

УДК 571.27

DOI: 10.18413/2409-0298-2016-2-4-20-24

Нгуен Т.Х.,  
Кротова Е.Е.,  
Шамрай Е.А.,  
Беляева С.С.,  
Кролевец А.А.

## ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ АЛКИЛИРУЮЩЕГО ТИПА ДЕЙСТВИЯ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

### Аннотация

С использованием метода атомно-силовой микроскопии в опытах *in vitro* были изучены упруго-эластические свойства опухолевых клеток крови больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) под влиянием препаратов алкилирующего типа действия. В качестве химиотерапевтических агентов использовали циклофосфамид и ифосфамид. Выявлена зависимость морфофункциональных свойств лимфоидных клеток от концентрации исследуемых препаратов. Установлено, что циклофосфамид и ифосфамид в концентрации  $7,66 \cdot 10^{-6}$  моль/л повышают модуль Юнга лимфобластных форм и вызывают снижение жизнеспособности исследуемых клеток в 2,5 раза по сравнению с контролем. Полученные результаты имеют клинико-диагностическое значение для подбора лечения больных ОЛЛ и оценки качества терапии.

**Ключевые слова:** опухолевые клетки; циклофосфамид; ифосфамид; острый лимфобластный лейкоз; модуль Юнга

Nguen T.H.,  
Krotova E.E.,  
Shamray E.A.,  
Belyaeva S.S.,  
Krolevets A.A.

## THE INFLUENCE OF DRUGS WITH ALKYLATION-TYPE EFFECT ON TUMOR CELLS IN PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUCOSIS

### Abstract

The authors studied *in vitro* the elastic properties of blood tumor cells in patients with acute lymphoblastic leucosis (ALL) under the influence of drugs with alkylation-type effect by using the method of atomic force microscopy. Among chemotherapeutic agents, we used cyclophosphamide and ifosfamide. The dependence of morphological and functional properties of lymphoid cells was found in the concentration of the investigated drugs. It was found that cyclophosphamide and ifosfamide used in the concentration of  $7,66 \cdot 10^{-6}$  mol/l increase the Young's modulus of lymphoblastic forms and cause a decrease in viability of the examined cells by 2.5 times compared with the control. The results of the research have a clinical and diagnostic value for the treatment of patients with ALL and evaluation of the quality of care.

**Key words:** tumor cells; cyclophosphamide; ifosfamide; acute lymphoblastic leucosis; Young's modulus

Острый лимфобластный лейкоз представляет собой широко распространенное заболевание системы крови. Его развитие сопровождается накоплением и появлением в костном мозге и периферической крови аномальных бластов, которые не дифференцируются до более зрелых лимфоидных клеток [3, 4]. Как известно, химиотерапия является основным методом лечения онкологических заболеваний, в том числе и острых лейкозов [1]. Многочисленные исследования посвящены описанию эффективности и проведению различных схем химиотерапий с использованием комбинаций противоопухолевых препаратов [3].

Циклофосфамид и ифосфамид являются весьма эффективными алкилирующими цитостатиками и применяются в комплексном лечении различных онкологических заболеваний [2, 5]. Понимание биомеханики и биофизики опухолевых клеток под действием этих препаратов дает возможность для значительных новых разработок в области диагностики заболеваний, профилактики, терапии и эффективности лекарственных средств. Целью настоящего исследования являлось изучение упруго-эластических свойств поверхности лейкоцитов ОЛЛ, жизнеспособных после действия препаратов алкилирующего типа действия.

