

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
( Н И У « Б е л Г У » )

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК  
КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ АЛКИЛИРУЮЩЕГО ТИПА  
ДЕЙСТВИЯ (ЦИКЛОФОСФАМИД И ИФОСФАМИД) НА СТРУКТУРУ  
И ФУНКЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ  
ПРОЛИФЕРАЦИИ В СИСТЕМЕ КРОВИ**

Магистерская диссертация  
обучающегося по направлению подготовки 06.04.01 Биология  
очной формы обучения, группы 07001540

Нгуен Тхи Хоа

Научный руководитель  
д.б.н., профессор  
Скоркина М.Ю.

Рецензент  
к.м.н., доцент, зав.  
гематологическим  
отделением  
Белгородской областной  
клинической больницы  
Св. Иоасафа  
Беляева С.С.

БЕЛГОРОД 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Глава 1. Обзор литературы.....	7
1.1. Характеристики системы крови в условиях злокачественной пролиферации .....	7
1.1.1. Острый лимфобластный лейкоз .....	10
1.1.2. Острый миелобластный лейкоз .....	12
1.1.3. Хронический миелобластный лейкоз.....	14
1.1.4. Лимфома.....	17
1.2. Характеристика препаратов алкилирующего типа действия .....	20
1.2.1. Циклофосфамид .....	21
1.2.2. Ифосфамид .....	28
Глава 2. Материалы и методы исследования .....	32
2.1. Забор крови и условия эксперимента.....	32
2.2. Определение жизнеспособности лейкоцитов .....	32
2.3. Изучение структуры и свойств клеточной поверхности методом атомно-силовой микроскопии .....	33
Глава 3. Результаты исследования .....	37
3.1. Влияние препаратов алкилирующего типа действия на жизнеспособность лейкоцитов больных лейкозом .....	37
3.2. Влияние циклофосфамида и ифосфамида на упруго-эластические свойства лимфоцитов больных лейкозом.....	39
3.3. Цитоархитектоника лимфоцитов крови больных лейкозом под действием препаратов циклофосфамида/ифосфамида.....	46
Глава 4. Обсуждение результатов исследования .....	57
Выводы .....	62
Список использованной литературы.....	63

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Поиск механизмов, объясняющих устойчивость злокачественных клонов гемопозитической системы к стандартной химиотерапии и разработка стратегий их преодоления, является одной из актуальных проблем современной онкогематологии. Согласно данным статистики, около 10% пациентов с острыми миелопролиферативными процессами в системе крови неудовлетворительно отвечают на начальную стандартную химиотерапию и более 60% рецидивов характеризуются устойчивостью к лечению (Siegel et al., 2014). В стандартных схемах лечения, используемых в терапии онкологических заболеваний системы крови, достаточно распространено включение алкилирующих химиотерапевтических препаратов, представителями которых являются циклофосфамид и ифосфамид. Они успешно применяются в разных схемах лечения рака (Allan, 2006). Клеточная мембрана является уникально организованным и сложным компонентом клетки, ответственным за поддержание клеточной структуры и взаимодействие с окружающей средой, особенно при использовании химиотерапии. Важные изменения в клеточной мембране раковых клеток, резистентных к действию алкилирующих химиотерапевтических препаратов дают возможность оценить эффективность лекарственных средств (Zalba, 2017). Понимание влияния алкилирующих химиотерапевтических препаратов на морфофункциональную активность и биофизические свойства опухолевых клеток, дает возможность для новых разработок в области диагностики, профилактики и терапии.

Разработанность темы исследования. В современной литературе представлен спектр экспериментальных исследований, демонстрирующих молекулярные внутриклеточные механизмы действия препаратов алкилирующего типа (Alan, 2006; Kondo et al., 2010; Rauf, 2005). В ряде работ подробно описаны пути метаболизма циклофосфамида и иифосфамида

(Jgueviel et al., 1998; Riddick, 2005; Zhang 2005, 2006). Установлено цитогенетическое действие и высокий мутагенный эффект препаратов алкилирующего ряда в высоких дозах на клетки костного мозга (Быковская, 1996), описано их влияние на митохондрии, вследствие чего нарушаются процессы окислительного фосфорилирования и дыхания клетки (Wen et al., 2013). Однако, несмотря на целый спектр исследований, посвященных действию противоопухолевых препаратов на генетический аппарат клетки (Шорманов, 2014; Davies, 2001), остается неизученным их влияние на структуру и свойства поверхности опухолевых клеток крови. Доставка лекарства к генетическому аппарату клетки в большинстве случаев зависит от транспортной функции клеточной мембраны, которая в значительной мере определяется ее механическими и электрическими свойствами. В связи с выше изложенными были сформулированы цели и задачи исследования.

Целью исследования явилось изучить влияние препаратов алкилирующего типа действия на структуру и функции лейкоцитов при развитии злокачественной пролиферации в системе крови.

Задачи исследования:

1. Изучить жизнеспособность лейкоцитов крови в группах больных острым лимфобластным лейкозом, острым миелобластным лейкозом, хроническим миелобластным лейкозом и лимфомой под влиянием циклофосфида/ифосфида.

2. Изучить влияние циклофосфида/ифосфида на упруго-эластические свойства лимфоцитов больных разными типами лейкоза.

3. Выявить изменения в структуре поверхности лимфоцитов больных лейкозом под действием циклофосфида/ифосфида.

Объект исследования – лейкоциты периферической крови людей.

Предмет исследования – изучение структуры и свойств лейкоцитов при развитии в системе крови злокачественных лимфо- и миелопролиферативных процессов.

Научная новизна исследования. Впервые проведено сравнительное исследование влияния препаратов алкилирующего типа действия (циклофосфамида, ифосфамид) на опухолевые и нормальные клетки больных разными типами лейкоза в условиях *in vitro*. В результате проведенных экспериментов установлена зависимость между изменением упруго-эластических свойств поверхности лимфоцитов и концентрацией противоопухолевых препаратов, которая выражается, в большинстве случаев, в снижении жесткости клеточной поверхности с увеличением дозы химиотерапевтического антибиотика. Выявлена взаимосвязь между изменениями в микрорельефе поверхности лимфоцитов со значениями модуля упругости.

Методы исследования. В работе использованы метод оценки жизнеспособности лейкоцитов. Топографию поверхности лимфоцитов изучали на атомно-силовом микроскопе Integra Vita (Зеленоград, 2009) в режиме полуконтактного сканирования. Модуль Юнга, характеризующий жесткость клеточной поверхности измеряли на атомно-силовом микроскопе в режиме силовой спектроскопии. Обработку, полученных сканов и измерение морфометрических параметров рельефа клеточной поверхности осуществляли с использованием компьютерной программы Nova. Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли методами вариационной статистики.

Теоретическая и практическая значимость работы.

На основании проведенных исследований получены новые сведения о влиянии препаратов (циклофосфамид, ифосфамид) на функциональные свойства и поверхностную структуру опухолевых лимфоцитов больных ОЛЛ, лимфомой, а также нормальных лимфоцитов больных ОМЛ, ХМЛ в условиях *in vitro*. Полученные результаты дополняют современные представления о механизмах влияния данной группы препаратов не только на популяции опухолевых, но и нормальных лимфоцитов. Практическая значимость работы

связана с возможностью использования, разработанных методических приемов в клинико-диагностической лабораторной диагностике с целью оценки терапевтического действия препаратов в конкретных концентрациях и своеобразной чувствительности клеток к противоопухолевым препаратам алкилирующего типа действия, в связи с чем, полученные данные могут быть одним из критериев оценки эффективности проводимой химиотерапии.

Структура работы. Магистерская диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и метод исследования, 3 глав с описанием полученных результатов исследования, обсуждения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 75 странице машинописного текста, включает 10 таблиц и 17 рисунков. Список литературы включает 54 источника на русском языке и 65 иностранных источников.

По результатам исследования было опубликовано 2 работы:

1. Влияние препаратов алкилирующего типа действия на опухолевые клетки больных острым лимфобластным лейкозом [Текст] / Нгуен Т. Х., Кротова Е. Е., Шамрай Е. А. [и др.] // Научный результат. Серия «Физиология». – 2016. – Т. 2, № 4. – С. 20-24.

2. Структуры и свойства лимфоцитов больных острым лимфобластным лейкозом под влиянием препаратов алкилирующего типа действия // Скоркина М. Ю., Нгуен Т. Х. // CHRONOS: Естественные и технические науки: материалы XV международной научно-практической конференции. – Москва, 03 мая 2017. – С. 4-9.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Характеристики системы крови в условиях злокачественной пролиферации

Злокачественная клональная пролиферация миелоидных или лимфоидных клеток в системе крови в современной литературе описывается термином лейкоз (лейкемия, белокровие). Данный процесс характеризуется ростом содержания лейкоцитов в кроветворной ткани, других органах и в циркулирующей крови (Шанина, 2004).

Под лейкозом понимают системное заболевание крови опухолевого характера, возникающее из кроветворных клеток с первичным поражением костного мозга (Конова, 2000) в результате мутации родоначальной клетки крови (Колосков, 2013). Мутация проявляется бесконтрольной пролиферацией и омоложением кроветворных элементов с задержкой их созревания, нарушением процессов обмена и метаплазией кроветворной ткани. Следствием мутации является потеря потомками мутировавшей клетки способности к дифференцировке до зрелых форм (Висмонт и др., 2009).

Лейкозные клетки секретируют цитокины, которые угнетают размножение нормальных стволовых клеток. Пролиферирующие опухолевые клетки проникают в костный мозг, что приводит к функциональной аплазии. При одновременном поражении факультативных органов кроветворения (селезёнки, лимфатических узлов) возможности нормального гемопоэза значительно ограничены, нарушаются и подавляются нормальные функции эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, что способствует развитию инфекций, кровоизлияниям, анемии. При этом опухолевые клетки крови не тождественны бластным и более зрелым элементам, присутствующим в процессе нормального кроветворения (Колосков, 2013). Патологические, опухолевые клетки характеризуются удлинённым жизненным циклом,

выраженными изменениями в гистохимических, иммунофенотипических особенностях и хромосомных аномалиях, которым отводят центральную роль в патогенезе лейкоза. Основными молекулярными событиями при развитии злокачественной пролиферации являются соматические мутации, которые приводят к гиперэкспрессии онкогенов и/или делеции антионкогенов (Висмонт и др., 2009; Panoskaltsis, 2003).

Лейкозы являются пролиферативными заболеваниями гематопоэтической системы (Reya et al., 2001), которые не подчиняются нормальным сигналам. Они происходят из стволовых клеток или предшественников гемопоэтической системы и включают в себя несколько этапов прогрессии. Во время этой опухолевой прогрессии генетические и/или эпигенетические изменения появляются либо в самой последовательности ДНК (генетической), либо в других наследуемых модификациях, которые влияют на геном (эпигенетический). Эти (эпи)генетические изменения способствуют превращению нормальной клетки в злокачественную. Существуют разные типы лейкозов, обычно классифицируемых по преобладающим типам патологических клеток и/или по клиническому течению заболевания (Al-Hajj et al., 2004). В зависимости от степени дифференцировки (зрелости) лейкозных клеток выделяют острые и хронические лейкозы (Леонова и др., 2005).

Острыми лейкозами называют гетерогенную группу опухолевых заболеваний системы крови, мишенью которых являются молодые незрелые кроветворные клетки. В остром лейкозе первично нарушаются функции костного мозга морфологически незрелыми бластными клетками с вытеснением ими нормальных элементов и инфильтрацией различных тканей и органов, благодаря способности их к миграции (Воробьев, 2002; Василевский, Камарли, 2007). Среди гемобластозов острые лейкозы занимают одно из первых мест по частоте встречаемости. 75% случаев больных выявляется в популяции взрослых людей. При этом соотношение



острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) к острым лимфоидным лейкозам составляет 6:1. У пациентов в возрасте 40 лет и старше 80% составляют ОМЛ, а у детей преобладает острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ). В костном мозге обнаруживается более 30% лейкозных бластов, которые преобладают по численности преобладают. В периферической крови снижено содержание гемоглобина, развиваются необратимая анемия и геморрагический диатез (нарушение гемопоэза уже в начале заболевания). Острый лейкоз продолжается несколько месяцев. В развитии острые лейкозы проходят следующие стадии: дебют (атаку), ремиссию, рецидив, терминальную стадию, выздоровление (состояние полной ремиссии на протяжении 5 лет и более) (Смирнова, Манчук, 2013).

В настоящее время общепризнанной считается клональная теория патогенеза острых лейкозов, согласно которой все они возникают из одной мутировавшей кроветворной клетки. Мутация родоначальной клетки происходит под влиянием различных этиологических факторов (радиация, химические вещества, вирусы, ионизирующее излучение и др.) и заключается в обширном повреждении ДНК. В результате этого в лейкозных клетках нарушается контроль над клеточным циклом, изменяются процессы транскрипции и продукции ряда ключевых белков. Одна мутировавшая клетка после деления дает огромное количество бластов, и при их общем числе  $10^{12}$  и более начинаются клинические проявления заболевания. Вследствие бесконтрольной пролиферации и дефекта дифференцировки накапливаются патологические клетки (Абдулкадыров, 2004; Воробьева, 2002; Радченко, 2003).

Согласно иммунологической классификации острых лейкозов Европейской группой иммунологов каждый этап дифференцировки клеток-предшественников гемопоэза характеризуется наличием на их мембране определенного набора антигенов дифференцировки – CD. К антигенам, обнаруживающимся на клетках лимфоидной линии относятся CD1 - CD5,

CD7 - CD10, CD20, CD22, CD23, CD53, CD57, миелоидной – CD11, CD13 - CD15, CD33, CD36, CD41, CD42, CD65, HLA-DR, стволовомклеточный антигенный маркер CD34 (Коленкова, 2002; Френкель, 1999; Naferlach et al., 2005). В клинической практике часто применяются классификации острых лейкозов, разработанные гематологами Франции, США, Великобритании, основанных на морфологических признаках доминирующей популяции бластов с учетом цитохимических критерий и ультраструктуры лейкозных клеток (Abdul-Hamid, 2011).

При хронических лейкозах созревание клеток частично задерживается, при этом субстрат опухоли составляют созревающие и уже зрелые клетки, которые в основном и обнаруживаются в периферической крови, анемия в большинстве случаев развивается по мере прогрессирования заболевания. Медленное течение хронических лейкозов прогностически не оказывается более благоприятным. Во многих случаях острые лейкозы успешно лечатся, в то время как хронические оказываются резистентными к терапии. Острые и хронические лейкозы развиваются на разной клональной и неидентичной мутационной основе. Острый лейкоз с течением времени не переходит в хронический, так как утраченную ранее способность к дифференцировке неопластический клон вновь не приобретает. Однако хронический лейкоз может трансформироваться в острый (Baba, Cătoi, 2007).

### **1.1.1. Острый лимфобластный лейкоз**

Острый лимфобластный лейкоз является наиболее распространенным типом лейкемии среди детей младшего возраста, взрослые тоже могут болеть, в возрасте старше 65. Выживаемость 85% детей и 50% взрослых, по данным литературы, составляет около пяти лет (De Santis et al., 2014).

Согласно данным ряда авторов, в мазках периферической крови преобладают бластные клетки правильной округлой формы. Ядра лимфобластов крупные, окрашены в фиолетовый цвет, содержат нежную

сеть хроматина и ядрышки. Форма ядер округлая или неправильная. Цитоплазма бластных клеток светло или темно-голубая, узкая. Лимфобласты – низкодифференцированные (незрелые) клетки, не проходящие дальнейших этапов дифференцировки (Новицкий, Уразова, 2011). На долю 75% больных детей выявляют экспрессию общего (лимфоцитарного) антигена CD10, для взрослых этот показатель ниже. Важный критерий, отличающий острый лимфобластный лейкоз от нелимфобластного – присутствие в лимфоидных опухолевых элементах ядерного фермента (ДНК-полимеразной терминальной дезокситрансферазы) (Пальцев, Пауков, 2011). Согласно Французско-американо-британской классификации ОЛЛ подразделяют на 3 морфологических подтипа – L1, L2, L3, дифференциальным признаком которых являются размер, форма ядер, структура ядерного хроматина, степень выраженности нуклеол, ядерно-плазматические соотношения, вакуолизация цитоплазмы лейкозных клеток (Bain, 2010).

Характеристики этих подтипов следующие: клетки L1 относительно малы с грубым хроматином и их ядра характеризуются однородной популяцией. Клетки L2 характеризуются ядерной неоднородностью, и эти клетки больше, чем клетки L1. Клетки L3 характеризуются преобладанием вакуолей внутри клетки, их ядра обычно однородны по численности и больше L1 (Morteza et al., 2015).

Для острого лимфобластного лейкоза характерен ряд хромосомных аномалий. Наблюдаются высокие гипердиплоидии, то есть кариотипы, содержащие число хромосом от 51 до 67. В том числе наиболее важной аномалией является транслокация t(9; 22) – филадельфийская хромосома. Такая аномалия встречается в бластах у 5 % больных ОЛЛ детей и 30 % взрослых. В картине крови при ОЛЛ также выявляются анемия, тромбоцитопения, гранулоцитопения, значительно снижено содержание дифференцированных лимфоцитов – абсолютная лимфопения. При низком уровне лейкоцитов не всегда наблюдаются бласты (Mrózek et al., 2009).

У больных острым лимфобластным лейкозом, по данным литературы, при цитогенетическом исследовании злокачественных клеток клональные хромосомные перестройки определяют в 60-85 % случаев. Довольно часто (10-20%) у больных ОЛЛ митозы отсутствуют либо их качество неудовлетворительное (Зотова и др., 2013).

Цитохимические исследования показывают, что от 1% до 90% бластных клеток содержат полисахариды в форме гранул различных размеров. В лимфобластах не выявлено наличие фосфолипидов, пероксидазы, хлорацетат- и неспецифической эстеразы. Активность таких ферментов, как а-нафтилацетатэстераза и кислая фосфатаза, можно обнаружить лишь в некоторых клетках в виде 1-3 гранул; бластные клетки обладают сниженной активностью нуклеаз. Поверхностные мембраны бластных клеток у 1/3 взрослых больных ОЛЛ несут маркеры Т-клеток. Чаще на них присутствуют маркеры незрелых стадий Т- и В-лимфоцитов. При Т-клеточной форме острого лейкоза у больных с самого начала заболевания наблюдаются высокий лейкоцитоз, значительное увеличение размеров лимфатических узлов, в том числе в средостении. Бласты Т-клеточного происхождения характеризуются высокой активностью кислой фосфатазы, а так же наличием в них фермента терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы. Т-клеточный лейкоз характеризуется наиболее неблагоприятным прогнозом.

### **1.1.2. Острый миелобластный лейкоз**

Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) – морфологически гетерогенная группа клональных заболеваний, возникающих из клеток – миелоидных предшественников, замещающих нормальное кроветворение и поражающих экстрамедуллярные ткани. ОМЛ наблюдают в 15-20% случаев всех лейкозов у детей. Заболеваемость ОМЛ составляет 5,6 на 1 млн детского населения,

соотношение мальчиков и девочек примерно одинаковое (Мельниковой, 2009).

Острый миелоидный лейкоз представляет собой спектр заболеваний, характеризующихся нарушением роста миелоидных клеток крови, что приводит к целому ряду клинических проблем, включая, например, инфекцию, кровотечение и ангиоспазм (Clay Smith et al., 2014).

Острый миелоидный лейкоз является гетерогенным состоянием, как на фенотипическом, так и на молекулярном уровне с различными генетическими изменениями, вызывающими болезнь. Главный дефект лейкозных клеток при ОМЛ – неспособность лейкемической стволовой клетки нормально дифференцироваться, у миелобластов утрачена способность самоиндуцировать запрограммированную гибель (Chan, Huntly, 2008).

При ОМЛ бластные клетки иногда несколько более базофильные и более крупные, чем при ОЛЛ. Лейкозные миелобласты представлены клетками различной величины (от 10 до 25 мкм). Они имеют правильную округлую форму или овальные очертания. Цитоплазма миелобластов серо-голубого цвета, ядра часто круглые с 1-4 ядрышками варьирующего размера, ядерный хроматин имеет нежную структуру. При ОМЛ бластные клетки характеризуются наличием фосфолипидов, пероксидазы и хлорацетатэстеразы. У отдельных больных начальный этап заболевания характеризуется так называемой эритробластической фазой, когда в костном мозге обнаруживают большое количество эритробластов, содержащих два, три нередко перекрученных ядра. Эта фаза сменяется быстро миелобластозом костного мозга (Feller, Diebold, 2003).

