

# Разработка *ex vivo*-модели и оценка химиочувствительности бластных клеток в индивидуализации терапии острых миелоидных лейкозов

А.С. Поляков, Я.А. Носков, Ю.В. Никитин, В.В. Тыренко, С.Н. Колюбаева, А.Н. Богданов, В.Н. Семелев, О.Р. Петрова, С.В. Бондарчук, Д.К. Жоголев, А.Д. Золотарёв, А.В. Ковалев, Ю.Е. Пучкова

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России;  
Россия, 194044 Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

**Контакты:** Алексей Сергеевич Поляков doctorpolyakov@gmail.com

Несмотря на постоянные попытки совершенствования терапии, исходы острых миелоидных лейкозов остаются практически неизменными уже на протяжении нескольких десятилетий. Пока не оправдывают надежд на изменение ситуации даже перспективные препараты, создаваемые с учетом более глубокого понимания биологии лейкозов. По-прежнему наилучшие результаты достигаются лишь при высокодозной индукционной химиотерапии, применение которой возможно только у ограниченного числа пациентов. Высокая фенотипическая и генотипическая разнородность миелоидных лейкозов определяет актуальность развития персонализированных подходов к терапии, в том числе основанных на определении индивидуальной химиочувствительности опухолевых клеток.

В статье представлены результаты разработки модели острого миелоидного лейкоза *ex vivo*, а также апробации 2 методов исследования химиочувствительности *in vitro*: оценки генотоксичности противоопухолевых препаратов в микроядерном тесте, а также жизнеспособности и химиочувствительности отсортированных бластных клеток. Определены перспективы индивидуализированной терапии миелоидных лейкозов на основании внедрения и дальнейшего совершенствования результатов работы.

**Ключевые слова:** острый миелоидный лейкоз, вторичный острый миелоидный лейкоз, модель *ex vivo*, химиочувствительность *in vitro*, генотоксичность, микроядерный тест, сортировка клеток, индивидуализация терапии

**Для цитирования:** Поляков А.С., Носков Я.А., Никитин Ю.В. и др. Разработка *ex vivo*-модели и оценка химиочувствительности бластных клеток в индивидуализации терапии острых миелоидных лейкозов. Онкогематология 2019;14(2):59–69.

DOI: 10.17650/1818-8346-2019-14-2-59-69

## *Ex vivo*-model design and evaluation of the sensitivity of blast cells to chemotherapy as a way to personalize the treatment of acute myeloid leukemia

A.S. Polyakov, Ya.A. Noskov, Yu.V. Nikitin, V.V. Tyrenko, S.N. Kolubaeva, A.N. Bogdanov, V.N. Semelev, O.R. Petrova, S.V. Bondarchuk, D.K. Zhogolev, A.D. Zolotarev, A.V. Kovalev, Yu.E. Puchkova  
Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Ministry of Defense of the Russia;  
6 Akademika Lebedeva St., Saint-Petersburg, 194044 Russia

Despite continuous attempts to improve therapy, the outcomes of acute myeloid leukemia remain almost unchanged over last decades. Drugs made with a more complete understanding of the biology of acute myeloid leukemia do not equal the hopes for better prognosis. The best results are achieved only with high-dose chemotherapy, which is only possible for a limited number of patients. High phenotypic and genotypic heterogeneity of acute myeloid leukemia defines the relevance to develop personalized approaches to therapy, including those based on determination of individual drug sensitivity of blast cells.

This article presents the results of developing an *ex-vivo* model of acute myeloid leukemia, as well as testing of two *in vitro* sensitivity assessment methods: evaluation of the genotoxicity of drugs in the micronucleus test and vitality and sensitivity to chemotherapy in sorted blast cells. Prospects of individualized therapy of acute myeloid leukemia were determined based on introduction into clinical practice and continuing the research.

**Key words:** acute myeloid leukemia, secondary acute myeloid leukemia, *ex vivo* model, drug sensitivity testing, genotoxicity, micronucleus test, fluorescence activated cell sorting, individualization of drug therapy

**For citation:** Polyakov A.S., Noskov Ya.A., Nikitin Yu.V. et al. *Ex vivo*-model design and evaluation of the sensitivity of blast cells to chemotherapy as a way to personalize the treatment of acute myeloid leukemia. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2019;14(2):59–69.

### Введение

Несмотря на непрекращающиеся попытки совершенствования подходов и методов специфической и сопроводительной терапии, острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) являются одной из самых серьезных проблем онкогематологии. Долгосрочные результаты терапии ОМЛ остаются практически неизменными уже более 20 лет, а среди лиц старше 60 лет, составляющих большинство заболевших (при медиане возраста 65 лет), — более 30 лет, что определяет особую актуальность интенсификации исследований, направленных хоть на какую-то положительную динамику в решении этой проблемы [1].

Медиана заболеваемости ОМЛ продолжает увеличиваться, несмотря на успехи в других областях профилактической и практической медицины, увеличение продолжительности жизни. Среди возрастных пациентов 5-летняя выживаемость не превышает 10–12 % [1, 2]. Повышением результативности гематологической и онкологической помощи считается увеличение числа пациентов с особой группой ОМЛ — вторичными ОМЛ (вОМЛ), принципиальными отличиями которых является патогенетическая связь с другими новообразованиями, а также с предшествующей химио- или лучевой противоопухолевой терапией. В настоящее время вклад вОМЛ в общее число случаев ОМЛ оценивается в пределах 25–35 % [2, 3], однако, по-видимому, он будет расти с увеличением выживаемости пациентов [4].

Выявление вОМЛ по сравнению с первичными ОМЛ уже при установке диагноза позволяет определить принципиально иной прогноз, выражающийся в существенно более низких показателях частоты ремиссий, длительности безрецидивной и общей выживаемости (ОВ) [2, 5, 6]. Наличие вОМЛ является фактором прогноза ранней смерти [7, 8]. Это определяется характером возникновения заболевания, связанного с прогрессированием или с трансформацией «хронического» миелопролиферативного новообразования, истощением гемопоэтических резервов и генотоксичностью предшествующей химио- или лучевой терапии по поводу любых других опухолей [2]. Помимо этого, высокий средний возраст пациентов с вОМЛ, снижение активности, фоновая коморбидность и токсичность ранее проведенного лечения значительно ограничивают возможности выбора специфической терапии.

Для пациентов с вОМЛ также характерна более высокая частота неблагоприятных цитогенетических и молекулярных aberrаций (моносомии 5, 7, делеции 5q, 7q, мутации 11q23, inv(3), t(3;3) и др.), самостоятельно определяющих худший прогноз и резистентность к терапии [5, 9–11]. В таких случаях практически нивелируется прогностическое значение возраста, других хромосомных аномалий и многих других факторов [2].

Все вышеперечисленное определяет осознание необходимости создания новых индивидуализирован-

ных подходов к терапии ОМЛ, особенно вОМЛ, выбор тактики с учетом генотипической, фенотипической и прогностической разнородности опухолевых клонов в пределах одного заболевания.

