristic feature of leukemic cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). The search for the substances capable of overcoming the inhibition of Ap or modifying the susceptibility to Ap induction in the malignant lymphoproliferative diseases is a topical issue. The aim of the study was to analyze cell death and Ap induction in primary cultures of B-CLL cells treated with cytotoxic chemotherapeutic agents of various classes. The possible modifying effects of quercetin on cell death and Ap induction were also studied. Materials and methods: the primary cultures of peripheral blood mononuclear cells isolated from B-CLL patients were treated with fludarabine phosphate or etoposide. The same cultures were also pretreated with quercetin. Cell death was assessed and Ap was measured by flow cytometry. The index of cytotoxicity and apoptotic index were calculated. Results: the significant heterogeneity in susceptibility of B-CLL cultures to the anticancer drugs used in the study has been demonstrated. In several cases quercetin potentiated considerably the cytotoxicity of fludarabine phosphate or etoposide. Nevertheless, this effect was not statistically significant when the cumulative data in the total group of B-CLL patients under study were analyzed. Conclusion: the considerable patient-to-patient heterogeneity in the rate of Ap induced ex vivo in CLL cells by anticancer drugs has been demonstrated. The findings also confirmed the considerable non-apoptotic component in the death fraction of B-CLL cells exposed to chemotherapeutic drugs that is in line with the known data on the defectiveness in apoptotic response of these cells.*

Key Words: chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), fludarabine phosphate, etoposide, quercetin, cytotoxicity, apoptosis, caspase-3, Bcl-2, CAS.

Адреса для листування:

Фільченко О.О.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

E-mail: apoclub@i.ua

Одержано: 24.09.2014