

УДК 616.155.392: 616-006.446

**МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ  
ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК****А. И. Свирновский****Республиканский научно-практический центр трансфузиологии  
и медицинских биотехнологий, г. Минск**

Доклиническая диагностика лекарственной чувствительности опухолевых клеток кроветворной системы способствует назначению адекватной терапии и ее индивидуализации. Прослежены варианты осуществления лабораторных исследований и значение каждого этапа.

**Ключевые слова:** лейкоз, лекарственные средства, чувствительность клеток *ex vivo*, значение для терапии.

**METHODOLOGY FOR STUDIES OF DRUG SENSITIVITY  
OF LEUKEMIA CELLS****A. I. Svirnovskiy****Republican Research Center for Transfusiology and  
Medical Biotechnology, Minsk**

The preclinical diagnostics for drug sensitivity of malignant blood cells contributes to administration of adequate treatment and its individualization. The scheme of laboratory studies and significance of each stage has been presented in the article.

**Key words:** leukemia, drugs, cell sensitivity *ex vivo*, significance of treatment.

Назначение адекватной терапии при любых заболеваниях предопределяется сегодня не только соответствующей нозологической диагностикой, без которой оно в принципе невозможно, но и использованием ряда диагностических процедур на молекулярном, клеточном, тканевом, органном и организменном уровнях, что в совокупности дает представление о степени нарушения специфической функции пораженного органа и дискоординации взаимодействия различных защитных систем организма. Помимо диагностического значения особый прогностический и терапевтический смысл приобретает возможность выполнения относительно неинвазивных исследований для выделения объектов из организма, анализ которых *ex vivo* позволяет осуществить выбор индивидуализированной терапии и предсказать ответ на нее даже при учете возможных различий в ответе опухолевых клеток на лекарственные средства в организме и вне его.

При опухолевых заболеваниях кроветворной ткани такая возможность является вполне реальной в случае выделения из организма патологических клеток, которые составляют морфологический субстрат заболевания, для определения их чувствительности к противоопухолевым препаратам до назначения пациенту лечения. Если впервые чувствительность опухолевых клеток к лекарственным препаратам определили более полувека назад, то интенсивное использование этого метода в клинических целях началось гораздо позже [1–5].

Однако в настоящее время применение чувствительность-адаптированной терапии лейкозов не регламентировано соответствующими документами, хотя она имеет ряд преимуществ перед успешно используемой риск-адаптированной терапией, в основе которой лежит оценка ряда молекулярно-генетических и фенотипических свойств клеток. Определение мутаций, хромосомных aberrаций или экспрессии даже многих генов, несмотря на показанную эффективность такого подхода, однозначно не прогнозирует чувствительность к конкретным противоопухолевым препаратам у каждого пациента [6, 7]. Действительно, в рамках доказательной медицины уже накопилось достаточно фактического материала, который свидетельствует о возможности персонификации терапии лейкозов без нарушения требований доказательной медицины. Терапия, основанная на доклиническом определении с помощью цитометрического метода непосредственно лекарственной чувствительности клеток, обеспечивает в несколько раз больший терапевтический ответ, чем при назначении терапии без учета ответа клеток на препараты *in vitro* [8–13].

В связи с этим назрела необходимость разработки многоэтапной методологии проведения доклинической диагностики лекарственной чувствительности лейкозных клеток. Лабораторное обеспечение персонифицированной терапии, особенно если учесть необходимость многократного определения лекарственной чувствительности лейкозных клеток у ка-

жлого пациента, связано с разработкой для клинической практики, с одной стороны, мало затратных в экономическом и производственном отношении методов, а с другой, — эффективных по информативности и доступности для клинико-диагностической лаборатории методов.

На 1-м этапе можно провести скрининг лекарственной чувствительности лейкозных клеток, используя для этой цели разработанный в рамках выполнения инновационного проекта набор реагентов (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, кафедра гематологии и трансфузиологии БелМАПО, 9-я ГКБ г. Минска) [14]. При этом исследуется чувствительность клеток к одной концентрации, которая близка к терапевтической, целого ряда препаратов (до 24 лекарственных средств, зарегистрированных для использования в Беларуси) после контакта с лекарственными средствами (регистрируется с помощью МТТ-теста по сохранению метаболической активности клеток), что указывает на чувствительность клеток к препаратам. Результаты позволяют определить спектр лекарственной чувствительности лейкозных клеток пациента. При этом появляется возможность судить о перекрестной резистентности клеток к некоторым препаратам. Выполнение первого этапа диагностики лекарственной чувствительности клеток станет при использовании набора доступным для гематологических лабораторий областных больниц.

На 2-м этапе анализируется диапазон концентраций тех препаратов, к которым клетки оказались наиболее чувствительными и (или) включены в протоколы для лечения данного варианта заболевания. Для этого используются 5–6 разведений препаратов в области, близкой к терапевтической концентрации, использованной на первом этапе. При этом по графику путем аппроксимации рассчитывают концентрацию, вызывающую 50 %-ную ингибицию клеток (IC<sub>50</sub>). Вид кривой при построении дозозависимости выживаемости лейкозных клеток может быть использован для оценки целесообразности назначения высокодозной химиотерапии. Это исследование и выполнение следующих этапов требуют участия более специализированной лабораторной службы (исследовательские лаборатории гематологического профиля).