### Современные подходы к терапии острых миелоидных лейкозов

Несмотря на значительные патогенетические и прогностические различия, подходы к индукционной терапии ОМЛ и вОМЛ остаются практически одинаковыми и неизменными на протяжении нескольких десятилетий. Частота достижения полных ремиссий после стандартных схем терапии на основе цитозина-арабинозида и даунорубина («7 + 3») при вОМЛ находится в пределах 30–60 %, а длительность ОВ не превышает 9 мес [2, 12–14]. При этом применение монотерапии цитарабином (малые дозы цитарабина) и других схем со сниженной токсичностью из-за возрастных и коморбидных особенностей пациентов приводит к еще менее обнадеживающим результатам [7, 12]. В связи с неблагоприятным по факту выявления вОМЛ прогнозом практически всем пациентам показана аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Однако даже для той небольшой когорты пациентов, рассматриваемой в качестве кандидатов на аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток после учета возраста, коморбидности, других факторов риска, оценки результатов и осложнений индукционной терапии, предполагается гораздо более высокая ассоциированная с трансплантацией летальность и худший прогноз [15, 16].

Неудовлетворительные результаты лечения ОМЛ обуславливают актуальность внедрения новых подходов к терапии. Наиболее широкое распространение в качестве альтернативных получили схемы на основе гипометилирующих агентов — азацитидина и децитабина. В исследовании на когорте пациентов с ОМЛ и миелодиспластическим синдромом для сравнения эффективности гипометилирующих агентов и цитарабинсодержащих схем были показаны более высокая частота достижения полных ремиссий (41 % против 35 %) и увеличение времени до возникновения рецидива (9 мес против 5 мес) для альтернативных препаратов [17]. Однако при выделении в отдельную группу пациентов с вОМЛ различий в эффективности гипометилирующих агентов и цитарабинсодержащих схем уже не выявляется, хотя и сохраняется некоторое преимущество в длительности ОВ (6,9 мес против 5,4 мес) [18]. Подобные результаты в отношении вОМЛ были достигнуты и при сравнении азацитидина с полихимиотерапией по схеме МЕС (митоксантрон, этопозид, цитарабин): показана даже меньшая частота ответов на гипометилирующую терапию при сохранении преимущества в показателях выживаемости [19]. Несмотря на наличие некоторых преимуществ, в отечественных гематологических центрах

применение гипометилирующих агентов в целом не влияет на общие результаты лечения ОМЛ [1]. Относительно более высокая стоимость препаратов и связанные с этим организационные сложности не только существенно ограничивают охват пациентов современной терапией, но иногда и являются причиной низкой воспроизводимости протоколов.

В настоящее время в нашей стране недоступен и целый ряд перспективных препаратов для терапии ОМЛ. Так, значительное преимущество в показателях ОВ было показано для комплексного липосомального агента цитарабина и даунорубицина (СРХ-351) по сравнению со стандартной схемой «7 + 3» (9,56 мес против 5,95 мес), при этом безрецидивная выживаемость была почти сопоставима (2,53 мес против 1,31 мес), а частота достижения ремиссии для СРХ-351 оказалась даже ниже [20]. Одобренное в США в 2000 г. решение о применении гемтузумаба озогамидина было отозвано в 2010 г. по причине отсутствия преимуществ по сравнению со стандартными схемами терапии и токсичности в виде развития синдрома слабости синусового узла [21]. После повторного одобрения в 2017 г. на основании доказательств лучшей переносимости при снижении дозировки [22] гемтузумаба озогамидин вновь не показал преимуществ в показателях ОВ по сравнению с другими доступными методами [22, 23].

Ожидания от исследований перспективных агентов в большинстве случаев исходят из теоретического обоснования принципиально новых фармакодинамических свойств. Предполагалось, что применение амонафида – нового ингибитора топоизомеразы II – получит преимущество над антрациклинами вследствие отсутствия характерной для последних утраты Р-гликопротеина. Однако результаты клинического исследования не выявили различий при использовании комбинации амонафида и цитарабина по сравнению со схемой «7 + 3» [24]. Ингибитор PARP (белок, угнетающий репарацию ДНК) велипариб смог показать значимую активность при вОМЛ лишь в испытаниях *in vitro* [25]. Селективный ингибитор циклинзависимых киназ алвоцидид в исследовании II фазы показал большую эффективность в комбинации с цитарабином и митоксантроном в достижении полных ремиссий при вОМЛ по сравнению со схемой «7 + 3» (60 % против 35 % пациентов) [26].

Неоднозначность перспектив появления и внедрения в клиническую практику новых направлений противоопухолевого воздействия определяет сохранение актуальности исследований, направленных на модификацию уже существующих схем терапии, прежде всего основанных на цитозине-арабинозиде. Так, в исследовании EORTC-GINEMA AML-12 оценивали сочетание высоких доз цитарабина с эпопозидом и даунорубицином у 105 пациентов с вОМЛ. Было показано значительное, по сравнению со стандартными подходами, увеличение частоты полных ремиссий

(94,1 % против 59,1 % в группе пациентов в возрасте младше 45 лет и 82,8 % против 52,9 % в группе старше 45 лет), а также повышение 6-летней ОВ у молодых пациентов (76,5 % против 28,7 %) [27]. В 2 похожих исследованиях эффективности схемы FLAG (флударабин, высокие дозы цитарабина и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора) у пациентов в возрасте до 60 лет частота достижения ремиссий составила 58 и 64 % соответственно, летальность, ассоциированная с лечением, – 12 и 16 %. В 1-м исследовании ОВ превысила 12 мес (для 54 % пациентов), во 2-м исследовании составила 8 мес (для всей выборки) [28, 29]. Применение режима GCLAC (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор – праймер с клофарабином и высокими дозами цитарабина) позволило достичь полных ремиссий у 76 % пациентов, медиана ОВ составила 24,3 мес, а летальность, ассоциированная с лечением, не превышала 2 % [30]. Возможно, более обнадеживающие результаты терапии были связаны с относительно низким средним возрастом испытуемых – 53 года. Результаты большинства исследований подтверждают правило о том, что при любых подходах к терапии увеличение среднего возраста и доли пациентов с вОМЛ всегда ассоциируется со снижением частоты ответов и сроков ОВ и безрецидивной выживаемости при росте летальности, связанной с лечением.

Недостаточная эффективность современной терапии ОМЛ и не соответствующая ожиданиям клиническая эффективность перспективных препаратов могут объясняться, прежде всего, алгоритмическими принципами при создании и совершенствовании подходов к терапии, разрабатываемых без учета индивидуальных особенностей каждого случая заболевания – уникального патологического процесса в рамках весьма гетерогенной группы ОМЛ, существенно более разнообразной, чем формы, представленные в современной классификации. Поэтому отсутствие в ближайшей перспективе внедрения новых, активных в отношении большинства вариантов ОМЛ терапевтических агентов, оправдывает попытки дальнейшего совершенствования помощи на основе разработки индивидуализированных подходов к лечению.