Патогенез ОМЛ является сложным, но в целом он обусловлен специфическими транслокациями гена, точечными мутациями или большими делециями и дупликациями гена, а также разнообразием эпигенетических изменений, приводящих к гипо-гиперэкспрессии разнообразия генов,

участвующих в росте, дифференцировке и самообновлении гемопоэтических клеток (Ferrara, Schiffer, 2013). Эти генетические изменения могут иметь место, как на гемопоэтических стволовых клетках, так и на уровне предшественников, что дополнительно влияет на биологию и клиническое определение ОМЛ (Forsberg et al., 2010).

Согласно авторам Becker, Jordan, (2011); Horton, Huntly, (2012) при развитии ОМЛ лейкозные стволовые клетки обладают более высокой способностью к самообновлению и, возможно, уникальным механизмом резистентности к лекарственным средствам по сравнению с основной массой популяции лейкозных клеток. На развитие ОМЛ существенно влияет микроокружение и различные сигнальные вещества, такие как факторы роста негемопоэтического происхождения, хемокины и иммуномодулирующие соединения, регуляция окислительно-восстановительной среды и индукция клеточной передачи сигналов через молекулы адгезии и другие пути (Konopleva, Jordan, 2011; Krause et al., 2013).

### **1.1.3. Хронический миелобластный лейкоз**

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) – первое клональное миелопролиферативное заболевание, поражающее мультипотентные гемопоэтические стволовые клетки. ХМЛ характеризуется ускоренной и неконтролируемой пролиферацией миелоидных клеток костного мозга с последующим накоплением их в крови (Абрамова, Бутылин, Зарицкий, 2015). ХМЛ составляет 20 % среди всех лейкозов. В странах Европы и Северной Америки по частоте распространения он занимает третье место после острых лейкозов и хронического лимфолейкоза. Мужчины заболевают чаще женщин, составляя 55-60 % больных. Половина пациентов заболевает в возрасте 30-50 лет, чаще между 30-40 годами (Смирнова, 2012).

На молекулярном уровне у более 90% пациентов с ХМЛ характеризуется специфическим генетическим поражением – хромосомой

Филадельфии. Образование хромосомы Филадельфии происходит путем хромосомной транслокации большей части длинного плеча 22-й хромосомы на 9-ю, в результате чего образуется сливной ген BCR-ABL, продуктом экспрессии которого является гибридный аномальный белок Bcr-Abl p210, который вызывает злокачественную трансформацию ХМЛ и ответственен за фенотипические отклонения хронической фазы ХМЛ (Stephanie, Catherine, 2002). Белок Bcr-Abl проявляет дерегулированную, конститутивно высокую активность тирозинкиназы и находится в цитоплазме клетки, скомбинированной с некоторыми цитоскелетными белками (Виноградова, 2011; Jane, Junia, Timothy, 2003). Эти особенности, как полагают исследователи, лежат в основе способности BCR-ABL индуцировать лейкозный фенотип. В гибридном белке Bcr-Abl обнаружено несколько функциональных доменов, которые могут способствовать клеточной трансформации: увеличение пролиферативной активности миелоидных клеток-предшественниц, снижение адгезии лейкозных клеток к строме костного мозга и снижение апоптозной реакции на мутагенные стимулы (Deininger, Goldman, Melo, 2000; Stephanie, Catherine, 2002).

ХМЛ является двухфазным заболеванием с начальной хронической фазой, характеризующейся массивным расширением миелоидных предшественников и зрелых клеток, которые преждевременно покидают костный мозг, но сохраняют способность дифференцироваться в норме. Это неизменно сопровождается переходом к фатальной острой фазе, называемой «взрывным кризисом», который напоминает острый лейкоз (Stephanie, Catherine, 2002).

В картине крови больных ХМЛ характерен постепенный нарастающий лейкоцитоз: в начальной стадии болезни число лейкоцитов небольшое ( $10-15 \times 10^9/\text{л}$ ), но по мере развития болезни без лечения оно достигает цифр  $200-500-800 \times 10^7/\text{л}$  и более. Одновременно с нарастанием количества лейкоцитов выявляются характерные изменения в лейкоцитарной формуле: увеличение

содержания гранулоцитов до 85-95%, появление незрелых гранулоцитов – миелоцитов, метамиелоцитов, при значительном лейкоцитозе – нередко промиелоцитов, а иногда и единичных бластных клеток. Характерно повышение числа базофилов до 5-10%, нередко сопровождается увеличением числа эозинофилов до 5-8% и уменьшение числа лимфоцитов до 5-10%. У большинства пациентов число тромбоцитов увеличено до  $400-600 \times 10^7/\text{л}$ , а иногда до  $800-1000 \times 10^7/\text{л}$  и более (Волкова, 2001).

Экспрессия Ph1-позитивных клеток в костном мозге, периферической крови и экстрамедуллярных областях связывается с расширением пула гранулоцитарных предшественников, которые утратили чувствительность к регуляторным сигналам и изменениям микроокружения, в результате чего они подвергаются диссеминации, нарушается продукция цитокинов и подавляется процесс нормального гемопоэза. Период полужизни гранулоцитов при ХМЛ превышает таковой нормального гранулоцита в 10 раз (Clarkson et al., 2003).

В клинике выделяют три стадии ХМЛ: хроническую (развернутую) фазу, акселерации и терминальную (бластный криз). В первой стадии в периферической крови наблюдается умеренный лейкоцитоз с эозинофилией, увеличивается число незрелых гранулоцитов. Содержание бластных клеток в костном мозге не превышает 7%, содержание гемоглобина и эритроцитов может долгое время оставаться нормальными, иногда в начале заболевания возможен небольшой эритроцитоз ( $5-5,5 \times 10^{12}/\text{л}$ ). У больных в развернутой стадии ХМЛ снижаются относительные уровни Т-лимфоцитов,  $\text{CD4}^+$ -клеток, цитотоксических лимфоцитов, возрастают относительное и абсолютное содержание В-лимфоцитов и абсолютное число лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR антиген (Смирнова, 2012).

Вторая стадия (акселерация) характерна разрастанием белого ростка миелоидной ткани не только в костном мозге, но и в жировой, соединительной тканях, матке и других областях, а также замещением жира



трубчатых костей миелоидной тканью. Для гематологической картины характерны: лейкоцитоз, сдвиг лейкоцитарной формулы влево до бластов (10 %) с присутствием всех форм гранулоцитов, базофилия, эозинофилия (базофильно-эозинофильная ассоциация), тромбоцитоз или тромбоцитопения, увеличение СОЭ; нормохромная анемия с большим числом нормобластов. Согласно данным литературы, иммунологическое исследование пациентов показало уменьшение содержания Т-хелперов, Т-супрессоров, снижение секреции лимфокинов, угнетение фагоцитарной активности нейтрофилов (Леонова и др., 2005).

В третьей стадии – терминальной – характерно развитием бластного криза. Учитывая морфологические, цитохимические, иммунофенотипические характеристики бластных клеток при ХМЛ, различают несколько вариантов бластных кризов, чаще всего миелобластный или лимфобластный криз, реже - промиелоцитарный, монобластный, миеломонобластный, эритробластный, мегакариобластный. В костном мозге содержание бластов достигает 60-95% ядродержащих клеток, обнаруживается выраженный фиброз (Jabbour, 2007).

#### **1.1.4. Лимфома**

Лимфомы – моноклональные опухолевые заболевания, возникающие из малигнизированной лимфатической клетки разного уровня дифференцировки до или после контакта с центральными органами лимфопоэза – тимусом, лимфатическими узлами, селезёнкой.

Все лимфомы – злокачественные опухоли. В отличие от лейкозов лимфома характеризуется тем, что злокачественная трансформация лимфоцита изначально происходит в лимфатических узлах, лимфоидной ткани органов, а костный мозг поражается вторично в результате метастазирования (Давыдов, Ганцев, 2010). Опухолевые клетки в крови не циркулируют. Практически все лимфомы способны к лейкемизации, однако

обратная трансформация лейкоза в лимфому, невозможна. Среди лимфом выделяют болезнь Ходжкина и Неходжкинские лимфомы (Пальцев, Пауков, 2010).

Лимфома Ходжкина (лимфогранулематоз) является одним из наиболее часто встречающихся злокачественных заболеваний лимфоидной ткани, которая представляет собой злокачественную опухоль с клональной пролиферацией В-клеток зародышевых центров лимфоузлов (Румянцев, Масчан, 2014). В России ежегодно заболевает порядка 3,2 тыс. молодых пациентов обоего пола (Семочкин и др., 2008). Заболевание может возникать в любом возрасте, но преимущественным является интервал 16-35 лет, в котором преобладают женщины (Давыдов, Аксель, 2009).

Выделяют две принципиально различные формы заболевания, отличающиеся друг от друга по эпидемиологическим, клиническим, морфологическим, иммунофенотипическим и молекулярно-биологическим признакам: лимфому Ходжкина, нодулярный тип лимфоидного преобладания и классическую лимфому Ходжкина.

Классическая лимфома Ходжкина представлена четырьмя гистологическими вариантами: вариантом с нодулярным склерозом, смешанно-клеточным вариантом, вариантом с истощением лимфоидной ткани и вариантом с большим числом лимфоцитов (Криволапов, Леенман, 2006).

Все варианты классической лимфомы Ходжкина характеризуются единым иммунофенотипом: CD30 (dot-like, мембранная, цитоплазматическая реакция), CD15 (dot-like, мембранная, цитоплазматическая реакция), PAX-5 (слабая ядерная реакция по сравнению с В-клетками реактивного микроокружения). В опухолевых клетках может обнаруживаться вирус Эпштейна-Барр (LMP1/EBER). Опухолевые клетки в части случаев экспрессируют пан-В-клеточный маркер CD20 (гетерогенная по

интенсивности мембранная реакция); экспрессия опухолевыми клетками CD45 и CD3 отсутствует.

Дополнительным маркером, позволяющим отличить лимфому Ходжкина от диффузной В-крупноклеточной лимфомы, является отсутствие экспрессии В-клеточного транскрипционного фактора BoV.1 (или слабая позитивная ядерная реакция в отдельных опухолевых клетках) (Румянцев, Масчан, 2014).

Лимфома Ходжкина – это В-клеточная лимфома с выраженным реактивным полиморфноклеточным микроокружением. К опухолевой популяции лимфомы Ходжкина относят клетки Березовского-Рид-Штернберга, клетки Ходжкина, лакунарные, мумифицированные, LP-клетки (Демина, Румянцев, Масчан, 2014).

Клетки Березовского-Штернберга-Риид (БШР) представляют собой гигантские клетки диаметром 20-25 микрон, которые имеют два и более ядра. Процентное содержание данных клеток в опухоли не превышает 1-10%. Каждое ядро имеет круглую форму и содержит 1-2 крупных оксифильных, гомогенных ядрышка. Ядра окружены обильной базофильной или слабооксифильной цитоплазмой с околядерным просветлением и утолщенным краем, нередко вакуолизированным.

Обнаружение клеток БШР является неременным условием диагноза лимфомы Ходжкина. Одноядерные клетки, имеющие схожую с клетками БШР морфологию получили название клеток Ходжкина. Считается, что они являются предшественниками клеток БШР, но не имеют однозначного диагностического значения, так как морфологически очень схожи с иммунобластами, встречающимися при неспецифических поражениях лимфоузлов (Криволапов, Леенман, 2006).

## 1.2. Характеристика препаратов алкилирующего типа действия

Одним из устойчивых механизмов выживания опухолевых клеток является безграничный репликативный потенциал, требующий постоянного биосинтеза генетического материала для обеспечения комплементарного набора хромосом в каждой из дочерних клеток после их деления. В связи с этим одним из фармакологических подходов для замедления роста опухоли является использование препаратов, ингибирующих репликацию ДНК (Siddik, 2005). По этой причине ДНК стала критической мишенью для многих цитотоксических противоопухолевых агентов. Взаимодействие между ДНК и лекарствами способствует химическим и конформационным изменениям и, как следствие, влияет на электрохимические свойства нуклеиновых кислот (Sirajuddin, Ali, Badshah, 2013). По данным литературы, многие из противоопухолевых агентов, попадая в окружение опухолевых клеток, проявляют ДНК-интерактивные свойства. Среди них наиболее эффективными для лечения рака являются алкиляторы ДНК или сшивающие агенты (Damia, D'Incalci, 1998). Большинство алкилирующих препаратов представляют собой монофункциональные метилирующие агенты (темозоломид, дакарбазин), бифункциональные алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты (например, хлорамбуцил, циклофосфамид, ифосфамид) (Kondo et al., 2010). Алкилирующие агенты включают несколько групп структурно разнообразных соединений – это азотистые иприты, метилирующие агенты, платиновые агенты и нитрозомочевина (Alan, 2006).

Алкилирующие агенты особенно эффективны против делящихся клеток. Злокачественные клетки обладают большей скоростью деления, чем нормальные, в результате чего они становятся более чувствительными к повреждениям ДНК. ДНК-алкилирующие агенты используются в качестве противораковых агентов, вызывая значительное повреждение ДНК и уничтожая опухолевые клетки (Rajski, Williams, 1998). Благодаря своей

высокой химической реакционной способности, все алкилирующие агенты образуют ковалентные связи с макромолекулами (в первую очередь ДНК и в меньшей степени РНК), имеющим нуклеофильные центры (пурины, пиримидины), вызывая перекрестное сшивание и аномальное спаривание оснований, тем самым нарушая функцию репликации ДНК (Rauf et al., 2005). Основным преимуществом ковалентных связывающих является высокая прочность связывания (Liu, Sadler, 2011).

В литературе описаны три механизма воздействия алкилирующих агентов на опухолевые клетки. Первый механизм: алкилирующий агент присоединяет алкильные группы к основаниям ДНК, что приводит к ее фрагментации репарационными ферментами в процессе замены алкилированных оснований (Polavarapu, 2012). Второй механизм: образование поперечных связей между атомами ДНК. В этом процессе два основания соединяются вместе с алкилирующим агентом, который имеет два участка связывания ДНК. Сшивание двух нитей ДНК, полученных с помощью бифункциональных алкилирующих агентов, предотвращает использование этой ДНК в качестве матрицы для дальнейшего синтеза ДНК и РНК, приводящей к ингибированию репликации и транскрипции, а затем к гибели клеток (Kurrner, 2008). Третий механизм: неправильное образование нуклеотидов, приводящее к мутациям. Алкилирующие агенты, посредством химических взаимодействий, образуют ковалентные связи с ДНК. Это приводит к «ошибкам» в ДНК, что может привести к ошибкам, замене или удалению. Клеточный ответ этих ошибок может препятствовать синтезу и пролиферации ДНК, или они могут приводить к апоптозу (Damia, 1998; Longley, 2005).

### **1.2.1. Циклофосфамид**

Циклофосфамид (ЦФ) является одним из самых эффективных противоопухолевых алкилирующих агентов для лечения гематологических

злокачественных опухолей и различных солидных опухолей, включая лейкемию, рак яичников и мелкоклеточный рак легкого (Júlio, 2011). ЦФ по своей химической структуре относится к алкилирующим агентам из группы оксазафосфоринов. Он представляет пролекарство (латентное лекарство) и требует внутриклеточной активации, которая быстрее и активнее всего происходит в опухолевых и активированных лимфоидных клетках. Структурная формула ЦФ представлена на рис. 1.1.

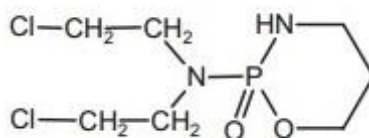


Рис. 1.1. Структурная формула циклофосфамид (Телегин, 2012)

Интернациональное химическое название циклофосфамида – N,N-бис(2хлорэтил)тетрагидро-2-Н-1,3,2-оксазафосфорин-2-амин-2-оксид).

Молекулярная масса ЦФ равна 261,087 Да. Как правило, используют кристаллический моногидрат ЦФ. Это белый кристаллический порошок без запаха, растворим в воде, хуже – в физиологическом растворе и очень хорошо растворим в этаноле, бензоле, хлороформе, диоксане, этиленгликоле, ацетоне и эфире (Телегин, 2012).

ЦФ биоактивируется ферментами цитохрома Р450 печени, что приводит к образованию фосфорамидного иприта и акролеина (Júlio, 2011). На первом этапе происходит активация ЦФ с помощью изоформ цитохрома Р450 печени – реакция окислительного гидроксирования атома углерода в 4 положении кольца. В результате образуется главный метаболит циклофосфамида – 4-гидроксициклофосфамид (4-ОН-ЦФ), который поступает в кровь и транспортируется в опухолевые клетки эритроцитами. Поскольку 4-ОН-ЦФ является нестабильным продуктом, он находится в равновесии со своим таутомерным альдофосфамидом (рис. 1.2).

4-ОН-ЦФ и альдофосфамид в дальнейшем подвергаются превращениям, идущим по двум путям:

В первом пути – 4-ОН-ЦФ с помощью фермента алкогольдегидрогеназы (ADH) – инактивируется (Yule et al., 2004) в относительно нетоксичный метаболит – 4-кетоциклофосфамид. Альдофосфамид с помощью фермента – цитозольной альдегиддегидрогеназы ALDH1A1 и, в меньшей степени, – ALDH3A1 и ALDH5A1 окисляется до карбоксифосфамида. Карбоксифосфамид считается одним из главных химически стабильных метаболитов ЦФ, который легко определяется в плазме крови и в моче (Joqueviel et al., 1998).

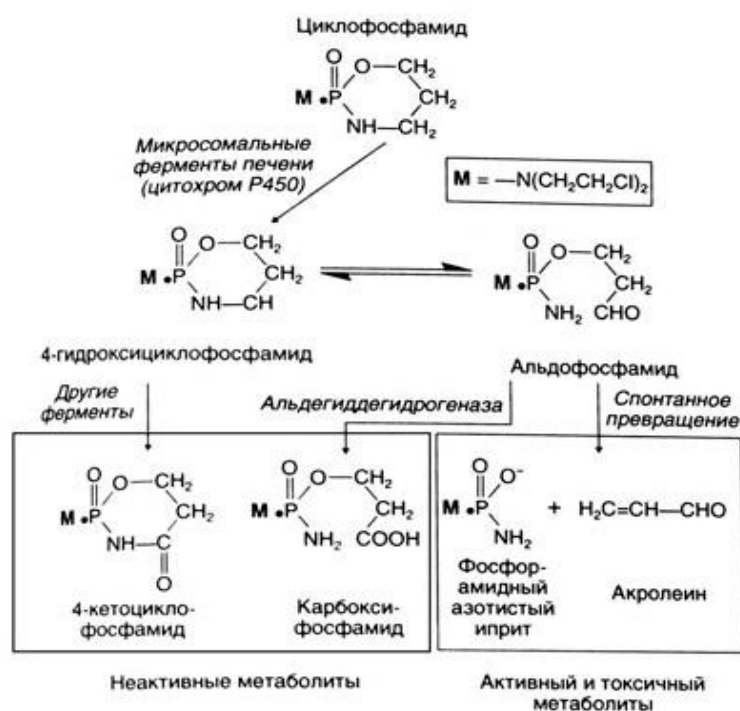


Рис.1.2. Метаболизм циклофосфамида (Гилман, 2006)

Второй путь метаболизма ЦФ – это превращение в токсические продукты. Альдофосфамид путём реакции  $\beta$ -элиминации спонтанно расщепляется на акролеин и фосфорамидный иприт (phosphoramidate mustard, PM) (Zhang et al., 2005, 2006). Согласно Shanmugarajan et al. (2008), терапевтический эффект циклофосфамида связан с фосфорамидным азотным ипритом, а акролеин вызывает токсические побочные эффекты.

Фосфорамидный иприт образует ДНК-сшивки между (межслоевыми сшивками) и внутри (внутри- и поперечные сшивки) нитей ДНК на положениях гуанина N-7 (рис. 1.3). После образования сшивки ДНК опухолевые клетки подвергаются апоптозу, инициированному повреждением ДНК и ингибированию репликации ДНК, модуляции клеточного цикла и другим антипролиферативным эффектам (Bhatia et al., 1995; O'Connor et al., 1991; Dong et al., 1995).