На 3-м этапе диагностируется чувствительность испытуемых клеток к протокольному сочетанию препаратов.

Несмотря на то, что концепция индивидуализации противолейкозной терапии на основе мониторинга лекарственной чувствительности лейкозных клеток, в том числе не только при выборе протокольной терапии, но и в ее

процессе находит все больше сторонников, возможно появление непредвиденных ситуаций.

Действительно, попытки использования персонализированной терапии могут потребовать от клинициста принятия неординарных решений. Так, например, использование в больших дозах препаратов, к которым клетки *in vitro* оказались чувствительными, не исключает высокой токсичности и по отношению к нормальным тканям организма пациента. Дискутабельными остаются вопросы внесения корректив в протоколы лечения при нечувствительности клеток к одному или нескольким препаратам протокола. Возможно, что в связи с этим некоторые принципы проведения многоцентровых исследований и правила доказательной медицины будут нуждаться в уточнении. Важно правильно оценить перспективные лекарственные воздействия на каждого пациента, причем в различные периоды заболевания и даже вне связи с экспрессией отдельных генов, их мутационным статусом или хромосомными aberrациями, так как характер ответа лейкозных клеток определяется совокупностью ряда их биологических свойств, взаимодействие между которыми ответственно за интегральный ответ клеток на повреждение.

Следует также иметь в виду, что терапия даже адекватными препаратами в течение одного курса может ускорить ранний ответ, но это еще не гарантирует увеличение продолжительности жизни, так как лекарственная нечувствительность может развиваться в течение последующих курсов и ее надо периодически контролировать.

На 4-м этапе можно попробовать подобрать новые эффективные сочетания препаратов (создание перспективных стандартных протоколов или терапия спасения конкретного пациента, нечувствительного к стандартным протоколам).

Определение лекарственной чувствительности лейкозных клеток, находящихся в контакте со стромой (на монослое мезенхимальных клеток), можно рассматривать пока как факультативный этап для составления заключения о лекарственной чувствительности лейкозных клеток в условиях, приближенных к ситуации *in vivo*.

Рисунок 1, на котором показаны этапы исследования, не обязательно отражает их последовательность. Потребность в проведении соответствующего исследования определяется конкретной задачей, хотя скрининговый тест, по-видимому, целесообразно выполнить в самом начале.

Анализируя методологию непосредственного исследования лекарственной чувствительности лейкозных клеток, нельзя забывать, что в перспективе она может быть заменена параллельными детальными молекулярными исследованиями генетического профиля опухолевых и нормальных клеток одного и того

же пациента и установлением эффективности противоопухолевой терапии при наличии совокупности тех или иных мутаций в злокачественных клетках. Несмотря на начало осуществ-

ления таких проектов, вопрос об экономической эффективности терапии, основанной на фармакогенетических исследованиях, остается также предметом исследований.

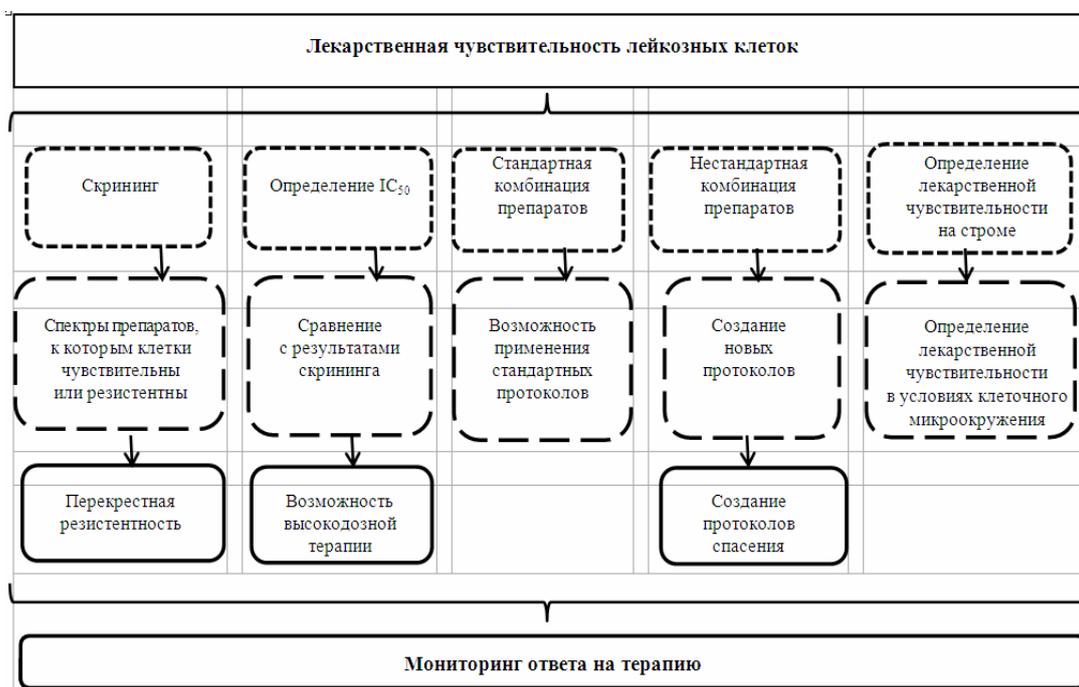


Рисунок 1 — Исследование лекарственной чувствительности лейкозных клеток *ex vivo*