### **Индивидуализация противоопухолевой терапии в онкогематологии**

Концепция пациент-специфичного выбора терапии на основе изучения восприимчивости к фармакологическому воздействию известных этиопатогенетических факторов болезни не нова. Наибольшие успехи в этом отношении достигнуты в области антимикробной терапии в виде применения в клинике результатов микробиологических исследований. В то же время лишь недавно были сделаны первые шаги к использованию таких подходов и при выборе противоопухолевых препаратов [31–36]. До настоящего времени применение методов оценки воздействия

на опухолевые клетки различных препаратов было ограничено доклиническими этапами испытаний разрабатываемых фармакологических субстанций. В качестве объекта в таких исследованиях выступают или модели на животных, или воспроизводимые клеточные линии различных новообразований.

Несмотря на то что реализация идеи скрининга чувствительности к цитостатикам конкретного опухолевого субстрата кажется вполне возможной, ее использованию в практической онкологии препятствуют почти непреодолимые трудности: неоднородность строения и клеточная гетерогенность новообразований, выделение и лабораторное воспроизведение ведущего пролиферирующего клона, а также выполнение дополнительной биопсии в необходимый для исследования момент. Кроме этого, оценка культуральной модели опухоли вне организма не учитывает таких условий, как микроокружение, васкуляризация, барьерные свойства, нарушение межклеточных контактов, иммунный ответ, взаимодействие препаратов [37].

В то же время опухоли системы крови представляют собой гораздо более перспективный в этом отношении предмет для изучения. Большинство онкогематологических заболеваний характеризуется однородностью опухолевого клона, его относительно равномерным распределением в костном мозге или периферической крови. Даже при лимфомах злокачественные инфильтраты в различных участках лимфоидной и других тканях фенотипически и генотипически однородны.

Пригодность для культурального изучения клеток, полученных из аспиратов костного мозга или периферической крови, подтверждена многими исследователями [38, 39], а первые шаги по разработке методов оценки химиочувствительности лейкозных клеток *in vitro* и определению их клинического и прогностического значения были сделаны еще в начале 1990-х годов [40, 41]. И только в последние несколько лет стали появляться работы, посвященные результатам реального применения подобных лабораторных тестов при выборе терапии, в том числе при ОМЛ [42–47].

#### **Разработка *ex vivo*-модели острого миелоидного лейкоза**

В настоящее время на кафедре факультетской терапии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова совместно с научно-исследовательским центром академии и кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики академии проводится работа по разработке методов индивидуализации противоопухолевой терапии при ОМЛ, основанной на исследованиях химиочувствительности бластных клеток.

Прежде всего была оценена возможность создания воспроизводимой *ex vivo*-модели ОМЛ путем выделения и культивирования линии бластных клеток, полученных из периферической крови или костного мозга

у пациентов с вОМЛ и первичным ОМЛ. В период с декабря 2018 г. по февраль 2019 г. были исследованы материалы от 2 пациентов.

**Пациент 1**, мужчина 70 лет, у которого в возрасте 67 лет впервые установлен диагноз миелопролиферативного новообразования: атипичный хронический миелоидный лейкоз BCR-ABL1, пересмотрен в первичный миелофиброз промежуточного-2 риска по шкалам IPSS, DIPSS, DIPSS+, высокого риска по MIPSS, MIPSS+, GIPSS (тройной негативный статус по драйверным мутациям, ASXL1+). В хронической фазе миелопролиферативного новообразования гематологический ответ (длится 18 мес) достигнут на фоне комбинированной терапии руксолитинибом и цепэгинтерфероном альфа-2b. Бластная трансформация – через 26 мес после установки диагноза: вОМЛ (M1 по FAB-классификации); фенотип CD7+CD9+CD11b+CD33+CD34+CD36+CD38+CD56+CD117+HLA-DR+; мутация 45,XY,-7,inv(3)(q23q26); бластоз в крови 65 % (уровень лейкоцитов  $32,4 \times 10^9/\text{л}$ ), в миелопунктате – 74,4 % (клеточность  $39,6 \times 10^9/\text{л}$ ). После проведения терапии децитабином (1 курс), цитарабином (малые дозы, 2 курса), азациитидином/цитарабином/идарубицином (2 курса) ответ не достигнут.

**Пациент 2**, мужчина 19 лет, у которого впервые установлен диагноз: острый промиелоцитарный лейкоз (M3 по FAB-классификации); t(15;17)(q22;q21); бластоз в крови 48 % (уровень лейкоцитов  $35,7 \times 10^9/\text{л}$ ), в миелопунктате – 54,4 % (клеточность  $228,3 \times 10^9/\text{л}$ ). Материалы получены до начала индукционной терапии.

Дополнительный забор крови и костного мозга для исследования у пациентов не проводили, так как использовались пробы, полученные в диагностических целях в рамках клинической практики. У пациентов получено добровольное информированное согласие на биомедицинское исследование.

Пробы крови и миелопунктата центрифугировали в стандартных вакутейнерах на 6 мл с гепарином. Лейкоцитарную пленку и часть плазмы добавляли в стерильные пробирки на 15 мл. Полученная в результате полная питательная среда (ППС) для культивирования содержала 80 % RPMI 1640, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 10 % оригинальной сыворотки больного, 10 мкл фитогемагглютинаина (ФГА) и 100 ЕД/мл пенициллина. Суспензионные клеточные культуры инкубировали в термостате (37 °С, в воздушной среде с 5 % CO<sub>2</sub>).

В результате проведенной работы была показана возможность создания *ex vivo*-моделей ОМЛ, пригодных для определения чувствительности бластных клеток к противоопухолевым препаратам (см. далее). Продемонстрировано, что в качестве источника бластных клеток для создания модели ОМЛ *ex vivo* пригодны как миелопунктат, так и образцы периферической крови (при наличии бластоза).

После 3-кратной последовательной смены ППС (на 1/3) из одного из образцов крови больного с полирезистентной формой вОМЛ (пациент 1) была получена морфологически однородная стабильная линия бластных клеток, представляющая перспективный научный интерес. Эта клеточная линия была криоконсервирована для последующего изучения. Полученный материал планируется использовать (в качестве универсальной модели полирезистентного ОМЛ) для дальнейшей отработки и совершенствования различных методов культивирования бластных клеток и определения химиочувствительности к противоопухолевым препаратам. Например, планируется оценка возможности усовершенствования модели *ex vivo* совместным культивированием бластов и мезенхимальных стволовых клеток. На данном этапе проводится апробация методов культивирования мезенхимальных стволовых клеток.

**Разработка и апробация методов определения химиочувствительности бластных клеток в модели *ex vivo***

Недоступность сложных и дорогостоящих методов тестирования перспективных фармакологических субстанций, применяемых при их разработке и доклинических фармакологических испытаниях, а также разрабатываемых и уже апробируемых в зарубежных центрах систем комплексного автоматического фармакологического анализа, таких как PharmaFlow platform [47], предопределили необходимость поиска альтернативных подходов в планировании и организации лабораторного обеспечения работы по внедрению персонифицированной терапии.

