

**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛИМФОЦИТОВ,
РЕЗИСТЕНТНЫХ К ДОКСОРУБИЦИНУ, ПРИ РАЗВИТИИ
ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В СИСТЕМЕ КРОВИ**

Магистерская диссертация

обучающегося по направлению подготовки 06.04.01 Биология

очной формы обучения, группы 07001540

Кротовой Екатерины Евгеньевны

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

Рецензент
Биолог клинико-
диагностической
лаборатории Белгородской
областной клинической
больницы Святителя
Иоасафа, кандидат
биологически наук
Черкашина О.В.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы.....	8
1.1. Общая характеристика системы крови при развитии злокачественных пролиферативных процессов	8
1.2. Физико-химические свойства доксорубина и механизм его действия на клетки крови	16
1.3. Механизмы лекарственной резистентности клеток.....	25
Глава 2. Материалы и методы исследования	30
2.1. Организация эксперимента и забор материала	30
2.1. Выполнение экспериментов с доксорубином <i>in vitro</i>	30
2.2. Изучение свойств и рельефа поверхности клеток методом атомно-силовой микроскопии	31
Глава 3. Результаты исследования	36
3.1. Жизнеспособность лимфоцитов крови больных ОМЛ и ОЛЛ под влиянием доксорубина	36
3.2. Влияние доксорубина на упруго-эластические свойства лимфоцитов крови.....	37
3.3. Электрические свойства доксорубин-резистентных клеток.....	39
3.4. Цитоархитектоника лимфоцитов крови больных ОЛЛ и ОМЛ под влиянием препарата – доксорубина.....	41
Глава 4. Обсуждение результатов исследования.....	51
Выводы	54
Список сокращений	55
Список использованной литературы.....	56

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Поиск механизмов, объясняющих устойчивость злокачественных клонов гемопоэтической 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 препаратов антрациклинового ряда, представителем которого является доксорубин. Несмотря на целый спектр экспериментальных исследований, демонстрирующих молекулярные внутриклеточные механизмы действия доксорубина (Lerma-Diaz et al., 2006; Harati et al., 2012; Du et al., 2012; Liu et al., 2008; Denard, 2012; Bao et al., 2011; Di Donato, 2012; Naci, 2012; Wang, 2012; Sun, 2011; Ortiz-Lazarenko, 2014), к настоящему моменту нет единой точки зрения на развитие множественной лекарственной резистентности опухолевых клеток.

Мы полагаем, что первостепенную роль в разработке стратегий преодоления лекарственной устойчивости, необходимо связывать с обменно-транспортными свойствами биологических мембран. Транспортная функция мембран в значительной мере определяется ее механическими и электрическими свойствами, от которых зависит способность препарата достигать внутриклеточных молекулярных мишеней. Учитывая вышеизложенное в проведенном исследовании мы сконцентрировали свое внимание на изучении свойств клеточной мембраны доксорубин-резистентных клеток.

Степень разработанности темы исследования. Многочисленные исследования посвящены описанию механизмов действия и токсичности доксорубицина (Шуйкова и др., 2012; Гендлин и др., 2011; Микуляк и др., 2013; Сванадзе и др., 2015). Известно, что одной из наиболее чувствительных систем организма к действию антрациклинового антибиотика является сердечно-сосудистая система, а именно – кардиомиоциты (Octavia et al., 2012; Branco et al., 2012; Миннигалева и др., 2014). Однако недооцененной остается проблема токсического действия доксорубицина на иммунную систему, которая обладает повышенной чувствительностью по отношению к данному препарату. Вследствие иммунотоксичности антибиотика, возможны негативные изменения в структуре и функциях клеток иммунной системы. В частности, по данным немногочисленных исследований показано снижение поверхностного натяжения мембран клеток и изменения их структур под влиянием препаратов антрациклинового ряда, которые способны индуцировать оксидативный стресс, отрицательно действующий на все клетки организма (Bell et al., 2013). Все это усугубляет негативные процессы иммунорезистентности организма и может вызывать возникновение различных инфекционных осложнений, которые часто встречаются в условиях онкопатологии. Также не оценена роль иммунологических механизмов в прогрессировании острых лейкозов (Москвичёв, Рожковский, 2014). Все это определяет актуальность дальнейшего исследования иммунопатогенеза при развитии злокачественных пролифераций в системе крови.

Учитывая вышеизложенное, целью выполненного исследования было изучить влияние доксорубицина на морфофункциональные свойства лимфоцитов при развитии лимфопролиферативных процессов в системе крови.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать жизнеспособность лимфоцитов крови больных острым лимфо- и миелобластным типом лейкоза под влиянием доксорубицина.

2. Выявить влияние доксорубицина на жесткость клеточной поверхности лимфоцитов больных острым лимфобластным и острым миелобластным лейкозом.

3. Изучить изменение электрического заряда клеточной поверхности доксорубицин-резистентных клеток при остром лимфо- и миелобластном лейкозах.

4. Выявить особенности изменения рельефа поверхности лимфоцитов больных острым лимфобластным и острым миелобластным лейкозом под влиянием доксорубицина.

Объектом исследования были выбраны лимфоциты крови человека при развитии злокачественных пролиферативных процессов.

Предмет исследования: морфофункциональные свойства лимфоцитов под влиянием доксорубицина.

Научная новизна. В выполненном исследовании получены новые данные, которые свидетельствуют об изменении упруго-эластических, электрических, морфологических свойств лимфоцитов при развитии лимфопролиферативных процессов. Установлено повышение потенциала поверхности и снижение жесткости клеток под действием доксорубицина.

Новизна исследования заключается в том, что при изучении влияния доксорубицина на морфофункциональные свойства лимфоцитов, результаты получены на специально разработанных клеточных моделях, в условиях *in vitro*, которые позволили провести последующие эксперименты с доксорубицин-резистентными клеточными популяциями. Это позволило получить новые данные и детально изучить морфологию мембраны резистентных к препарату клеток, измерить жесткость и заряд клеточной поверхности. Выявленные изменения свойств биомембран лимфоцитарных

клеток могут быть использованы как критерии оценки функционального состояния лимфоцитов при злокачественных процессах в системе крови.

Методы исследования. В работе использованы следующие методы: оценка жизнеспособности клеток, методы центрифугирования и культивирования суспензии клеток, методы атомно-силовой микроскопии (режим зонда Кельвина, режим силовой спектроскопии и полуконтактного сканирования), методы вариационной статистики.

Характеристика практической значимости исследования.

Полученные результаты имеют теоретическое и практическое значение в области клинической диагностики, клеточной физиологии и гематологии, а также могут быть использованы для оценки качества проводимой терапии при развитии злокачественных пролиферативных процессов в системе крови. Обнаруженные морфофункциональные свойства лимфоцитов могут служить важным показателем состояния иммунной системы человека при прохождении химиотерапии антрациклиновыми антибиотиками.

Структура работы. Магистерская диссертация состоит из введения, 4 глав основной части (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов исследования) и 10 подразделов, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы. Работа изложена на 71 страницах машинописного текста, включает в себя 6 таблиц и 25 рисунков. Список литературы включает в себя 128 наименований, из которых 84 отечественных и 44 иностранных источников.

По результатам исследования было опубликовано 5 работ:

1. Влияние немодифицированного водного раствора фуллерена C_{60} на функциональную активность лимфоцитов в норме и при развитии лимфопролиферативных процессов [Текст] // М. Ю. Скоркина, А. С. Бучельников, Т. С. Тикунова, Е. Е. Кротова // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ – 2015 : Материалы международной

научно-технической конференции. – Севастополь : Севастопольский государственный университет. – 2015. – С. 147-151.

2. Использование технологий атомно-силовой микроскопии для оценки структуры и свойств поверхности клеток крови [Текст] / М. Ю. Скоркина, Е. А. Сладкова, Е. Е. Кротова [и др.] // Научный результат. Серия «Физиология». – 2015. – Т. 1, № 4. – С. 23-26.

3. Шамрай Е. А., Кротова Е. Е. Реакции осморегуляции лимфоцитов здоровых людей и больных ОЛЛ на стадии ремиссии [Текст] / Е. А. Шамрай, Е. Е. Кротова // Актуальные направления фундаментальных и прикладных исследований : материалы VII международной научно-практической конференции, North Charleston, USA, 19-20 октября 2015 г. – С. 4-7.

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

5. Влияние химиотерапии на структурно-функциональные особенности лимфоцитов больных острым миелобластным лейкозом [Текст] / Е. А. Сладкова, Е. А. Шамрай, Е. Е. Кротова [и др.] // Научный результат. Серия «Физиология». – 2016. – Т. 2, № 4. – С. 14-19.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика системы крови при развитии злокачественных пролиферативных процессов

В группу острых лейкозов входят острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) и острый миелобластный лейкоз (ОМЛ). Для обоих случаев характерны нарушения в гемопоэтической системе, в результате чего в периферической крови и костном мозге преобладают аномальные незрелые бласты. Как правило, у многих больных в результате диагностики заболевания выявляются такие нарушения, как анемии, тромбоцитопении и снижение числа нейтрофильных гранулоцитов (Ковалева, 1990). Число лейкоцитов у таких больных колеблется в широких пределах, начиная от $1,0 \cdot 10^9$ л, и может достигать $200 \cdot 10^9$ л (Волкова, 2001).

Важный показатель острого лейкоза – наличие бластных клеточных форм. Их число в периферической крови и в костном мозге может быть больше 20 % (Абдулкадыров, 2004). По типу данных лейкемических бластов проводится определение вида острого лейкоза. Используемые в лабораторной диагностике методы позволяют выбрать наиболее выгодную для каждого случая терапию, а также определить прогноз заболевания (Белохвостикова и др., 2012). Для постановки диагноза чаще всего используется стандартная FAB-классификация, предложенная группой иностранных ученых-гематологов. Согласно данной классификации, выделяют 8 вариантов острых нелимфобластных лейкозов и 3 типа лимфобластных. Это распределение основывается на морфологических характеристиках опухолевых клеток. В дополнение к данному критерию применяют цитогенетические, цитохимические и иммунофенотипические исследования (Джумагазиева и др., 2010).

К цитохимическим исследованиям относят:

1. Реакция на миелопероксидазу.
2. Реакция на липиды с суданом черным.

3. PAS-реакция.

4. Реакция на неспецифические эстеразы.

При проведении PAS-реакции определяют тип острого лейкоза (ОМЛ или ОЛЛ). Все остальных реакции при ОЛЛ являются отрицательными и позволяют подтвердить ОМЛ (Ходулева, Кравченко, 2010).

У больных острыми лейкозами происходит снижение реактивности иммунной системы. Состояние иммунитета зависит от стадии болезни и ее степени. На первой (острой) стадии у больных ОЛЛ повышается абсолютное число лимфоцитов, и в то же время понижается содержание Т-клеток. На стадии ремиссии наблюдается другая закономерность: одновременно со снижением числа лимфоцитов, уменьшается общее количество НК-клеток, лимфоидных клеток, В - и Т-лимфоцитов (Смирнова и др., 2011). Снижение Т-клеток у больных закономерно зависит от уменьшения количества CD4⁺. При рецидиве болезни чаще всего регистрируется только уменьшение числа Т-лимфоцитов. Есть данные, что увеличение содержания на данной стадии НК-клеток, циркулирующих в периферической крови, скорее всего, связано с ростом бластных клеток. Это защитная (компенсаторная) реакция организма. Со стороны гуморального иммунитета в момент ремиссии заболевания регистрируется снижение содержания Ig A и Ig G, а на стадии рецидива уменьшение концентрации Ig M в плазме крови (Смирнова и др., 2013; Мовчан, 2012; Колбацкая, Тупицин, 2012).

Состояние биомембран клеток как эритроцитов, так и лимфоцитов крови больных лимфопролиферативными заболеваниями изменяется: происходит ярко выраженное нарушение метаболизма основных классов мембранных липидов и белков. Резко увеличивается уровень токсических и мембранолитических лизофосфатидилхолинов (ЛФХ). Они накапливаются в лимфоцитарных и эритроцитарных плазматических мембранах. В результате этого возникают процессы деградации глицерофосфолипидов (Казарян и др., 2011).

Если рассматривать изменения аномальных форм клеток при острых лейкозах с точки зрения цитогенетики, то в среднем встречается 70 % случаев клональных хромосомных перестроек. Частое явление, которое сопровождает развитие ОЛЛ – это отсутствие митоза или его неудовлетворительное качество. В работе Зотова Е.В. с соавт. (2013) обнаружено, что у 74 % исследованных больных острым лейкозом возникают цитогенетические аномалии. В результате данных исследований, а также на основе анализа кариотипа можно формировать группы больных для подбора оптимальной схемы химиотерапии.

Наиболее частые хромосомные аномалии при лимфолейкозе у 60-80% больных детей первых лет жизни – это нарушения хромосомного участка 11q23 и перестройки гена MLL. С помощью методов цитогенетики, а также ПЦР и метода FISH возможно более точное получение данных по хромосомным абберациям. Использование только цитогенетических методов не дает точных результатов в связи с возможными скрытыми хромосомными перестройками, а также с наличием клеток, неделящихся митозом, и нарушением морфологии самих хромосом злокачественных форм (Цаур и др., 2016).

Острый лимфобластный лейкоз. ОЛЛ относится к группе опухолевых заболеваний системы крови, для которых характерна злокачественная пролиферация незрелых бластных клеток (Блау, 2016). В данном случае происходит замещение нормальных клеток-предшественников в костном мозге лейкозными бластами (Шиффман, 2001; Пименова и др., 2012). Эти злокачественные формы имеют сглаженный рельеф поверхности мембраны, а также у них снижается жесткость и повышается потенциал клеточной поверхности (Сладкова, 2015). Благодаря разработке современных методов лечения излечение от ОЛЛ возможно у 80-85 % больных (Субботина и др., 2013).

Различают 3 варианта острого лимфолейкоза:

1. L_1 – вариант, для которого характерен небольшой размер лимфобластов (диаметр до 10 мкм). Ядро бластов имеет округлую форму, в основном без ядрышка. Данный вариант встречается чаще у детей, на его долю приходится не более 20 % всех видов острых лейкозов (Радченко, 2003) (рис. 1.1).

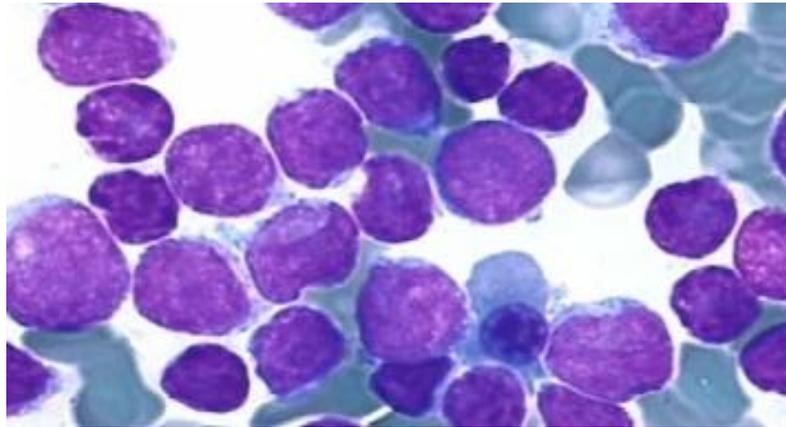


Рис. 1.1. Острый лимфобластный лейкоз L_1 типа (Chiaretti et al., 2014)

2. L_2 – вариант, для которого характерен широкий диапазон клеточных форм; клетки могут быть различных размеров с ядрами неправильных очертаний. Можно выделить одно или несколько нуклеол. Данный тип ОЛЛ самый распространенный у взрослых больных (рис. 1.2).