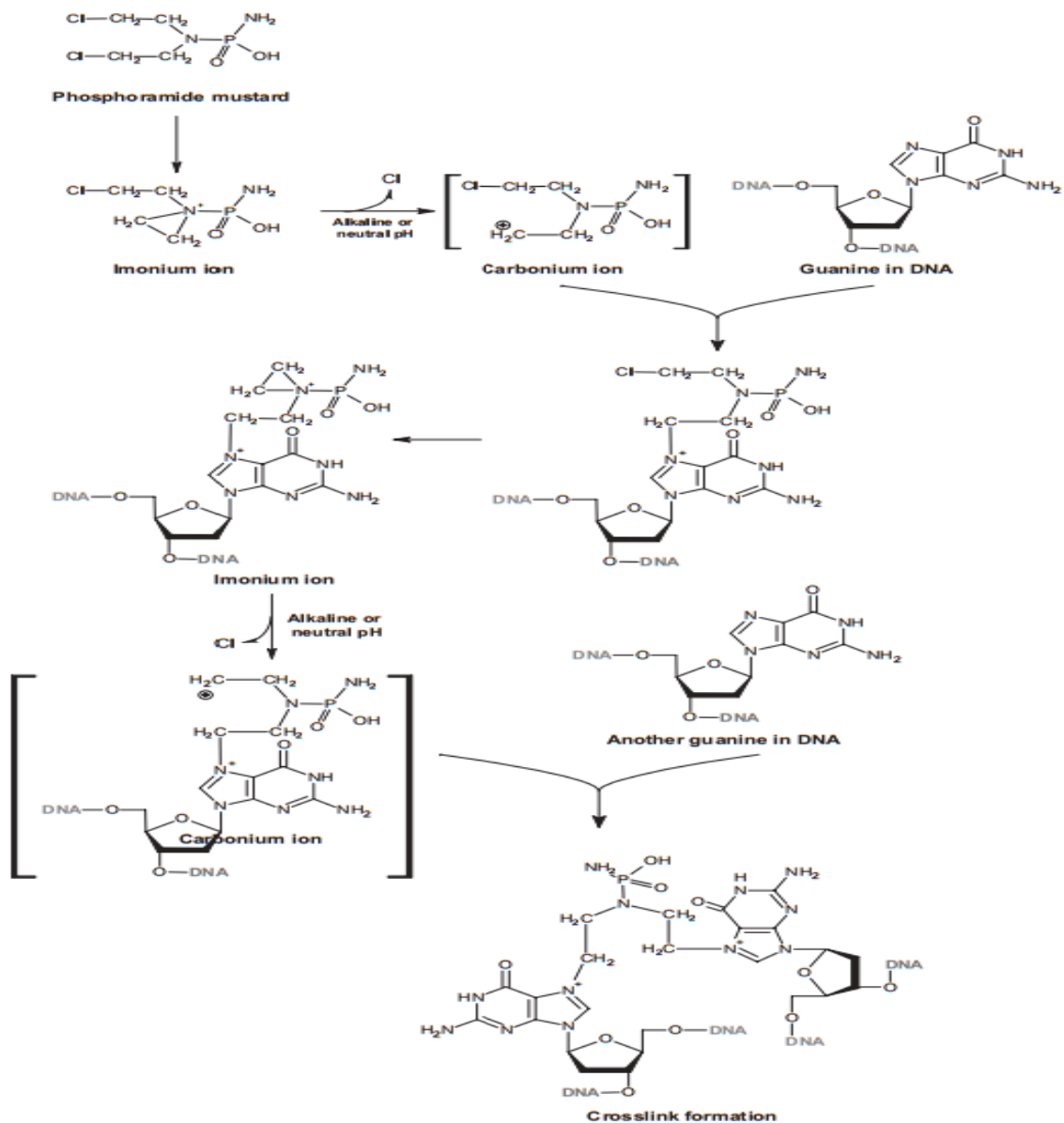


Рис. 1.3. Механизм алкилирования 7-атома азота гуанина в молекулах ДНК с помощью фосфорамидного иприта в результате активации ЦФ (Zhang et al., 2005)



Апоптоз характеризуется каскадной активацией внутриклеточных цистеинпротеаз (каспаз). Лекарственный апоптоз всегда опосредуется митохондриальным путем (рис. 1.4).

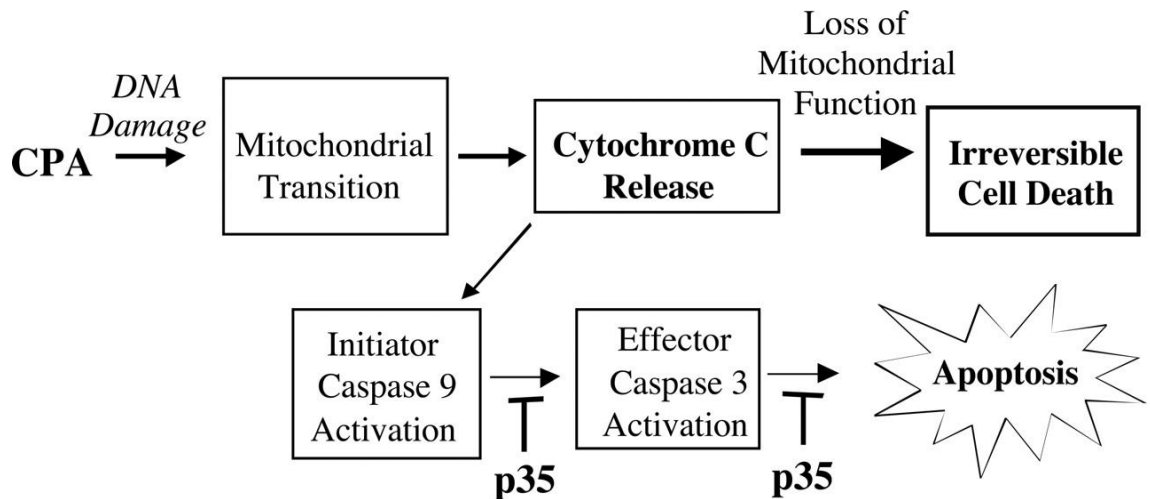


Рис. 1.4. Роль p35 в ингибировании апоптоза без блокирования гибели опухолевых клеток (Riddick et al., 2005)

Повреждение ДНК, индуцированное P<sub>450</sub>-активированным циклофосфамидом, приводит к митохондриальному переходу, высвобождению цитохрома С и активации каспазы 9-зависимого апоптотического пути (Schwartz, Waxman, 2001). Общий путь гибели клеток, индуцированный циклофосфамидом, блокируется в опухолевых клетках, которые сверхэкспрессируют митохондриальный антиапоптотический фактор Bcl-2, который ингибирует высвобождение цитохрома С из митохондрий, тем самым придавая лекарственную устойчивость к обработанным циклофосфамидом опухолевым клеткам (Schwartz et al., 2002). Бакуловирусный белок p35 является ингибитором панкаспазы, который блокирует активность каспазы и последующий апоптотический ответ после митохондриального перехода. Белок p35 действует таким образом, чтобы не прерывать вызванную лекарствами потерю функции митохондрий, что в конечном итоге приводит к необратимой гибели опухолевых клеток (Sun et al., 1999).

ЦФ обладает цитогенетическим действием. Его мутагенный эффект наблюдается в клетках костного мозга при введении препарата в высоких концентрациях. Он выражается в появления множественных хромосомных aberrаций преимущественно хроматидного типа, что указывает на избирательность повреждения клеток в фазе S или G2. Максимум aberrаций исследователи фиксировали через 24 ч после введения препарата (Ren, 2002). Хроматидный характер повреждений позволяет отнести ЦФ к мутагенам «задержанного» типа. Высказывается мнение, что в реализации антибластического эффекта определенную роль играет повышение иммуногенности опухолевых клеток, а также увеличение нуклеотидов (Быковская, 1996).

В механизме действия ЦФ важную роль играют изменения в структурах митохондрий, приводящие к нарушению энергетики клетки. Это основано на том, что уже через несколько часов после воздействия препарата выявляются ультрамикроскопические изменения в митохондриях опухолевых клеток. Они разбухают, их кристы дезорганизуются, внутренняя мембрана повреждается и распадается на отдельные фрагменты, что, в свою очередь, ведет к нарушению окислительного фосфорилирования и дыхания клетки (Wen et al., 2013).

Изменения, вызванные циклофосфамидом в клеточном цикле опухоли, довольно стабильны и сохраняются в течение длительного времени. Наилучший эффект препарата, исследователи отмечают при введении лекарственного средства в период, предшествующий максимальной митотической активности, т.е. когда большинство клеток находится в премитотической фазе перед выходом в митоз (Zhang, Tian, Zhou, 2006).

Токсичность акролеина, прежде всего, связана с удалением внутриклеточных тиолов и других нуклеофильных молекул, а также с влиянием на активность генов, либо непосредственно стимулируя семейство генов, регулируемых так называемыми электрофильными реагирующими

элементами (electrophile response elements, ERE, относящимся к группе антиоксидантных элементов), либо опосредуемо через транскрипционные факторы, как это наблюдается, например, при активации Ah-рецептора (Тутельян и др., 2003). Итогом этих событий является нарушение баланса окислительно-восстановительных реакций, подавление пролиферации, индукция апоптоза и гибель клетки (Kehrer, Biswal., 2000). Механизмы токсического действия акролеина представлены на рисунке 1.5.

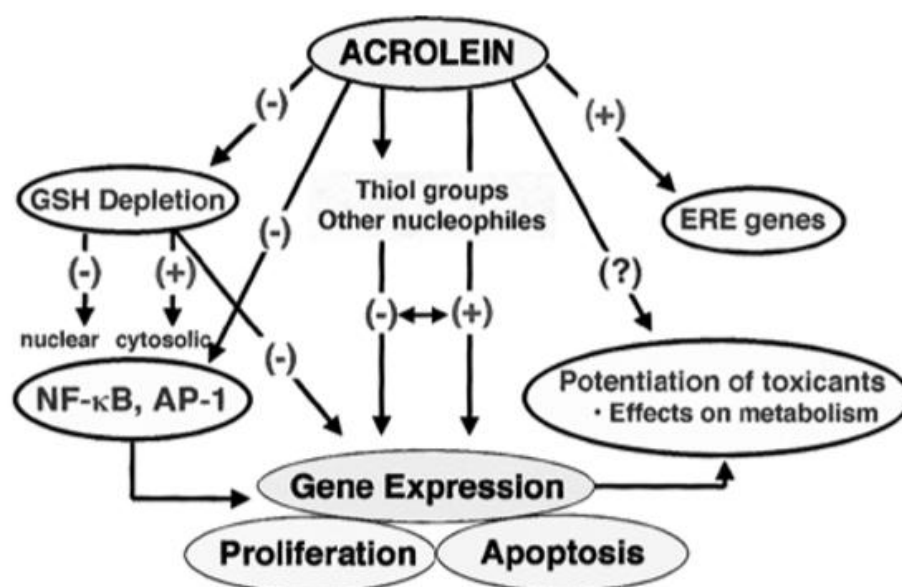


Рис. 1.5. Молекулярные механизмы действия акролеина на клетку  
(Kehrer, Biswal, 2000)

Акролеин, высокореактивный ненасыщенный альдегид. На клеточном уровне воздействие акролеина имеет разнообразные токсические эффекты, включая аддукцию ДНК и белка, разрушение митохондрий, повреждение мембраны, стресс эндоплазматического ретикулума и иммунную дисфункцию (Moghe, Ghare, 2015). Акролеин в настоящее время рассматривается как один из самых сильных индукторов окислительного стресса в организме. В работе Adams и Klaidman (1993) показано, что акролеин и его глутатион-аддукт, глутатионилпропиональдегид, вызывают образование кислородных радикалов. Глутатион является основным

защитным механизмом против токсичности ЦФ (Aleksa, 2005). Акролеин окислялся ксантинооксидазой с образованием акролеинильного радикала и  $O^{2-}$  (Luo, Shi, 2004; 2005).

Клеточный механизм токсичности ЦФ обусловлен образованием высоко реактивных свободных радикалов кислорода его метаболитами. Согласно данным литературы, высокие уровни активных форм кислорода в организме могут инициировать окислительный стресс (Lou et al., 2005; Júlio, 2011).

### 1.2.2. Ифосфамид

Ифосфамид (ИФ) относится к группе оксафосфориновых цитостатиков и является структурным аналогом циклофосфамида. По химическому строению ИФ представляет 3-(2-хлорэтил)-2-(2-хлорэтил)амино-тетрагидро-2-Н-1,3,2-оксафосфорин-3-оксид (рис. 1.6)

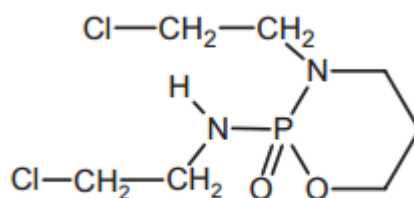


Рис. 1.6. Структурная формула ифосфамида (Hadjiliadis, Govert, 2000)

В литературе описано три механизма, посредством которых ИФ снижает способность опухолевых клеток к пролиферации: 1 – прямое взаимодействие с ДНК в ядре; 2 – активация проапоптотических путей и 3 – уменьшение воспалительных и антиапоптотических путей. ИФ транслоцируется в ядро посредством пассивной диффузии. В ядре ИФ реагирует с ДНК с помощью ковалентной связи между его высокореактивной алкильной группой и нуклеофильными группами ДНК, образующей внутри- и межслойные сшивки. Эти разрывы ДНК приводят к неспособности

синтезировать ДНК и к апоптозу клеток с помощью каскада каспаз (Madhusudan, Wilson, 2013).

Метаболизм ИФ в основном аналогичен метаболизму ЦФ (рис. 1.7).

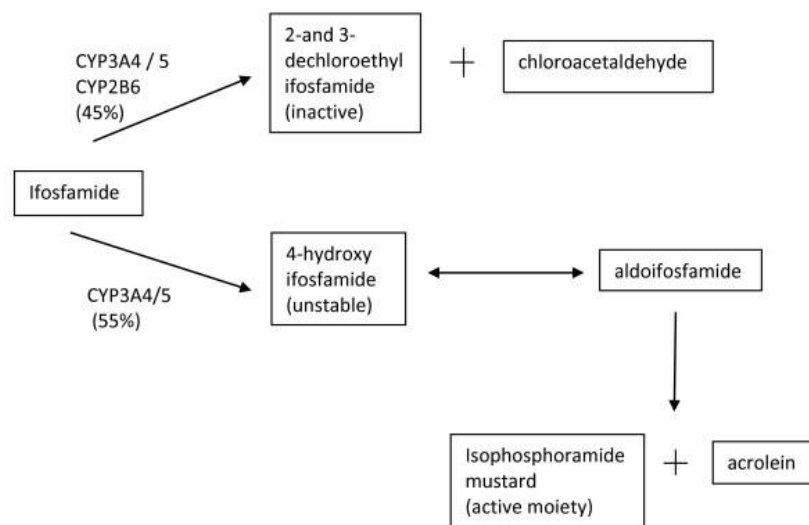


Рис. 1.7. Метаболизма ифосфамида (Cheung et al., 2011).

В качестве пролекарства ИФ активируется по идентичному пути посредством 4-гидроксилирования CYP2B6 и CYP3A4 с образованием цитотоксического ифосфамидного горчичного вещества и побочного альдегидного промежуточного хлорацетальдегида (Chen et al., 2004; Huang et al., 2000; Sladek, 2002). Ифосфамидный азотный иприт является конечным алкилирующим агентом ИФ, который является цитотоксическим, способным образовывать ковалентную связь с электрофильными остатками молекулы ДНК и вызывать сшивки между цепями ДНК (Furlanut, Franceschi, 2003). Подобно ЦФ, 4-ОН-ИФ метаболизируется до неактивных метаболитов 4-кето-ИФ с помощью алкогольдегидрогеназы и 4-тио-ИФ с конъюгацией восстановленного глутатиона. Альтернативно, таутомер 4-ОН-ИФ, альдоифосфамид может разлагаться с образованием цитотоксического ифосфорамида азотного иприта с одновременным образованием акролеина путем спонтанного  $\beta$ -элиминирования и неактивных метаболитов карбоксифосфамида альдегиддегидрогеназами (Boddy, Yule, 2000).

Способность ИФ сшивать ДНК не только препятствует пролиферации опухолевых клеток, но также изменяет иммунный ответ человека. ИФ вызывает истощение внутриклеточного глутатиона (GSH) – главного антиоксиданта. Множественные метаболиты ИФ могут реагировать с GSH, приводя к образованию различных конъюгатов. Этот пониженный уровень GSH проявляется в Т-клетках и естественных киллерах, что снижает функциональность иммунного ответа. ИФ влияет на дифференциальные опосредованные дендритными клетками эффекторные пути, в частности, на естественные клетки-киллеры. Однако это подавление опосредованной дендритными клетками пролиферации естественных киллерных клеток является косвенным и через Т-клетки. Низкие уровни GSH снижают способность дендритных клеток стимулировать продукцию ИЛ-2 Т-клеток (Kupfer et al., 2008).

ИФ структурно отличается от ЦФ только положением одной хлорэтильной группы (Kaijser et al., 1994). Это различие приводит к количественным различиям в их биотрансформации в печени. Хотя циклофосфамид почти полностью превращается в его активный 4-гидроксиметаболит у людей, до 50% ИФ метаболизируется в хлорацетальдегид (САА) по второму пути. Более того, другие факторы, такие как большая длина сшивающего расстояния ИФ и его более продолжительный период полураспада, могут способствовать этому различию (Kamen et al., 1995). По этой причине требуется примерно в четыре раза больше ИФ, чтобы дать тот же цитотоксический эффект, что и ЦФ. На сегодняшний день считается, что САА отвечает за побочные эффекты ИФ, такие как нейро- и нефротоксичность (Brain et al., 1998).

Акролеин, токсический побочный продукт активации ИФ, представляет собой ненасыщенный и высокореактивный альдегид. При активации акролеин может проникать в клетки уротелии и активировать внутриклеточные реактивные окислительные гены, что приводит к

продукции пероксинитрита, которая может повредить белки, ДНК и липиды. Накопление акролеина в мочевом пузыре приводит к геморрагическому циститу (MacAllister, 2013).

Ферменты альдегиддегидрогеназы ALDH1A1 могут детоксифицировать акролеин и САА путем окисления до менее токсичных карбоновых кислот, акриловой кислоты и хлоруксусной кислоты. Поэтому ингибирование альдегиддегидрогеназы способствует повышенной токсичности. Считается, что гиперэкспрессия ALDH1A1 и ALDH3A1 способствует устойчивости к ИФ. Другим возможным фактором, способствующим устойчивости к ИФ, является фермент MGMT (O(6)-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза (MGMT) – репарационный белок ДНК), ответственный за восстановление предканцерогенного и дотоксического повреждения ДНК. MGMT обладает способностью восстанавливать более крупные аддукты, образовавшиеся из-за метилирования или хлорирования агентов, таких как акролеин. Таким образом, MGMT может распознавать и восстанавливать аддукты, индуцированные акролеином. Исследования показали, что при высоких концентрациях MGMT в опухолевых клетках эти клетки, наоборот, менее чувствительны к механизмам ингибирования роста ИФ (Hansen et al., 2007).

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Забор крови и условия эксперимента**

Исследования выполнены на базе кафедры биологии ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ». В ходе исследования использовали венозную кровь больных острым лимфобластным лейкозом (n=15), острым (n=25) и хроническим миелобластным лейкозом (n= 12), а также лимфомой (n= 5). Все пробы крови отобраны на стадии лечения болезни. Забор крови осуществляли с участием специализированного медицинского персонала, на базе гематологического отделения областной клинической больницы им. Св. Иоасафа г. Белгорода.

Кровь получали путем венепункции, собирали в вакуумные пробирки Vacutte КЗЕ, содержащие сухую ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) в концентрации 2,0 мг на 1 мл крови. Лейкоцитарную суспензию получали путем центрифугирования венозной крови при 1500 об./мин в течение 10 минут. После этого отбирали надосадочную жидкость и лейкоцитарное кольцо, затем центрифугировали 5 минут при той же скорости. Полученную клеточную суспензию ресуспендировали в среде RPMI 1640.

Для эксперимента использовали препарат циклофосфамид/ифосфамид в трех разных концентрациях, выбранных согласно используемым схемам лечения (2 мг/мл; 0,02мг/мл и 0,0002 мг/мл).

### **2.2. Определение жизнеспособности лейкоцитов**

В пробирки помещали лейкоцитарную суспензию, среду RPMI-1640 и раствор циклофосфамида/ифосфамида в равных количествах по 10 мкл. В качестве контроля использовали пробы, состоящие из суспензии клеток и среды RPMI-1640 без добавления препаратов. Далее инкубировали пробирки в термостате при температуре 37°C в течение 24 часов.

После инкубации клеток с циклофосфамидом/ифосфамидом оценивали жизнеспособность клеток крови. Тест проводили путем окрашивания



культуры клеток 0,4% раствором трипанового синего. Подсчет числа окрашенных (мертвых) и неокрашенных (живых) клеток осуществляли в камере Горяева. Жизнеспособность клеток вычисляли по формуле:

$$N = 1 - \left(\frac{X_1}{X_2}\right) \times 100 \quad (1)$$

где N – число жизнеспособных клеток, (%);

$X_1$  – число окрашенных (мертвых) клеток;

$X_2$  – общее число клеток.