Исходя из имеющихся возможностей, нами были отобраны и адаптированы к локальным материально-техническим условиям 2 методики определения

химиочувствительности бластных клеток при ОМЛ в моделях *ex vivo*. Приводим их краткое описание.

**Исследование химиочувствительности бластных клеток методом оценки генотоксичности противоопухолевых препаратов в микроядерном тесте (метод ХЧ-МЯТ)**

Материал от больных (периферическая кровь от пациентов 1 и 2) культивировали с 5 мл ППС. Через 24 ч в пробы эксперимента добавляли разведенные в ППС в различных концентрациях противоопухолевые препараты (цитарабин, даунорубин, идарубин, митоксантрон, децитабин, интерферон альфа-2а, даунорубин в комбинации с интерфероном альфа-2а) или чистую ППС в качестве контроля. Далее пробы культивировали в течение 48 ч, после чего оценивали генотоксичность препаратов *in vitro* в микроядерном тесте (МЯТ): в культуры добавляли по 6 мкл/мл цитохалазина, через 24 ч клетки фиксировали, раскапывали по предметным стеклам и окрашивали по Романовскому–Гимзе. В каждом препарате подсчитывали по 100 бластных клеток с блоком цитокинеза. Оценку генотоксичности производили по определению соотношения количества клеток с микроядрами к количеству «чистых» делящихся клеток, а также по общему количеству микроядер на 100 клеток.

При оценке результатов кратность различий в количестве клеток с микроядрами в различных пробах и контроле составляла от 1,7 до 14,4 в зависимости от выбранного препарата или их сочетаний, что полностью подтвердило возможность применения МЯТ для оценки генотоксичности терапии в условиях *in vitro* (рис. 1).

С наибольшими сложностями нам пришлось столкнуться при выборе оптимальных концентраций

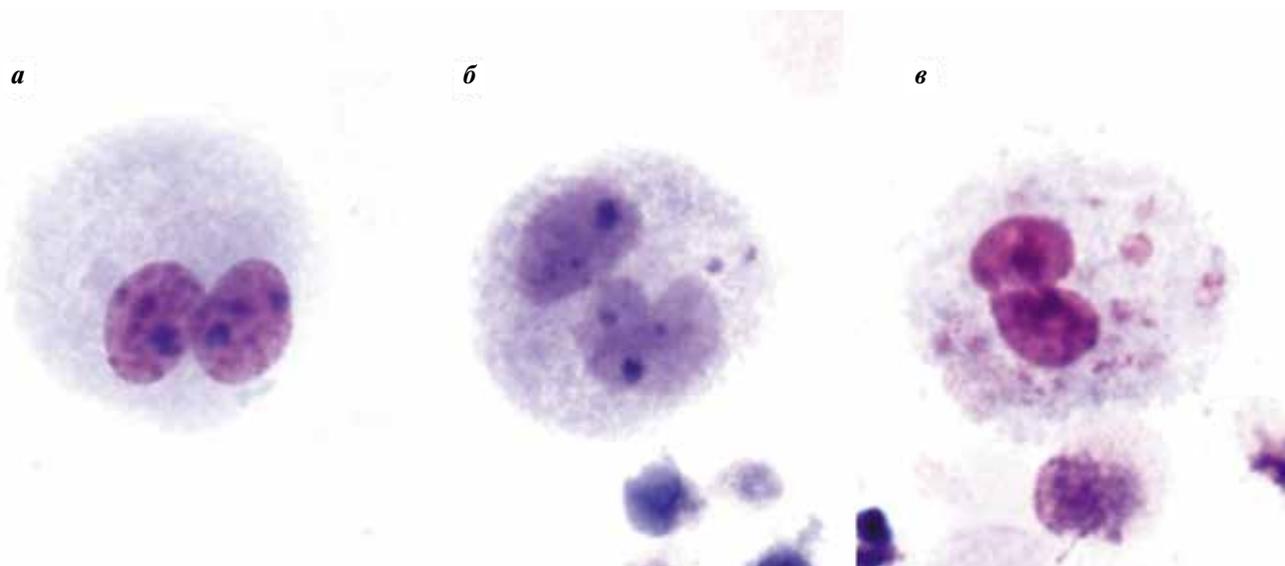


Рис. 1. Двухядерные клетки в микроядерном тесте: а – без микроядер (контроль); б – с двумя микроядрами; в – с множественными микроядрами  
 Fig. 1. Binuclear cells in micronucleus test: а – without micronuclei (control); б – with two micronuclei; в – with multiple micronuclei

добавляемых в клеточную культуру химиотерапевтических агентов и времени экспозиции. Существенные различия в фармакодинамических свойствах, степени и скорости биотрансформации каждого из изучаемых препаратов в подобных исследованиях принимаются как достаточные основания к эмпирическому подбору таких величин, при которых удается достичь в среднем 50 % гибели опухолевых клеток (условно LD50). В качестве предполагаемых медианы и диапазона разведений химиопрепаратов в питательной среде нами были избраны данные о средней равновесной концентрации и другие фармакодинамические параметры (при наличии достоверной информации).

При выполнении МЯТ для каждого препарата было использовано от 1 до 3 разведений, максимально для децитабина (290, 580 и 1160 нг/мл) и для даунорубина (1700, 3400 и 6800 нг/мл), минимально для интерферона альфа-2а (только 3600 МЕ/мл). На данном этапе эксперимента нами были отобраны только парентерально применяемые при ОМЛ препараты с водорастворимой фармакологической основой: цитарабин, даунорубин, идарубин, митоксантрон, интерферон альфа-2а, децитабин. В настоящее время продолжается работа по доработке методов разведения и режимов экспонирования препаратов в целях совершенствования и стандартизации методики.