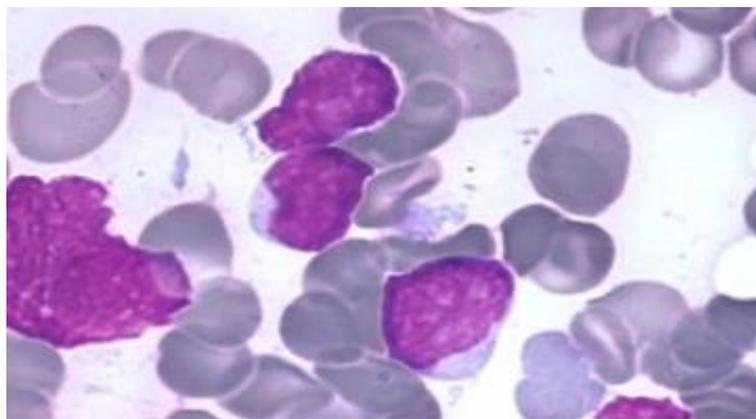


Рис. 1.2. Острый лимфобластный лейкоз L_2 типа (Chiaretti et al., 2014)

3. L_3 – вариант, характеризуется постоянным размером клеток. Бласты крупные, с овальным или круглым ядром (рис. 1.3). Ядрышко одно или несколько, отчетливой формы. Цитоплазма лимфобластов данного типа вакуализирована. Самый редкий из выделенных типов (5 % случаев) (Радченко, 2003).

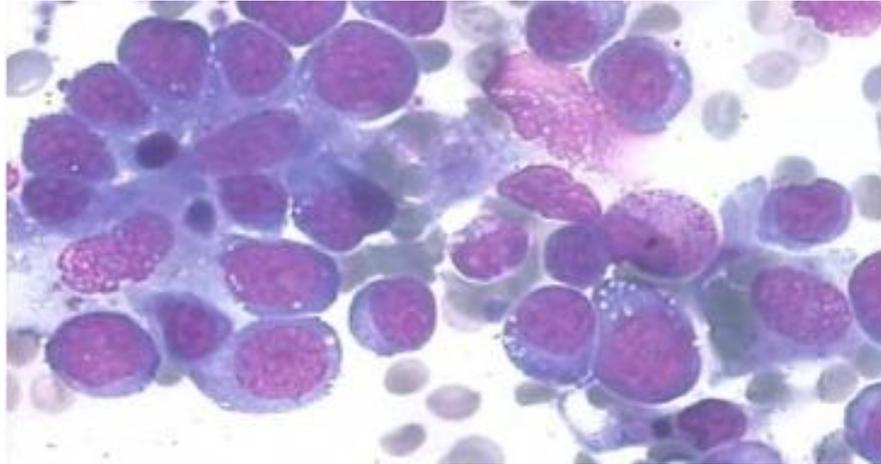


Рис. 1.3. Острый лимфобластный лейкоз L_3 типа (Chiaretti et al., 2014)

Для выяснения L_1 и L_2 типов необходимо проведение подсчета бластов на 100 клеток данной популяции. Если выявляется более 90% бластных форм с диаметром клеток до 10 мкм, то диагностируется L_1 вариант лейкоза (Волкова, 2001).

По другой классификации на основании иммунологического критерия ОЛЛ подразделяют на Т- и В-линейный. Лимфобласты при В-ОЛЛ полиморфны, то есть различны по размеру, форме, окраске цитоплазмы. При Т-ОЛЛ бласты небольшого размера, как правило, одинаковые. В них выявляется кислая фосфатаза и неспецифическая эстераза, которые располагаются в цитоплазме в виде изолированных друг от друга гранул (Волкова, 2013). Т-клеточный лимфобластный лейкоз – агрессивно развивающееся заболевание, в ходе которого происходит злокачественная трансформация предшественников Т-клеток (Фиясь и др., 2013).

Острый миелобластный лейкоз. ОМЛ входит в группу острых лейкозов развитие которого, характеризуется появлением злокачественных лейкозных клеточных форм, возникших из клетки-предшественницы миелоидного ряда. Заболевание может диагностироваться в любом возрасте, но чаще всего болеют пожилые люди (Захаров и др., 2014). Авторы FAB-классификации подразделяют ОМЛ на следующие типы (Белоусов и др., 2015):

1. M_0 – острый миелобластный недифференцированный лейкоз. Его диагностика возможна только после иммунофенотипического исследования. Характерные антигены, которые экспрессируют клетки – CD13, CD34, CD33. Встречается данный тип редко, составляет 5% от всех случаев миелолейкозов (рис. 1.4).

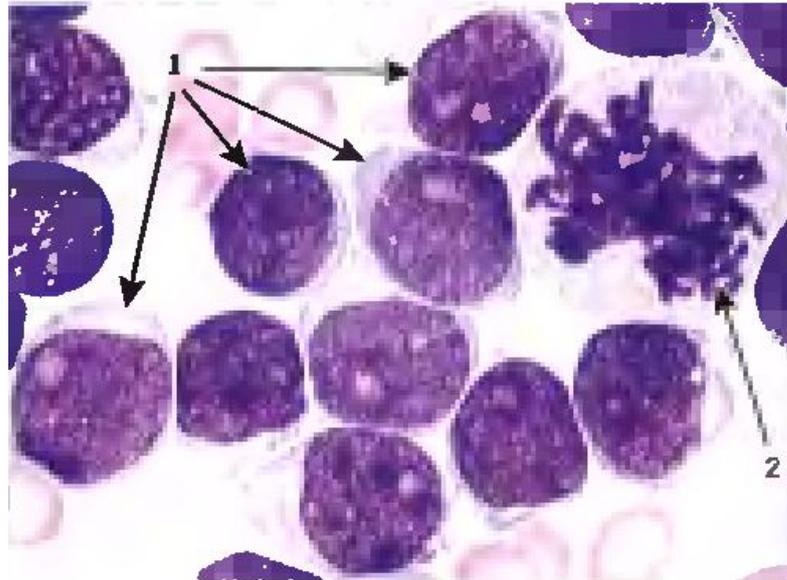


Рис. 1.4. Периферическая кровь больного при остром миелобластном лейкозе с минимальной миелоидной дифференцировкой (Луговская, Почтарь, 2016)

2. M_1 – ОМЛ без созревания. При данном лейкозе выявляется минимальная степень миелоидной дифференцировки. Характерно отсутствие зернистости клеток (Михайлов, 2001).

3. M_2 – острый миелобластный лейкоз с созреванием. Цитоплазма бластных клеток богата азурофильными гранулами, присутствуют

промиелоциты (более 3%). Созревающих клеток гранулоцитарного ряда около 10% (Глузман и др., 2010).

4. M_3 – острый промиелоцитарный лейкоз составляет 10 % случаев и характеризуется наличием в бластных клетках обильной зернистости. Для клеток характерен полиморфизм (Савченко и др., 2014; Тарасова и др., 2014).

5. M_4 – острый миеломонобластный лейкоз. Достаточно распространенный тип, встречается в 25% случаев. Число миелобластов и промиелоцитов всегда превышает 20%.

6. M_5 – острый монобластный лейкоз, для которого характерно преобладание моноцитов и промоноцитов. В случае незрелого типа данного лейкоза монобластов может быть до 80%.

7. M_6 – острый эритробластный лейкоз, при диагностике которого выявляется большое число эритрокариоцитов, с увеличением процента миелобластов.

8. M_7 – мегакариобластный лейкоз, практически не встречается у взрослых пациентов, характерен для детей на первом году жизни. Составляет всего 3% от всех случаев заболевания ОМЛ, прогноз неблагоприятный (Илларионова и др., 2015). Преобладают крупные бластные клетки, с гиперхромными ядрами, их цитоплазма светлая, встречается вакуолизация (рис. 1.5). Трудность диагностики вызывает полиморфная картина костного мозга. Чаще всего диагностика возможна после иммунофенотипирования (Абдулкадыров, 2004; Никитин и др., 2012).

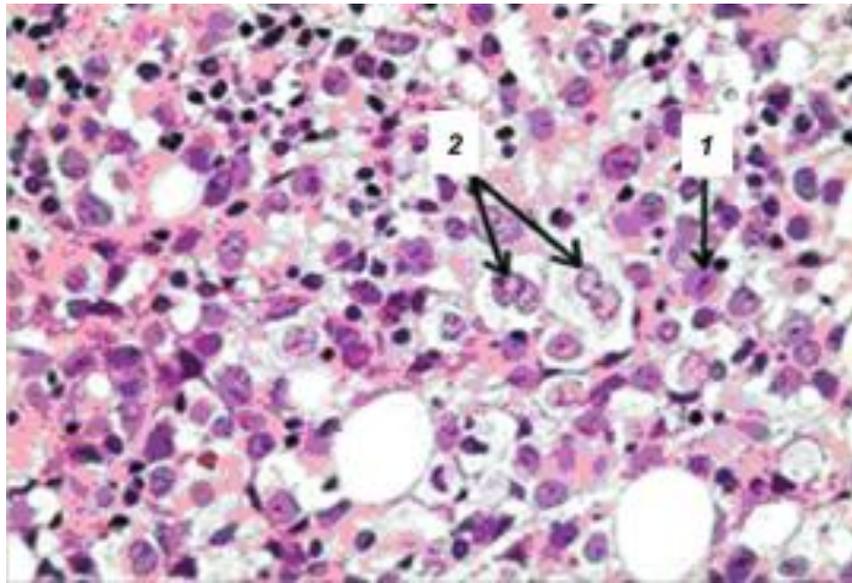


Рис. 1.5. Трепанат костного мозга при мегакариобластном лейкозе. Стрелками показаны одноядерные (1) и двуядерные (2) бластные формы клеток (Никитин и др., 2012).

При клиническом анализе в момент постановки диагноза возможны варьирующие показатели периферической крови у разных больных. В работе Клочковой Г.Н с соавт. (2016) показано, что для группы больных ОМЛ характерно снижение числа лейкоцитов на 61,5% и тромбоцитов на 28% с одновременным увеличением числа моноцитов и базофилов. Число эозинофилов, нейтрофилов и лимфоцитов тоже снижено по сравнению с показателями крови здоровых людей. При развитии миелолейкоза объем и площадь поверхности эритроцитов увеличены, их появление в кровотоке указывает на наличие функционально «старых» клеточных форм.

В течение того как развивается лейкоз, увеличивается число клеток с азурофильной зернистостью. Вместе с тем в этих же клетках часто наблюдается появление палочек Ауэра, которые накапливаются в цитоплазме в виде патологических гранул. Также содержание миелопероксидазы в миелобластах разных типов ОМЛ различно. Так, при ОМЛ М2 ее намного больше, чем при ОМЛ М1. В системе крови наблюдается морфологическая гетерогенность бластных клеток при ОМЛ разных типов. Бласты чаще всего

крупные, округлой формы, их цитоплазма базофильная. Ядерно-цитоплазматическое соотношение среднее или высокое (Краснова, 2009).

Вместе с крупными бластами в периферической крови встречаются и более мелкие. В костном мозге присутствуют такие клетки, как промиелоциты, миелоциты, зрелые нейтрофилы, для которых исследователи отмечают признаки диспластических изменений. У зрелых бластов цитоплазма может быть гомогенной, светло-розового цвета или зернистой с крупными включениями. Эозинофилы и базофилы присутствуют в повышенном количестве, причем отмечается увеличение незрелых клеток эозинофильного ряда. Эритробласты и мегакариоциты, присутствующие в костном мозге при миелолейкозе, морфологически не отличаются от таковых у здоровых людей (Глузман и др., 2010).

1.2. Физико-химические свойства доксорубина и механизм его действия на клетки крови

Доксорубин активно используется в схемах лечения при химиотерапии рака (Брынских и др., 2008). Это противоопухолевый препарат-антибиотик класса антрациклинов, вызывающий антимиотическое и антипролиферативное действие (Живодерников и др., 2013).

Химически данный класс веществ представляет собой гликозиды. Агликоновый остаток – это антрациклон, а углеводный – даунозамин (аминосахар) (рис. 1.6). Эта химическая структура предопределяет цвет антрациклинов, которые чаще всего, имеют специфический желтый цвет. Активное вещество цитостатика выделено из микроорганизмов вида *Streptomyces peucetius* (Рукавицын и др., 2008).

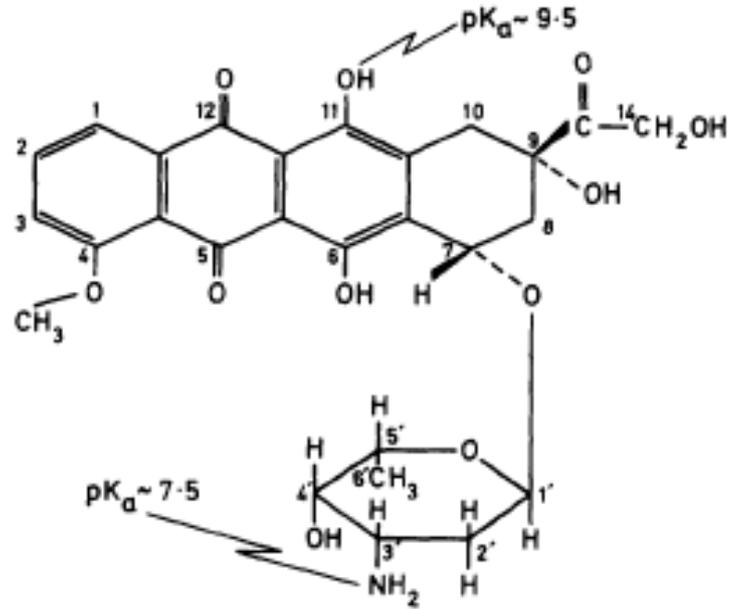


Рис. 1.6. Структурная формула доксорубина (Jue-Yeon et al., 2011)

Известно, что доксорубин воздействует и на опухолевые и на нормальные клетки организма, тем самым вызывая побочные эффекты. Чаще всего от таких явлений страдают пищеварительная, нервная и сердечно-сосудистая системы (Самуилов и др., 2000).

Восприимчивость опухолевых клеток организма к доксорубину зависит от того на какой стадии клеточного цикла они находятся. Так, в работе Живодерникова И.В. с соавт. (2013) показаны результаты воздействия препарата при инкубации с клеточными линиями, которые были распределены по фазам клеточного цикла. Максимальное число мертвых клеток наблюдалось на синтетической стадии в период репликации ДНК (рис. 1.7).

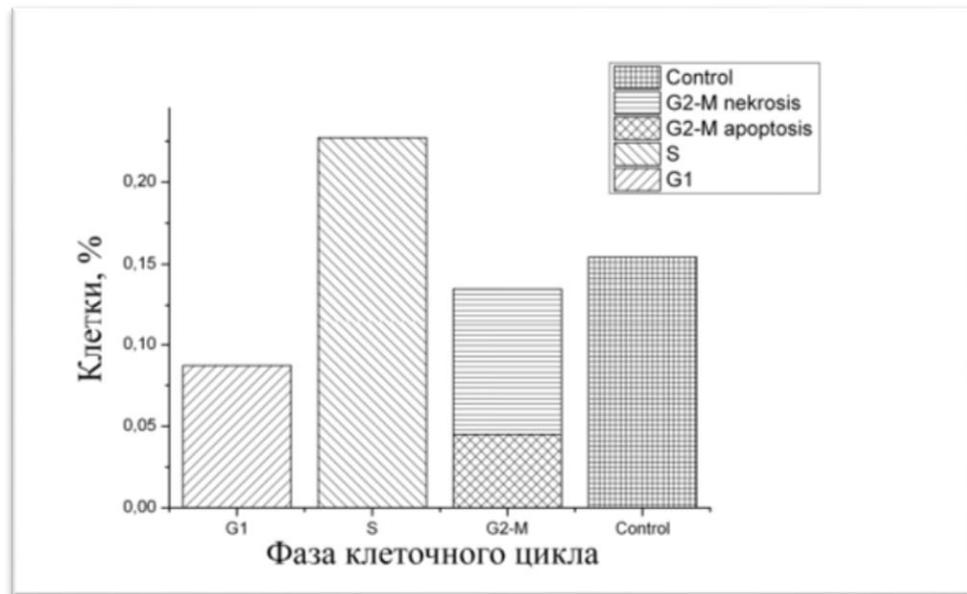


Рис. 1.7. Процент погибших клеток на каждой стадии клеточного цикла под влиянием доксорубицина (Живодерников и др., 2013).