## Материалы и методы исследования

Для эксперимента использовали венозную кровь больных острым лимфобластным лейкозом, поступивших на лечение в областную клиническую больницу Святителя Иоасафа г. Белгорода. Кровь получали путем венепункции и собирали в вакуумные пробирки Vacuette КЗЕ. Цельную кровь разделяли на фракции с помощью метода центрифугирования при 1500 об./мин в течение 5 минут. На следующем этапе отбирали надосадочную жидкость и лейкоцитарное кольцо с последующим центрифугированием по той же схеме. Для экспериментов *in vitro* использовали противоопухолевые препараты циклофосфамид и ифосфамид в 3 различных концентрациях ( $7,66 \cdot 10^{-6}$ ;  $7,66 \cdot 10^{-8}$ ;  $7,66 \cdot 10^{-10}$  моль/л). Далее проводили инкубацию полученной суспензии клеток с данными препаратами в течение 24 часов в термостате при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . В пробирки помещали суспензию клеток, 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. Инкубировали в термостате при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов. Перед экспериментом проводили оценку жизнеспособности клеток крови, а также после инкубации клеток с циклофосфамидом и ифосфамидом. Тест проводили путем окрашивания

5 мкл суспензии лейкоцитов 0,4% раствором трипанового синего. Подсчет клеток осуществляли на световом микроскопе Olympus. Определение упругости опухолевых клеток осуществляли на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита. Препараты готовили путем нанесения инкубированной ранее клеточной суспензии на стеклянные подложки. Сканирование проводили в полуконтактном режиме с использованием кантилевера NSG03. В программном обеспечении «Nova» с каждой клетки проводили сканирование 25 точек поверхности. По полученным силовым кривым оценивали упругость клеток. Достоверность полученных данных оценивали по критерию Манна – Уитни (для непараметрических данных) и критерию Стьюдента (для нормально распределенных данных) для 5%-го уровня значимости.

## Результаты исследования и их обсуждение

В опытах *in vitro* число жизнеспособных клеток было снижено в зависимости от концентрации циклофосфамида и ифосфамида. При максимально использованной дозе препаратов ( $7,66 \cdot 10^{-6}$ ) процент жизнеспособных лимфобластов снизился практически в 2,5 раза по сравнению с контролем. При уменьшении концентрации циклофосфамида до  $7,66 \cdot 10^{-8}$  моль/л жизнеспособность составила  $39,3 \pm 3,3$  % ( $p < 0,05$ ) клеток (рис. 1).

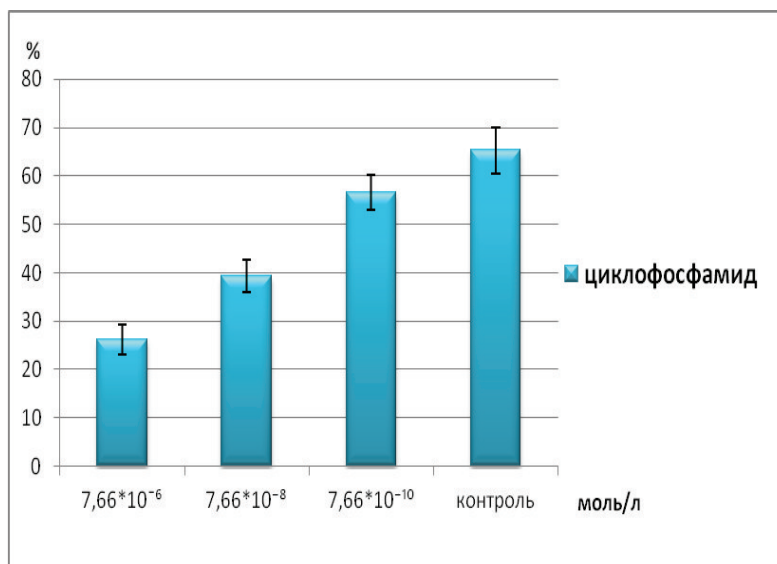


Рис. 1. Процент жизнеспособных клеток при инкубации с циклофосфамидом

Fig.1. Percentage of viable cells in incubation with cyclophosphamide

Через 24 ч инкубации в пробах с ифосфамидом в концентрации  $7,66 \cdot 10^{-10}$  моль/л  $49,9 \pm 3,9$ % ( $p < 0,05$ ) исследованных клеток были жизнеспособны, а при максимальной

концентрации ( $7,66 \cdot 10^{-6}$  моль/л) жизнеспособность клеток составила  $28,2 \pm 5,7$ % ( $p < 0,05$ ) (рис. 2).