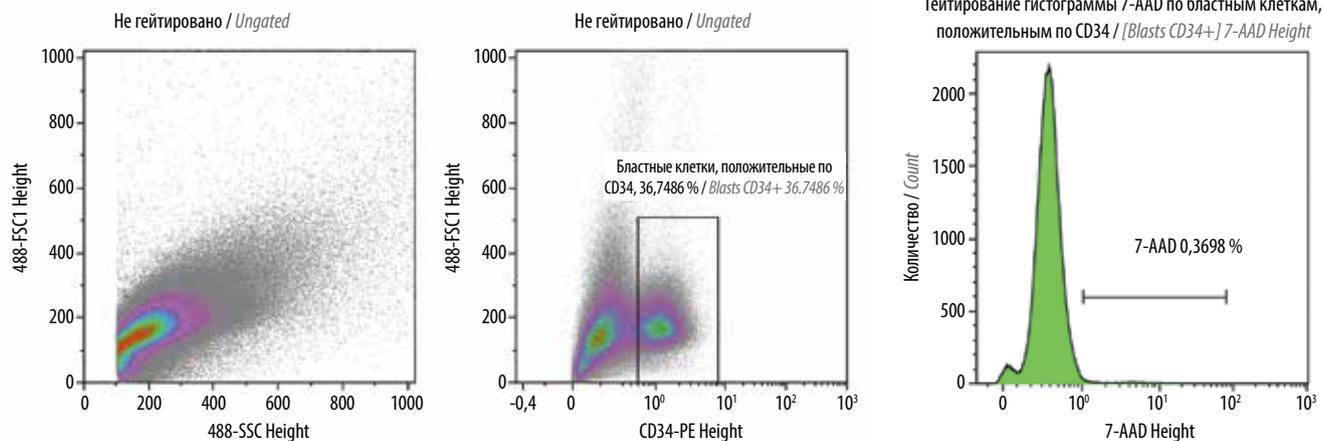
Необходимо отметить, что с учетом результатов добавления в среду интерферона альфа-2а как в монорежиме, так и в сочетании с даунорубином удалось показать значимое влияние данного препарата на количество клеток с микроядрами, что является одним из возможных подтверждений (по крайней мере, на нашей модели ОМЛ *ex vivo*) до сих пор обсуждаемых механизмов прямого цитотоксического действия интерферона альфа-2а и требует дальнейшего изучения.

### Исследование химиочувствительности отсортированных клеток CD34+ методом оценки количества жизнеспособных клеток по маркировке свободной ДНК (метод ХЧ-Sort)

Сортировке бластных клеток предшествовало диагностическое иммунофенотипическое исследование периферической крови пациента с вОМЛ (пациент 1) на проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием различных комбинаций прямых моноклональных антител и соответствующих контролей (Beckman Coulter, США). Обнаружена область бластных клеток с aberrантным фенотипом: CD7+CD9+CD11b+CD33+CD34+CD36+CD38+CD56+CD117+HLA-DR+. В связи с преобладанием бластной популяции в образце, а также отсутствием в других областях клеток, положительных по CD34+ (антитела CD34 PE; Beckman Coulter, США), этот маркер был отобран для протокола дальнейшей сортировки.

Для сортировки бластных клеток из окрашенных антителами CD34 PE (Beckman Coulter, США) 7 AAD Viability Dye (Beckman Coulter, США) образцов периферической крови использовали клеточный сортер MoFlow Astrios EQ (Beckman Coulter, США) в конфигурации с 3 лазерами 200 мВт 488 нм, 55 мВт 405 нм, 100 мВт 645 нм и стандартным набором фильтров, оптимизированных для каждого лазера. Настройку прибора и последующую сортировку осуществляли с насадкой сопла Jet-in-air 70 мкм, давлениями 59,7–60 psi для потока обжимающей жидкости IsoFlow (Beckman Coulter, США) и 60,9–61,1 psi для потока образца соответственно. Скорость анализа образцов была до 10 000 событий в секунду (рис. 2).

Настройку протокола сортировки осуществляли с учетом полученных данных ранее выполненного диагностического иммунофенотипирования, в результате из 300 мкл периферической крови отсортировали по 520 650 жизнеспособных клеток CD34+ в 2



**Рис. 2.** Выделение клеток CD34+ при сортировке (Fluorescence activated cell sorting)  
**Fig. 2.** Results of sorting CD34+ cells (Fluorescence activated cell sorting)

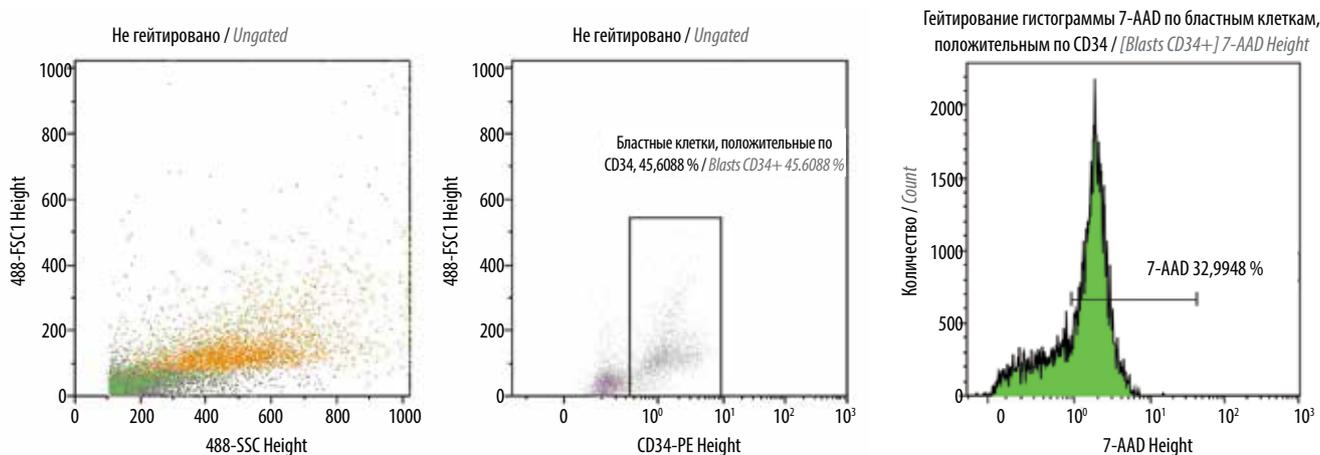


Рис. 3. Оценка жизнеспособности клеток после культивирования без химиопрепарата (контроль)  
 Fig. 3. Evaluation of cell viability after cultivation without chemotherapeutic agent (control)

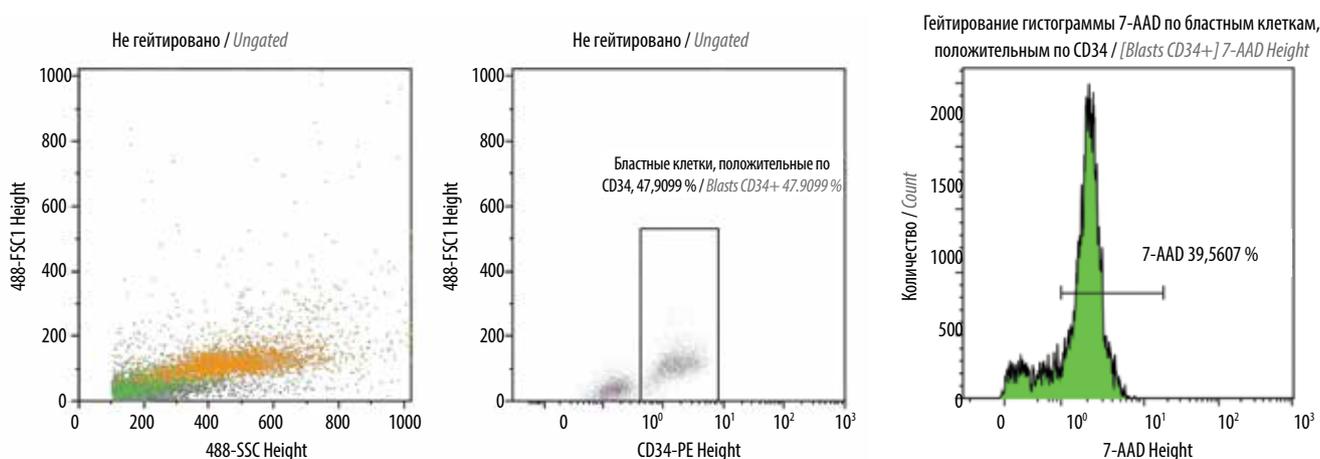


Рис. 4. Оценка жизнеспособности клеток после культивирования с химиопрепаратом  
 Fig. 4. Evaluation of cell viability after cultivation with chemotherapeutic agent