Транспорт доксорубицина в клетку и ее ядро происходит поэтапно (Kiyomiya et al., 2001):

- 1) проникновение через мембрану опухолевых клеток путем простой диффузии;
- 2) переход доксорубицина в цитоплазму и связывание его с белковыми структурами – протеасомами;
- 3) транслокация образовавшегося комплекса через нуклеопоры в ядро;
- 4) диссоциация комплекса и интеркаляция доксорубицина в ДНК (Fan Yang et al., 2014).

Противоопухолевый механизм действия препарата характеризуется подавлением ДНК и РНК. В ходе этого процесса осуществляется внедрение молекулы доксорубицина в двойную спираль ДНК между азотистыми основаниями (рис. 1.8). На рисунке 1.8(а) показано образование ковалентной связи между доксорубицином и гуанином на одной цепи ДНК.

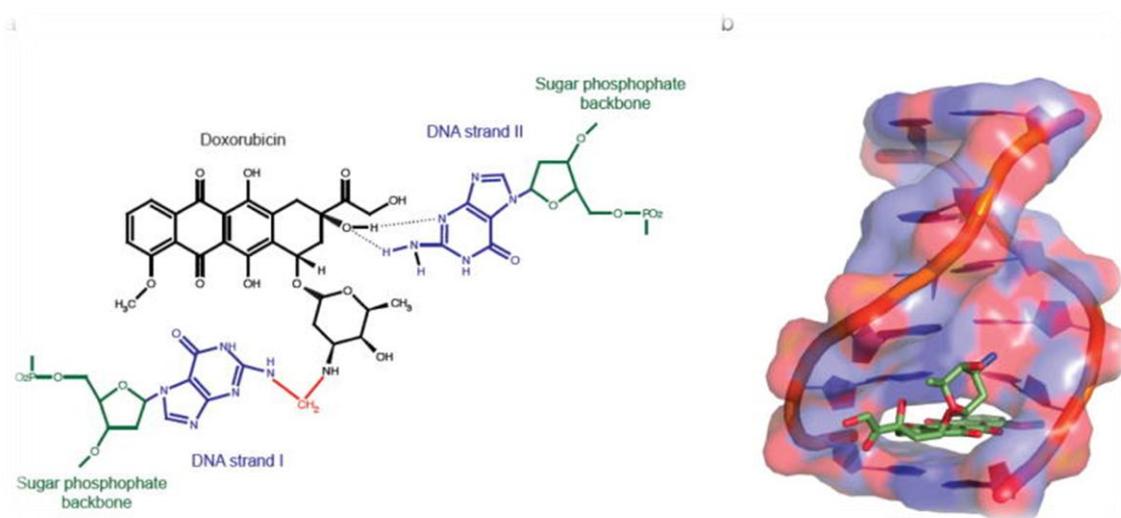


Рис. 1.8. Структура комплекса ДНК-доксорубицин: а – химическая формула доксорубицина, связанного с ДНК; в – 3D-структура ДНК с доксорубицином (Fan Yang et al., 2014)

Однако это наиболее общий и примерный механизм действия доксорубицина, который до конца неясен. В научной литературе предложены несколько моделей, которые демонстрируют действие доксорубицина, вызывающее гибель клеток:

- 1) взаимодействие доксорубицина с топоизомеразой II, вызывающее повреждение ДНК (Хуснутдинов и др., 2016);
- 2) угнетение синтеза нуклеиновых кислот в результате интеркаляции доксорубицина в ДНК (Fan Yang et al., 2014);
- 3) синтез свободных радикалов, окислительный стресс и прямое воздействие на мембраны клеток (Ефремова, 2016);
- 4) активация p53-зависимого пути и апоптических процессов клетки (Куликов, Беляева, 2014);
- 5) влияние доксорубицина на активность хеликазы. Нарушение разделения нитей ДНК (Ефремова, 2016).

Топоизомеразы представляют собой класс ферментов, которые присутствуют практически во всех живых организмах, начиная от бактерий и до человека. Они, вероятно, являются основной мишенью для

протиопухолевого действия антрациклинов. Топоизомераза II – это АТФ-зависимый фермент, который существует в двух изоформах у человека, это топоизомераза II α и топоизомераза II β . Их главная функция – это влияние на топологию ДНК. Дефицит топоизомераз приводит к нарушению нормального цитокенеза и вызывает гибель клеток. После связывания доксорубицина с комплексом ДНК и топоизомеразы II, в последнем происходят нарушения процесса сшивки ДНК и, как следствие, апоптоз клетки (Ващенко, 2003).

Известно, что окислительный стресс и перекисное окисление липидов участвуют в различных и многочисленных патологических состояниях, включая воспаление, нейродегенеративные заболевания и лейкозы. Термин «окислительный стресс» часто используется для описания дисбаланса в окислительно-восстановительном равновесии. Например, нарушения соотношения GSH/GSSG или NADPH/NADP⁺ связаны не только с перепроизводством реакционноспособных свободных радикалов, но также возникают по несвободному радикальному пути, например, с помощью перекиси водорода. В таких случаях его продуктами действия являются молекулы, обогащенные одним или несколькими атомами кислорода, которые обычно считаются маркерами окислительного стресса (Hybertson et al., 2011; Мартусевич и др., 2012).

Считается, что активные формы кислорода (АФК) являются ответственными за изменение макромолекул в результате окислительного стресса. АФК образуется в качестве побочных продуктов клеточного метаболизма, главным образом в митохондриях (Кучменко, 2013). Это, например, свободные радикалы - супероксидный анион (O₂⁻), пергидроксильный радикал (HO₂[·]), гидроксильный радикал ([·]OH), оксид азота (NO) и другие виды, такие как перекись водорода (H₂O₂), синглетный кислород (O₂), хлорноватистая кислота (HClO) и пероксинитритин ONOO⁻ (Lü et al., 2010; Толпыгина, 2012; Надеев, Гончаров, 2014). Гидроксильный радикал ([·]OH) является наиболее реакционноспособным, который может возникнуть в результате реакции Фентона и реакции Хабера-Вейсса из

перекиси водорода и металлов (железо, медь) (Cheng, Li, 2007; Riess et al., 2004). Чтобы предотвратить повреждение, вызванное АФК, клетки обладают несколькими антиоксидантными ферментами. Это супероксиддисмутазы MnSOD и Cu / ZnSOD, которые расположены в митохондриях и цитозоле, где они превращают супероксид в перекись водорода (Колесникова и др., 2013). Запуск разложения пероксида водорода на воду и кислород происходит с помощью каталазы. Другой защитный механизм включает неферментативные антиоксиданты, например, такие как глутатион (GSH) (Misra et al., 2009).

Промежуточные продукты, образующиеся в результате окислительного стресса, могут изменять структуру мембраны и вызывать перекисное окисление липидов полиненасыщенных жирных кислот, приводящее к образованию липопероксильного радикала (LOO•) (Spiteller et al., 2001).

Перекисное окисление липидов и их разложение с образованием реакционноспособных соединений вызывают изменения проницаемости и текучести липидного бислоя мембран и кардинально модифицируют целостность клеток (Dix, Aikens, 1993).

Среди продуктов окислительной деградации липидов наиболее интенсивно изучается 4-гидроксиноненал, поскольку он является высокоэлектрофильной молекулой, которая легко вступает в реакцию с низкомолекулярными соединениями, такими как глутатион, а при более высокой концентрации с ДНК. Благодаря своей химической реакционной способности этот продукт распада может образовывать ковалентные модификации с макромолекулами (например, путем образования простых аддуктов) и оказывать определенные биологические эффекты. Есть данные, что 4-гидроксиноненал, добавленный к опухолевым клеткам, вызывает снижение пролиферации и индукцию апоптоза (Копнин, 2012). Первые эксперименты были проведены с использованием культивируемых лейкоэмических клеток человека. Было выяснено, что очень низкие

концентрации 4-гидроксинонена снижают клеточную пролиферацию и блокируют экспрессию онкогена c-myc (Barrera et al., 1994).

Многие данные свидетельствуют о том, что увеличение АФК в опухолевых клетках организма может играть важную роль в иницировании и прогрессировании рака, поэтому окислительный стресс рассматривается как нежелательное явление. Так, известно, что в клетках крови больных лимфолейкозом увеличивается продукция АФК по сравнению с нормальными лимфоцитами здоровых людей (Рязанцева и др., 2013).

Умеренное повышение АФК может способствовать пролиферации и дифференцировке клеток, тогда как его избыточное количество может вызывать оксидативное повреждение (Пожилова и др., 2015). В связи с чем, поддержание гомеостаза АФК имеет решающее значение для нормального роста клеток и их выживания, а его увеличение связано с аномальным ростом опухолевых клеток и отражает нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза (Кормош, 2013).

Повышение продукции АФК может зависеть от разных механизмов, таких как активация онкогенов, митохондриальной дисфункции или нарушения функции p53. Факторы роста и цитокины также стимулируют выработку данных повреждающих агентов (Кормош, 2013).

Многие химиотерапевтические препараты, такие как винбластин, цисплатин, доксорубин, камптотecin проявляют свою противоопухолевую активность посредством АФК-зависимой активации апоптической гибели клеток. Так, противоопухолевое действие доксорубина вызывает образование свободных радикалов и возникновение окислительного стресса. Выделяют 2 механизма этих процессов. Первый путь подразумевает образование свободного семихион-радикала под действием нескольких НАДФ*Н-зависимых редуктаз, которые вызывают одноэлектронное восстановление доксорубина до семихиона. Данная форма препарата является свободным радикалом и способствует восстановлению кислорода до супероксидных радикалов. В ходе этой реакции также генерируется исходная

форма доксорубицина – хинон. Таким образом, для доксорубицина характерны редокс-циклические реакции, в результате которых происходит образование свободных радикалов. Эти процессы, в свою очередь, и вызывают оксидативный стресс. Его последствия вызывают повреждения ДНК, после чего запускаются механизмы репарации (Крючков и др., 2011).

Во втором случае возможно образование свободных радикалов доксорубицина в результате неферментативных механизмов, в основе которых лежат реакции с железом. Так, например, Fe^{3+} реагирует с адриамицином (синоним доксорубицина), в ходе окислительно-восстановительной реакции атом железа принимает электрон и образуется комплекс свободных радикалов Fe-доксорубицина. Этот комплекс способен восстанавливать кислород до перекиси водорода и других активных форм кислорода (Quiles et al., 2002).

В работе Прилуцкой С.В (2011) установлено, что использование доксорубицина в комплексе с фуллереном C_{60} способствует эффективному подавлению роста опухоли, а также подавляет метастазирование карциномы легких Льюиса. Эти данные демонстрируют возможность использования в противоопухолевой терапии молекул C_{60} в сочетании с доксорубицином. Стоит обратить внимание на то, что без фуллерена данный противоопухолевый препарат при введении распределяется в ядре клетки и подавляет синтез нуклеиновых кислот. Однако в комплексе с молекулами фуллерена доксорубицин находится в цитоплазме клетки. Ведутся разработки создания новых лекарственных форм доксорубицина с целью снижения токсического действия (Бойко и др., 2013; Замулаева и др., 2016). Это формы в виде и наночастиц, липосомы, наносомальные формы, полимерные мицеллы и другие. Таким образом, необходимо проводить дальнейшие исследования данного комплекса (Liu et al., 2010; Мищенко и др., 2013; Переверзева и др., 2016).

Из множества исследуемых лекарственных форм в настоящее время широко рассматривается возможность использования липосом – липидных

везикул диаметром от 50 до 200 нм. Создание комплекса препарата с этими структурами увеличивает эффективность противоопухолевой терапии за счет избирательной транспортировки препарата к месту локализации опухоли (рис. 1.9). Такая селективная доставка возможна только благодаря пассивному накоплению липидных везикул в опухолевых очагах из-за повышенной проницаемости капилляров (Зангиева и др., 2014).

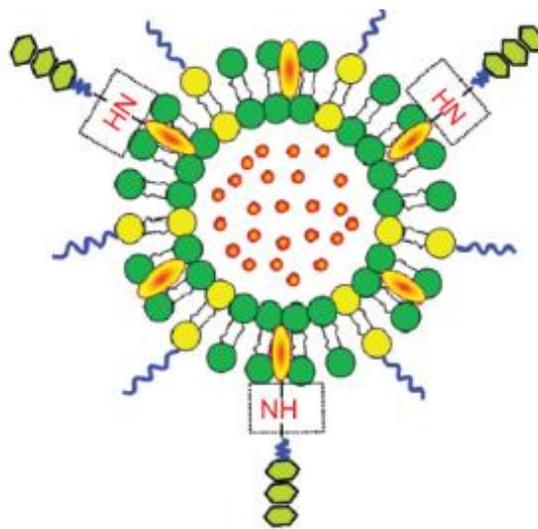


Рис. 1.9. Схематическое строение липосомы в комплексе с доксорубицином
(Препарат выделен красными точками)
(Huang et.al., 2014).

В дополнении к образованию свободных радикалов и увеличению окислительного метаболизма лечение доксорубицином увеличивает уровень церамида. Это липидная молекула, главные компоненты которой сфингозиды и жирная кислота. Церамид входит в состав клеточных мембран и участвует во множестве клеточных процессов, включая остановку роста, апоптоз и клеточное старение. Кроме того, лечение доксорубицином повышает количество церамида в чувствительных к доксорубицину клетках, но не в доксорубицин-резистентных клетках, что указывает на то, что увеличение церамида может вызывать резистентность к используемому препарату. Действительно, повышенная активность глюкозилцерамидсинтазы (GCS),

фермента, превращающего церамид в глюкозилцерамид, связана с клеточной устойчивостью к доксорубину, тогда как подавление GCS восстанавливает чувствительность к доксорубину, вызывая апоптотическую гибель клеток (Fan Yang et al., 2014).

В результате нарушения клеточных структур после воздействия доксорубина возможна активация апоптоза. Существует два известных механизма реализации данного процесса. Это митохондриальный и рецепторный механизмы, в основе которых лежит принцип взаимодействия проапоптотических и антиапоптотических факторов. В этих процессах немаловажную роль играют белки семейства Bcl-2, белок p53 и CD95. Предполагается, что в развитии острых лейкозов немаловажную роль играет нарушение митохондриального механизма апоптоза. Есть зависимость снижения апоптоза в популяции клеток с увеличением экспрессии Bcl-2 при ОМЛ, а также известно, что аномальные формы клеток CD³⁴⁺ при острых лейкозах более устойчивы к апоптозу в отличие от клеток CD³⁴⁻ (Паровичникова и др., 2013; Hengartner, 2000; Stijn et al., 2003). Однако программируемая клеточная гибель возникает чаще всего только при лечении препаратом в малых дозах. При повышенных концентрациях доксорубина вызывает гибель опухолевых клеток посредством нефизиологических механизмов (Aredia et al., 2014).

1.3. Механизмы лекарственной резистентности клеток

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) – это способность клеток, характеризующая их невосприимчивость к действию широкого спектра противоопухолевых препаратов (Pogorzala et al., 2015). Резистентность клеток формируется с помощью защитных механизмов, а также в результате снижения чувствительности к действию лекарств. МЛУ является большим препятствием для проведения эффективной химиотерапии (Чехун и др., 2000; Горбенко и др., 2015).