Число жизнеспособных клеток на 1 мл культуры рассчитывали по формуле:

$$C = X_3 \times 10^4 \times R \quad (2)$$

где C – число жизнеспособных клеток на 1 мл культуры;

$X_3$  – число неокрашенных клеток;

$R = 1,1$  – коэффициент разведения при подсчете в камере Горяева.

### **2.3. Изучение структуры и свойств клеточной поверхности методом атомно-силовой микроскопии**

Влияние препарата на структуру клеточной поверхности исследовали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). АСМ представляет собой один из наиболее современных методов в медицинских, биологических и биофизических исследованиях благодаря своим уникальным способностям. В отличие от электронной микроскопии, данный метод позволяет исследовать легкодеформируемые объекты (в том числе биологические), не требует сложных методов фиксации, этапов окрашивания, но дает возможность получать истинный трехмерный рельеф поверхности исследуемого объекта с наномасштабным пространственным разрешением (Bolshakova и др., 2004). АСМ широко применяется для выяснения ультраструктурных изменений и

появления новых клеточных структур, таких как образование псевдоподий на поверхности клеток, распределение молекул на клеточной поверхности. Выявленные изменения могут свидетельствовать о биохимических или биомеханических свойствах, индуцированных внутриклеточными процессами (Oddershede, 2012).

Принцип работы атомно-силового микроскопа основан на регистрации межатомного взаимодействия между наноразмерным острым зондом и поверхностью исследуемой клетки. Зонд закрепляется на свободном конце упругим кантилевером, отклонение которого происходит за счет сил взаимодействия. Детектор измеряет степень отклонения кантилевера по мере прохождения зонда над клеткой, в результате чего получается карта топографии поверхности клетки и кривая зависимости силы от расстояния (Давлеткильдеев и др., 2011) (рис. 2.1а).

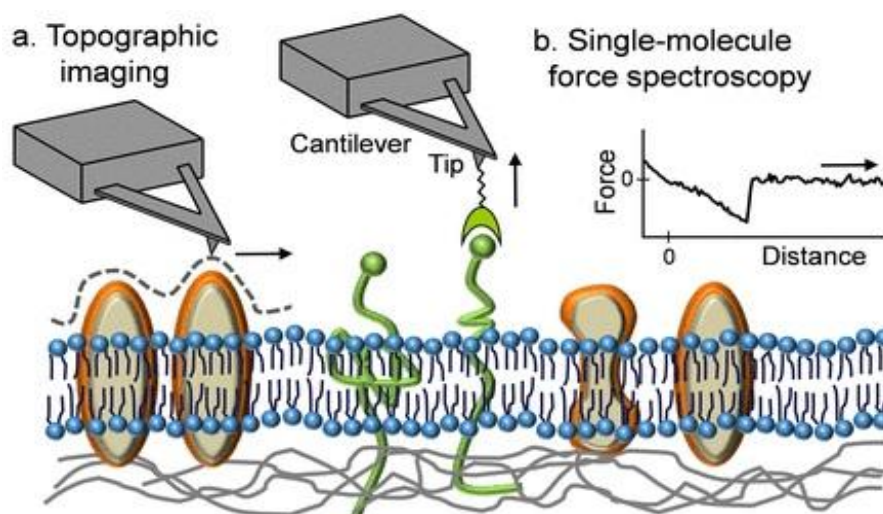


Рис. 2.1. Модель работы АСМ: а – топографическое изображение  
 б – кривая зависимости силы от расстояния (Dufrêne, 2014)

Препараты для исследований структуры и функциональных параметров лимфоцитов готовили путем нанесения инкубированной ранее клеточной суспензии на обезжиренное предметное стекло согласно разработанному на кафедре «Способу исследования нативных клеток крови» (патент РФ №

2398243) и помещали во влажную камеру, запатентованную коллективом кафедры (патент РФ № 98248). Из каждой пробы сканировали по 15 лимфоцитов на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА ВИТА (NT-MDT, Зеленоград, 2009) в полуконтактном режиме. Для сканирования использовали кантилеверы серии NSG 03. На полученных сканах изучали структуру рельефа поверхности. Используя программное обеспечение Nova (Зеленоград, 2009) строили кривые профиля бокового сечения плазмалеммы площадью  $3 \times 3$  мкм, на которых посчитывали число морфологических образований поверхности и измеряли их линейные размеры (рис. 2.2).

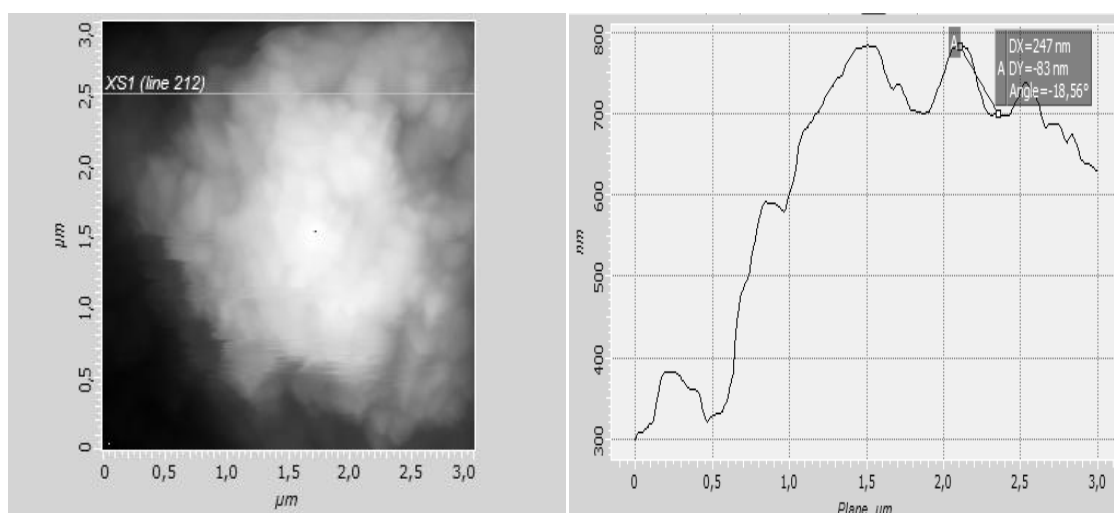


Рис. 2.2. АСМ-изображение и вид профиля поверхности:

А – глобулярный выступ на профиле поверхности

(по оси абсцисс – длина профиля сечения, по оси ординат – высота профиля сечения)

Модуль Юнга, характеризующий жесткость клеточной поверхности измеряли на атомно-силовом микроскопе в режиме силовой спектроскопии. Для этого использовали стандартный зондовый датчик серии NSG03, нагрузку на клеточную поверхность осуществляли в 25 точках наноидентификации (рис. 2.3).

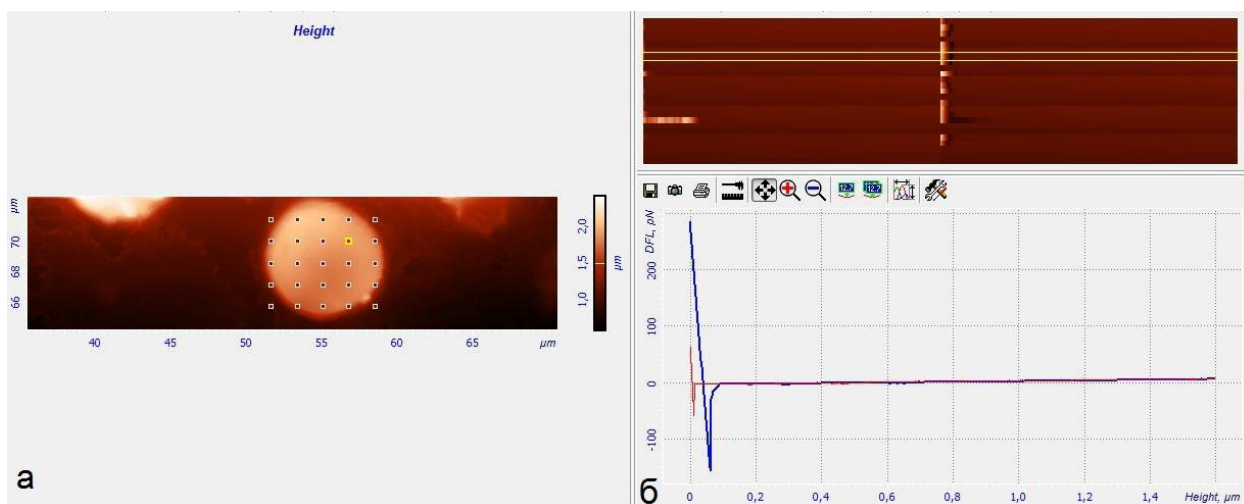


Рис. 2.3. Точки наноиdentирования, силовые кривые и карта упругости лимфоцита: а – изображение клетки; б – экспериментальные кривые сближения зонда с поверхностью (синяя – кривая подвода, красная – кривая отвода зонда)

В результате проведения АСМ-спектроскопии получали силовые кривые подвода и отвода (см. рисунок 2.2а). Для расчета модуля Юнга использовали кривые подвода, которые с помощью скрипта `DFL_to_Force` программного обеспечения Nova (NT-MDT, Россия, 2009) преобразовывали из системы координат «ток рассогласования – высота» в систему координат «сила – высота». Все расчеты проводили согласно формулам, изложенным в работе (Скоркина и др., 2012).

Обработку экспериментальных данных осуществляли методами вариационной статистики. В работе представлены данные с их средними стандартными ошибками. Проверку на нормальность распределения проводили с помощью стандартизованных коэффициентов асимметрии и эксцесса. Достоверность полученных данных оценивали по критерию Манна – Уитни (для непараметрических данных) и критерию Стьюдента (для нормально распределенных данных) для 5%-го уровня значимости.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Влияние препаратов алкилирующего типа действия на жизнеспособность лейкоцитов больных лейкозом

В результате проведенных экспериментов в опытах *in vitro* выявлено, что число жизнеспособных лейкоцитов снижалось в зависимости от концентрации циклофосфамида и ифосфамида. Так, при максимально использованной дозе циклофосфамида (2 мг/мл) процент жизнеспособных лейкоцитов в группе больных ОМЛ снизился практически в 2,5 раза по сравнению с контролем. При уменьшении концентрации циклофосфамида до 0,02 и 0,0002 мг/мл жизнеспособность лейкоцитов уменьшилась соответственно на 43% и 17% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (табл. 1).

Таблица 1

Процент жизнеспособных лейкоцитов больных лейкозом при инкубации с циклофосфамидом (%)

Тип лейкоза	ОМЛ	ОЛЛ	Лимфома	ХМЛ
Контроль (без препарата)	74,3± 1,2	65,3± 4,8	83,8± 3,0	67,2± 4,0
2 мг/мл	28,1± 2,1*	26,2± 3,1*	30,7± 1,0*	34,2± 1,2*
0,02 мг/мл	42,5± 2,4*	39,3± 0,3*	50,4± 1,6*	46,9± 4,5
0,0002 мг/мл	62,0± 3,7*	56,6± 3,5	62,4± 2,7*	54,2± 7,8

*Примечания:\** Достоверность различий по сравнению с результатами измерений в контрольной пробе по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

У больных ОЛЛ под действием циклофосфамида при концентрации 0,02 мг/мл жизнеспособность лейкоцитов составила 26,2±3,1%, т.е снижена на 60% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. По мере снижения концентрации препарата до 0,0002 мг/мл около 40% ( $p < 0,05$ ) клеток теряли свою жизнеспособность (см. табл. 1).

В группе больных лимфомой также отмечали снижение числа жизнеспособных лейкоцитов соответственно на 64%, 40% и 25,5% ( $p < 0,05$ ) при концентрациях циклофосфамида соответственно 2 мг/мл, 0,02 мг/мл,

0,0002 мг/мл по сравнению с тем же показателем контрольной группы (см. табл. 1).

В результате инкубации лейкоцитов больных ХМЛ с циклофосфамидом в концентрации 2 мг/мл установлено достоверное снижение жизнеспособности клеток на 49% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (табл. 1).

При проведении исследования жизнеспособности лейкоцитов больных лейкозом под действием ифосфамида установлено, что наибольший процент (58,4%) жизнеспособных исследованных клеток у больных ОМЛ отмечался в пробе с дозой ифосфамида 0,0002 мг/мл. В ряде концентраций 2 мг/мл, 0,02 мг/мл жизнеспособность лейкоцитов была снижена соответственно на 54% и 45,6% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (табл. 2).

Таблица 2

Процент жизнеспособных клеток при инкубации с ифосфамидом

Тип лейкоза	ОМЛ	ОЛЛ	Лимфома	ХМЛ
Контроль (без препарата)	74,3± 1,2	65,3± 4,8	83,8± 3,0	57,2± 4,0
2 мг/мл	34,3± 2,2*	28,2± 5,7*	26,4± 1,3*	22,5± 0,3*
0,02 мг/мл	40,4± 2,7*	37,4± 3,8*	43,1± 4,5*	31,1± 3,8*
0,0002 мг/мл	58,4± 0,9*	49,9± 3,9*	64,4± 5,3*	47,4± 12,1

*Примечания:\** Достоверность различий по сравнению с результатами измерений в контрольной пробе по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

В группе больных ОЛЛ через 24 ч инкубации в пробах с концентрацией ифосфамида 0,0002 мг/мл 50% ( $p < 0,05$ ) клеток сохраняли свою жизнеспособность, а при максимальной концентрации (2 мг/мл) жизнеспособность клеток составляла  $28,2 \pm 5,7\%$  (см. табл. 2).

Исследования показали что у больных лимфомой жизнеспособность клеток значительно снижена в пробах с концентрациями ифосфамида 2 мг/мл (на 68,5%) и 0,02 мг/мл (на 48%) ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Она составляла  $64,4 \pm 5,3\%$  при концентрации ифосфамида 0,0002 мг/мл (см. табл. 2).

У больных ХМЛ в пробах с концентрацией ифосфамида 2 мг/мл  $22,5 \pm 0,3\%$  клеток сохраняли жизнеспособность. В пробах с концентрацией препарата 0,02 мг/мл выживаемость клеток снижена на 55% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

Таким образом, влияние препаратов алкилирующего типа действия в условиях *in vitro* на жизнеспособность лейкоцитов больных лейкозом носит дозозависимый характер. При максимально использованной дозе препаратов (2 мг/мл) процент жизнеспособных исследованных клеток у больных всеми типами лейкоза снизился практически в 2-2,5 раза по сравнению с контролем. Анализируя результаты исследования, установлено, что жизнеспособность лейкоцитов снижается с увеличением дозы препарата. Однако 100% гибели клеток ни в одной из исследованных пробы не наблюдали, следовательно, опухолевые клетки выработали механизмы резистентности к препаратам данного типа.

### **3.2. Влияние циклофосфамида и ифосфамида на упруго-эластические свойства лимфоцитов больных лейкозом**

Учитывая, что часть популяции опухолевых клеток сохраняла свою жизнеспособность к препаратам алкилирующего типа действия, на следующем этапе эксперимента, мы изучали свойства лимфоцитов резистентных к ифосфамиду и циклофосфамиду.

Острый лимфобластный лейкоз. Под влиянием циклофосфамида в концентрации 2 мг/мл у резистентных лимфоцитов установлено повышение модуля Юнга по краю цитоплазмы клетки на 21% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (табл. 3).

Таблица 3

Величины модуля Юнга резистентных лимфоцитов больных ОЛЛ под влиянием циклофосфамида и ифосфамида

Образцы		Модуль Юнга, $\mu\text{Pa}$			
		ПП	ОЯ	Я	Ц
Контроль		2,39 $\pm$ 0,06	2,38 $\pm$ 0,09	2,24 $\pm$ 0,16	2,35 $\pm$ 0,08
I	2 мг/мл	2,90 $\pm$ 0,14 <sup>u</sup>	2,48 $\pm$ 0,11	2,36 $\pm$ 0,20	2,58 $\pm$ 0,11
	0,02 мг/мл	2,36 $\pm$ 0,07 <sup>u</sup>	2,23 $\pm$ 0,12 <sup>u</sup>	2,18 $\pm$ 0,21	2,23 $\pm$ 0,09 <sup>u</sup>
	0,0002 мг/мл	1,87 $\pm$ 0,05 <sup>u</sup>	1,88 $\pm$ 0,07 <sup>u</sup>	1,89 $\pm$ 0,17	1,84 $\pm$ 0,06 <sup>u</sup>
II	2 мг/мл	3,28 $\pm$ 0,10 <sup>u</sup>	3,44 $\pm$ 0,23	3,27 $\pm$ 0,53	3,36 $\pm$ 0,15 <sup>u</sup>
	0,02 мг/мл	3,12 $\pm$ 0,12 <sup>u</sup>	2,90 $\pm$ 0,21 <sup>u</sup>	3,12 $\pm$ 0,31 <sup>u</sup>	3,01 $\pm$ 0,19 <sup>u</sup>
	0,0002 мг/мл	2,59 $\pm$ 0,07	2,46 $\pm$ 0,12	2,40 $\pm$ 0,23	2,48 $\pm$ 0,11

Примечание: I – Циклофосфамид; II – Ифосфамид; ПП – подмембранное пространство, Ц – цитоплазма, ОЯ – околядерное пространство, Я – ядро. <sup>u</sup> – достоверное различие по сравнению с результатами измерений в контрольной пробе по U- критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

В образцах с концентрацией циклофосфамида 0,02 мг/мл величина модуля Юнга лимфоцитов незначительно снизилась: на 5,7% ( $p < 0,05$ ) по периферии цитоплазмы, на 6,6% ( $p < 0,05$ ) – в области околядерного пространства и на 5,2% ( $p < 0,05$ ) – в центре цитоплазмы. При инкубации с дозой циклофосфамида 0,0002 мг/мл жесткость поверхности лимфоцитов ниже в среднем на 22% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (см. табл. 3).

Под действием препарата ифосфамида в концентрации 2 мг/мл модуль упругости клеток был выше в области подмембранного пространства на 37% ( $p < 0,05$ ) и на 43% ( $p < 0,05$ ) – в области цитоплазмы по сравнению с контролем. В пробах с концентрацией 0,02 мг/мл упругость поверхности лимфоцитов значительно возросла во всех областях. Так наибольшее увеличение модуля Юнга зафиксировано в области ядра – на 39% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольными пробами.

Таким образом, циклофосфамид и ифосфамид в опытах *in vitro* вызывают изменение упругости клеточной поверхности лимфоцитов больных ОЛЛ. Под действием циклофосфамида при концентрациях 0,02 мг/мл и 0,0002 мг/мл жесткость клеточной поверхности снизилась. В тоже время



под влиянием ифосфамида при концентрации 0,02 мг/мл зафиксировано увеличение модуля Юнга клеток по сравнению с контролем.

Лимфома. В группе пациентов с лимфомой, нами были изучены свойства опухолевых клонов лимфоцитов, резистентных к препаратам алкилирующего типа действия. Однако, в отличие от острого лимфобластного лейкоза, происхождение злокачественных типов клеток осуществляется в периферических лимфоидных органах.

В результате полученных данных установлено, что после инкубации лимфоцитов больных лимфомой как с циклофосфамидом, так и с ифосфамидом при всех используемых концентрациях препаратов модуль упругости в разных участках клеточной поверхности снижен. Под действием циклофосфамида дозой 2 мг/мл, жесткость поверхности лимфоцитов снизилась в среднем в 3,4 раза ( $p < 0,05$ ) в зонах околядерного пространства и цитоплазмы. Особенно в области ядра модуль Юнга достоверно снижен в 4 раза по сравнению с контролем (табл. 4).