пробирки, которые культивировали (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>) в течение 4 сут в 5 мл ППС, содержащей 80 % RPMI 1640, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 10 % оригинальной сыворотки больного, 10 мкл ФГА и 100 ЕД/мл пенициллина. В одну из проб после первых суток добавили децитабин в концентрации 1160 нг на 1 мл среды. Для оценки его генотоксичности на том же сортере через 5 сут культивирования определили количество клеток, сохранивших жизнеспособность, путем оценки результатов маркировки свободной ДНК (рис. 3, 4).

В результате эксперимента была апробирована методика культивирования отсортированных CD34+ жизнеспособных бластных клеток ОМЛ из периферической крови. В связи с тем что культивирование осуществляли без специальных смесей цитокинов для роста клеток CD34+, а также с предполагаемым повреждением при сортировке, погибших клеток в обоих пробах оказалось значительно больше, чем ожидалось. Тем не менее в пробе с добавлением децитабина живых бластных клеток оказалось почти в 2 раза меньше, чем в контрольной пробе (9330

и 17633 клеток соответственно), что подтвердило потенциальную информативность метода.

Выбор набора антител, необходимых для настройки протокола сортировки в каждом конкретном случае, должен основываться на результатах предшествующего диагностического иммунофенотипического исследования.

#### Перспективы применения методов оценки химиочувствительности

Как в методе ХЧ-МЯТ, так и в методе ХЧ-Sort в качестве объекта исследования могут выступать не только непосредственно полученные от больного нативные биологические материалы (кровь, миелопунктат), но и полученные в результате культивирования *ex vivo*-модели ОМЛ, в том числе криоконсервированные стабильные линии бластных клеток (например, для оценки динамики формирования химиорезистентности).

С позиций оценки точности метода среди апробированных нами методик наибольшей прецизионностью обладает исследование однородных («чистых»)

клеточных суспензий, полученных при проточно-цитометрической сортировке бластных клеток с абберантным фенотипом методом ХЧ-Sort. Однако выявленная на практике проблема снижения жизнеспособности отсортированных клеток значительно ограничивает возможности их дальнейшей культивации и изучения без применения сложных многоцитокиновых сред и создания особых физических условий. Кроме этого, немаловажными являются высокая стоимость и недостаточная распространенность специального оборудования в отечественных центрах, что дополнительно ограничивает возможности распространения такого опыта.

Поэтому применение клеточного сортера может рассматриваться как метод контроля качества культуральных способов выделения и пассажа бластных клеток, а также как один из контрольных методов оценки химиочувствительности (ХЧ-Sort). Оказалось, что культуральный метод выделения обладает достаточной специфичностью, а выделенные бластные клетки ОМЛ остаются достаточно жизнеспособными и для определения генотоксичности лекарственных препаратов, и для создания экспериментальных клеточных линий.

#### Обсуждение

В настоящее время успехи в терапии ОМЛ базируются на применении схем высокодозной химиотерапии и аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Данные подходы вполне реализуемы у молодых пациентов, в то время как пациенты старших возрастных групп из-за ряда ограничений в большинстве случаев лишены возможности получения эффективной помощи. Увеличивающиеся с возрастом частота вОМЛ, первичная и вторичная резистентность к терапии дополнительно определяют низкую частоту ответов, рецидивирование и необходимость повторного эмпирического подбора эффективной терапии.

По нашему мнению, недостаточно оптимистичные результаты лечения ОМЛ, особенно вОМЛ, связаны и с тем, что общепринятые типовые протоколы лечения, даже составленные с учетом фенотипических и генотипических различий внутри группы ОМЛ, не учитывают предлагаемой концепции о необходимости разработки уникальной схемы лечения для каждого пациента. Разработка персонализированных подходов на основе изучения химиочувствительности опухолевых клеток может помочь избежать бесконечного эмпирического перебора режимов терапии, снизить ее токсичность и в перспективе привести

к улучшению результатов лечения даже в сравнении с новейшими, но протоколизованными подходами к лечению [43–47].

В настоящее время мы работаем над оценкой возможностей модификации существующих протоколов лечения, основанных на создании индивидуальных лабораторных моделей ОМЛ *ex vivo* и применении наиболее эффективных и, главное, относительно доступных методов оценки химиочувствительности бластных клеток.

Предварительные результаты нашего исследования показывают возможность выделения и культивирования бластных клеток ОМЛ и достаточную, прежде всего с позиций относительной доступности и воспроизводимости, информативность избранных и апробированных методик оценки генотоксичности противоопухолевых препаратов. По предварительным данным, адаптированные к нашим локальным возможностям методы определения генотоксичности как с применением МЯТ, так и подсчет «живых» клеток при проточно-цитометрическом анализе, обладают сопоставимыми чувствительностью и специфичностью и могут рассматриваться в качестве перспективных методов определения химиочувствительности бластных клеток при ОМЛ.

Применение результатов определения химиочувствительности выделенных от конкретного больного бластных клеток в модели *ex vivo* является одним из перспективных направлений разработки персонализированных схем терапии. И даже несмотря на то что пока непосредственный перенос результатов изучения опухолевых клеток вне организма в клиническую практику имеет определенные сложности, полученные с помощью таких методов сведения уже сейчас могут как минимум помочь избежать назначения заведомо неэффективных для конкретного пациента препаратов. Это может способствовать снижению общей токсичности терапии и предупреждению развития множественной лекарственной резистентности.