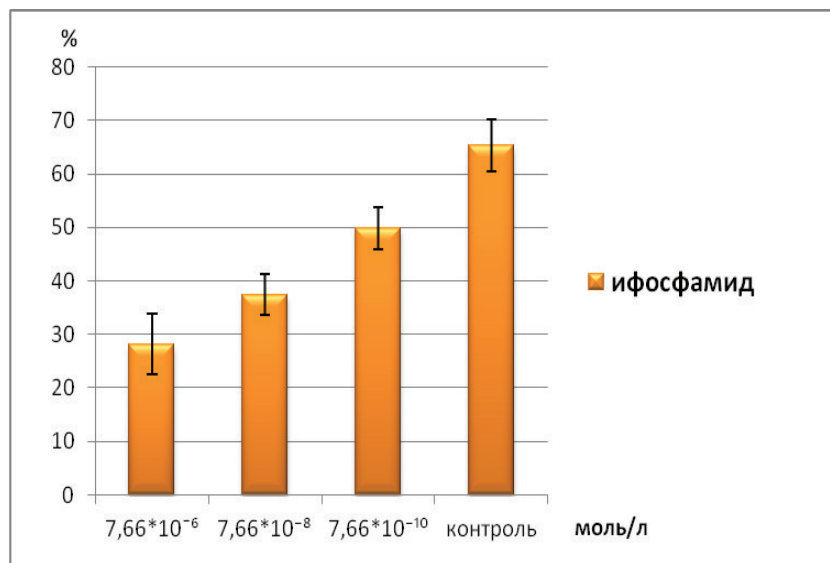


Рис. 2. Процент жизнеспособных клеток при инкубации с ифосфамидом  
Fig.2. Percentage of viable cells in incubation with ifosfamide

Под влиянием циклофосфамида в концентрации  $7,66 \cdot 10^{-6}$  моль/л по краю клетки наблюдали повышение модуля Юнга на 21,1% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (таблица 1). В образцах с концентрацией препарата  $7,66 \cdot 10^{-8}$  моль/л модуль Юнга лимфоцитарных клеток снизился на 5,7% ( $p < 0,05$ ) в области

подмембранного пространства, на 6,6% ( $p < 0,05$ ) – около ядра и на 5,2% ( $p < 0,05$ ) – в области цитоплазмы. Аналогично в пробах с циклофосфамидом ( $7,66 \cdot 10^{-10}$  моль/л) модуль Юнга клеток достоверно снизился в среднем на 21,6 % ( $p < 0,05$ ).

**Значение модуля Юнга лимфоцитов в группе больных ОЛЛ под влиянием циклофосфамида (n=5)**

Таблица 1

Table 1

**Young's modulus of lymphocytes in patients with ALL under the influence of cyclophosphamide**

Образцы	Модуль Юнга, $\mu Pa$			
	КК	ОЯ	Я	Ц
Контроль	2,398 $\pm$ 0,056	2,380 $\pm$ 0,089	2,243 $\pm$ 0,161	2,351 $\pm$ 0,082
$7,66 \cdot 10^{-6}$ моль/л	2,904 $\pm$ 0,135 <sup>u</sup>	2,484 $\pm$ 0,106	2,357 $\pm$ 0,201	2,584 $\pm$ 0,114
$7,66 \cdot 10^{-8}$ моль/л	2,361 $\pm$ 0,069 <sup>u</sup>	2,223 $\pm$ 0,120 <sup>u</sup>	2,178 $\pm$ 0,206	2,230 $\pm$ 0,098 <sup>u</sup>
$7,66 \cdot 10^{-10}$ моль/л	1,874 $\pm$ 0,047 <sup>u</sup>	1,879 $\pm$ 0,074 <sup>u</sup>	1,886 $\pm$ 0,176	1,842 $\pm$ 0,063 <sup>u</sup>

Примечание: КК – край клетки, Ц – цитоплазма, ОЯ – околядерное пространство, Я – ядро. <sup>u</sup> – достоверность различий в опытных пробах по сравнению с результатами измерений в контрольной пробе по критерию Манна – Уитни ( $p < 0,05$ ).