Согласно данным литературы, процесс формирования фенотипа лекарственной устойчивости сводится к нескольким молекулярно-клеточным механизмам:

- 1) выброс лекарственных веществ из клетки путем включения энергетически зависимого транспорта;
- 2) активация системы детоксикации внутри клетки;
- 3) повышение активности процессов репарации в связи с внутриклеточными нарушениями (Барышникова и др., 2015).

Первая модель, обеспечивающая ограничение накопления лекарственных веществ в клетке, характеризуется гиперфункцией АТФ-транспортеров (Житняк и др., 2016). Самыми исследованными из них являются Р-гликопротеиды (Callaghan et. al., 2014). Это мембраносвязанные переносчики, которые в литературе получили название Pgp или P-170, являются продуктом гена MDR1, расположенного на длинном плече хромосомы 7 (Чубарова и др., 2012). Они состоят из 1280 аминокислот, морфологически поделены на 2 части, имеющие по 6 трансмембранных участков. В каждом таком комплексе обязательно есть один цитоплазматический сайт для связывания АТФ (рис. 1.10) (Ставровская, 2000; Поспелова и др., 2004).

С помощью Pgp в клетках-мишенях обеспечивается защита от накопления лекарственных веществ путем их «выбрасывания» против градиента концентрации из внутриклеточного пространства в межклеточное. Этот механизм эволюционно появился гораздо раньше, чем сама химиотерапия. Его первоначальная функция состояла в предотвращении опасного воздействия факторов внешней среды. Для этой системы защиты свойственна стабильно наследуемая активация специфических систем ферментативного действия в ответ на вредные для жизни воздействия (Штиль, 2003).

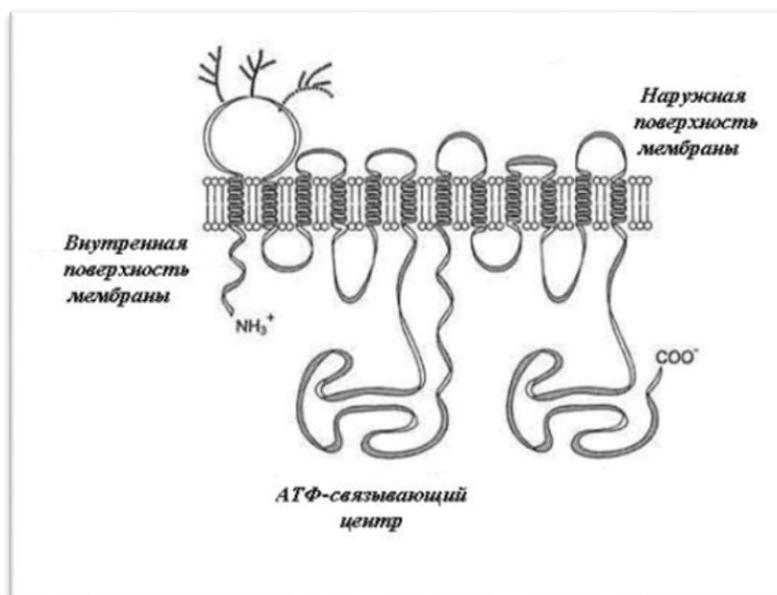


Рис. 1.10. Структура Р-гликопротеида (Волкова и др., 2012)

В организме человека выявлено наличие двух генов семейства MDR, соотношение которых неодинаково: в резистентных линиях клеток намного больше MDR1 (Зенков и др., 2004).

Известно, что трансмембранные участки белка способны формировать поры для активного транспорта веществ через липидный бислой мембран (рис. 1.11).



Рис. 1.11. Механизм действия Р-гликопротеина (на схеме черный круг – противоопухолевый агент) (Волкова и др., 2012).

Обеспечение работы насоса осуществляется в результате переноса энергии гидролиза АТФ от двух цитоплазматических сайтов связывания (Roninson, 1991).

Механизм внутриклеточной детоксикации основывается на реакции взаимодействия лекарственных веществ с глутатионом. Осуществление данных процессов возможно благодаря усиленной работе ферментов семейства глутатион-S-трансфераз (GSTs) и глутатион-редуктазы. Образовавшиеся комплексы лекарственных веществ могут выбрасываться в межклеточное пространство специальными транспортерами GS-X (Штиль, 2003).

Класс ферментов GSTs представляет собой различные изоэнзимы, функции которых в инактивации лекарственных веществ неодинаковы, но есть данные о возможности совместного действия в клетках сразу нескольких механизмов защиты (рис. 1.12). Например, усиление активности GSTπ в клетках может наблюдаться совместно с повышенным синтезом Pgp (Блохин, 2005).

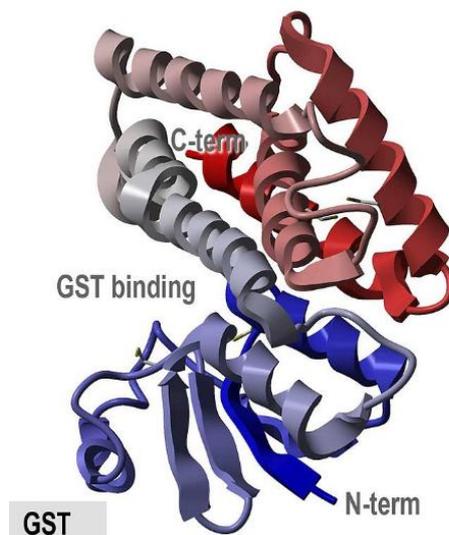


Рис. 1.12. Строение фермента семейства глутатион-S-трансфераз (Udomsinprasert et al., 2005)

Выделяют еще одно семейство белков, которые играют важную роль в инактивации ксенобиотиков. Это цитохромы P450, обеспечивающие процессы метаболического распада лекарственных веществ, находящихся в клетках. Данные механизмы защиты присущи не только опухолевым клеткам, подобные системы функционируют и в нормальных клетках организма. Генетический полиморфизм, характерный для соответствующих генов защитных систем, определяет индивидуальную чувствительность организма к лекарственным веществам (Ставровская, 2004).

Третий вариант защитного механизма запускается в том случае, когда произошло взаимодействие лекарственного агента с внутриклеточными мишенями. Включаются защитные ферментативные системы, выполняющие восстановление поврежденных макромолекул клетки. Эти системы активно участвуют в процессах эксцизионной репарации ДНК, устраняют поврежденные участки молекул и способствуют связыванию разрывов ДНК. Немаловажную роль в восстановлении поврежденных биомолекул играют белки теплового шока (HSPs) и убиквитинлигазы. Главная функция HSPs— это защита организма от стрессорных воздействий, опасных для организма. Убиквитинлигазы осуществляют модификации тех белковых молекул, которые уже невозможно восстановить, поэтому данная система их утилизирует (Блохин, 2009).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Организация эксперимента и забор материала

Экспериментальные исследования выполнены на кафедре биологии НИУ «БелГУ». Объект исследования – венозная кровь больных ОЛЛ (n=50) и ОМЛ (n=35), которые находились на лечении в областной клинической больнице Святителя Иоасафа г. Белгорода.

Периферическую кровь больных получали путем венепункции с помощью медицинского персонала гематологического отделения. Забор крови осуществляли в вакуумные пробирки Vacutte КЗЕ, после чего её центрифугировали в лаборатории при 1500 об/мин в течение 5 минут. Далее отбирали лейкоцитарное кольцо и надосадочную жидкость и снова центрифугировали в течение 10 минут при той же скорости центрифуги, с последующей трехкратной отмывкой средой RPMI-1640 и ресуспендированием в этой же среде.

2.1. Выполнение экспериментов с доксорубицином *in vitro*

С целью изучения механических и электрических свойств доксорубицин-резистентных клеток осуществляли постановку опытов *in vitro*. 1×10^6 клеток культивировали в 6-ти луночных планшетах с добавлением среды RPMI 1640 в соотношении клетки: среда 1:1 (по объему). В лунки планшета добавляли доксорубицин в восходящей концентрации (0,001; 0,01; 0,1; 0,5, 1 мг/мл) в соотношении 1 мкл доксорубицина на 10 мкл клеточной суспензии в среде RPMI. В качестве контроля использовали 1 лунку без добавления доксорубицина. Инкубацию осуществляли в CO₂ инкубаторе при температуре 37⁰C в течение 1 ч и 24 ч.

Оценку жизнеспособности клеток проводили путем окраски 1 мкл клеточной суспензии 0,4% раствором трипанового синего в фосфатно-солевом буфере (рН 7,2-7,3) и последующего подсчета погибших форм в камере Горяева на световом микроскопе Olympus. Процент выживших клеток

рассчитывали согласно формуле (1):

$$N = 1 - \left(\frac{N \text{ число окрашенных клеток}}{T \text{ общее число клеток}} \right) \times 100 \quad (1)$$

где N – процент выживших клеток;

N – число окрашенных клеток;

T – общее число клеток.

Резистентные к доксорубину клетки трижды отмывали от среды инкубации с использованием среды Хенкса (pH 7,4). После этого изучали упруго-эластические и электрические свойства клеточной поверхности с использованием различных режимов сканирования на атомно-силовом микроскопе.

2.2. Изучение свойств и рельефа поверхности клеток методом атомно-силовой микроскопии

Работа на атомно-силовом микроскопе (АСМ) позволяет сканировать поверхности образцов с помощью специального зонда, который располагается на кантилевере, его другое название – консоль (Быков, 2014). Силы взаимодействия, образующиеся в результате контакта изучаемого образца и зонда, приводят к изгибам кантилевера. Возникающие деформации консоли регистрируют с помощью оптической системы микроскопа. Эта система состоит из специального лазера, свет которого падает на зеркальную сторону кантилевера, отдельного фотодетектора, который принимает отраженный луч (рис. 2.1).

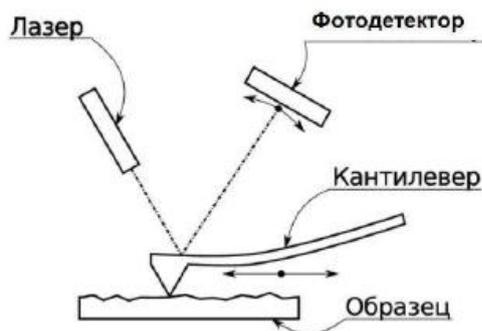


Рис. 2.1. Схема работы атомно-силового микроскопа (Долгова и др., 2012)

В ходе сканирования любые изменения поверхности, например, впадины или выступы вызывают изгиб кантилевера, тем самым происходит отклонение лазерного луча, что позволяет получать трехмерное изображение в режиме реального времени (Никиян, Татлыбаева, 2014).

Сканирование исследуемых образцов возможно осуществлять с использованием трех режимов: контактный, бесконтактный и полуконтактный. При контактном режиме объект исследования и зонд находятся на расстоянии нескольких десятых нанометра, при взаимодействии которых доминирующими силами являются силы отталкивания. В бесконтактном режиме кантилевер осуществляет колебания над образцом с амплитудой – 5 нм, которая превышает расстояние между зондом и объектом. В данном режиме получение изображения осуществляется в результате определения силы притяжения, значение которой зависит от изменения амплитуды или частоты колебаний. В полуконтактном режиме кантилевер периодически касается поверхности образца и совершает вынужденные колебания с амплитудой – 100 нм. Устройство АСМ делает возможным сканировать не только достаточно крупные объекты, но и проводить манипуляции с отдельными атомами. Это возможно благодаря действию Ван-дер-Ваальсовых сил, возникающих между зондом и поверхностью объектов (Долгова и др., 2012).

Помимо получения 3D-изображений АСМ позволяет анализировать механические свойства, что делает возможным более глубокое изучение клеточных процессов. С помощью атомно-силовой микроскопии можно выяснять такие свойства, как эластичность, адгезию и потенциал поверхности биологических объектов. Все это входит в новое направление клеточной биологии, которое называют «клеточная эластография» (Нагорнов, 2016).

Исследование упруго-эластических свойств лимфоцитов крови осуществляли на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71, производитель NTMDT, Зеленоград, 2009). Препараты готовили путем нанесения нативной клеточной суспензии на стеклянные обезжиренные подложки. Сканирование клеток проводили в режиме силовой спектроскопии с использованием кантилевера NSG03. С каждого образца сканировали по 20 клеток. В программном обеспечении «Nova» проводили наложение нагрузки в 25 участках клеточной поверхности (рис. 2.2).

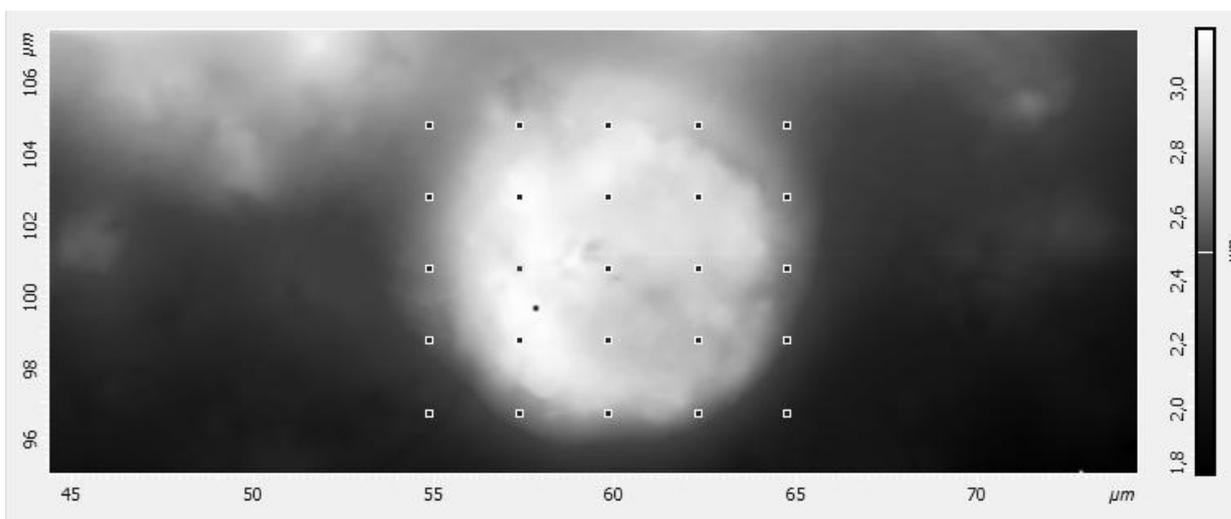


Рис. 2.2. Наложение сетки сканирования на клеточную поверхность в программе Nova

В ходе проведения процедуры эластографии с поверхности лимфоцита в каждой точке снимали силовые кривые, которые использовали для вычисления силы взаимодействия зонда и образца (рис. 2.3).

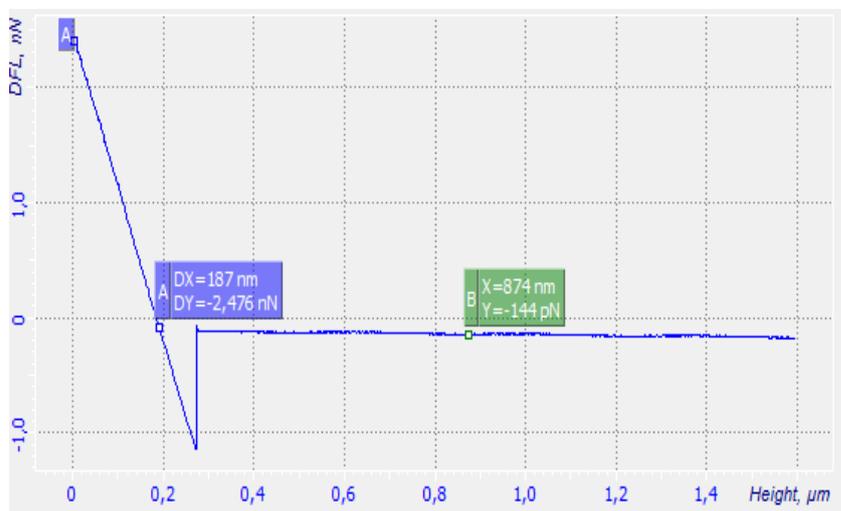


Рис. 2.3. Преобразованная силовая кривая лимфоцита больного ОЛЛ

Полученные силовые кривые подвода и отвода обрабатывали на основе модели Герца в модификации Снедона с помощью программного обеспечения «Ef3» (NT-MDT, Зеленоград, 2009).