#### Заключение

В настоящее время мы оцениваем возможность применения новых принципов индивидуализации противоопухолевой терапии и при разработке схем терапии пациентов с резистентными формами ОМЛ. На данном этапе мы демонстрируем возможность лабораторного изучения чувствительности полученных от конкретного больного бластных клеток к противоопухолевым препаратам. Данные литературы и уже полученные собственные наработки позволяют надеяться на перспективность разрабатываемых подходов.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых. Национальное гематологическое общество. Под ред. В.Г. Савченко. 2018. 65 с. [Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of adult acute myeloid leukemia. National Hematological Society. Ed. V.G. Savchenko. 2018. 65 p. (In Russ.)].
2. Granfeldt Östgård L.S., Medeiros B.C., Sengeløv H. et al. Epidemiology and clinical significance of secondary and therapy-related acute myeloid leukemia: a National Population-Based Cohort Study. *J Clin Oncol* 2015;33(31):3641–9. DOI: 10.1200/JCO.2014.60.0890.
3. Hulegårdh E., Nilsson C., Lazarevic V. et al. Characterization and prognostic features of secondary acute myeloid leukemia in a population-based setting: a report from the Swedish acute leukemia registry. *Am J Hematol* 2015;90(3):208–14. DOI: 10.1002/ajh.23908.
4. Valentini C.G., Fianchi L., Voso M.T. et al. Incidence of acute myeloid leukemia after breast cancer. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011;3(1):e2011069. DOI: 10.4084/MJHID.2011.069.
5. Kayser S., Döhner K., Krauter J. et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood* 2011;117(7):2137–45. DOI: 10.1182/blood-2010-08-301713.
6. Borthakur G., Lin E., Jain N. et al. Survival is poorer in patients with secondary core-binding factor acute myelogenous leukemia compared with *de novo* core-binding factor leukemia. *Cancer* 2009;115(14):3217–21. DOI: 10.1002/cncr.24367.
7. Krug U., Röllig C., Koschmieder A. et al. Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. *Lancet* 2010;376(9757):2000–8. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62105-8.
8. Walter R.B., Othus M., Borthakur G. et al. Prediction of early death after induction therapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia with pretreatment risk scores: a novel paradigm for treatment assignment. *J Clin Oncol* 2011;29(33):4417–24. DOI: 10.1200/JCO.2011.35.7525.
9. Smith S.M., Le Beau M.M., Huo D. et al. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood* 2003;102(1):43–52. DOI: 10.1182/blood-2002-11-3343.
10. Larson R.A. Etiology and management of therapy-related myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;(1):453–9. DOI: 10.1182/asheducation-2007.1.453.
11. Christiansen D.H., Andersen M.K., Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol* 2001;19(5):1405–13. DOI: 10.1200/JCO.2001.19.5.1405.
12. Löwenberg B., Ossenkoppele G.J., van Putten W. et al. High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2009;361(13):1235–48. DOI: 10.1056/NEJMoa0901409.
13. Boddü P., Kantarjian H.M., Garcia-Manero G. et al. Treated secondary acute myeloid leukemia: a distinct high-risk subset of AML with adverse prognosis. *Blood Adv* 2017;1(17):1312–23. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017008227.
14. Lancet J.E., Uy G.L., Cortes J.E. et al. Final results of a phase III randomized trial of CPX-351 versus 7+3 in older patients with newly diagnosed high risk (secondary) AML. *J Clin Oncol* 2016;34(15):7000. DOI: 10.1200/JCO.2016.34.15\_suppl.7000.
15. Michelis F.V., Atenafu E.G., Gupta V. et al. Comparable outcomes post allogeneic hematopoietic cell transplant for patients with *de novo* or secondary acute myeloid leukemia in first remission. *Bone Marrow Transplant* 2015;50(7):907–13. DOI: 10.1038/bmt.2015.59.
16. Tang F.F., Huang X.J., Zhang X.H. et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult patients with treatment-related acute myeloid leukemia during first remission: comparable to *de novo* acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2016;47:8–15. DOI: 10.1016/j.leukres.2016.05.005.
17. Ravandi F., Issa J.P., Garcia-Manero G. et al. Superior outcome with hypomethylating therapy in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome and chromosome 5 and 7 abnormalities. *Cancer* 2009;115(24):5746–51. DOI: 10.1002/cncr.24661.
18. Boddü P.C., Kantarjian H.M., Ravandi F. et al. Characteristics and outcomes of older patients with secondary acute myeloid leukemia according to treatment approach. *Cancer* 2017;123(16):3050–60. DOI: 10.1002/cncr.30704.
19. Maurillo L., Buccisano F., Spagnoli A. et al. Comparative analysis of azacitidine and intensive chemotherapy as front-line treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2018;97:1767–74. DOI: 10.1007/s00277-018-3374-x.
20. Lancet J.E., Uy G.L., Cortes J.E. et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) liposome for injection versus conventional cytarabine plus daunorubicin in older patients with newly diagnosed secondary acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2018;36(26):2684–92. DOI: 10.1200/JCO.2017.77.6112.
21. Petersdorf S.H., Kopecky K.J., Slovak M. et al. A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2013;121(24):4854–60. DOI: 10.1182/blood-2013-01-466706.
22. Castaigne S., Pautas C., Terré C. et al. Final analysis of the ALFA 0701 study. *Blood* 2014;124(21):376.
23. Burnett A.K., Russell N.H., Hills R.K. et al. Addition of Gemtuzumab Ozogamicin to induction chemotherapy improves survival in older patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012;30(32):3924–31. DOI: 10.1200/JCO.2012.42.2964.
24. Stone R.M., Mazzola E., Neuberg D. et al. Phase III open-label randomized study of Cytarabine in combination with Amonafide L-malate or Daunorubicin as induction therapy for patients with secondary acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2015;33(11):1252–7. DOI: 10.1200/JCO.2014.57.0952.
25. Pratz K.W., Rudek M.A., Gojo I. et al. A phase I study of Topotecan, carboplatin and the PARP inhibitor Veliparib in acute Leukemias, aggressive myeloproliferative neoplasms, and chronic Myelomonocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2017;23(4):899–907. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1274.
26. Zeidner J.F., Foster M.C., Blackford A.L. et al. Randomized multicenter phase II study of flavopiridol (alvocidib), cytarabine, and mitoxantrone (FLAM) versus cytarabine/daunorubicin (7 + 3) in newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2015;100(9):1172–9. DOI: 10.3324/Haematol.2015.125849.
27. Willemze R., Suci S., Meloni G. et al. High-dose Cytarabine in induction treatment improves the outcome of adult patients younger than age 46 years with acute myeloid leukemia: results of the EORTC-GIMEMA AML-12 trial. *J Clin Oncol* 2014;32(3):219–28. DOI: 10.1200/JCO.2013.51.8571.
28. Bashey A., Liu L., Ihasz A. et al. Non-anthracycline based remission induction therapy for newly diagnosed patients with acute myeloid leukemia aged 60 or older. *Leuk Res* 2006;30(4):503–6. DOI: 10.1016/j.leukres.2005.09.002.
29. Ferrara F., Palmieri S., Izzo T. et al. Continuous sequential infusion of fludarabine and cytarabine for elderly