Представление о чувствительность-адапированной терапии при внедрении ее в теорию и практику клинической лейкологии расширяет возможности персонализированной терапии вследствие доступности выбора адекватных препаратов и их сочетаний. Кроме того, постоянный мониторинг лекарственной чувствительности лейкозных клеток препятствует неадекватному использованию дорогостоящих лекарственных препаратов, которые в случае нечувствительности к ним клеток вызывают лишь неоправданные токсические эффекты. Поэтому желательно диагностировать лекарственную чувствительность лейкозных клеток перед каждым курсом терапии, особенно если клинически появляются стандартные критерии резистентности к терапии или ее высокой токсичности с целью последующей коррекцией терапии.

**БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. *Bosanquet, A. G.* Novel *ex vivo* analysis of nonclassical, pleiotropic drug resistance and collateral sensitivity induced by therapy provides a rationale for treatment strategies in chronic lymphocytic leukemia / A. G. Bosanquet, P. B. Bell // *Blood*. — 1996. — Vol. 87, № 5. — P. 1962–1971.  
 2. *In vitro* cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia / G. J. Kaspers [et al.] // *Blood*. — 1997. — Vol. 90, № 7. — P. 2723–2729.  
 3. *Свирновский, А. И.* Биологические свойства лейкозных клеток и клинический фенотип при хроническом лимфоцитарном лейкозе / А. И. Свирновский // *Гематология и трансфузиология*. — 2010. — № 1. — С. 25–32.  
 4. Анализ чувствительности лейкоэмических клеток к химиопрепаратам при остром лимфобластном лейкозе у детей по

результатам МТТ-теста *ex vivo* / Т. А. Астрелина [и др.] // *Гематология и трансфузиология*. — 2002. — № 4. — С. 3–7.  
 5. *Шман, Т. В.* Связь лекарственной чувствительности и спонтанного апоптоза лейкоэмических клеток с факторами прогноза при В-линейном остром лимфобластном лейкозе у детей / Т. В. Шман, Т. А. Углова, В. П. Савицкий // *Гематология и трансфузиология*. — 2002. — Т. 47, № 4. — С. 8–10.  
 6. ABCB1 and ABCG2 proteins. Their functional activity and gene expression in concert with drug sensitivity of leukemia cells / A. I. Svimovski [et al.] // *Hematology*. — 2009. — Vol. 14, № 4. — P. 204–212.  
 7. Лекарственная чувствительность лимфоцитов при хроническом лимфоцитарном лейкозе и мутационный статус генов вариабельной области тяжелых цепей иммуноглобулинов / А. И. Свирновский [и др.] // *Вестник гематологии*. — 2011. — Т. 7, № 2. — С. 37–38.  
 8. *Bosanquet, A. G.* Laboratory tests of cytotoxic drug sensitivity / A. G. Bosanquet // *Biomedical Scientist*. — 2007. — Vol. 51. — P. 432–435.  
 9. Лекарственная чувствительность лейкозных клеток *ex vivo* и прогнозирование ответа пациентов с ХЛЛ на терапию / А. И. Свирновский [и др.] // *Здравоохранение*. — 2010. — № 3. — С. 57–60.  
 10. *Galderisi, F.* Flow cytometric chemosensitivity assay as a predictive tool of early clinical response in acute lymphoblastic leukemia / F. Galderisi // *Pediatric Blood Cancer*. — 2009. — Vol. 53, № 4. — P. 543–550.  
 11. *Kyung, R. J.* Relationship between *in vitro* chemosensitivity assessed with MTT assay in clinical outcomes in 103 patients with acute leukemia / R. J. Kyung // *Korean J Lab Med*. — 2007. — Vol. 27, № 2. — P. 89–95.  
 12. *Bosanquet, A. G.* Individualized tumor response testing in leukemia and lymphoma / A. G. Bosanquet, P. Nygren, L. M. Weisenthal // In: G. J. Kaspers, eds. *Innovate leukemia and lymphoma therapy*. — New York: Informa Healthcare. — 2008. — P. 23–43.  
 13. *Bosanquet, A. G.* Drug cross-resistance and therapy-induced resistance in chronic lymphocytic leukemia by an enhanced method of individualized tumor response testing / A. G. Bosanquet // *British Journal of Hematology*. — 2009. — Vol. 146, № 4. — P. 384–395.  
 14. Разработка принципов создания диагностического набора для определения лекарственной чувствительности лейкозных клеток / А. И. Свирновский [и др.] // *Проблемы здоровья и экологии*. — 2011. — № 3 (29). — С. 94–100.

Поступила 07.09.2012