С целью изучения электрических свойств биомембран лимфоцитов измеряли их поверхностный потенциал (ПП) в режиме зонда Кельвина. Суспензию лимфоцитов для измерения электрического заряда готовили по схеме (патент № 2027188). Измеряли ПП с использованием кантилевера с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN (Nanoworld, USA). С каждого образца сканировали по 15 клеток. Далее обработку полученных сканов осуществляли в программе Nova (NT-MDT, Россия).

Рельеф поверхности лимфоцитов крови больных ОМЛ и ОЛЛ изучали на АСМ в полуконтактном режиме сканирования. До сканирования готовили препараты: суспензию лимфоцитов наносили на обезжиренные стеклянные подложки. Далее проводили сканирование участка клетки размером 3×3 μm^2 , после чего в программе Nova строили профили бокового сечения

лимфоцита, на котором с помощью программного обеспечения измеряли размеры выступов и углублений на клеточной поверхности (рис. 2.4).

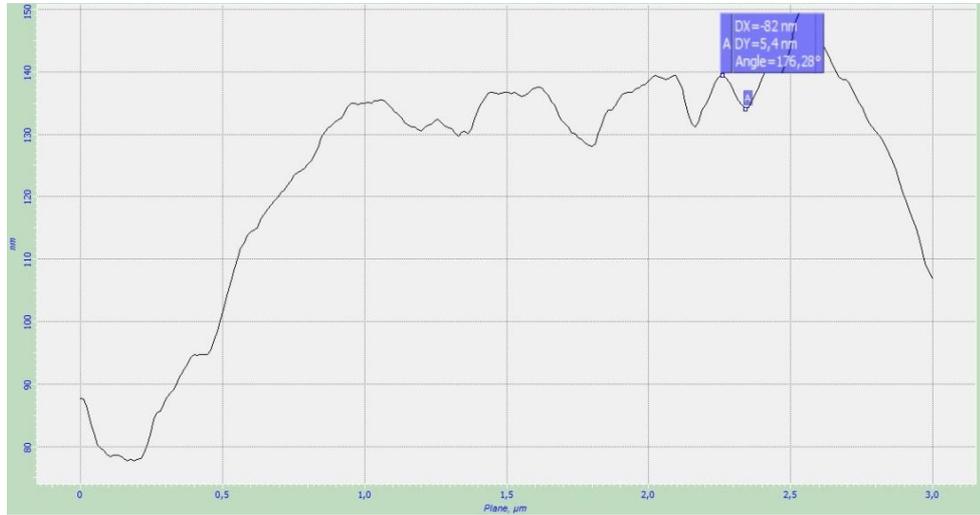


Рис. 2.4. Кривая профиля бокового сечения поверхности клетки

Результаты экспериментальных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий между контрольными и опытными пробами определяли с использованием t критерия Стьюдента $p < 0,05$ в случае нормального распределения признака и U -критерия Манна-Уитни при $p < 0,05$ – для непараметрических данных.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Жизнеспособность лимфоцитов крови больных ОЛЛ и ОМЛ под влиянием доксорубина

Под влиянием доксорубина жизнеспособность лимфоцитов больных острым лейкозом снижается в зависимости от концентрации препарата и времени его воздействия (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Процент жизнеспособных лимфоцитов крови больных ОЛЛ и ОМЛ

Группы	Время инкубации	Контроль	% жизнеспособных клеток				
			1 мг/мл	0,5 мг/мл	0,1 мг/мл	0,01 мг/мл	0,001 мг/мл
ОЛЛ	1 час	95,2±0,8	23,5 ± 2,3 ^u	52,8 ± 2,2 ^u	77,6 ± 1,6 ^u	92,9 ± 0,8	96,9 ± 0,9
	24 часа	95,7 ± 0,9	9,6 ± 1,3 ^u	28,1 ± 1,5 ^u	51,3 ± 1,4 ^u	80,2 ± 1,5 ^u	91,6 ± 0,8 ^u
ОМЛ	1 час	98,2±0,4	55,4 ± 1,2 ^u	78,2 ± 1,2 ^u	88,8 ± 1,2 ^u	96,6 ± 0,5	98,6 ± 0,2
	24 часа	97,8±0,5	39,8 ± 0,9 ^u	67,8 ± 1,7 ^u	81,8 ± 1,1 ^u	92,4 ± 0,9 ^u	97,4 ± 0,5

^u – достоверность различий по сравнению с результатами измерений в контрольной пробе по критерию Манна - Уитни ($p < 0,05$).

В пробах крови больных ОЛЛ при увеличении концентрации препарата до 0,5 мг/мл процент жизнеспособных клеток через 1 час инкубации снизился практически в два раза, а при увеличении концентрации до 1 мг/мл – в 4 раза по сравнению с контролем. При этом через час инкубации при концентрации препарата 0,001 мг/л 96,9±0,9% лимфоцитов выживали, с увеличением дозы препарата до 1 мг/мл жизнеспособность сохраняли 23,5±2,3% клеток (см. табл. 3.1).

Через 24 ч инкубации процент доксорубин-резистентных клеток снижался в зависимости от концентрации препарата. Так в среде, содержащей 0,001 мг/мл доксорубина, выживало 92±0,8% клеточной популяции, а при увеличении концентрации до 1 мг/мл жизнеспособность сохраняли 10,0±1,3% лимфоцитов.

В пробах крови пациентов больных ОМЛ выявлена более стойкая популяция лимфоцитов к высоким дозам доксорубина. Через час инкубации ни в одной из проб не наблюдали гибели 50% клеток, даже при увеличении дозы препарата до 1 мг/мл жизнеспособность сохраняло $55,4 \pm 1,2\%$ клеточной популяции, а через 24 инкубации при этой концентрации препарата выжило около $40 \pm 0,9\%$ лимфоцитов (см. табл. 3.1).

Таким образом, выявлены доксорубин-устойчивые клетки как лимфо-, так и миелобластного типов лейкоза. Наибольшей резистентностью к препарату обладают лимфоцитарные формы миелолейкоза, среди которых около 40% лимфоцитов сохраняют свою жизнеспособность через 24 ч инкубации в среде с самой высокой концентрацией препарата (1 мг/мл).

3.2. Влияние доксорубина на упруго-эластические свойства лимфоцитов крови

Функциональная активность лимфоцитов определяется их упруго-эластическими свойствами. Снижение модуля Юнга на 88% ($p < 0,05$) по сравнению контролем у лимфоцитов больных ОЛЛ наблюдали при концентрации препарата 1 мг/мл после 24-часовой инкубации исследуемых клеток (табл. 3.2).

Таблица 3.2

Значение модуля Юнга (μPa) лимфоцитов больных ОЛЛ под влиянием доксорубина

Образцы	1 час	24 часа
Контроль	1,79±0,01	
1 мг/мл	0,59±0,02*	0,22±0,02*
0,5 мг/мл	5,14±0,09*	0,93±0,01*
0,1 мг/мл	3,48±0,02*	1,21±0,02*
0,01 мг/мл	2,25±0,02*	1,38±0,02*
0,001 мг/мл	1,85±0,02	1,71±0,01*

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

После 24-х часовой инкубации установлено снижение модуля Юнга лимфоцитов крови больных ОЛЛ при всех использованных концентрациях доксорубицина. При концентрации доксорубицина 0,5 мг/мл модуль Юнга исследуемых клеток снизился на 48% ($p < 0,05$), 0,1 мг/мл – на 32% ($p < 0,05$), 0,01 мг/мл – на 23 % ($p < 0,05$) по сравнению контролем. Также установлено снижение данного показателя на 4% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем при минимальной концентрации препарата (0,001 мг/мл)

После часовой инкубации в образцах клеток, инкубированных с доксорубицином в концентрации 1 мг/мл, установлено снижение модуля Юнга на 67% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Модуль Юнга клеточной поверхности лимфоцитов при концентрациях доксорубицина 0,5, 0,1 и 0,01 мг/мл повысился соответственно на 187% ($p < 0,05$), 94% ($p < 0,05$) и 26% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Модуль Юнга лимфоцитов больных ОМЛ был снижен на 44% ($p < 0,05$) при концентрации препарата 1 мг/мл в течение часа инкубации, а также при 24-часовой инкубации – на 86% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными пробами (табл. 3.3).

Таблица 3.3

Модуль Юнга лимфоцитов больных ОМЛ под влиянием доксорубицина

Образцы	1 час	24 часа
Контроль	1,85±0,01	
1 мг/мл	1,03±0,04*	0,26±0,02*
0,5 мг/мл	3,58±0,02*	1,84±0,02
0,1 мг/мл	3,21±0,02*	2,25±0,02*
0,01 мг/мл	2,62±0,02*	2,06±0,02*
0,001 мг/мл	1,88±0,01	1,84±0,02

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

При концентрациях 0,5; 0,1; 0,01 мг/мл наблюдали увеличение модуля Юнга. Так, при концентрации препарата в среде 0,5 мг/мл в течении часа инкубации зарегистрировано увеличение модуля Юнга на 94% ($p < 0,05$), а при 0,1 мг/мл – на 74% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Модуль Юнга

клеток после инкубации с доксорубицином в концентрации 0,01 мг/мл составил $2,62 \pm 0,02$ μ Pa.

Через 24 часа инкубации при 0,1 мг/мл доксорубицина в культуре клеток показатель жесткости клеток увеличился на 2 % ($p < 0,05$) и на 11 % ($p < 0,05$) при концентрации 0,01 мг/мл по сравнению с контролем.

Таким образом, выявлена закономерность изменения биомеханических свойств лимфоцитов крови больных острым лимфобластным и острым миелобластным типами лейкоза под влиянием препарата. Доксорубин изменяет упруго-эластические свойства лимфоцитов крови больных как при ОЛЛ, так и при ОМЛ в зависимости от концентрации и времени его воздействия на клетки: увеличение концентрации вызывает снижение общей жесткости биомембран.

3.3. Электрические свойства доксорубин-резистентных клеток

Жизнеспособность лимфоцитов тесно связана с их функциональной активностью, в связи с чем, в выполненном исследовании был измерен поверхностный потенциал мембраны доксорубин-резистентных клеток. Согласно полученным данным, в исследуемых группах при концентрации доксорубицина в среде 0,001 мг/мл достоверных изменений заряда биомембраны не выявлено по сравнению с контролем (табл. 3.4).

Таблица 3.4

Потенциал поверхности лимфоцитов под влиянием доксорубицина

Группы	Время воздействия	Контроль	Потенциал, mV				
			1 мг/мл	0,5 мг/мл	0,1 мг/мл	0,01 мг/мл	0,001 мг/мл
ОЛЛ	1 час	$-28,36 \pm 0,12$	$15,76 \pm 2,19^*$	$-54,22 \pm 1,13^*$	$-39,18 \pm 0,71^*$	$-30,71 \pm 0,25^*$	$-26,71 \pm 0,34$
	24 часа	0,12	$29,18 \pm 0,27^*$	$-11,23 \pm 0,22^*$	$-51,27 \pm 0,24^*$	$-35,82 \pm 0,17^*$	$-29,36 \pm 0,38$

ОМЛ	1 час	-24,18 ± 0,10	12,37 ± 0,07*	-47,63 ± 0,12*	-35,21 ± 0,04*	-29,33 ± 0,24*	-24,65 ± 0,19
	24 часа		20,81 ± 0,21*	-59,71 ± 0,36*	-40,18 ± 0,19*	-33,12 ± 0,08*	-27,53 ± 0,26

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

В пробах крови больных ОЛЛ через 1 час инкубации при увеличении концентраций препарата в среде 0,01; 0,1 и 0,5 мг/мл в устойчивых популяциях лимфоцитарных клеток наблюдали увеличение поверхностного потенциала соответственно на 8%, 38% и 91% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. При максимальной концентрации препарата в среде 1 мг/мл резистентные к доксорубину клетки теряли отрицательный заряд, их поверхностный потенциал существенно возрастал. Через 24 ч инкубации в пробах наблюдали аналогичную картину, однако при концентрации препарата 0,5 мг/мл установлено увеличение поверхностного потенциала резистентных клеток на 40% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. При концентрации 1 мг/мл заряд выживших клеток возрастал на 85% ($p < 0,05$) по сравнению с зарядом клеток через 1 час инкубации.

В пробах больных ОМЛ установили схожие реакции с клетками больных ОЛЛ. Через 1 ч инкубации в интервале концентраций 0,1-0,5 мг/мл поверхностный потенциал мембраны снижался, наиболее значительно в пробах с концентрацией препарата 0,5 мг/мл на 97% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В пробах с концентрацией 1 мг/мл мембрана клеток была положительно заряжена (см. табл. 3.4). Через 24 ч инкубации отмечали аналогичную картину, положительный заряд мембран доксорубин-резистентных клеток при концентрации 1 мг/мл возрастал на 68% ($p < 0,05$) по сравнению с зарядом клеток через 1 ч инкубации.

3.4. Цитоархитектоника лимфоцитов крови больных ОЛЛ и ОМЛ под влиянием препарата – доксорубицин

В ходе серии экспериментов были получены данные об особенностях рельефа поверхности лимфоцитов крови больных ОЛЛ, резистентных к доксорубицину (табл. 3.5).

Таблица 3.5

Рельеф поверхности лимфоцитов больных ОЛЛ

Время воздействия – 1 час							
Морфологические структуры		Контроль	Концентрация доксорубицина				
			1 мг/мл	0,5 мг/мл	0,1 мг/мл	0,01 мг/мл	0,001 мг/мл
В	h, нм	17,8±3,7	16,5±2,8	6,9± 0,7*	24,5 ±2,9	26,4 ±2,7	21,3 ±1,9
	d, нм	180,0±17,5	107,9±11,0*	104,5±9,6*	234,9±19,4	142,5±11,1	132,7±15,7
У	h, нм	11,3 ±1,3	14,9±1,6	9,6 ±1,6	33,9±1,6*	24,88±0,1*	22,3 ±1,8*
	d, нм	135,3 ±6,9	132,6±13,3	142,5±11,5	152,1±13,4	128,4±12,5	140,3 ±10,1
Время воздействия – 24 часа							
В	h, нм	35,0 ±3,6	12,5 ±1,8*	11,5±2,5*	18,7±2,3*	21,6 ±1,8	27,9 ± 2,6
	d, нм	190,6 ±20,2	52,9± 6,7*	70,4±9,7*	106,3±11,1*	141,4±11,3	162,0±8,7
У	h, нм	39,6 ±7,2	11,6 ±2,0*	8,4 ± 2,3*	17,6 ± 2,2*	21,4±2,2	21,2 ±1,4
	d, нм	193,0 ±17,7	61,0 ±8,7*	78,2±5,4*	106,9±7,0*	167,0±7,5	161,7 ±8,2

*Примечание: * Достоверность различий по сравнению с результатами измерений в контрольной пробе по критерию Манна - Уитни ($p < 0,05$); В – выступы, У – углубления h – высота, d – ширина.*

Поверхность исследованных клеток имеет разнообразную морфологию и представлена многочисленными глобулярными выступами и углублениями мембраны. На рис. 3.1 показан рельеф лимфоцитов больных лимфолейкозом, которые не были подвержены воздействию доксорубицина.