Под действием препарата ифосфамида в концентрации  $7,66 \cdot 10^{-6}$  моль/л модуль Юнга клеток по краю клетки достоверно повысился на

37% ( $p < 0,05$ ) и на 43% ( $p < 0,05$ ) – в области цитоплазмы (таблица 2).

**Значение модуля Юнга у больных ОЛЛ под влиянием ифосфамида (n=5)**

Таблица 2

Table 2

**Young's modulus of lymphocytes in patients with ALL under the influence of ifosfamide**

Образцы	Модуль Юнга, $\mu Pa$			
	КК	ОЯ	Я	Ц
Контроль	2,398 $\pm$ 0,056	2,380 $\pm$ 0,089	2,243 $\pm$ 0,161	2,351 $\pm$ 0,082
$7,66 \cdot 10^{-6}$ моль/л	3,287 $\pm$ 0,098 <sup>u</sup>	3,440 $\pm$ 0,226	3,271 $\pm$ 0,536	3,361 $\pm$ 0,156 <sup>u</sup>
$7,66 \cdot 10^{-8}$ моль/л	3,122 $\pm$ 0,124 <sup>u</sup>	2,908 $\pm$ 0,214 <sup>u</sup>	3,121 $\pm$ 0,312 <sup>u</sup>	3,007 $\pm$ 0,190 <sup>u</sup>
$7,66 \cdot 10^{-10}$ моль/л	2,589 $\pm$ 0,074	2,459 $\pm$ 0,116	2,403 $\pm$ 0,226	2,479 $\pm$ 0,114

Примечание: КК – край клетки, Ц – цитоплазма, ОЯ – околядерное пространство, Я – ядро. <sup>u</sup> – достоверность различий в опытных пробах по сравнению с результатами измерений в контрольной пробе по критерию Манна – Уитни ( $p < 0,05$ ).

В пробах ифосфамида с концентрацией  $7,66 \cdot 10^{-8}$  моль/л модуль Юнга лимфоцитов был значительно повышен во всех областях. При этом наибольшее увеличение модуля Юнга наблюдалось в области ядра – на 39,1% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольными пробами.

### Заключение

В результате проведенных исследований было установлено, что влияние препаратов алкилирующего типа действия в условиях *in vitro* на лейкоциты больных ОЛЛ носит дозозависимый характер. При минимальной используемой концентрации ( $7,66 \cdot 10^{-10}$  моль/л) циклофосфамида модуль Юнга клеток снизился в среднем на 21,6% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Под действием ифосфамида клетки более чувствительны к средней концентрации ( $7,66 \cdot 10^{-8}$  моль/л), при этом модуль Юнга значительно возрос во всех областях, наиболее выраженное повышение наблюдали по краю клетки. Полученные данные позволяют оценить чувствительность лимфоцитов к действию препаратов циклофосфамида и ифосфамида в различных концентрациях. Это имеет практическое значение для оптимизации схемы лечения больных ОЛЛ.