Таблица 4

Величины модуля Юнга лимфоцитов у больных лимфомой под влиянием циклофосфамида и ифосфамида

Образцы		Модуль Юнга, $\mu\text{Pa}$			
		ПП	Ц	ОЯ	Я
Контроль		7,14 $\pm$ 0,31	7,60 $\pm$ 0,47	7,98 $\pm$ 0,49	8,78 $\pm$ 0,33
I	2 мг/мл	2,07 $\pm$ 0,01 <sup>u</sup>	2,31 $\pm$ 0,63 <sup>u</sup>	2,32 $\pm$ 0,10 <sup>u</sup>	2,23 $\pm$ 0,10 <sup>u</sup>
	0,02 мг/мл	2,48 $\pm$ 0,08 <sup>u</sup>	2,10 $\pm$ 0,10 <sup>u</sup>	1,98 $\pm$ 0,04 <sup>u</sup>	1,85 $\pm$ 0,11 <sup>u</sup>
	0,0002 мг/мл	2,69 $\pm$ 0,23 <sup>u</sup>	3,09 $\pm$ 0,48 <sup>u</sup>	2,62 $\pm$ 0,22 <sup>u</sup>	2,51 $\pm$ 0,13 <sup>u</sup>
II	2 мг/мл	3,10 $\pm$ 0,08 <sup>u</sup>	3,05 $\pm$ 0,11 <sup>u</sup>	3,11 $\pm$ 0,09 <sup>u</sup>	3,18 $\pm$ 0,12 <sup>u</sup>
	0,02 мг/мл	2,27 $\pm$ 0,16 <sup>u</sup>	2,08 $\pm$ 0,14 <sup>u</sup>	1,97 $\pm$ 0,08 <sup>u</sup>	1,87 $\pm$ 0,06 <sup>u</sup>
	0,0002 мг/мл	1,86 $\pm$ 0,03 <sup>u</sup>	1,91 $\pm$ 0,04 <sup>u</sup>	1,89 $\pm$ 0,04 <sup>u</sup>	1,94 $\pm$ 0,07 <sup>u</sup>

*Примечание: I – Циклофосфамид; II – Ифосфамид; ПП – подмембранное пространство, Ц – цитоплазма, ОЯ – околядерное пространство, Я – ядро. <sup>u</sup> – достоверное различие по сравнению с результатами измерений в контрольной пробе по U- критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).*

В пробе с концентрацией 0,02 мг/мл циклофосфамида отмечали снижение жесткости поверхности лимфоцитов больных лимфомой в области

подмембранного пространства в 3 раза ( $p < 0,05$ ), в зоне цитоплазмы – в 3,6 раз ( $p < 0,05$ ), в околядерной зоне – в 4 раза ( $p < 0,05$ ) в области ядра - в 4,7 раз ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. При концентрации 0,0002 мг/мл циклофосфамида в участках подмембранного пространства и цитоплазмы модуль Юнга клеточной поверхности снизился в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ), в перинуклеарной зоне – в 3 раза ( $p < 0,05$ ), в зоне ядра - в 3,5 раза ( $p < 0,05$ ) - по сравнению с контролем (см. табл. 4).

Согласно данным таблицы 4, ифосфамид приводил к снижению упругости во всех участках поверхности лимфоцитов больных лимфомой. В пробе с концентрацией ифосфамида 2 мг/мл жесткость клеточной поверхности больных лимфомой уменьшилась в 2,6 раз ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. В пробах с концентрацией препарата 0,02 мг/мл зафиксировано выраженное снижение модуля Юнга в 4 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. При используемой дозе препарата 0,0002 мг/мл жесткость поверхности поверхность достоверно не различалась (см. табл. 4).

Таким образом, под влиянием как циклофосфамида, так и ифосфамида модуль Юнга лимфоцитов больных лимфомой существенно снизился. Установлено, что жесткость клеточной поверхности была наименьшей при концентрации 2 мг/мл циклофосфамида, и концентрации 0,0002 мг/мл ифосфамида.

Острый миелобластный лейкоз. Развитие злокачественного миелобластного типа пролиферации сопровождается нарушением клеточного звена врожденного иммунитета, но вместе с тем, в кровотоке сохраняется популяция лимфоцитов, которые являются ключевыми участниками адаптивного иммунитета, однако их функциональная активность остается мало изученной. В связи с этим, важным аспектом является изучение свойств клеточной поверхности лимфоцитов, которая подвергается значительному влиянию со стороны химиотерапии. В связи с чем, в группе больных как ОМЛ, так и ХМЛ, мы изучали свойства поверхности нормальных

лимфоцитов, подвергшихся химиотерапевтическому воздействию препаратов алкилирующего типа действия.

После инкубации лимфоцитов больных ОМЛ с циклофосфамидом в максимальной дозе 2 мг/мл наблюдали снижение модуля Юнга клеток на 45,8% ( $p < 0,05$ ) в области цитоплазмы, на 55% ( $p < 0,05$ ) – в области ядра и околоядерном пространстве по сравнению с контролем. При уменьшении дозы препарата до 0,02 мг/мл жесткость поверхности лимфоцитов больных ОМЛ возросла в среднем на 23% ( $p < 0,05$ ) в областях цитоплазмы и ядра по сравнению с контролем. В образцах с концентрацией циклофосфамида 0,0002 мг/мл модуль упругости лимфоцитов снижен на 55% ( $p < 0,05$ ) в области цитоплазмы и на 60% ( $p < 0,05$ ) в околоядерной зоне по сравнению с контролем (табл. 5).

Таблица 5

Модуль Юнга поверхности лимфоцитов больных ОМЛ под влиянием циклофосфамида и ифосфамида

Образцы		Модуль Юнга, $\mu\text{Pa}$			
		ПП	Ц	ОЯ	Я
Контроль		5,32 $\pm$ 0,31	5,55 $\pm$ 0,33	5,82 $\pm$ 0,38	5,63 $\pm$ 0,58
I	2 мг/мл	2,88 $\pm$ 0,10	2,79 $\pm$ 0,18 <sup>u</sup>	2,65 $\pm$ 0,08 <sup>u</sup>	2,49 $\pm$ 0,14 <sup>u</sup>
	0,02 мг/мл	6,46 $\pm$ 0,27	7,44 $\pm$ 0,45 <sup>u</sup>	6,79 $\pm$ 0,27	7,62 $\pm$ 0,69 <sup>u</sup>
	0,0002 мг/мл	2,34 $\pm$ 0,12 <sup>u</sup>	2,53 $\pm$ 0,17 <sup>u</sup>	2,27 $\pm$ 0,06 <sup>u</sup>	2,27 $\pm$ 0,25
II	2 мг/мл	2,40 $\pm$ 0,09 <sup>u</sup>	2,41 $\pm$ 0,20 <sup>u</sup>	2,24 $\pm$ 0,18 <sup>u</sup>	2,54 $\pm$ 0,23 <sup>u</sup>
	0,02 мг/мл	6,41 $\pm$ 0,25	6,28 $\pm$ 0,18	6,48 $\pm$ 0,26	4,93 $\pm$ 0,35
	0,0002 мг/мл	6,23 $\pm$ 0,17	6,31 $\pm$ 0,13	5,79 $\pm$ 0,46 <sup>u</sup>	6,09 $\pm$ 0,15

*Примечание: I – Циклофосфамид; II – Ифосфамид; ПП – подмембранное пространство, Ц – цитоплазма, ОЯ – околоядерное пространство, Я – ядро. <sup>u</sup> – достоверное различие по сравнению с результатами измерений в контрольной пробе по U- критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).*

Инкубация лимфоцитов больных ОМЛ с ифосфамидом при концентрации 2 мг/мл приводила к снижению модуля Юнга во всех областях. По краю цитоплазмы и в области ядра значение модуля Юнга было ниже контроля на 54,8% ( $p < 0,05$ ), в области околоядерного пространства – на

61,5% ( $p < 0,05$ ). Жесткость поверхности перинуклеарной зоны лимфоцитов, инкубируемых с ифосфамидом при концентрации 0,0002 мг/мл достоверно не отличалась от контроля (см. табл. 5).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что под влиянием циклофосфида в максимальной (2 мг/мл) и минимальной (0,0002 мг/мл) дозах модуль Юнга лимфоцитов больных ОМЛ существенно снижен, а при средней дозе – 0,02 мг/мл – повышен. В отличие от циклофосфида, под влиянием ифосфамида при максимальной концентрации (2 мг/мл) достоверно снижена жесткость поверхности лимфоцитов до 61,5% по сравнению с контролем. При средней (0,02 мг/мл) и минимальной (0,0002 мг/мл) дозах ифосфамида статистически достоверных различий не установлено.

Хронический миелобластный лейкоз. Под действием циклофосфида (2 мг/мл) модуль упругости лимфоцитов больных ХМЛ достоверно уменьшился по краю цитоплазмы на 39%, в области околядерного пространства - на 54% по сравнению с контролем. По мере уменьшения концентрации препарата до 0,02 мг/мл наблюдали снижение модуля Юнга лимфоцитов практически в 2,4 раза ( $p < 0,05$ ) во всех участках клеточной поверхности по сравнению с контролем. При инкубации лимфоцитов больных ХМЛ с 0,0002 мг/мл циклофосфида жесткость поверхности в зоне цитоплазмы сохранялась на уровне контроля (табл. 6).

Таблица 6

Величины модуля Юнга у лимфоцитов больных ХМЛ под влиянием циклофосфамида и ифосфамида

Образцы		Модуль Юнга, $\mu\text{Pa}$			
		ПП	Ц	ОЯ	Я
Контроль		4,51 $\pm$ 0,17	4,77 $\pm$ 0,30	4,92 $\pm$ 0,44	5,21 $\pm$ 1,17
I	2 мг/мл	2,76 $\pm$ 0,24 <sup>u</sup>	3,32 $\pm$ 0,45	2,28 $\pm$ 0,20 <sup>u</sup>	2,11 $\pm$ 0,22
	0,02 мг/мл	2,06 $\pm$ 0,04 <sup>u</sup>	2,05 $\pm$ 0,02	2,07 $\pm$ 0,02 <sup>u</sup>	2,00 $\pm$ 0,03 <sup>u</sup>
	0,0002 мг/мл	4,33 $\pm$ 0,10 <sup>u</sup>	4,59 $\pm$ 0,29	4,37 $\pm$ 0,28	4,08 $\pm$ 0,17
II	2 мг/мл	2,30 $\pm$ 0,09	2,54 $\pm$ 0,26	2,22 $\pm$ 0,10 <sup>u</sup>	2,01 $\pm$ 0,04 <sup>u</sup>
	0,02 мг/мл	2,94 $\pm$ 0,11	4,41 $\pm$ 0,43	3,72 $\pm$ 0,69 <sup>u</sup>	5,04 $\pm$ 1,59
	0,0002 мг/мл	2,65 $\pm$ 0,12 <sup>u</sup>	2,73 $\pm$ 0,15 <sup>u</sup>	2,41 $\pm$ 0,079	2,44 $\pm$ 0,20

*Примечание: I – Циклофосфамид; II – Ифосфамид; ПП – подмембранное пространство, Ц – цитоплазма, ОЯ – околядерное пространство, Я – ядро. <sup>u</sup> – достоверное различие по сравнению с результатами измерений в контрольной пробе по U- критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).*

Из таблицы 6 следует, что при концентрации ифосфамид 2 мг/мл модуль Юнга в области околядерного пространства снизился на 55% ( $p < 0,05$ ), в области ядра – на 61,4% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. В пробах с концентраций препарата 0,02 мг/мл жесткость в околядерной зоне достоверно снизилась на 24,4% по сравнению с контрольной группой. Уменьшение дозы ифосфамида до 0,0002 мг/мл сопровождалось понижением упругости клеток в областях цитоплазмы и подмембранного пространства соответственно на 41,2% ( $p < 0,05$ ) и 42,7% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (см. табл. 6).

На основании проведенных исследований можно констатировать, что данные препараты изменяют упруго-эластические свойства лимфоцитов больных ХМЛ, существенно снижая их жесткость.

### 3.3. Цитоархитектоника лимфоцитов крови больных лейкозом под действием препаратов циклофосфида/ифосфида

Острый лимфобластный лейкоз. В результате проведенных исследований на поверхности лимфоцитов больных ОЛЛ установлено присутствие мелких глобулярных образований и инвагинаций (рис. 3.1а).

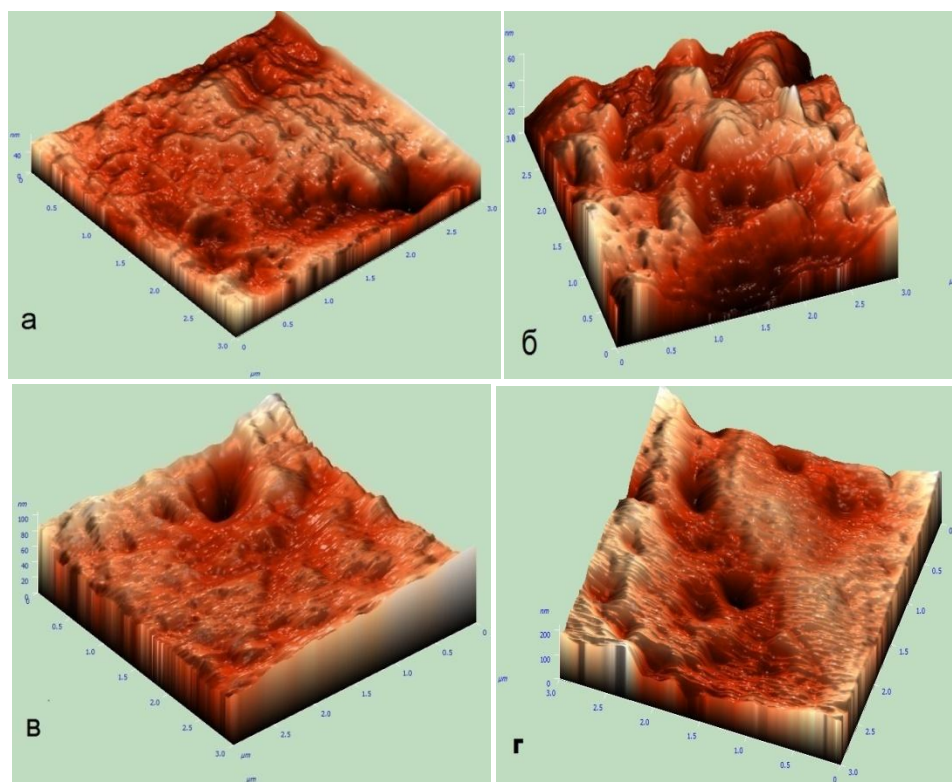


Рис. 3.1. Поверхность лимфоцитов больных ОЛЛ под действием циклофосфида в разных концентрациях: а – без добавления препарата; б – 2 мг/мл; в – 0,02 мг/мл; г – 0,0002 мг/мл

Под действием циклофосфида в концентрации 2 мг/мл на поверхности лимфоцитов присутствовали довольно крупные глобулярные выступы и инвагинации (рис. 3.1б). При этом общее число, высота и ширина глобулярных выступов плазмалеммы лимфоцитов больных ОЛЛ были увеличены соответственно на 50%, 170,8% и 94,6% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с лимфоцитами контрольной группы; число, глубина и ширина инвагинаций на

поверхности мембраны возросли соответственно на 42% ( $p<0,05$ ), 123% и 15% ( $p<0,05$ ) по сравнению с контролем (табл. 7).

Таблица 7

## Морфология поверхности лимфоцитов больных ОЛЛ

Пробы	Глобулярные выступы			Углубления в мембране		
	число	высота, нм	ширина, нм	число	глубина, нм	ширина, нм
Контроль	10,7±1,2	7,2±0,8	147,1±3,4	12,3±1,4	4,3±0,1	156,7±3,6
I	2 мг/мл	15,5±2,5 <sup>#</sup>	19,5±3,1 <sup>#</sup>	7,0±0,5 <sup>#</sup>	9,6±0,3 <sup>#</sup>	178,8±3,9 <sup>#</sup>
	0,02 мг/мл	8,8±1,2	6,8 ±2,2	197,5±5,8 <sup>#</sup>	4,6±1,1	6,4±1,4 <sup>#</sup>
	0,0002 мг/мл	4,5±0,4 <sup>#</sup>	4,8±0,2 <sup>#</sup>	176,5±4,2 <sup>#</sup>	12,1±1,2 <sup>#</sup>	7,4±0,2 <sup>#</sup>
II	2 мг/мл	17,3±3,8 <sup>#</sup>	9,4±0,4 <sup>#</sup>	122,5±2,5	5,8±0,6 <sup>#</sup>	3,3±0,1
	0,02 мг/мл	28,4±1,3 <sup>#</sup>	12,6±1,4 <sup>#</sup>	130,6±1,8	5,2±0,4 <sup>#</sup>	4,0±0,5 <sup>#</sup>
	0,0002 мг/мл	12,2±1,1	5,7±0,3	161,3±3,3	3,0±0,5	7,6±1,2 <sup>#</sup>

*Примечание:* # – достоверность различий в опытных пробах по сравнению с результатами измерений в контрольной пробе по критерию Стьюдента ( $p<0,05$ ).

I – циклофосфамид, II – ифосфамид

При концентрации циклофосфамида 0,02 мг/мл число глобулярных образований было снижено на 17,8% ( $p<0,05$ ), при этом их ширина достоверно увеличилась на 34,3% ( $p<0,05$ ) по сравнению с контролем. На поверхности лимфоцитов также появились большие углубления (рис. 3.1в); число углублений на мембране лимфоцитов уменьшилось на 62,3% ( $p<0,05$ ), их ширина возросла на 48,8% ( $p<0,05$ ), по сравнению с контролем. В пробах с концентрацией ЦФ 0,0002 мг/мл на поверхности лимфоцитов выявлены глубокие инвагинации (рис. 3.1г). Установлено, что число и высота глобулярных структур были снижены соответственно на 58% и 33,3% ( $p<0,05$ ), при этом их ширина увеличилась на 20% ( $p<0,05$ ) по сравнению с контролем (см. табл. 7).

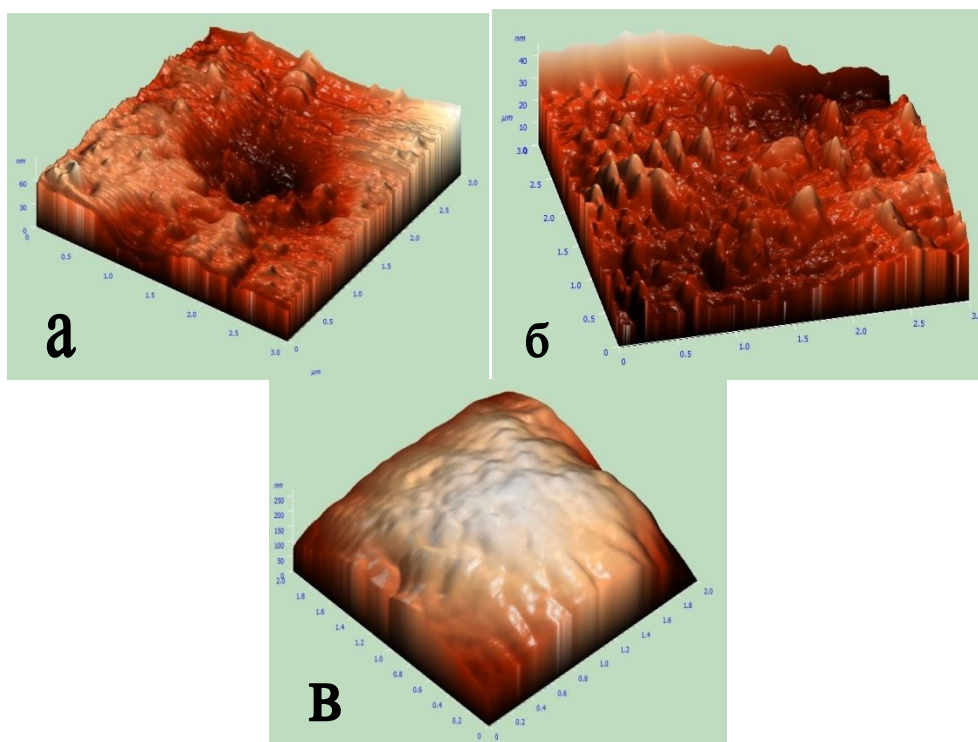


Рис. 3.2. Рельеф поверхности лимфоцитов больных ОЛЛ под действием ифосфамида при концентрации:

а – 2 мг/мл ; б – 0,02 мг/мл; в – 0,0002 мг/мл

Под действием ифосфамида (2 мг/мл) в рельефе поверхности лимфоцитов наблюдали присутствие острых мелких выступов и глубоких инвагинаций (рис. 3.2а). Общее число и высота глобулярных образований были повышены соответственно на 38% и 23% ( $p < 0,05$ ), на фоне уменьшения их ширины по сравнению с контролем. При уменьшении дозы ифосфамида до 0,02 мг/мл на поверхности лимфоцитов идентифицированы мелкие иглообразные выступы (рис. 3.2б), их число и высота возросли на 165,4% и 75% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Число и ширина инвагинаций плазмалеммы уменьшились соответственно на 58% и 26% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем ( см. табл.7).

Поверхность лимфоцитов под действием ифосфамида (0,0002 мг/мл) представлена на рисунке 3.2в. Число глобулярных структур было увеличено на 14% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Несмотря на небольшое число



инвагинаций на поверхности плазмалеммы, их глубина достоверно повышена на 43,4% по сравнению с контролем (см. табл. 7).