- patients with acute myeloid leukaemia secondary to a previously diagnosed myelodysplastic syndrome. *Hematol Oncol* 2010;28(4):202–8. DOI: 10.1002/hon.943.
30. Becker P.S., Medeiros B.C., Stein A.S. et al. G-CSF priming, clofarabine, and high dose cytarabine (GCLAC) for upfront treatment of acute myeloid leukemia, advanced myelodysplastic syndrome or advanced myeloproliferative neoplasm. *Am J Hematol* 2015;90(4):295–300. DOI: 10.1002/ajh.23927.
  31. Jeong E., Moon S.U., Song M. et al. Transcriptome modeling and phenotypic assays for cancer precision medicine. *Arch Pharm Res* 2017;40(8):906–14. DOI: 10.1007/s12272-017-0940-z.
  32. Muraro M.G., Muenst S., Mele V. et al. *Ex-vivo* assessment of drug response on breast cancer primary tissue with preserved microenvironments. *Oncimmunology* 2017;6(7):e1331798. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1331798.
  33. Meijer T.G., Naipal K.A., Jager A. et al. *Ex vivo* tumor culture systems for functional drug testing and therapy response prediction. *Future Sci OA* 2017;3(2):FSO190. DOI: 10.4155/fsoa-2017-0003.
  34. Yadav B., Pemovska T., Sz wajda A. et al. Quantitative scoring of differential drug sensitivity for individually optimized anticancer therapies. *Sci Rep* 2014;4:5193. DOI: 10.1038/srep05193.
  35. Brigulová K., Cervinka M., Tošner J. et al. Chemoresistance testing of human ovarian cancer cells and its *in vitro* model. *Toxicol In Vitro* 2010;24(8):2108–15. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.08.010.
  36. Ehemann V., Kern M.A., Breinig M. et al. Establishment, characterization and drug sensitivity testing in primary cultures of human thymoma and thymic carcinoma. *Int J Cancer* 2008;122(12):2719–25. DOI: 10.1002/ijc.23335.
  37. Ferris J.S., Rice L.W. The role of *in vitro* directed chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Reviews Obstetrics Gynecology* 2010;3(2):49–54.
  38. Pemovska T., Kontro M., Yadav B. et al. Individualized systems medicine strategy to tailor treatments for patients with chemorefractory acute myeloid leukemia. *Cancer Discov* 2013;3(12):1416–29. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0350.
  39. Bosanquet A.G., Bell P.B. *Ex vivo* therapeutic index by drug sensitivity assay using fresh human normal and tumor cells. *J Exp Ther Oncol* 2004;4(2):145–54.
  40. Kaspers G.J., Veerman A.J., Pieters R. et al. *In vitro* cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997;90(7):2723–9.
  41. Dogan A.L., Kars A., Canpinar H. Prediction of clinical response to chemotherapy by *in vitro* chemosensitivity assay in acute leukemia. *Turk J Cancer* 2004;34(2):75–80.
  42. Kurtz S.E., Eide C.A., Kaempf A. et al. Molecularly targeted drug combinations demonstrate selective effectiveness for myeloid- and lymphoid-derived hematologic malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114(36):7554–63. DOI: 10.1073/pnas.1703094114.
  43. Snijder B., Vladimer G.I., Krall N. et al. Image-based *ex vivo* drug screening for patients with aggressive haematological malignancies: interim results from a single-arm, open-label, pilot study. *Lancet Haematol* 2017;4(12):595–606. DOI: 10.1016/S2352-3026(17)30208-30209.
  44. Swords R.T., Azzam D., Al-Ali H. et al. *Ex vivo* sensitivity profiling to guide clinical decision making in acute myeloid leukemia: a pilot study. *Leukemia Res* 2017;64:34–41. DOI: 10.1016/j.leukres.2017.11.008.
  45. Le Tourneau C., Kamal M., Tsimberidou A.M. et al. Treatment algorithms based on tumor molecular profiling: the essence of precision medicine trials. *J Natl Cancer Inst* 2016;108(4). DOI: 10.1093/JNCI/djv362.
  46. Megias-Vericat J., Martines-Cuadron D., Lopez J. et al. Differences in *ex vivo* chemosensitivity to anthracyclines in first line acute myeloid leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2019;11:e2019016. DOI: 10.4084/mjhid.2019.016.
  47. Hernandez P., Gorrochategui J., Primo D. et al. Drug discovery testing compounds in patient samples by automated flow cytometry. *SLAS Technology* 2017;22(3):325–37. DOI: 10.1177/2472630317700346.

#### Вклад авторов

А.С. Поляков, Я.А. Носков, Ю.В. Никитин: разработка концепции и дизайна исследования, клинические исследования, лабораторные исследования, сбор данных, интерпретация данных, написание текста статьи;  
 В.В. Тыренко, А.Н. Богданов: разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация данных, редактирование статьи, окончательное утверждение статьи;  
 С.Н. Колюбаева, Д.К. Жоголев, А.Д. Золотарёв: разработка концепции и дизайна исследования, лабораторные исследования, написание текста статьи;  
 В.Н. Семелев, С.В. Бондарчук: интерпретация данных, редактирование статьи;  
 О.Р. Петрова, А.В. Ковалев, Ю.Е. Пучкова: клинические исследования, лабораторные исследования, написание текста статьи.

#### Authors' contributions

A.S. Polyakov, Ya.A. Noskov, Yu.V. Nikitin: study concept and design development, clinical researches, laboratory research, data collection, data interpretation, article writing;  
 V.V. Tyrenko, A.N. Bogdanov: study concept and design development, data interpretation, article editing, final approval of the article;  
 S.N. Kolubaeva, D.K. Zhogolev, A.D. Zolotarev: study concept and design development, laboratory research, article writing;  
 V.N. Semelev, S.V. Bondarchuk: data interpretation, article editing;  
 O.R. Petrova, A.V. Kovalev, Yu.E. Puchkova: clinical researches, laboratory research, article writing.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

А.С. Поляков/A.S. Polyakov: <https://orcid.org/0000-0001-9238-8476>  
 Я.А. Носков/Ya.A. Noskov: <https://orcid.org/0000-0003-1213-8472>  
 Ю.В. Никитин/Yu.V. Nikitin: <https://orcid.org/0000-0001-7892-2783>  
 В.В. Тыренко/V.V. Tyrenko: <https://orcid.org/0000-0002-0470-1109>  
 С.Н. Колюбаева/S.N. Kolubaeva: <https://orcid.org/0000-0003-2441-9394>  
 А.Н. Богданов/A.N. Bogdanov: <https://orcid.org/0000-0003-1964-3690>  
 В.Н. Семелев/V.N. Semelev: <https://orcid.org/0000-0002-9319-462X>  
 О.Р. Петрова/O.R. Petrova: <https://orcid.org/0000-0003-2441-9394>  
 С.В. Бондарчук/S.V. Bondarchuk: <https://orcid.org/0000-0003-2990-8621>  
 Д.К. Жоголев/D.K. Zhogolev: <https://orcid.org/0000-0002-6715-0340>  
 А.Д. Золотарёв/A.D. Zolotarev: <https://orcid.org/0000-0003-4918-1976>  
 А.В. Ковалев/A.V. Kovalev: <https://orcid.org/0000-0001-5884-2057>  
 Ю.Е. Пучкова/Yu.E. Puchkova: <https://orcid.org/0000-0002-0790-8746>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.  
Financing. The study was performed without external funding.

**Информированное согласие.** Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.  
Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.