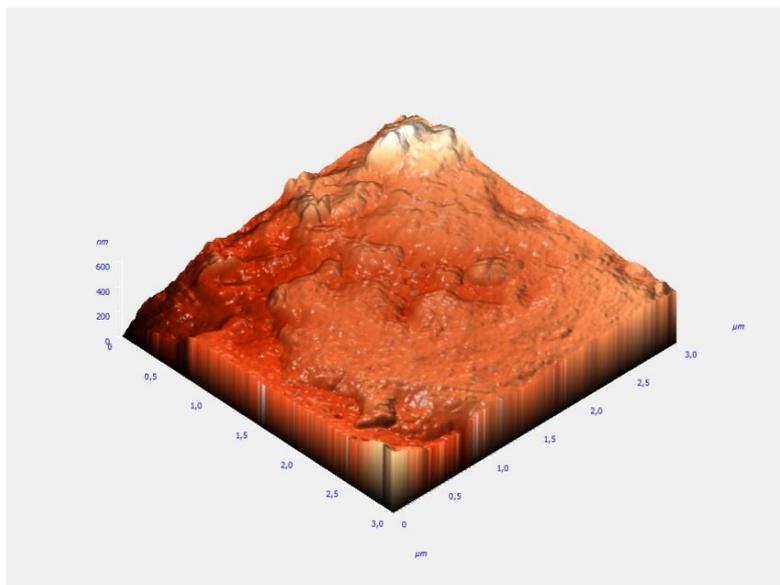


Рис. 3.1. Рельеф лимфоцитов больных ОЛЛ без добавления доксорубицина

Анализируя полученные результаты, установили, что часовое воздействие препарата на клетки вызывало незначительные изменения клеточной поверхности. Достоверные изменения глобулярных выступов были зарегистрированы в среде клеток с концентрацией препарата 0,5 мг/мл. Так, высота выступов в этой экспериментальной пробе снизилась на 61% ($p < 0,05$), а ширина – на 42% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рис. 3.2). В среде с концентрацией препарата 1 мг/мл в популяции клеток ширина выступов снизилась на 40% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

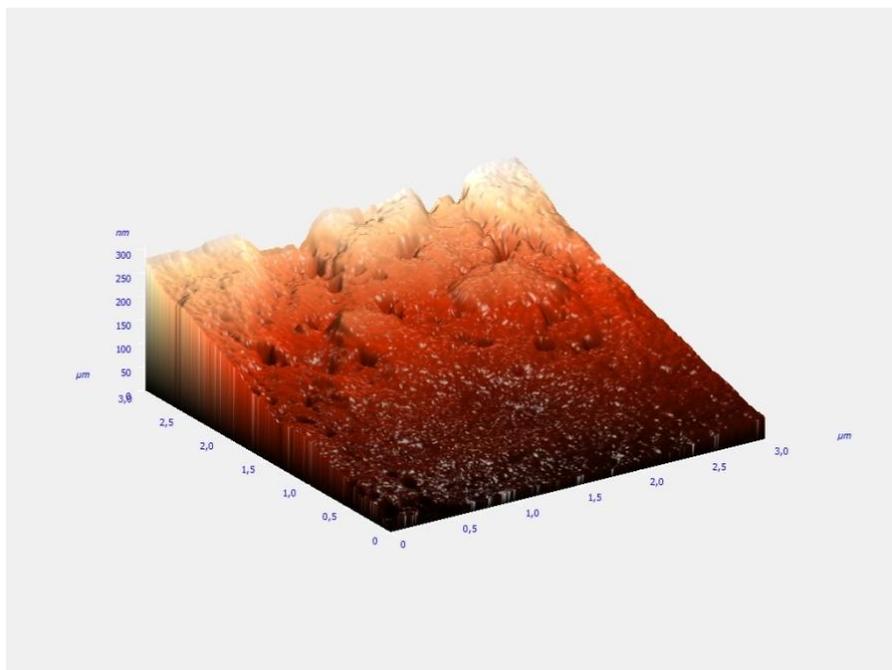


Рис. 3.2. Клеточная поверхность лимфоцита в среде с концентрацией доксорубицина 0,5 мг/мл

Достоверное увеличение высоты углублений выявлено у лимфоцитов под воздействием доксорубицина в концентрации 0,1 мг/мл, 0,01 мг/мл и 0,001 мг/мл. Так эти показатели увеличились соответственно на 200% ($p < 0,05$), 120% ($p < 0,5$) и 97% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

По истечению 24-х часовой инкубации лимфоцитов с доксорубицином наблюдали противоположную картину. Воздействие препарата в трех максимально использованных концентрациях вызывало снижение всех исследуемых показателей. Так, высота и ширина выступов при концентрации доксорубицина 1 мг/мл в культуре клеток снизились соответственно на 64% ($p < 0,05$) и 72% ($p < 0,05$), а при 0,5 мг/мл эти значения уменьшились соответственно на 67% ($p < 0,05$) и на 63% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Высота глобулярных структур на поверхности лимфоцитов при концентрации препарата 0,1 мг/мл в среднем была равна $18,7 \pm 2,3$ нм, а ширина – $106,3 \pm 11,1$ нм. Клеточная поверхность таких лимфоцитов представлена на рисунке 3.3. Рельеф плазмалеммы состоит из равномерных выступов и углублений малых и средних размеров.

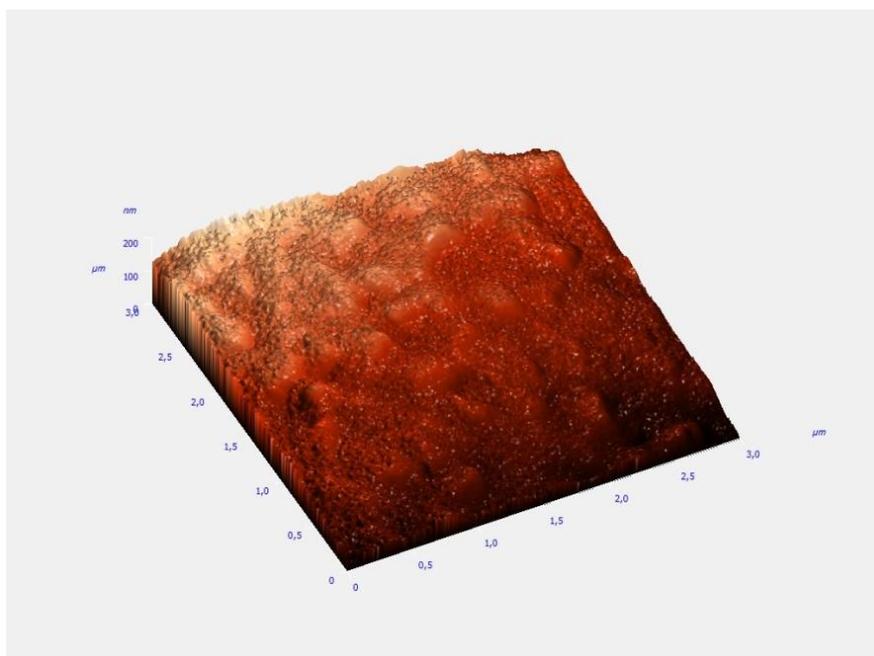


Рис. 3.3. Рельеф поверхности лимфоцита при остром лимфобластном лейкозе под влиянием доксорубицина в концентрации 0,1 мг/мл

Аналогичную картину наблюдали при измерении углублений клеточной поверхности. В пробах с концентрацией препарата 1 мг/мл, 0,5 мг/мл и 0,1 мг/мл высота инвагинаций снизилась соответственно на 71% ($p < 0,05$), 79% ($p < 0,05$) и 55,5% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Ширина впадин в той же последовательности концентраций доксорубицина уменьшилась на 68% ($p < 0,05$), 60% ($p < 0,05$) и 45% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (см. табл. 3.5). Клеточная поверхность данных лимфоцитов была однородной, с наличием выступов и инвагинаций плазмалеммы (рис. 3.4).

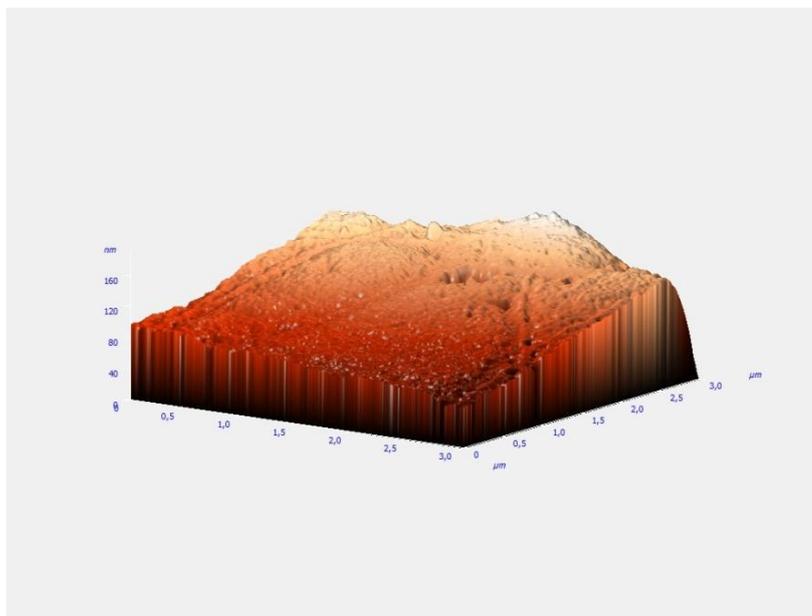


Рис. 3.4. Поверхность лимфоцита ОЛЛ после 24-часовой инкубации с доксорубицином в концентрации 1 мг/мл.

При концентрации в среде доксорубицина 0,01 и 0,001 мг/мл достоверных изменений исследуемых показателей в цитоархитектонике поверхности лимфоцитов не обнаружено.

Таким образом, выявлено достоверное снижение глобулярных выступов и углублений лимфоцитов больных ОЛЛ после 24-часовой инкубации при максимально используемых концентрациях доксорубицина.

Изменения клеточной поверхности лимфоцитов больных ОМЛ имели неоднозначный характер. Рельеф клеток в контроле был немного сглажен (рис.3.5) , а также присутствовали небольшие глобулярные выступы и углубления.

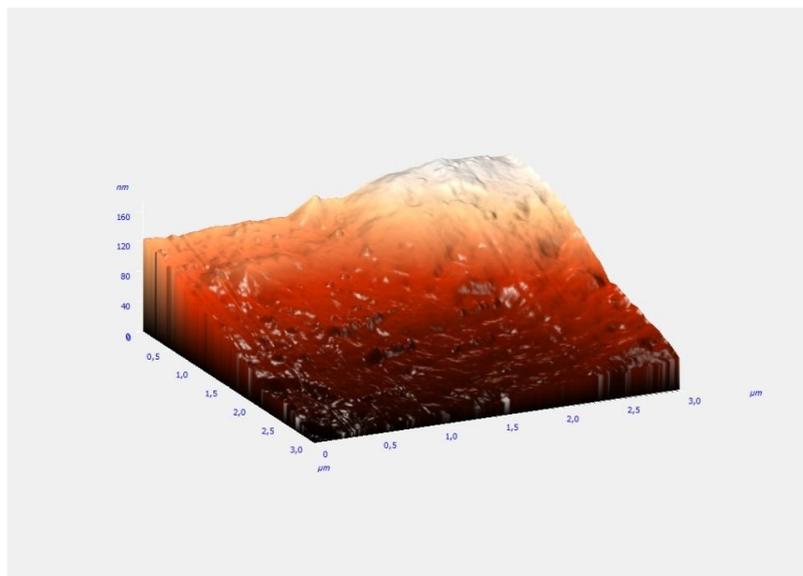


Рис. 3.5. 3D-фотография клеточной поверхности лимфоцита ОМЛ

При инкубации лимфоцитов с доксорубицином наблюдали тенденцию к увеличению исследуемых показателей цитоархитектоники (табл. 3.6).

Таблица 3.6

Выступы и углубления лимфоцитов крови больных ОМЛ

Время воздействия – 1 час							
Морфологические структуры		Контроль	Концентрация доксорубицина				
			1 мг/мл	0,5 мг/мл	0,1 мг/мл	0,01 мг/мл	0,001 мг/мл
В	h, нм	17 ± 1,3	54,9 ± 4,3*	50,5 ± 5,7*	24,9 ± 1,5*	18,0 ± 1,2	21,3 ± 2,4
	d, нм	116,8 ± 6,8	207,3 ± 23,7*	195,8 ± 22,0*	157,7 ± 10,9*	161,7 ± 6,9*	208,7 ± 11,9*
У	h, нм	17,7 ± 0,8	44,9 ± 3,4*	34,6 ± 3,0*	21,9 ± 2,0	19,3 ± 1,5	18,7 ± 0,6
	d, нм	165,6 ± 3,4	120,2 ± 15,5	136,7 ± 20,9	106,5 ± 6,5*	150,4 ± 17,9	176,9 ± 10,67
Время воздействия - 24 часа							
В	h, нм	22,3 ± 1,5	17,6 ± 4,6	28,6 ± 1,4*	29,2 ± 2,5*	31,4 ± 3,6*	12,3 ± 2,3*
	d, нм	150,7 ± 2,8	200,6 ± 20,4*	133,3 ± 3,9*	153,4 ± 24,5	172,6 ± 3,8*	178,6 ± 6,9*

У	h, нм	25,3±0,4	11,7 ±3,5*	45,2±7,3*	22,0 ±5,7	18,9 ± 3,3	18,9 ±3,5
	d, нм	179±1,5	188,7±60,4	267,4±30,8*	137,7±16,9*	151,4±18,3	190,5±5,2*

*Примечание: * Достоверность различий по сравнению с результатами измерений в контрольной пробе по критерию Манна – Уитни ($p < 0,05$); В – выступы, У – углубления h – высота, d – ширина.*

Так, после часовой инкубации лимфоцитов с доксорубицином в концентрациях 1 мг/мл; 0,5 мг/мл и 0,1 мг/мл установлено увеличение высоты и ширины выступов плазмолеммы. При концентрации 1 мг/мл ширина увеличилась на 223% ($p < 0,05$), а высота – на 77,5% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. На поверхности лимфоцитов наблюдали достаточно крупные выступы, а также многочисленные инвагинации (рис. 3.6).

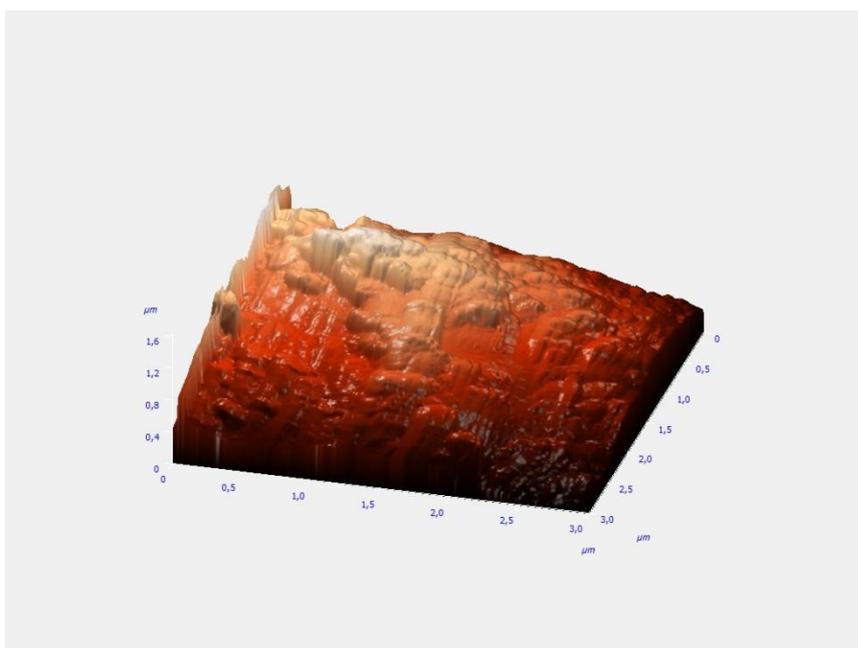


Рис. 3.6. Рельеф поверхности лимфоцита ОМЛ в среде инкубации с доксорубицином в концентрации 1 мг/мл

При концентрации препарата в среде инкубации 0,5 мг/мл ширина и высота выступов увеличились соответственно на 197% ($p < 0,05$) и 68% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. При концентрации доксорубицина 0,1

мг/мл средняя высота глобулярных выступов была равна $24,9 \pm 1,5$ нм, а ширина – $157,7 \pm 11$ нм.