Согласно полученным данным циклофосфамид, ифосфамид существенно изменяли структуру поверхности лимфоцитов больных ОЛЛ. Установлено, что число глобулярных выступов и инвагинаций плазмалеммы, а также их габаритные размеры были увеличены при концентрации циклофосфамида 2 мг/мл; снижены – при концентрации 0,02 мг/мл и 0,0002 мг/мл по сравнению с контролем. Под действием ифосфамида во всех исследуемых концентрациях на поверхности лимфоцитов больных ОЛЛ появились многочисленные мелкие острые глобулярные структуры, высота которых была увеличена на фоне сокращения их ширины по сравнению с контролем.

Лимфома. Поверхность лимфоцитов больных лимфомой под действием циклофосфамида представлена в рисунке 3.3 а.

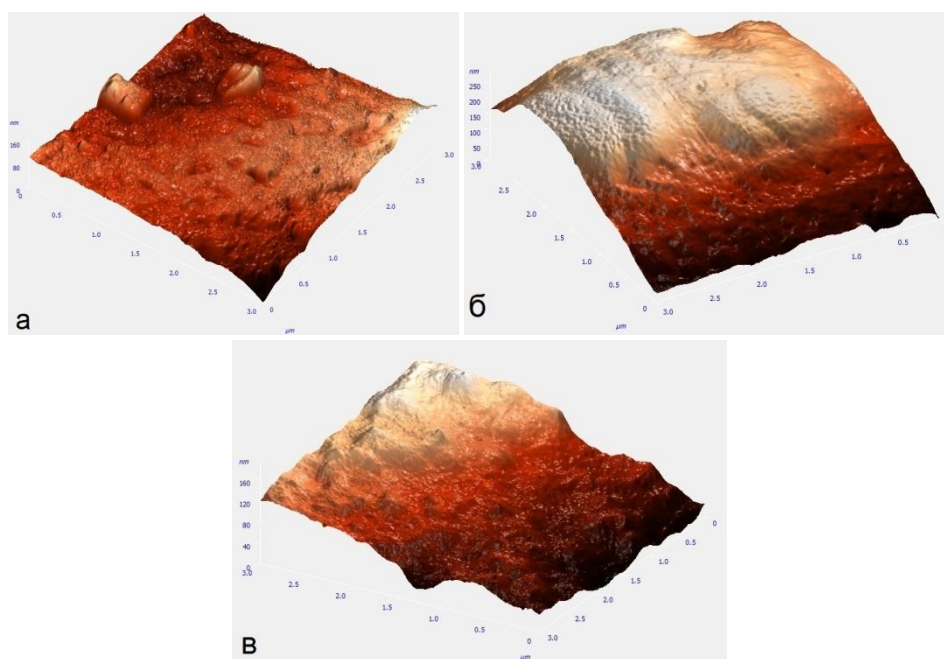


Рис. 3.3. Рельеф поверхности лимфоцитов больных лимфомой под действием циклофосфамида: а – без добавления препарата; б – 2 мг/мл; в – 0,02 мг/мл

При концентрации 2 мг/мл циклофосфамда высота и ширина глобулярных образований увеличились на 68% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Число инвагинаций на мембране уменьшились на 68% ( $p < 0,05$ ); одновременно их и глубина и ширина увеличилась соответственно на 45,6% и 26% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (табл. 8).

Таблица 8

## Морфология поверхности лимфоцитов больных лимфомой

Пробы		Глобулярные выступы			Углубления в мембране		
		число	высота, нм	ширина, нм	число	глубина, нм	ширина, нм
Контроль		6,8±0,8	37,8±2,1	110,7±3,6	13,3±1,2	45,4±1,8	96,5±5,2
I	2 мг/мл	4,3±0,6	63,6±2,7 <sup>#</sup>	185,7±5,8 <sup>#</sup>	4,2±0,4 <sup>#</sup>	66,1±3,2 <sup>#</sup>	121,4±4,2 <sup>#</sup>
	0,02 мг/мл	11,5±1,2 <sup>#</sup>	23,4±1,4 <sup>#</sup>	82,4±3,3 <sup>#</sup>	8,5±1,5 <sup>#</sup>	20,3±1,8 <sup>#</sup>	69,9±1,3 <sup>#</sup>
	0,0002 мг/мл	8,2±1,1	55,8±3,1	119,2±0,6	5,0±0,1 <sup>#</sup>	42,3±5,2	101,8±3,5
II	2 мг/мл	13,2±2,3 <sup>#</sup>	33,3±1,4	97,1±2,2	8,2±0,9	101,6±5,0 <sup>#</sup>	164,3±4,4 <sup>#</sup>
	0,02 мг/мл	5,5±1,2	57,8±0,5 <sup>#</sup>	141,4±3,7 <sup>#</sup>	3,5±0,1 <sup>#</sup>	35,4±0,7 <sup>#</sup>	103,8±3,8
	0,0002 мг/мл	18,8±1,6 <sup>#</sup>	61,4±2,3 <sup>#</sup>	132,5±5,3 <sup>#</sup>	16,7±1,8	74,2±2,9 <sup>#</sup>	128,5±3,6 <sup>#</sup>

Примечание: # – достоверность различий в опытных пробах по сравнению с результатами измерений в контрольной пробе по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

I – циклофосфамид, II – ифосфамид

При уменьшении дозы циклофосфамида до 0,02 мг/мл число глобулярных структур было повышено на 69% ( $p < 0,05$ ), их высота и ширина были снижены соответственно на 38% и 26% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Число впадин, их глубина и ширина снизились соответственно на 36%, 55,3% и 27,6% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (см. табл. 8).

Под действием ифосфамида (2 мг/мл) в рельефе поверхности лимфоцитов больных лимфомой идентифицированы довольно глубокие инвагинации (рис. 3.4а), их глубина и ширина были увеличены соответственно на 123% и 70% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с лимфоцитами контрольной группы (см. табл. 8). Число глобулярных структур также увеличилось на 50% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

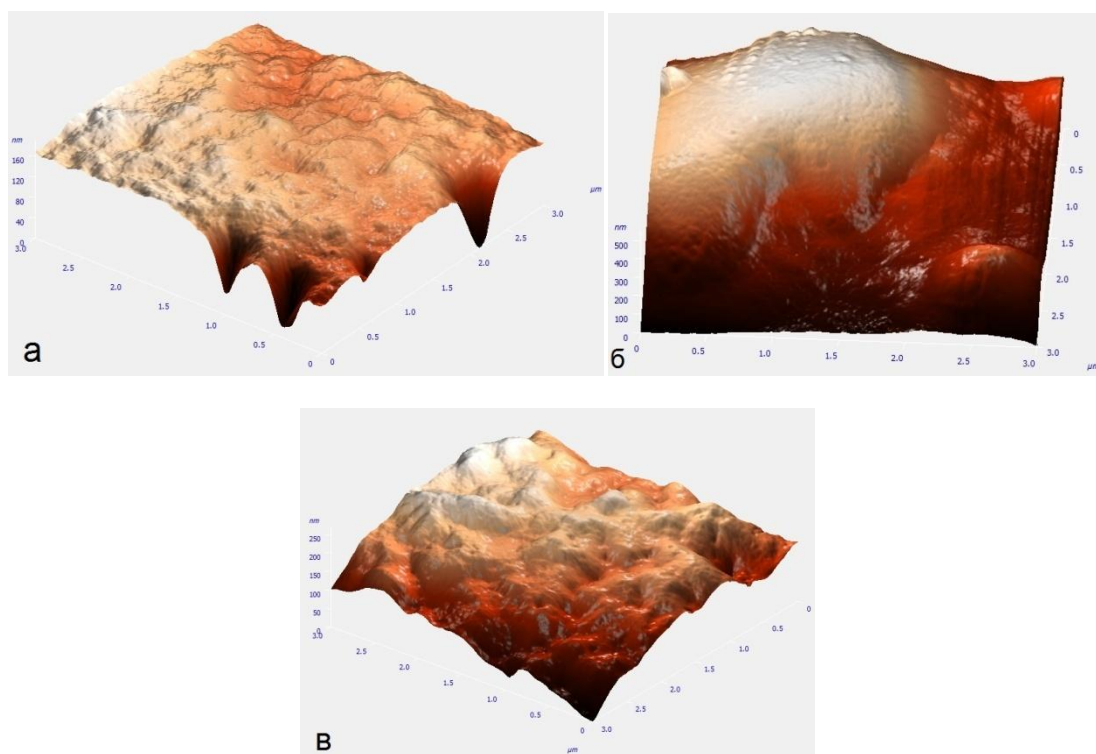


Рис. 3.4. Рельеф поверхности лимфоцитов больных лимфомой под действием ифосфамида: а – 2 мг/мл; б – 0,02 мг/мл; в – 0,0002 мг/мл

Под влиянием ифосфамида в концентрации 0,02 мг/мл высота и ширина глобулярных образований увеличились соответственно на 53% и 28% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Число и глубина впадин на мембране были снижены соответственно на 734% и 22% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

Под влиянием ифосфамида в дозе 0,0002 мг/мл на поверхности клетки появились однотипные глобулярные выступы: их число, высота и ширина возросли соответственно на 176%; 62,4% и 20% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Глубина и ширина инвагинаций на мембране также увеличились соответственно на 63% и 33% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с лимфоцитами в контрольной группе (см. табл. 8).

Острый миелобластный лейкоз. Рельеф поверхности лимфоцитов больных ОМЛ представлен на рисунке 3.5а.

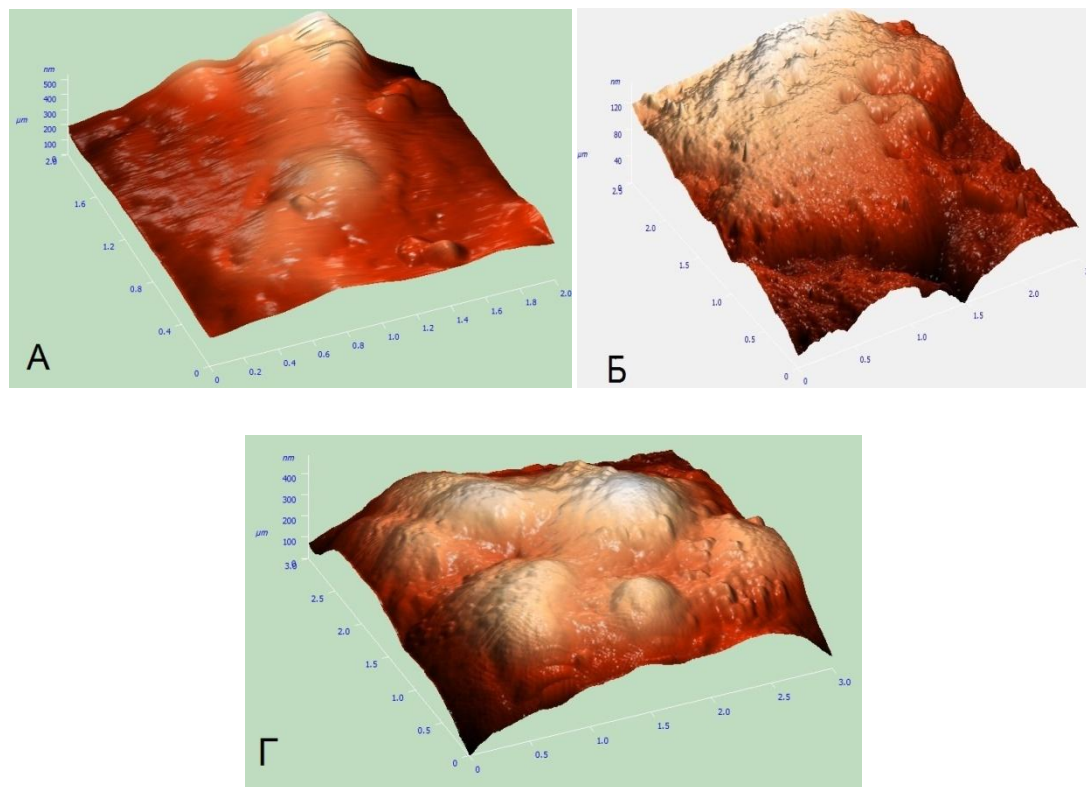


Рис. 3.5. Поверхность лимфоцитов больных ОМЛ: а – без препарата; б – под действием циклофосфамида 0,0002 мг/мл; г – ифосфамид 2 мг/мл

Под действием циклофосфамида в концентрации 2 мг/мл число глобулярных выступов увеличилось на 58% ( $p < 0,05$ ), их ширина снизилась на 21% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Число инвагинаций, их глубина были повышены соответственно на 73% и 56,7% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. При снижении дозы ЦФ до 0,02 мг/мл число выступов плазмалеммы возросло на 150% ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения их высоты и ширины соответственно на 45,4% и 32% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Глубина и ширина инвагинации на мембране также снизились в среднем на 30% по сравнению с контролем (табл. 9).

## Рельеф поверхности лимфоцитов больных ОМЛ

Пробы	Глобулярные выступы			Углубления в мембране			
	число	высота, нм	ширина, нм	число	глубина, нм	ширина, нм	
Контроль	6,2±0,2	14,1±1,1	104,8±5,4	3,0±0,1	7,4±0,5	95,2±2,8	
I	2мг/мл	9,8±0,2 <sup>#</sup>	10,8±0,9	82,6±2,1 <sup>#</sup>	5,2±0,3 <sup>#</sup>	11,6±0,8 <sup>#</sup>	82,3±1,5
	0,02 мг/мл	15,5±1,6 <sup>#</sup>	7,7±1,0 <sup>#</sup>	71,6±1,8 <sup>#</sup>	2,7±0,8	5,2±0,4 <sup>#</sup>	66,5±1,9 <sup>#</sup>
	0,0002 мг/мл	13,3±1,8 <sup>#</sup>	11,9±1,1	63,4±2,5 <sup>#</sup>	3,6±0,2	5,7±0,6	71,4±0,6 <sup>#</sup>
II	2 мг/мл	7,5±0,4	62,5±3,3 <sup>#</sup>	161,9±6,2 <sup>#</sup>	4,8±0,3 <sup>#</sup>	29,1±1,7 <sup>#</sup>	122,9±5,4 <sup>#</sup>
	0,02 мг/мл	3,8±0,1 <sup>#</sup>	5,6±0,3 <sup>#</sup>	41,0±2,4 <sup>#</sup>	4,6±0,7 <sup>#</sup>	16,8±1,8 <sup>#</sup>	97,6±2,4
	0,0002 мг/мл	5,0±0,5	7,3±0,9 <sup>#</sup>	49,1±3,3 <sup>#</sup>	4,3±0,9	16,6±1,1 <sup>#</sup>	102,9±3,5

*Примечание: # – достоверность различий в опытных пробах по сравнению с результатами измерений в контрольной пробе по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).*

*I – циклофосфамид, II – ифосфамид*

Под действием циклофосфамида в концентрации 0,0002 мг/мл поверхность плазмалеммы лимфоцитов была шероховатой (рис. 3.5б). Установлено увеличение числа глобул на поверхности лимфоцитов больных ОМЛ на 114,5% ( $p < 0,05$ ), их ширина напротив, снижена на 39% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Ширина инвагинаций на мембране была увеличена на 25% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

Конфигурация поверхности лимфоцитов больных ОМЛ под действием ИФ (2 мг/мл) изменилась и приобрела ярко выраженные крупные выступы (см. рис. 3.5г). При этом высота глобулярных структур увеличилась в 4 раза, их ширина – в 1,5 раза по сравнению с контролем. Глубина инвагинаций в мембране увеличилась в 4 раза на фоне их расширения на 29% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

При концентрации ифосфамида 0,02 мг/мл, 0,0002 мг/мл наблюдали снижение числа и габаритных размеров глобулярных структур на 50% ( $p < 0,05$ ), увеличение глубины инвагинаций в 2 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, под действием циклофосфамида во всех используемых концентрациях были снижены габаритные размеры глобулярных структур и

инвагинаций на мембране лимфоцитов больных ОМЛ. Однако число выступов существенно возросло. Напротив, ифосфамида в концентрации 2 мг/мл вызывал увеличение размеров выступов и углубления плазмалеммы, а в концентрациях 0,02 мг/мл и 0,0002 мг/мл – снижение.

Хронический миелобластный лейкоз. Под действием циклофосфамида в концентрации 2 мг/мл на поверхности лимфоцитов больных ХМЛ идентифицированы глобулярные выступы (рис. 3.6а).

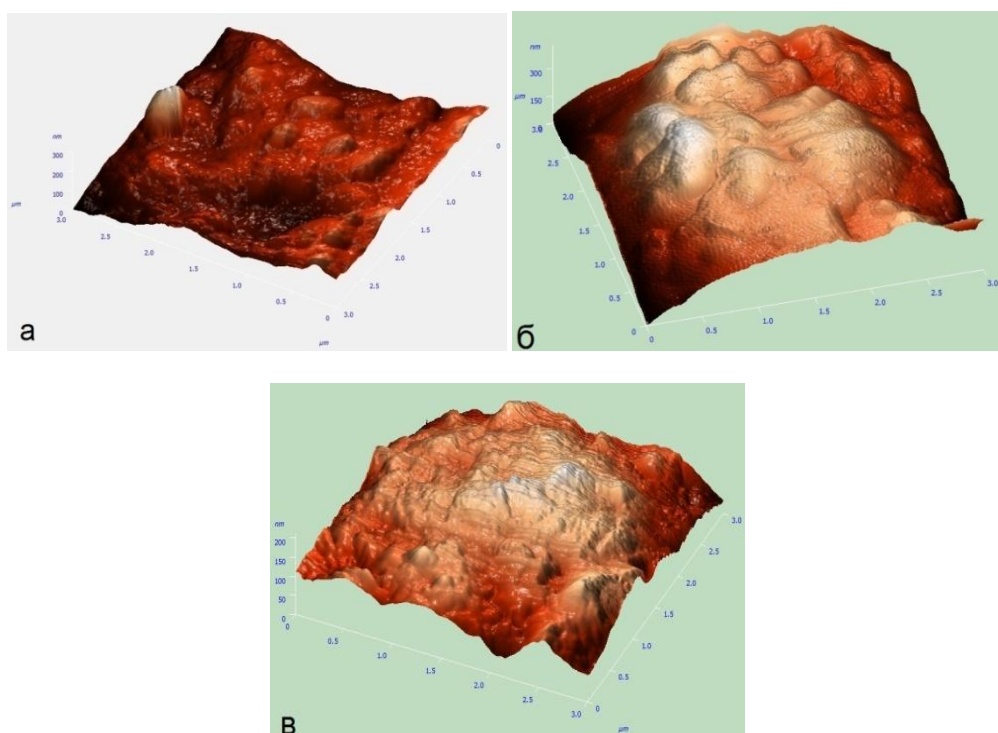


Рис. 3.6. Поверхность лимфоцитов больных ХМЛ под действием циклофосфамида: а – без препарата, б – 2 мг/мл; в – 0,0002 мг/мл

Число глобулярных структур и их высота снизились на 25% ( $p < 0,05$ ), ширина возросла на 30% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Глубина и ширина инвагинаций на мембране характерны возросли соответственно на 75% и 68% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с лимфоцитами в контрольной группе. Аналогично при уменьшении дозы циклофосфамида до 0,02 мг/мл число выступов и их высота были снижены соответственно на 60% и 55,4% ( $p < 0,05$ ) на фоне возрастания их ширины до 83% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

Число инвагинаций плазмалеммы уменьшено на 50% ( $p < 0,05$ ), а их глубина увеличилась на 157% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (табл. 10).

Таблица 10

## Рельеф поверхности лимфоцитов больных ХМЛ

Пробы	Глобулярные выступы			Углубления в мембране			
	число	высота, нм	ширина, нм	число	глубина, нм	ширина, нм	
Контроль	16,2±1,1	57,6±3,5	180,6±5,6	6,7±0,4	18,9±1,1	95,2±2,9	
I	2 мг/мл	12,5±1,9 <sup>#</sup>	43,4±2,1 <sup>#</sup>	275,4±1,8 <sup>#</sup>	5,4±0,3	74,8±3,4 <sup>#</sup>	159,6±5,8 <sup>#</sup>
	0,02 мг/мл	6,4±0,8 <sup>#</sup>	25,7±0,7 <sup>#</sup>	331,2±1,5 <sup>#</sup>	3,3±0,2 <sup>#</sup>	48,6±0,9 <sup>#</sup>	105,5±2,5
	0,0002 мг/мл	18,5±2,2	14,9±1,1 <sup>#</sup>	139,5±1,4 <sup>#</sup>	11,5±1,4 <sup>#</sup>	26,9±1,5	136,0±4,2 <sup>#</sup>
II	2 мг/мл	12,3±1,2 <sup>#</sup>	62,5±3,2	223,7±7,3	6,7±0,5	36,5±1,7 <sup>#</sup>	141,5±5,9 <sup>#</sup>
	0,02 мг/мл	9,3±0,4 <sup>#</sup>	95,3±2,6 <sup>#</sup>	258,4±1,9 <sup>#</sup>	5,8±0,6	21,2±1,3	46,3±2,1 <sup>#</sup>
	0,0002 мг/мл	14,2±1,3	74,8±2,8 <sup>#</sup>	167,2±2,3	9,6±0,8 <sup>#</sup>	75,8±2,1 <sup>#</sup>	219,7±6,4 <sup>#</sup>

*Примечание: # – достоверность различий в опытных пробах по сравнению с результатами измерений в контрольной пробе по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).*

*I – циклофосфамид, II – ифосфамид*

При концентрации циклофосфамида 0,0002 мг/мл наблюдали снижение высоты и ширины выступов соответственно на 74% и 22% ( $p < 0,05$ ). Однако число инвагинаций плазмалеммы возросло на 71,6%, вместе с повышением их габаритных размеров на 43% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (см. табл. 10).