### Список литературы

1. Блохин Д.Ю. Механизмы формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Клиническая онкогематология. 2009. Т.2, №1. С. 167-175.
2. Бобрышева И.В. Изменение ультраструктуры тимуса белых крыс после введения циклофосфамида // Вестник ВГМУ. 2013.Т.12, №4. С.63-69.
3. Вотякова О.М., Османов Д.Ш. Лечение рецидивов множественной миеломы бортезомибом в сочетании с циклофосфамидом и преднизолоном // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2012. Т.5, №2. С.135-140.
4. Смирнова О.В., Манчук В.Т. Особенности клеток иммунной системы при остром лимфобластном лейкозе // Медицинская иммунология. 2013. Т.15, №6. С.577-584.
5. Шиффман Ф.Дж. Патфизиология крови. СПб.: «Издательство БИНОМ» – «Невский диалект», 2000. 448 с.
6. Шорманов В.К., Столяров М.Л. Спектрофотометрическое определение циклофосфана и ифосфамида на основе получения их нитропроизводных // Научные ведомости Белгородского государственного университета.

Серия: Медицина. Фармация. 2014. Т.26, №11. С. 251-254.

### References

1. Blokhin D.Y. The mechanisms of formation of drug resistance of tumors // Clinical oncohematology. 2009. Vol. 2. No. 1. Pp. 167-175.
2. Bobrysheva I.V. The change in the ultrastructure of the thymus in white rats after introduction of cyclophosphamide // The Bulletin of VGMU. 2013. Vol. 12. No. 4. Pp.63-69.
3. Votyakova O.M., Osmanov D.Sh. The treatment of relapse of multiple myeloma with bortezomib in combination with cyclophosphamide and prednisolone // Clinical oncohematology. Fundamental research and clinical practice. 2012. Vol. 5. No. 2. Pp.135-140.
4. Smirnova O.V., Manchuk V.T. Features of immune cells in acute lymphoblastic leukemia // Medical Immunology. 2013. Vol. 15. No. 6. Pp. 577-584.
5. Shiffman F.J. Pathophysiology of blood. Edition Group «BINOM», - «Nevsky Dialect», 2000. 448 p.
6. Shormanov V.K., Stolyarov M.L. Spectrophotometric determination of cyclophosphamide and ifosfamide based on obtaining their nitro-derivates // Scientific Bulletin of BSU. Medicine. Pharmacy. 2014. Vol. 26. No. 11. Pp. 251-254.

**Нгуен Тхи Хоа**, студент

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»  
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия  
E-mail: 691628@bsu.edu.ru

**Кротова Екатерина Евгеньевна**, студент

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»  
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия  
E-mail: 691628@bsu.edu.ru

**Шамрай Елена Александровна**, аспирант

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»  
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия  
E-mail: elenashamray@yandex.ru

**Беляева Светлана Сергеевна**, заведующая гематологическим отделением, кандидат медицинских наук

Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа,  
ул. Некрасова, 8/9, г. Белгород, 308007, Россия  
E-mail: S-belyaeva@yandex.ru

**Кролевец Александр Александрович**, Доктор химических наук, профессор кафедры технологии продуктов питания

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия  
*E-mail: krolevets@bsu.edu.ru*

**Nguyen Thi Hoa**, Student  
Belgorod State National Research University,  
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia  
*E-mail: 691628@bsu.edu.ru*

**Krotova Ekaterina Evgenievna**, Student  
Belgorod State National Research University,  
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia.  
*E-mail: 691628@bsu.edu.ru*

**Shamray Elena Aleksandrovna**, Postgraduate Student, Department of Biology,  
Belgorod State National Research University,  
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia  
*E-mail: elenashamray@yandex.ru*

**Belyaeva Svetlana Sergeevna**, PhD in Medicine, Head of Haematological Department,  
Belgorod St. Ioasaph Regional Clinical Hospital  
8/9 Nekrasova St., Belgorod, 308007, Russia  
*E-mail: S-belyaeva@yandex.ru*

**Krolevets Aleksandr Aleksandrovich**, Doctor of Chemistry, Professor, Department of Food Technology  
Belgorod State National Research University,  
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia  
*E-mail: krolevets@bsu.edu.ru*