После часовой инкубации с доксорубицином достоверные изменения ширины инвагинаций клеточной поверхности были обнаружены только в пробе с концентрацией препарата 0,1 мг/мл. Этот показатель был снижен на 36% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Снижение глубины инвагинаций было выявлено при концентрациях 1 мг/мл и 0,5 мг/мл соответственно на 54% ($p < 0,05$) пересчитать цифру, снижение цифры не может быть более 100%, увеличение может быть, а снижение, нет и 95% ($p < 0,05$) по сравнению с лимфоцитами контрольной группы.

После завершения 24-часовой инкубации высота глобулярных структур лимфоцитов больных ОМЛ увеличилась на 28% ($p < 0,05$) в пробах с концентрацией доксорубицина 0,5 мг/мл, при содержании препарата 0,1 мг/мл - на 31% ($p < 0,05$), а при 0,01 мг/мл – на 41% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой лимфоцитов больных миелолейкозом. Рельеф поверхности таких лимфоцитов неодинаков и представлен разнообразными выступами и углублениями (рис. 3.7).

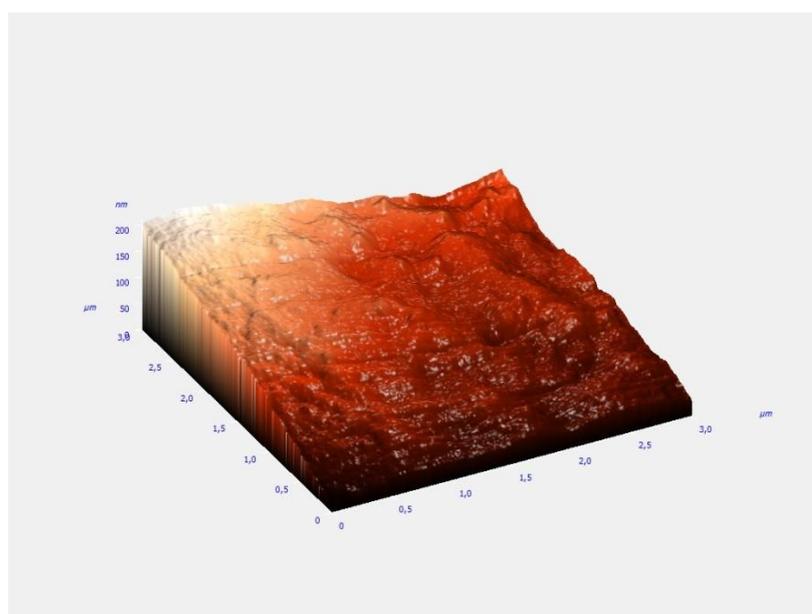


Рис. 3.7. Клеточная поверхность лимфоцита ОМЛ при 24-часовой инкубации с доксорубицином в концентрации 0,1 мг/мл

Установлено снижение высоты выступов и увеличение их ширины у лимфоцитов при минимально используемой концентрации доксорубицина (0,001 мг/мл) соответственно на 45% ($p<0,05$) и 18,5% ($p<0,05$) по сравнению с контролем.

Снижение высоты инвагинаций плазмалеммы на 54% ($p<0,05$) обнаружено у лимфоцитов, которые подвергались воздействию доксорубицина в концентрации 1 мг/мл. В пробах лимфоцитов периодически встречались клетки, у которых рельеф поверхности был представлен немногочисленными крупными глобулярными выступами со сниженным числом инвагинаций плазмалеммы (рис. 3.8).

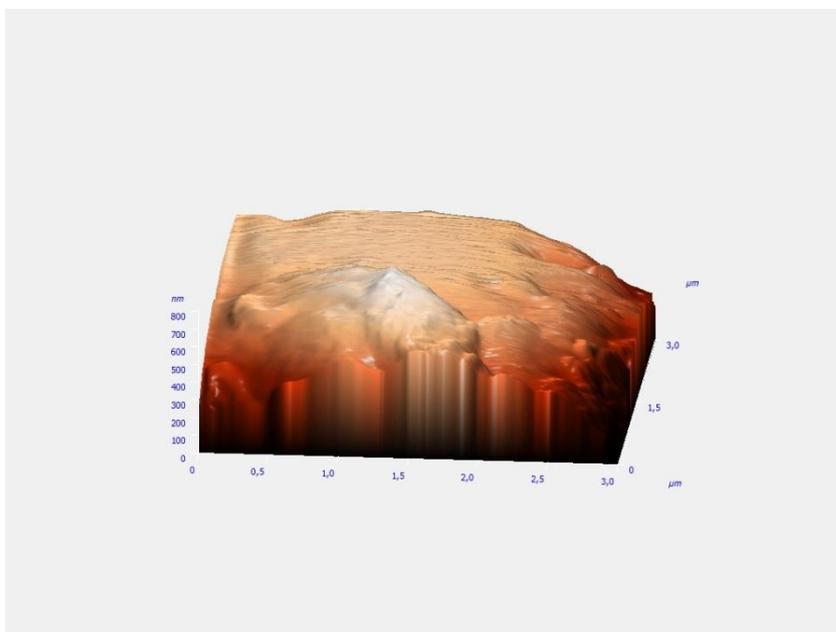


Рис. 3.8. Рельеф лимфоцитов больных ОМЛ при концентрации доксорубицина в среде 0,01 мг/мл

Максимальное изменение высоты и ширины углублений клеточной поверхности при суточной инкубации лимфоцитов с доксорубицином было обнаружено в пробах с концентрацией препарата 0,5 мг/мл. Высота инвагинаций плазмалеммы достоверно увеличилась на 78,5% ($p<0,05$), а ширина – на 49% ($p<0,05$) по сравнению с контролем. Для рельефа

поверхности исследуемых лимфоцитов больных ОМЛ было характерно наличие глобулярных образований неправильной формы и более крупных инвагинаций плазмалеммы (рис. 3.9).

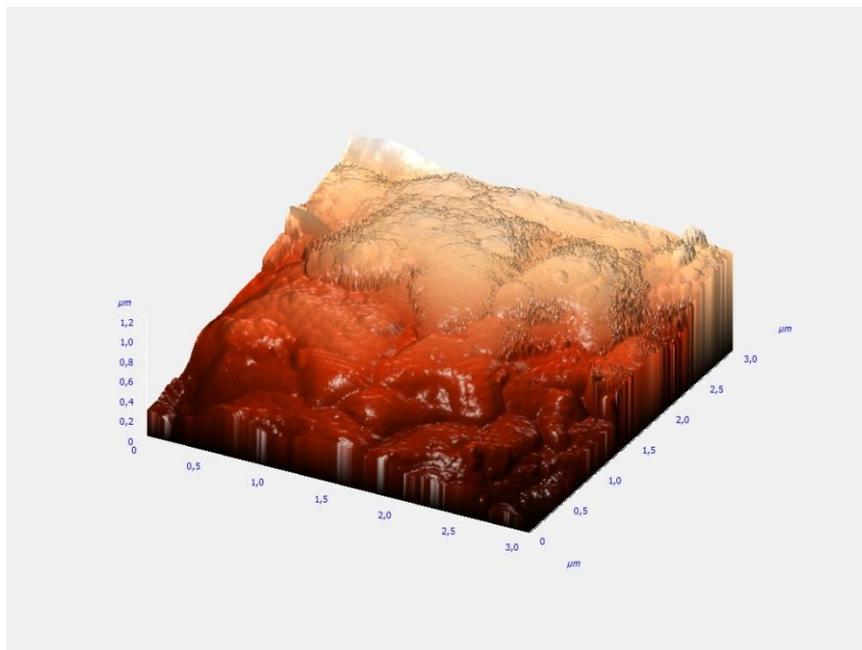


Рис. 3.9. Рельеф клеточной поверхности лимфоцита под влиянием доксорубицина в концентрации 0,5 мг/мл

Таким образом, установлено изменение рельефа клеточной поверхности лимфоцитов крови больных ОМЛ и ОЛЛ. В исследуемых пробах лимфоцитов при лимфолейкозе выявлено, что наибольшие изменения цитоархитектоники мембран клеток возникают при более длительном воздействии доксорубицина. При ОМЛ достоверные изменения ширины и высоты выступов и углублений наблюдаются уже после часа воздействия препарата, но при более высоких его концентрациях в среде инкубации.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В выполненном исследовании изучены доксорубицин-устойчивые лимфоциты при развитии лимфобластного типа пролиферации в системе крови. При низких концентрациях препарата 0,001- 0,5 мг/мл достаточно большой процент (50-95%) жизнеспособных клеток сохраняет высокие значения жесткости и отрицательный заряд мембраны. Установленный факт указывает на то что, первоначально препарат поступает в клетку путем диффузии, модель такого транспорта описана в более ранних исследованиях (Dalmark, Hoffman, 1983; Skovsgaard, Nissen, 1986).

Под влиянием высоких концентраций препарата выявлена популяция клеток при ОЛЛ, которая сохраняет резистентность к терапии, обладая положительным зарядом клеточной поверхности и очень мягкой мембраной. Механизм данного выживания, вероятно, кроется в изменении механических свойств мембран и работы мембранных транспортеров под влиянием высоких доз доксорубицина. Согласно исследованиям (Hurwitz et al., 1997) препарат аккумулируется в лизосомах, которые участвуют в формировании лекарственной резистентности клеток. В то же время формирование лизосом связано с разницей сил поверхностного натяжения между бислоями и образованием изгибов мембраны (Rauch, Farge, 2000). Можно полагать, что имея высокую степень сродства к липидам мембран, доксорубицин изменяет ее текучие свойства, влияя, тем самым, на работу мембранных транспортеров. Согласно данным литературы множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток больных острыми формами лейкоза связана с экспрессией и мутацией в мембране клеток аденозинтрифосфат кассетных транспортеров (ATP binding casset), функциональная активность которых изменяется после использования антрациклинов в терапевтических схемах (Sehal et al., 2015). Ряд работ доказывают, что химиотерапевтическая устойчивость клеток-мишеней коррелируют с наличием в мембране

транспортного насоса (Pgp) Р-гликопротеина, который активно выкачивает лекарство из клетки (Aller et al., 2009).

Под влиянием доксорубина в рельефе поверхности наблюдали снижение высоты и ширины глобулярных выступов и углублений в группе больных ОЛЛ, однако эти изменения наблюдались после 24 часов воздействия препарата. Рельеф плазмалеммы имел разнообразную морфологию с преобладанием крупных выступов и инвагинаций. Эти данные свидетельствуют об изменении структур цитоскелета после взаимодействия препарата с клетками (Glinska et al., 2015).

По результатам исследования при остром лейкозе миелобластного типа пролиферации нормальные лимфоциты крови обладают наиболее сильной устойчивостью к доксорубину, чем опухолевые клетки-мишени при лимфобластном лейкозе. Так, около 40% клеток сохраняют свою жизнеспособность через 24 ч инкубации в среде с самой высокой концентрацией препарата (1 мг/мл). Это доказывает, что препарат в меньшей степени влияет на нормальные лимфоциты, и они могут выполнять свои защитные функции в условиях дисфункции миелоидного ростка. Однако выжившие группы устойчивых лимфоцитов все же подвергаются воздействиям препарата. Так, установлены аналогичные изменения потенциала поверхности и жесткости мембран как исследуемых клеток при ОЛЛ, так и при ОМЛ. Заряд клеточной поверхности в среде с максимальной концентрацией доксорубина после 24 часов стал положительным, а жесткость клеток в обеих экспериментальных группах (ОЛЛ и ОМЛ) была снижена. Это указывает на схожие механизмы действия доксорубина как на здоровые, так и на опухолевые клетки.

Известно, что токсичность доксорубина на здоровые клетки обусловлена его способностью индуцировать синтез свободных радикалов и повреждающий окислительный стресс (Ефремова, 2016). Можно предположить, что изменения в структуре мембран клеток также вызваны одним из перечисленных механизмов.

Полученные данные имеют важное клинико-диагностическое значение при выполнении терапевтических процедур и прогнозе течения заболевания. Электрические и механические свойства поверхности лимфоцитов могут быть использованы в качестве объективных маркеров функционального состояния иммунной системы.

ВЫВОДЫ

1. Под влиянием доксорубина жизнеспособность лимфоцитов крови как при ОЛЛ, так и при ОМЛ снижается в зависимости от концентрации препарата: с увеличением дозы препарата, выживаемость клеток снижается. Наибольшей резистентностью к препарату обладают нормальные лимфоциты в группе пациентов с острым миелобластным типом пролиферации.

2. Под влиянием доксорубина в дозе 1 мг/мл через 1 ч инкубации жесткость клеточной поверхности лимфоцитов снижена как при лимфо-, так и при миелобластном типе пролиферации, однако при более низких концентрациях препарата в среде (0,5 мг/мл, 0,1 мг/мл и 0,01 мг/мл) – возросла.

3. Под влиянием доксорубина в концентрациях 0,1 мг/мл и 0,01 мг/мл через 24 ч установлено увеличение жесткости клеточной поверхности лимфоцитов в группе пациентов с острым миелобластным типом пролиферации, в остальных пробах – жесткость была снижена.

4. Заряд клеточной поверхности доксорубин-резистентных клеток существенно увеличился как при развитии лимфо-, так и миелобластного типа пролиферации в системе крови.

5. Рельеф поверхности лимфоцитов в пробах больных острым лимфобластным типом пролиферации был сглажен под влиянием доксорубина в концентрациях 1 мг/мл, 0,5 мг/мл и 0,1 мг/мл.

6. Рельеф поверхности лимфоцитов в группе пациентов с острым миелобластным типом пролиферации был неоднородным, с разнообразными по морфологии выступами и углублениями на клеточной поверхности.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСМ – атомно-силовой микроскоп

АФК – активные формы кислорода

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ОМЛ – острый миелобластный лейкоз

ПП – поверхностный потенциал

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулкадыров, К. М. Гематология : Новейший справочник [Текст] / К. М. Абдулкадыров. – Москва : Эксмо, 2004. – 928 с.
2. Белоусов, К. А. Результаты лечения острого миелобластного лейкоза в реальной клинической практике [Текст] / К. А. Белоусов, А. К. Голенков, Е. В. Катаева // Альманах клинической медицины. – 2015. – № 41. – С. 66-71.
3. Блау, О. В. Мутации генов при острых миелоидных лейкозах [Текст] / О. В. Блау // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2016. – Т. 9, № 3. – С. 245-256.
4. Блохин, Д. Ю. Механизмы формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток [Текст] / Д. Ю. Блохин // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2009. – Т. 2, № 2. – С. 167- 175.
5. Блохин, Д. Ю. Причины ограниченной эффективности противоопухолевой терапии с позиции клеточной биологии [Текст] / Д. Ю. Блохин // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 18-23.
6. Быков, А. В. Конструктивно-технологические особенности кантилеверов для атомно-силовой микроскопии [Текст] / А. В. Быков // Известия Южного федерального университета. Технические науки. – 2014. – № 9. – С. 141-151.
7. Ващенко, В. И. Ингибиторы топоизомераз как лекарственные средства, механизм их действия [Текст] / В. И. Ващенко // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 2-13.
8. Влияние вспомогательных веществ на токсические свойства лекарственной формы препарата доксорубицин наносомальный [Текст] / Э. Р. Переверзева, Н. В. Еремкин, М. И. Трещалин [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15, № 1. – С. 84-85.