Под действием ифосфамида (2 мг/мл) на поверхности лимфоцитов больных ХМЛ появились глобулярные выступы разной формы (рис. 3.7а). Число выступов было снижено на 25% ( $p < 0,05$ ) на фоне увеличения их ширины до 23% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Габаритные размеры углублений на мембране увеличились на 50% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (см. табл. 10).

Под влиянием ифосфамида в концентрации 0,02 мг/мл рельеф поверхности лимфоцитов больных ХМЛ характеризовался обилием выступов (рис. 3.5б), их высота и ширина повысились соответственно на 64,5% и 43% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, однако ширина углублений на мембране снизилась на 50% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (см. табл. 10).



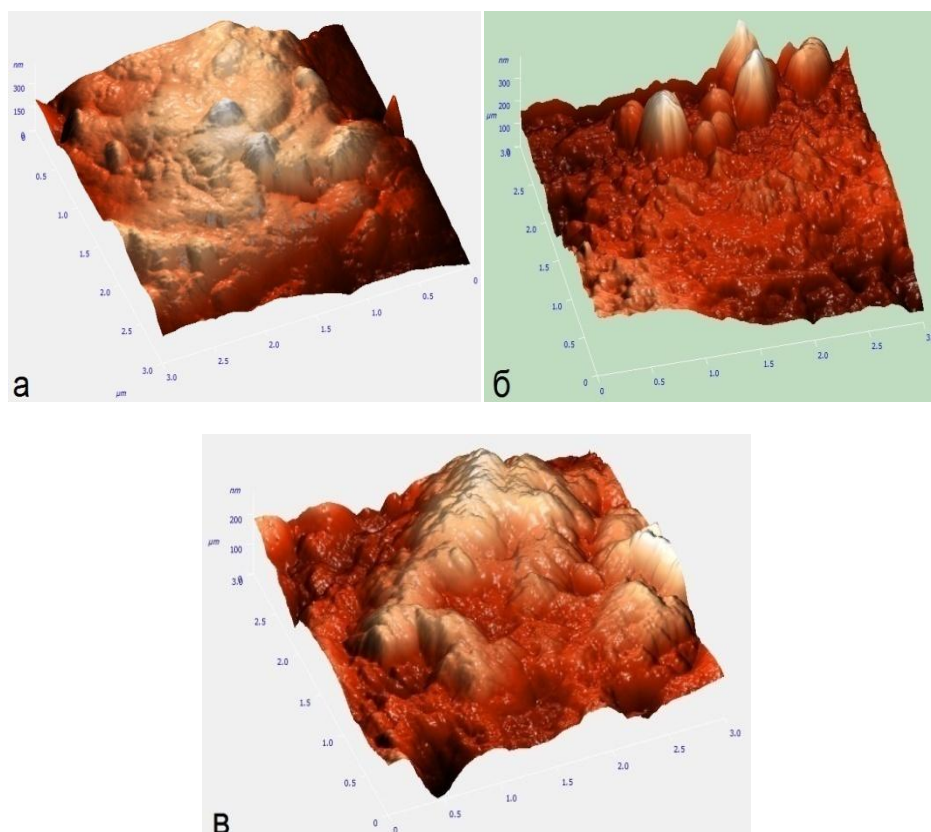


Рис. 3.7. Рельеф поверхности лимфоцитов больных ХМЛ под действием ифосфамида при концентрации:  
 а – 2 мг/мл; б – 0,02 мг/мл; в – 0,0002 мг/мл

В исследуемых группах при концентрации ифосфамида 0,0002 мг/мл на поверхности лимфоцитов больных ХМЛ присутствовали довольно глубокие инвагинации и выступы, которые объединялись в группы неправильной формы (рис. 3.7в). Высота глобулярных структур была повышена на 23% ( $p < 0,05$ ), число, глубина и ширина инвагинаций на мембране были увеличены соответственно на 30%, 300% и 193% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (см. табл. 10).

В результате исследования установлено, что под действием циклофосфамида высота глобулярных структур снизилась на фоне увеличения их ширины; высота и ширина углублений на мембране повысилась по сравнению с контролем. Под действием ифосфамида практически во всех исследуемых дозах размеры выступов и инвагинаций плазмалеммы увеличились по сравнению с контролем.



## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате проведенных экспериментов получены новые данные о жизнеспособности лейкоцитов в условиях *in vitro* под влиянием препаратов алкилирующего типа действия. При максимально использованной дозе препаратов (2 мг/мл) процент жизнеспособных исследованных клеток у больных всеми типами лейкоза снизился практически в 2-2,5 раза по сравнению с контролем. Однако 100% гибели клеток ни в одной из исследованных проб не наблюдали, следовательно, в группе больных острым и хроническим лимфобластным лейкозом, а также лимфомой, опухолевые клетки выработали механизмы резистентности к препаратам данного типа, в то время как в группе больных миелобластными типом лейкоза – часть субпопуляции здоровых лимфоцитов была резистентна по отношению к данным антибиотикам.

По данным литературы, прогрессия и патогенез опухолевых заболеваний системы крови связаны с изменением упруго-эластических свойств клеточной поверхности (Dulinska et al., 2006; Miller et al., 2002). Согласно, полученным нами данным, для опухолевых лимфоцитов больных ОЛЛ под влиянием циклофосфида в концентрации 2 мг/мл наблюдали увеличение жесткости поверхности, особенно в области края клетки. По некоторым данным, увеличение жесткости клеточной мембраны, индуцированное химиотерапией, в наибольшей степени связано с динамическими изменениями актинового цитоскелета (Gatfield et al., 2005). Жесткость клеточного каркаса определяет способность опухолевых клеток деформироваться и проходить через мелкие сосуды микроциркуляторного русла (Gabriele, 2009; Vuun et al., 2013). Вместе с тем, жесткая клеточная мембрана отчасти затрудняет миграцию опухолевых клеток.

Нами установлено, что в рельефе поверхности культивируемых лимфоцитов произошло увеличение числа и размеров глобулярных структур, а также инвагинаций. По некоторым данным, причина образования

глобулярных выступов и инвагинаций плазмалеммы может быть следствием цитотоксического действия алкилирующих агентов. Они не только вызывают инактивацию репликации ДНК, но и другие внутриклеточные события, такие как деполимеризации микротрубочек, тем самым приводят к ингибированию метастазирующей способности опухолевых клеток (Лю, 2008).

При уменьшении концентрации циклофосфида до 0,02 мг/мл и 0,0002 мг/мл количество жизнеспособных клеток значительно увеличилось (соответственно на 39,3% и 56,6%). Клеточная мембрана при этом стала более «мягкой» по сравнению с лимфоцитами контрольной группы. Высота глобулярных выступов и глубина инвагинаций на мембране увеличены на фоне снижения их ширины, что указывает на способность клеток расплываться на подложке. Согласно данным литературы, снижение жесткости клеточной поверхности и расплывание ее на подложке являются ключевыми индикаторами, указывающими на образование ламеллоподий при метастазировании опухолевых клеток (Hessler, 2005; Rosenbluth, 2006). Следовательно, полученные результаты свидетельствуют о снижении эффективности действия циклофосфида на опухолевые лимфоциты больных ОЛЛ. Не исключено, что в результате использования химиотерапевтического препарата подавляется развитие опухолевых клеток, но потенциальная способность лимфоцитов к миграции в ткани сохраняется.

Подобно циклофосфиду, под действием ифосфида резистентность опухолевых лимфоцитов снизилась на фоне увеличения дозы препарата. Согласно данным литературы, установлена клиническая значимость исследований резистентности к лекарственным средствам *in vitro*. Так, профили резистентности к лекарственным препаратам *in vitro* различных типов лейкемии отражают эмпирически известную клиническую эффективность различных лекарств в этих типах (Kaspers, Veerman, 1997). В наших экспериментах, при всех используемых концентрациях (2 мг/мл; 0,02

мг/мл; 0,0002 мг/мл) ифосфамида жесткость клеточной мембраны значительно возросла по сравнению с лимфоцитами в контроле. Вместе с тем на поверхности лимфоцитов больных ОЛЛ появились многочисленные мелкие острые глобулярные структуры, высота которых была увеличена на фоне сокращения их ширины. Таким образом, ифосфамид в трех исследуемых дозах оказывал эффективное терапевтическое действие.

В группе больных лимфомой под влиянием препаратов (циклофосфамид/ифосфамид) установили, что чем больше концентрация препарата, тем меньшее число резистентных к нему клеток в культуре *in vitro*. Однако, под влиянием как циклофосфамида, так и ифосфамида во всех исследуемых концентрациях достоверно значительно снизилась жесткость клеточной поверхности во всех участках наноидентификации. Интересно отметить, что эффекты, вызываемые препаратами, на лимфоциты больных ОЛЛ и лимфоциты больных лимфомой значительно отличаются. Причина этого может быть связана с происхождением исследуемых клеток, и их чувствительностью к препаратам в зависимости от степени дифференцировки. Микрорельеф поверхности клеток существенно изменился после обработки препаратами. Вероятно, циклофосфамид, ифосфамид вызывали перестройку актинового цитоскелета. Согласно данным литературы, алкилирующие препараты эффективно индуцируют ремиссию при лимфоме (Шиффман, 2001).

В группе больных ОМЛ и ХМЛ среди выживших клеток мы исследовали свойства поверхности нормальных лимфоцитов, подвергшихся химиотерапевтическому воздействию препаратов алкилирующего типа действия. Так, при концентрациях циклофосфамида 0,0002 мг/мл и 2 мг/мл модуль Юнга клетки достоверно значительно снизился во всех областях клетки, особенно в зоне ядра. Согласно данным литературы, уменьшение жесткости в области ядра является результатом диффузного распределения хроматина, что свидетельствует об интенсификации синтетических

процессов в клетке (Mazumder, 2008). Однако под влиянием концентрации 0,02 мг/мл циклофосфамида наблюдали увеличение модуля жесткости клетки в зонах ядра и цитоплазмы. Согласно данным литературы, снижение значений модуля упругости на крае цитоплазмы может создавать благоприятные условия для формирования ламеллоподий и фокальных контактов (Morrison, 2007). Под действием циклофосфамида во всех используемых концентрациях были снижены габаритные размеры глобулярных структур и инвагинаций на мембране лимфоцитов больных ОМЛ. Тем не менее, число глобулярных выступов существенно возросло.

Ифосфамид в концентрации 2 мг/мл также способствовал существенному снижению жесткости лимфоцитов больных ОМЛ и увеличению размеров выступов и углублений плазмалеммы. Сравнивая с циклофосфамидом в этой же концентрации (2 мг/мл) выявлено, что лимфоциты больных ОЛЛ «мягче». Это может быть объяснено, что в пробах крови больных ОЛЛ мы исследовали популяцию опухолевых клеток, а в пробах крови, больных ОМЛ – здоровых клеток.

Таким образом, циклофосфамид, ифосфамид в высоких дозах (2 мг/мл) снижали жесткость лимфоцитов, это будет способствовать облегчению продвижения лимфоцитов в микроциркуляторном русле. Напротив, при низких дозах (0,02 мг/мл и 0,0002 мг/мл) жесткость нормальных лимфоцитов больных ОМЛ имела тенденцию к увеличению, однако статически достоверных увеличений не установлено.

Для нормальных лимфоцитов больных ХМЛ после 24 часов инкубации с циклофосфамидом/ифосфамидом в трех разных концентрациях жесткость клетки существенно снизилась. Наименьший модуль Юнга лимфоцитов фиксирован при дозе 0,02 мг/мл циклофосфамида и 2 мг/мл ифосфамида. Одновременно установлено, что под действием циклофосфамида высота глобулярных структур снизилась на фоне увеличения их ширины; высота и ширина углублений на мембране повысилась. Под действием ифосфамида

практически во всех исследуемых дозах размеры выступов и инвагинаций плазмалеммы увеличились. Вышеуказанные результаты свидетельствуют о том, что препараты алкилирующего типа действия значительно изменяют свойства и структуру поверхности нормальных лимфоцитов.

На основе полученных результатов можно сделать заключение, что лейкозные клетки больных ОЛЛ, лимфомой и нормальные лимфоциты больных ОМЛ, ХМЛ неодинаково реагируют на препараты (циклофосфамид/ифосфамид). Можно предлагать, что исследуемые препараты обладают предпочтительной токсичностью по отношению к злокачественным клеткам. В большинстве исследований, представленных в литературе, незлокачественные клетки оказались менее чувствительными к лекарственным средствам, чем лейкозные клетки (Khaw, 2014). Не исключено, что эти исследуемые клетки различаются по нескольким аспектам, таким как иммунофенотип и этап дифференцировки (Луговская, 2005; Kaspers et al., 1991). Согласно теоретическим представлениям, активность лекарств и их способность индуцировать апоптоз являются наиболее эффективным способом устранения опухолевых клеток. По данным ряда источников, положительные ответы на препараты *in vitro* в результате элиминации клеток апоптозом в большинстве случаев сопровождались положительной терапией *in vivo* (Desotelle, 2008; Jamroziak, Robak, 2010).

## ВЫВОДЫ

1. В условиях *in vitro* жизнеспособность лейкоцитов больных лейкозом носит дозозависимый характер. При максимально использованной дозе препаратов (2 мг/мл) процент жизнеспособных клеток у больных всеми типами лейкоза снизился практически в 2-2,5 раза по сравнению с контролем. При низких дозах (0,02 и 0,0002 мг/мл) препаратов процент выживших лейкоцитов увеличился соответственно до 50% и 65% по сравнению с контролем.

2. Жесткость клеточной поверхности опухолевых лимфоцитов под влиянием препаратов алкилирующего типа в большинстве случаев снижается с увеличением концентрации препарата в ряду 0,0002 – 0,02 – 2 мг/мл.

3. Жесткость клеточной поверхности нормальных лимфоцитов снижается под влиянием высоких доз препаратов (2 мг/мл) и возрастает при низких дозах препаратов (0,02 мг/мл, 0,0002 мг/мл).

4. Структура микрорельефа поверхности лимфоцитов специфична для каждого типа лейкоза, в зависимости от концентрации исследованных препаратов.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулкадыров, К. М. Клиническая гематология [Текст] : Справочник / К. М. Абдулкадыров. – М. – СПб. : Питер, 2006. – 448 с.
2. Абрамова, О. А. Сравнительные характеристики мезенхимных стволовых клеток костного мозга больных хроническим миелоидным лейкозом первичных пациентов, резистентных и здоровых людей [Текст] / О. А. Абрамова, П. А. Бутылин, А. Ю. Зарицкий // Клиническая онкогематология. – 2016. – Т. 9, № 3. – С. 336-368.
3. Андерсон, Ш. К. Атлас гематологии. Пер. с англ. / Ш. К. Андерсон, К. Б. Поулсен; И. А. Поповой [и др.]. – Москва : Логосфера, 2007. – 598 с.
4. Атлас по гематологии [Текст] : пер. с англ. / Под общ. ред. проф. В. С. Камышникова. – 2-е изд. – М. : МЕДпресс-информ, 2014. – 208 с.
5. Борисович, Н. В. Иммунологическая характеристика первых рецидивов острых лимфобластных лейкозов у детей и оценка эволюции иммунофенотипа бластных клеток в рецидиве [Текст] / Н. В. Борисович, М. В. Белевцев, О. В. Алейникова // Гематология и трансфузиология. – 2004. – Т. 2. – С. 14.
6. Василевский, М. Г. Статистика и проблемы гемобластозов [Текст] / М. Г. Василевский, З. П. Камарли // Вестник Кыргызско-Российского славянского университета. – 2007. – Т. 7, № 9. – С. 84-89.
7. Волкова, М. А. Хронический миелолейкоз [Текст] / М. А. Волкова // Клиническая онкогематология. – М. : Медицина, 2001. – С. 237-259.
8. Воробьёв, А. И. Диагностика и терапия хронического миелолейкоза [Текст] / А. И. Воробьёв, К. М. Абдулкадыров, А. Г. Туркина. – М. – СПб. : Медицинская технология, 2010. – 33 с.
9. Гематология: Новейший справочник [Текст] / Под общ. ред. К. М. Абдулкадырова. – М.: Иза-во Эксмо, 2004. – 928 с.
10. Гусева, С. А. Болезни системы крови [Текст] / С. А. Гусева, В. П. Вознюк. – 2-е изд., доп. и перераб. – М. : МЕДпресс-информ, 2004. – 488 с.

11. Гущина, Ю. Ю. Исследование различий морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии [Текст] / Ю. Ю. Гущина, С. Н. Плескова, М. Б. Звонкова // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2005. – № 1. – С. 48-53.
12. Давыдкин, И. Л. Болезни крови в амбулаторной практике : руководство [Текст] / И. Л. Давыдкин, И. В. Куртов, Р. К. Хайретдинов. . – 2-е изд., испр. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 184 с.
13. Давыдов, М. И. Онкология : учебник [Текст] / М. И. Давыдов, Ш. Х. Гальцева. – М. ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 920с.
14. Диагностика лейкозов : атлас и практическое руководство [Текст] / под ред. Д. Ф. Глузмана. – Киев : Морион-Лтд, 2000. – 224 с.
15. Демина, Е. А. Лимфома Ходжкина (лимфогранулематоз). Современная терминология [Текст] / Е. А. Демина // Терапевтический архив. – 2004. – Т. 76, № 1. – С. 69-71
16. Дуткевич, И. Г. Основы клинической гемостазиологии. Физиология системы гемостаза, диагностика и лечение острых кровотечений и тромбофилий: Краткое рук-во [Текст] / И. Г. Дуткевич, Е. Н. Сухомлина, Е. А. Селиванов. – СПб. : ООО Изд.-полиграф. комп. «КОСТА», 2010. – 144 с.
17. Долгов, В. В. Клинико-диагностическое значение лабораторных показателей / В. В. Долгов. – Москва : Лабинформ Центр, 1995. – 215 с.
18. Долгов, В. В. Применение вакуумных систем BD Vacutainer для лабораторного анализа. Методические рекомендации [Текст] / В. В. Долгов, С. А. Луговская, М. Е. Почтарь. – М. : РМАПО, 2007. – 32 с.
19. Дягилева, О. А. Кровь: Клинический анализ. Диагностика анемий и лейкозов. Интерпретация результатов [Текст] / О. А. Дягилева, Г. И. Козинец, В. М. Погорелов [и др.]. – М. : Медицина XXI, 2006. – 256 с.
20. Зуховицкая, Е. В. Острые лимфобластные лейкозы [Текст] / Е. В. Зуховицкая, А. Т. Фиясь // Журнал Гродненского



государственного медицинского университета: ежеквартальный научно-практический журнал. – Гродно : ГрГМУ. – 2015. – № 3. – С.12-17.

21. Канаев, С. В. Лечение больных лимфомой ходжкина благоприятной и промежуточной прогностических групп [Текст] / С.В. Канаев // Практическая онкология. – 2007. – Т. 8, № 2. – С. 73-81.

22. Клиническая фармакология [Текст] : учебник для вузов / Под ред. В. Г. Кукеса. – 4-е издание., перераб. и доп., 2009. – 1056 с.

23. Клиническая онкогематология : Руководство для врачей. Под ред. М. А. Волковой. - М. : Медицина, 2001. – 576 с.

24. Коленкова, Г. В. Маркеры острого лейкоза в диагностике и прогнозе заболевания у детей [Текст] / Г. В. Коленкова // Гематология и трансфузиология. –2002. – Т. 47. № 2. – С. 28-35.

25. Колосков, А. В. Гемокомпонентная терапия в клинической практике [Текст] : учеб. пособие. – Изд. 2-е, испр. и доп. – Санкт-Петербург : КОСТА, 2013. –112с.

26. Кондратьева, Н. Е. Лечение больных лимфогранулематозом I-II стадии с массивным поражением средостения [Текст] / Н. Е. Кондратьева, Е. А. Демина, М. М. Нивинская [и др.] // Терапевтический архив. – 2000. – № 8. – С. 45-49.

27. Конова, Л. Б. Патологическая физиология [Текст] / Л. Б. Конова, Н.А. Любин, Т. М. Шленкина [и др.]. – Ульяновск : ГСХА, 2006. – 107 с.

28. Криволапов, Ю. А. Морфологическая диагностика лимфом [Текст] / Ю. А. Криволапов, Е. Е. Леенман. – Санкт-Петербург : КОСТА, 2006. – 208с.

29. Кузник, Б. И. Физиология и патология системы крови: руководство для студентов лечебного, педиатрического и стоматологического факультетов [Текст] / Б. И. Кузник. – Чита: ООО Типография газеты «Ваша реклама», 2004. – 336 с.

30. Кузнецова, Т. Г. АСМ эластография - новый метод биомедицинских исследований [Текст] / Т. Г. Кузнецова, М. Н. Стародубцева //

Ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал «Проблемы здоровья и экологии». – 2008. – Т. 1, № 15. – С. 143-151.

31. Кузнецова, Т.Г. Методологические проблемы изучения наномеханических свойств живых клеток [Текст] / Т. Г. Кузнецова, М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков // Проблемы здоровья и экологии. – 2007. – Т. 3. № 13. – С. 103-111.

32. Леонова, Е. В. Патологическая физиология системы крови [Текст] / Е. В. Леонова, А. В. Чантурия, Ф. И. Висмонт. – Мн. : БГМУ, 2009. – 127 с.

33. Луговская, С. А. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов [Текст] / С. А. Луговская, М. Е. Почтарь, Н. Н. Тупицын. – М-Тверь. Изд. «Триада», 2005. – 168 с.

34. Патология. Том 1 [Текст] / Под ред. Пальцева М. А., Паукова В. С. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 512 с.

35. Патологическая анатомия [Текст]. Том 2 / Под ред. В. С. Паукова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 528 с.

36. Патофизиология: руководство к практическим занятиям [Текст] / Под ред. В. В. Новицкого, О. И. Уразовой. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 336 с.

37. Погорелов, В. М. Ключи к диагностике острых лейкозов [Текст] / В. М. Погорелов, Г. И. Козинец // Гематология и трансфузиология. – 2008. – № 5. – С. 27-31.

38. Потапнев, М. П. Патогенетическая роль фактора некроза опухолей альфа при остром лимфобластном лейкозе у детей [Текст] / М. П. Потапнев, Н. В. Петевка, М. В. Белевцев. – М. : МЕДпресс-информ, 2006. – 112 с.

39. Рукавицын, О. А. Хронические лейкозы [Текст] / О. А. Рукавицын, В. П. Поп. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2004. – 240 с.

40. Руководство по гематологии: в 3-х т. Т. 1. [Текст] / Под общ. ред. А. И. Воробьева. – М. : Ньюдиамед, 2002. – 530 с.

41. Руководство по гематологии: в 3-х т. Т. 2. [Текст] / Под ред. А. И. Воробьева: 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Ньюдиамед, 2003. – 280 с.

42. Семочкин, С. В. Лечение лимфомы Ходжкина у подростков и молодых взрослых [Текст] / С. В. Семочкин, С. С. Лория, А. Г. Румянцев [и др.] // Онкогематология. – 2008. – Т. 1, № 2. – С. 18-26.
43. Скоркина, М. Ю. Использование наномеханического сенсора для изучения морфофункциональных свойств лимфоцитов здоровых доноров и больных хроническим лимфобластным лейкозом [Текст] / М. Ю. Скоркина, М. З. Федорова, А. В. Муравьев [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. - № 3. – С. 172-175.
44. Смирнова, О. В. Хронический миелолейкоз – клинические и иммунологические особенности у взрослых больных [Текст] / О. В. Смирнова // БЮЛЛЕТЕНЬ ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 3. – С. 185-189.
45. Смирнова, О. В. Особенности прогнозирования возникновения инфекционных осложнений после проведения химиотерапии у больных острыми лейкозами [Текст] / О. В. Смирнова, В. Т. Манчук // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 4-5. – С. 403-408.
46. Способ определения упругости клеток крови [Текст]: Пат. 2466401 Рос. Федерация G01N33/49 / М. Ю. Скоркина, Е. А. Сладкова, Н. А. Забиняков; заявитель и патентообл. БелГУ. – № 2011109741 ; заявл. 15.03.2011 ; опубл. 10.11.2012, Бюл. – № 31. – 9 с.
47. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. [Текст] / Под. ред. М. И. Давыдова и Е. М. Аксель. – М. : РОНЦ, 2014. – 226с.
48. Стародубцева, М. Н. Механические свойства эритроцитарных мембран при действии пероксинитрита [Текст] / М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, С. Н. Черенкевич // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 143, № 2. – С. 222-230.
49. Френкель, М. А. Современная диагностика острых лейкозов [Текст] / М. А. Френкель // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 1. – С. 25-32.

50. Основы клинической гематологии. Острые лейкозы [Текст] / В. Г. Радченко. – СПб. : Диалект, 2003. – Гл. 5. – С. 92-107.
51. Ткачев, С. И. Современное лечение больных с ранними стадиями лимфомы Ходжкина / С. И. Ткачев, Е. А. Демина, О. П. Трофимова [и др.] // Вопросы онкологии. – 2007. – Т. 53, № 1. – С. 114-117.
52. Фиясь, А. Т. Т-лимфобластный лейкоз/лимфома [Текст] / А. Т. Фиясь, Е. В. Зуховицкая, О. П. Чайковская // Журнал Гродненского государственного медицинского университета: ежеквартальный научно-практический журнал. Гродно : ГрГМУ. – 2013. – № 2. – С. 109-111.
53. Хоффбранд, В. Гематология [Текст] / В. Хоффбранд, Дж. Петтит. – СПб.: Питер, 2007. – 408 с.
54. Шорманов, В. К. Спектрофотометрическое определение циклофосфана и ифосфамида на основе получения их нитропроизводных [Текст] / В. К. Шорманов, М. Л. Столяров // Научные ведомости БелГУ. – 2014. – Т. 26, № 11. – С. 251-254.
55. Abu-Ghosh, A. M. Ifosfamide, carboplatin and etoposide in children with poor-risk relapsed Wilms' tumor: a Children's Cancer Group report [Text] / A. M. Abu-Ghosh, M. D. Krailo, S. C. Goldman et al. // Ann. Oncol. – 2002. – Vol. 13. – P. 460-469.
56. Al-Hajj, M. Therapeutic implications of cancer stem cells [Text] / M. Al-Hajj, M. W. Becker, M. Wicha [et al.] // Current Opinion in Genetics & Development. – 2004. – Vol. 14. – P. 43–47.
57. Allan, J. M. The molecular mechanisms of alkylating agent-related acute myeloid leukaemia [Text] / J. M. Allan // Haematologica reports. – 2006. – Vol. 2. – P. 28-29.
58. Amin, M. M. Recognition of Acute Lymphoblastic Leukemia Cells in Microscopic Images Using K-Means Clustering and Support Vector Machine Classifier [Text] / M. M. Amin, S. Kermani, T. Ardeshtir [et al.] // J Med Signals Sens. – Vol. 5. – 2015. – P. 49-58.

59. Bain, B. J. *Leukaemia Diagnosis* / B. J. Bain. – London: John Wiley and Sons, 2010. – 402 p.
60. Becker, M. W. Leukemia stem cells in 2010: current understanding and future directions [Text] / M. W. Becker, C. T Jordan // *Blood Rev.* – 2011. – Vol. 25. – P. 75-81.
61. Bhojwani, D. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia [Text] / D. Bhojwani, J. J. Yang, C. H. Pui // *Pediatr Clin North Am.* – 2015. – Vol. 62, № 1. – P. 47-60.
62. Brandhagen, B. N. Cytostasis and morphological changes induced by mifepristone in human metastatic cancer cells involve cytoskeletal filamentous actin reorganization and impairment of cell adhesion dynamics [Text] / B. N. Brandhagen, C. R. Tieszen, T. M. Ulmer [et al.] // *BMC Cancer.* – 2013. – 15p.
63. Brice, P. Managing relapsed and refractory Hodgkin lymphoma / P. Brice // *British Journal of Haematology.* – 2008. – Vol. 141, № 1. – P. 3-13.
64. Casorelli, I. Drug treatment in the development of mismatch repair defective acute leukemia and myelodysplastic syndrome [Text] / I. Casorelli, J. Offman, L. Mele [et al.] // *DNA Repair (Amst).* – 2003. – Vol. 2. – P. 547-559.
65. Clarkson, B. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies [Text] / B. Clarkson, A. Strife, D. Wisniewski [et al.] // *Leukemia.* – 2003. – Vol. 17. – P. 1211-1262.
66. *Clinically Relevant Resistance in Cancer Chemotherapy* / Edited by B. Andersson, D. Murray // *Cancer Treatment and Research.* – 2002. – Vol. 112. – P. 161-175.
67. Cortes, J. E. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review with emphasis on biology and therapy [Text] / J. E. Cortes, H. M. Kantarjian // *Cancer.* – 1995. – Vol. 76. – P. 2393-2417.
68. Chan, W. I. Leukemia stem cells in AML [Text] / W. I. Chan, B. J. P. Huntly // *Seminars in Oncology.* – Vol 35. – № 4. – 2008. – P. 326-335.

69. Checchi, P. M. Microtubule-interacting drugs for cancer treatment [Text] / P. M. Checchi, J. H. Nettles, J. Zhou [et al.] // Trends Pharmacol Sci. – 2003. – Vol. 24. – P. 361-365.
70. Cheung, M. Acute liver toxicity with ifosfamide in the treatment of sarcoma: A case report [Text] / M. Cheung, R. L. Jones, I. Judson // Journal of Medical Case Reports. – 2011. – Vol. 5. – P. 180-189.
71. Deininger, M. W. The molecular biology of chronic myeloid leukemia [Text] / M. W. Deininger, J. M. Goldman, J. V. Melo // Blood. – 2000. – Vol. 96. – P. 3343-3356.
72. Desotelle, E. J. Drug-induced senescence bystander proliferation in prostate cancer cells in vitro and in vivo [Text] / E. J. Desotelle, N. Almassi, D. Jarrard // Br J Cancer. – 2008. – Vol. 98, № 7. – P. 1244-1249.
73. Domke, J. Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy [Text] / J. Domke, S. Dannöhl, W. J. Parak [et al.] // Colloids and Surfaces B : Biointerfaces. – 2000. – Vol. 19, № 4. – P. 367-379.
74. Dufrêne, Y. F. Atomic Force Microscopy in Microbiology: New Structural and Functional Insights into the Microbial Cell Surface [Text] / Y. F. Dufrêne // mBio. – 2014. – Vol. 5, № 4. – P. 1-14.
75. Engert, A. Reduced treatment intensity in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma [Text] / A. Engert, A. Plutschow, H. T. Eich [et al.] // N Engl J Med. – 2010. – Vol. 363. – P. 640-652.
76. Estey, E. H. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management [Text] / E. H. Estey // Am. J. Hematol. – Vol. 88. – P. 318-327.
77. Ferrara, F. Acute myeloid leukemia in adult [Text] / F. Ferrara, C.A. Schiffer // Lancet. – 2013. – Vol. 381. – P. 484-495.
78. Foa, R. Towards an integrated classification of adult acute lymphoblastic leukemia [Text] / R. Foa, A. Vitale // Rev. Clin. Exp. Hematol. – 2002. – Vol. 6. – P.181-199.

79. Fritz, M. In vitro activation of human platelets triggered and probed by atomic force microscopy [Text] / M. Fritz, M. Radmacher, H. E. Gaub // *Experimental Cell Research*. – 1995. – Vol. 205. – P. 187-190.
80. Forsberg, E. C. Molecular signatures of quiescent, mobilized and leukemia-initiating hematopoietic stem cells [Text] / E. C. Forsberg // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5, № 1. – P. 484-495.
81. Jabbour, E. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring [Text] / E. Jabbour, H. Kantarjian // *Am J Hematol*. – 2016. – Vol. 91(2). – P. 252-265
82. Jordan, M. A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin [Text] / M. A. Jordan // *Curr Med Chem Anticancer Agents*. – 2002. – Vol. 2. – P. 1-17.
83. Haferlach, T. Modern diagnostics in acute leukemias [Text] / T. Haferlach // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 2005. – Vol. 56, № 2. – P. 223-234.
84. Hansen, R. J. Role of MGMT in protecting against cyclophosphamide-induced toxicity in cells and animals [Text] / R. J. Hansen, S. M. Ludeman, S. J. Paikoff [et al.] // *DNA repair*. – 2007. – Vol. 6. – P. 1145-1154.
85. Harris, N. L. Hodgkin's Lymphomas: classification, diagnosis, and grading / N. L. Harris [Text] // *Seminars in Hematology*. – 1999. – Vol. 36, № 3. – P. 220-232.
86. Horton, S. J. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology [Text] / S. J. Horton, B. J. Huntly // *Haematologica*. – 2012. – Vol. 97. – P. 966-974.
87. Kantarjian, H. Cytogenetic and molecular responses and outcome in chronic myelogenous leukemia [Text] / H. Kantarjian, S. O'Brien, J. Shan et al. // *Cancer*. – 2008. – Vol. 112. – P. 837-845.
88. Kaspers, G. J. L. In vitro drug sensitivity of normal peripheral blood lymphocytes and childhood leukaemic cells from bone marrow and peripheral

blood [Text] / G. J. L. Kaspers et al. // Br. J. Cancer. – 1991. – Vol. 64. – P. 469-474.

89. Khaw, S. L. Both leukaemic and normal peripheral B lymphoid cells are highly sensitive to the selective pharmacological inhibition of prosurvival Bcl-2 with ABT-199 [Text] / S. L. Khaw, D. Mérimo, M. A. Anderson [et al.] // Leukemia. –2014. – Vol. 28. – P. 1207-1215.

90. Konopleva, M. Y. Leukemia stem cells and microenvironment [Text] / M. Y. Konopleva, C. T. Jordan // Biology and therapeutic targeting // Journal of Clinical Oncology. – 2011. – Vol. 29. – P. 591-599.

91. Krause, D. S. Differential regulation of myeloid leukemia by the bone marrow microenvironment [Text] / D. S Krause // Nat. Med. – 2013. – Vol. 19. – P. 1513-1517.

92. Krol, A. D. Cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone chemotherapy and radiotherapy for stage I intermediate or high grade non-Hodgkin's lymphomas: results of a strategy that adapts radiotherapy dose to the response after chemotherapy [Text] / A. D. Krol, H. W. Berenschot, D. Doekharan, [et al.] // Radiother Oncol. – 2001. – Vol. 58, № 3. – P. 251-255.

93. Kuppner, M. C. Differential effects of ifosfamide on dendritic cell-mediated stimulation of T cell interleukin-2 production, natural killer cell cytotoxicity and interferon-gamma production [Text] / M. C. Kuppner, E. Bleifuss, E. Noessner [et al.] // Clinical and experimental immunology. – 2008. – Vol. 153, № 3. – P. 429-438.

94. Laport, G. F. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia [Text] / G. F. Laport, R. A. Larson // Semin Oncol. – 1997. – Vol. 24. – P. 70-82.

95. Lekka, M. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy [Text] / M. Lekka, P. Laidler, D. Gil [et al.] // European Biophysics Journal. – 1999. – Vol. 28, № 4. – P. 312-316.

96. Lieber, S. C. Aging increases stiffness of cardiac myocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation [Text] / S. C. Lieber, N. Aubry, J. Pain



[et al] // American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology. – 2004. – Vol. 287. – P. 645-651.

97. MacAllister, S.L. Acrolein and chloroacetaldehyde: an examination of the cell and cell-free biomarkers of toxicity [Text] / S. L. MacAllister, N. Martin-Brisac, V. Lau et al. // Chemico-biological interactions. – 2013. – Vol. 202. – P. 259-266.

98. Murakoshi, M. Local mechanical properties of mouse outer hair cells: atomic force microscopic study [Text] / M. Murakoshi, N. Yoshida, K. Lida [et al.] // Auris, Nasus, Larynx. – 2006. – Vol. 33, № 2. – P.149-157.

99. Mollinedo, F. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis [Text] / F. Mollinedo, C. Gajate // Apoptosis. – 2003. – Vol. 8. – P. 413-450.

100. Mrózek, K. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia / K. Mrózek, D. P. Harper, P. D. Aplan // Hematol Oncol Clin North Am. – 2009. – Vol. 23, № 5. – P. 991-1010.

101. O'Hare, T. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia [Text] / T. O'Hare, C. A. Eide, M. W. Deininger // Blood. – 2007. – Vol. 110. – P. 2242-2249.

102. Polavarapu, A. The Mechanism of Guanine Alkylation by Nitrogen Mustards: A Computational Study [Text] / A. Polavarapu, J. A. Stillabower, S. G. W. Stubblefield [et al.] // The Journal of Organic Chemistry. – 2012. – Vol. 77. – P. 5914-5921.

103. Pesen, D. Micromechanical Architecture of the Endothelial Cell Cortex / D. Pesen, J. H. Hoh [Text] // Biophysical Journal. – 2005. – Vol. 88. – P. 670-679.

104. Pui, C. H. Acute Lymphoblastic Leukemia [Text] / C. H. Pui, W. E. Evans // N. Engl J. Med. – 2008. – Vol. 339, № 9. – P. 605-615.

105. Reya, T. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [Text] / T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke [et al.] // Nature. – 2001. – Vol 414. – P. 105-111.

106. Riddick, D. S. Cancer chemotherapy and drug metabolism [Text] / D. S. Riddick, C. Lee, S. Ramji // Drug Metabolism and Disposition August. – 2005. – Vol. 33, № 8. – P. 1083-1096.

107. Rosenbluth, M. J. Force Microscopy of Nonadherent Cells: A Comparison of Leukemia Cell Deformability [Text] / J. M. Rosenbluth, W. A. Lam, D. A. Fletcher // *Biophys J.* – 2006. – Vol 90, № 8. – P. 2994-3003.
108. Rotsch, C. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study [Text] / C. Rotsch, R. Radmacher // *Biophysical Journal.* – 2000. – Vol. 78, № 1. – P. 520-535.
109. Worrillow, L. J. Deregulation of homologous recombination DNA repair in alkylating agent-treated stem cell clones: a possible role in the aetiology of chemotherapy-induced leukaemia [Text] / L. J. Worrillow, J. M. Allan // *Oncogene.* – 2006. – Vol. 25. – P.1709-1720.
110. Santoro, A. Ifosfamide, gemcitabine, and vinorelbine: a new induction regimen for refractory and relapsed Hodgkin's lymphoma [Text] / A. Santoro, M. Magagnoli, M. Spina // *Haematologica.* – 2007. – Vol. 92. – P. 35-41.
111. Sasaki, S. Elastic properties of living fibroblasts as imaged using force modulation mode in atomic force microscopy [Text] / S. Sasaki, M. Morimoto, H. Haga [et al.] // *Archives of Histology and Cytology.* – 1998. – Vol. 61, № 1. – P. 57-63.
112. Seam, P. Role of chemotherapy in Hodgkin's lymphoma [Text] / P. Seam, J. E. Janik, D. L. Longo [et al.] // *Cancer Journal.* – 2009. – Vol. 15, № 2. – P. 150-154.
113. Siddik, Z. H. *The Cancer Handbook. Mechanisms of Action of Cancer Chemotherapeutic Agents: DNA-Interactive Alkylating Agents and Antitumour Platinum-Based Drugs* [Text] / Z. H. Siddik. London, UK: Nature Publishing Group, 2002. – P.1295-1313.
114. Sirajuddin, M. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry [Text] / M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 2013. – Vol. 124. – P.1-19.

115. Shipley, J. L. Acute myelogenous leukemia [Text] / J. L. Shipley, J. N. Butera // *Experimental Hematology*. – 2009. – Vol. 37, № 6. – P. 649-658.
116. Stephanie, S. BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia [Text] / S. Stephanie, M. V. Catherine // *Oncogene* . – 2002. – Vol. 21. – P. 8547-8559.
117. Takai, E. Osteoblast elastic modulus measured by atomic force microscopy is substrate dependent [Text] / E. Takai, K. D. Costa, A. Shaheen [et al] // *Annals of Biomedical Engineering*. – 2005. – Vol. 33, № 7. – P. 963-971.
118. Zhang, J. Clinical pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide [Text] / J. Zhang, Q. Tian, S. F. Zhou // *Curr Drug Ther*. – 2006. – Vol. 1. – P. 55-84
119. Zhang, J. Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications [Text] / J. Zhang, Q. Tian, S. Yung [et al.] // *Drug Metabolism Reviews*. – 2005. – Vol. 37. – P. 611-703.