9. Влияние C₆₀-фуллерена, доксорубицина и их комплекса на опухолевые и нормальные клетки мышей линии BALB/C [Текст] / С. В. Прилуцкая, Г. В. Диденко, Ю. М. Кичмаренко [и др.] // *Biotechnologia acta.* – 2014. – Т. 7, № 1. – С. 60-65.

10. Влияние глицина на активность антиоксидантной системы в условиях оксидативного стресса, вызванного антрациклиновыми антибиотиками [Текст] / Г. Т. Брынских, А. Г. Маслакова, А. Г. Игнатенко [и др.] // *Научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в 21 веке».* – 2008. – Т. 10, № 2. – С. 90-91.

11. Волкова, М. А. Клиническая онкогематология: руководство для врачей [Текст] / М. А. Волкова. – Москва : Медицина, 2001. – 576 с.

12. Волкова, С. А. Основы клинической гематологии: учебное пособие [Текст] / С. А. Волкова. – Нижний Новгород : НГМА, 2013. – 400с.

13. Волкова, Т. О. Множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам. Экологические аспекты [Текст] / Т. О. Волкова, У. С. Багина // *Принципы экологии.* – 2011. – № 2. – С. 4-21.

14. Гематологические показатели системы крови больных лейкозом [Текст] / Г. Н. Клочкова, С. С. Беляева, Т. С. Тикунова // *Научный результат. Серия «Физиология».* – 2016. – Т. 2, № 2. – С. 34-40.

15. Генетическая гетерогенность острых лейкозов у детей первого года жизни [Текст] / Г. А. Цаур, Е. В. Флейшман, А. М. Попов [и др.] // *Онкогематология.* – 2016. – Т. 11, № 1. – С. 14-23.

16. Глузман, Д. Ф. Современная диагностика сотрых миелоидных лейкозов / Д. Ф. Глузман, М. М. Скмеренко, В. А. Нагорная // *Онкогематология.* – 2010. - № 1. – С. 37-38.

17. Горбенко, А. С. Исследование механизмов накопления даунорубицина и родамина-123 в клетках венозной крови человека цитометрическим методом [Текст] / А. С. Горбенко, И. А. Ольховский // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 2015. – Т. 60, № 2. – С. 36-42.

18. Действие доксорубина, доставленного в опухолевые клетки *in vitro* и *in vivo* новым наноразмерным функционализированным олигоэлектролитным носителем [Текст] / Н. Н. Бойко, Ю. В. Сенькив, Е. А. Шляхтина [и др.] // Биотехнология Акта. – 2013. – Т. 6, № 3. – С. 53-62.

19. Ефремова, А. С. Роль системы поли (АДФ-рибозил)ирования белков в механизмах кардиотоксического действия доксорубина [Текст]: дисс. ... канд. биол. наук: 03.01.04 / А. С. Ефремова. – Москва, 2016. – 164 с.

20. Живодерников, И. В. Влияние доксорубина на механизмы клеточной смерти синхронизированных культур раковых клеток [Текст] / И. В. Живодерников, В. П. Свеколкин, Ю. В. Саенко // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2013. – № 2. – С. 45-48.

21. Изучение новых систем доставки противоопухолевых препаратов на основе наночастиц нитрида бора [Текст] / И. Ю. Житняк, И. В. Сухорукова, А. М. Ковальский [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2016. – Т. 3, № 2. – С. 34-41.

22. Изучение характера и причин выраженности кардиотоксических свойств антрациклиновых антибиотиков [Текст] / Н. И. Микуляк, С. Д. Миннигалева, Р. Р. Магдеев [и др.] // Здоровье и образование в 21 веке. – 2013. – Т. 15, № 1-4. – С. 382-384.

23. Казарян П. А. Мембранные аспекты патогенеза и терапии лимфопролиферативных заболеваний [Текст] / П. А. Казарян, А. А. Галоян // Онкогематология. – 2011. – Т. 111, № 1. – С. 59-68.

24. Кардиоренальный синдром у больных лимфопролиферативными заболеваниями на фоне лечения антрациклиновыми антибиотиками [Текст] / А. М. Сванидзе, Н. Г. Потешкина, Н. С. Крылова [и др.] // Лечебное дело. – 2015. – № 1. – С. 49-54.

25. Кардиотоксичность современных химиотерапевтических препаратов [Текст] / К. В. Шуйкова, Е. И. Емелина, Г. Е. Генделин [и др.] // Атмосфера. Новости кардиологии. – 2012. – Т. 1, № 3. – С. 9-19.

26. Ковалева, Л. Г. Острые лейкозы [Текст] : / Л. Г. Ковалева. –

Москва. : Медицина, 1990. – 208 с.

27. Колбацкая, О. П. Субпопуляции лимфоцитов костного мозга у больных острыми лейкозами в период диагностики заболевания [Текст] / О. П. Колбацкая, Н. Н. Тупицин // Иммунология. – 2012. – Т. 33, № 2. – С. 77-82.

28. Колесникова, Л. И. Гены ферментов антиоксидантной системы [Текст] / Л. И. Колесникова, Т. А. Баирова, О. А. Первушина // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – Т. 68, № 12. – С. 83-88.

29. Компьютерное моделирование манипулирования нанообъектами при помощи атомно-силового микроскопа [Текст] / Е. В. Долгова, В. П. Константинов, Д. С. Курушин [и др.] // Вестник Уфимского государственного авиационного технического университета. – 2012. – Т. 15, № 2. – С. 45-51.

30. Кондакова, И. В. Влияние доноров оксида азота на противоопухолевый эффект доксорубина [Текст] / И. В. Кондакова, Г. В. Какурина, Е. Л. Чойнзонов // Сибирский научный музыкальный журнал. – 2005. – Т. 116, № 2. – С.92-95.

31. Конспект клинической цитометрии: острый мегакариобластный лейкоз [Текст] / О. И. Илларионова, М. В. Горчакова, Е. Б. Русанова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – № 7. – С. 42-49.

32. Копнин, Б. П. Современные представления о механизмах злокачественного роста: сходства и различия солидных опухолей и лейкозов [Текст] / Б. П. Копнин // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2012. – Т. 5, № 3. – С. 165-185.

33. Кормаш, Н. Г. Физиологическая роль активных форм кислорода на клеточном уровне и организма в целом – взгляд клинициста [Текст] / Н. Г. Кормаш // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 11, № 1. – С. 85-90.

34. Краснова, Л. С. Морфометрические особенности бластных клеток в стандартных центрифугах костного мозга при острых миелоидных лейкозах

[Текст] : автореф. дисс. ... канд.мед.наук : 14.00.29 / Л. С. Краснова. – Москва, 2009. – 26 с.

35. Крючков, Е. А. Индуцированный доксорубицином рост внутриклеточной концентрации восстановленного глутатиона в клетках *S. Cerevisiae* связан с активацией ДНК-репарирующих механизмов [Текст] / Е. А. Крючков, Е. В. Расторгуева, Ю. В. Саенко // Вестник новых медицинских технологий. 2011. – № 1. – С. 1-9.

36. Куликов, В. А. Сигнальные каскады, онкогены, гены-онкосупрессоры и метаболизм раковой клетки [Текст] / В. А. Куликов, Л. Е. Беляева // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2014. – Т. 13, № 5. – С. 6-15.

37. Кучменко, Е. Б. Биохимические особенности функционирования убихинона при экспериментальных патологических состояниях сердечно-сосудистой системы [Текст] / Е. Б. Кучменко // Вестник Новосибирского государственного педагогического университета. – 2013. – Т. 15, № 5. – С. 79-94.

38. Луговская, С. А. Гематологический атлас [Текст] // С. А. Луговская, М. Е. Почтарь. – 4-е издание, дополненное. – Москва-Тверь : Триада, 2016. – 434 с.

39. Маркеры апоптоза в CD34 – позитивных клетках при острых лейкозах [Текст] / Е. Н. Паровичникова, Е. Е. Ходунова, И. В. Гальцева [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2013. Т. 6, № 4. – С. 373-378.

40. Михайлов, В. В. Основы патологической физиологии [Текст] : практическое руководство / В. В. Михайлов. – Москва : Медицина, 2001. – 698 с.

41. Мовчан, Л. В. Лейкоз-ассоциированный иммунофенотип опухолевых клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом из предшественников В-лимфоцитов [Текст] / Л. В. Мовчан // Онкогематология. – 2012. – № 1. – С. 22-28.

42. Моделирование окислительного стресса в лимфоцитах крови *in vitro* для изучения апоптоза опухолевых клеток линии jurkat [Текст] / Н. В. Рязанцева, Е. А. Степовая, Е. В. Коновалова // Казанский медицинский журнал. – 2013. – Т. 94, № 5. – С. 736-740.

43. Модификация доксорубина водорастворимыми производными фуллерена C_{60} с целью снижения его токсичности и увеличения противоопухолевой активности [Текст] / Д. В. Мищенко, Н. П. Коновалова, Е. Н. Климанова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 57.

44. Молекулярные и клеточные механизмы действия синглетного кислорода на биосистемы [Текст] / А. А. Мартусевич, С. П. Перетягин, А. К. Мартусевич // Современные технологии в медицине. – 2012. – № 2. – С. 128-134.

45. Молекулярно-генетические маркеры в диагностике острого лимфобластного лейкоза у детей [Текст] / Д. С. Джумагазиева, О. В. Шевченко, В. Б. Бородулин [и др.] // Биомедицина. – 2010. – Т. 1, № 3. – С. 68-70.

46. Молекулярные механизмы преодоления множественной лекарственной устойчивости липосомальными противоопухолевыми препаратами [Текст] / М. А. Барышникова, А. Ю. Барышников Д. А. Афанасьева [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 3-10.

47. Москвичёв, Е. П. Влияние иммуотропных препаратов на активность мембранных ферментов лимфоцитов в условиях курсового введения доксорубина [Текст] / Е. П. Москвичёв, Я. В. Рожковский // Мир медицины и биологии. – 2014. – Т. 10, № 3. – С. 129-133.

48. Нагорнов, Ю. С. Метод определения внутриклеточного давления эритроцитов по данным атомно-силовой микроскопии. Часть 1. Теория и численный расчет [Текст] / Ю. С. Нагорнов // Наука. – 2016. – № 4. – С. 46-58.

49. Надеев, А. Д. Активные формы кислорода в клетках сердечно-сосудистой системы [Текст] / А. Д. Надеев, Н. В. Гончаров // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2014. – № 4. – С. 80-94.

50. Нарушения свертывания и маркеры развития дифференцировочного синдрома при лечении больных острым промиелоцитарным лейкозом [Текст] / Л. Н. Тарасова, С. Г. Владимирова, В. В. Черепанова // Геморрагические диатезы, тромбозы, тромбофилии. – 2014. – № 1. – С. 1-8.

51. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых [Текст] / В. Г. Савченко, Е. Н. Паровичникова, Б. В. Афанасьев [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59, № 52. – С. 2-28.

52. Некоторые аспекты трансплантации костного мозга у пациентов с крайне неблагоприятным прогнозом острого лимфобластного лейкоза: обзор литературы и собственное наблюдение [Текст] / Н. Н. Субботина, А. В. Попа, И. С. Долгополов [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2015. – Т. 8, № 3. – С. 331-336.

53. Никиян, А. Н. Успехи и перспективы развития атомно-силовой микроскопии в микробиологии [Текст] / А. Н. Никиян, Е. Б. Татлыбаева // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. Т. 167, № 6. – С. 112-119.

54. Основы опухолевой прогрессии шемобластозов [Текст] / Т. И. Поспелова, М. И. Лосева, И. Б. Ковынев [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2004. – № 2. – С. 71-73.

55. Острые миелоидные лейкозы: 10 лет терапии [Текст] / О. Ю. Баранова, А. С. Антипова, О. Д. Захаров [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2015. – Т. 8, № 3. – С. 287-301.

56. Острые сердечно-сосудистые события во время применения противоопухолевых химиопрепаратов: клинические наблюдения [Текст] /

Г. Е. Гендлин, Г. И. Сторожаков, К. В. Шуйкова [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2011. – Т. 4, № 2. – С. 155-164.

57. Оценка терапевтической эффективности совместного применения некоторых антрациклиновых антибиотиков и антиоксидантов [Текст] / С. Д. Миннигалева, Н. И. Микуляк, Р. Р. Магдеев [и др.] // Известия высших учебных заведений. Медицинские науки. 2014. – Т. 30, № 2. – С. 23-33.

58. Оценка экспрессии антигена CD9 при острых миелобластных лейкозах [Текст] / Т. С. Белохвостикова, О. В. Хороших, Н. В. Киселева [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – Т. 114, № 7. – С. 119- 120.

59. Паровичникова, Е. Н. Острые лейкозы [Текст] / Е. Н. Паровичникова // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2011. – Т. 4, № 1. – С. 80-83.

60. Повышение лекарственной устойчивости клеток острого миелобластного лейкоза в многоклеточных агрегатах *in vitro* [Текст] / С. Г. Захаров, А. К. Голенков, Т. А. Митина [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2014. – № 31. – С. 11-16.

61. Пожилова, Е. В. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки [Текст] / Е. В. Пожилова, В. Е. Новиков, О. С. Левченкова // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 13-22.

62. Радченко, В. Г. Основы клинической гематологии: Справочное пособие [Текст] / В. Г. Радченко. – СПб. : Диалект, 2003. – 304 с.

63. Разработка и исследование иммунолипосомальных конструкций *in vitro* [Текст] / М. Т. Зангиева, А. А. Матюшин, Д. В. Соколова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. Т. 13, № 2. – С. 19-23.

64. Рукавицын, О. А. Современные возможности применения пегилированного липосомального доксорубина (келикс) в гематологии [Текст] / О. А. Рукавицын, В. П. Поп // Онкогематология. – 2008. – Т. 1, № 2.

– С. 75-84.

65. Самуилов, В. Д. Программированная клеточная гибель [Текст] / В. Д. Самуилов, А. В. Алескин, Е. М. Лагунова // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 8. – С. 1-12.

66. Сладкова, Е. А. Функциональные параметры и структура поверхности лимфоцитов больных лимфобластным лейкозом на стадии обострения и ремиссии болезни [Текст] / Е. А. Сладкова // Научный результат. Серия «Физиология». – 2015. – Т. 1, № 1. – С. 19-25.

67. Случай острого мегакариобластного лейкоза [Текст] / Е. Н. Никитин, Н. А. Кирьянов, Д. Н. Миклин [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2012. – Т. 57, № 4. – С. 41-43.

68. Смирнова, О. В. Особенности взаимосвязей показателей иммунного статуса с количеством бластных клеток при острых лейкозах [Текст] / О. В. Смирнова, А. А. Савченко, В. Т. Манчук // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13, № 1. – С. 49-54.

69. Смирнова, О. В. Особенности клеток иммунной системы при остром лимфобластном лейкозе [Текст] / О. В. Смирнова, В. Т. Манчук // Медицинская иммунология. – 2013. – Т. 15, № 6. – С. 577-584.

70. Сравнительное исследование противоопухолевого эффекта немодифицированных фуллеренов C_{60} и доксорубина [Текст] / С. В. Прилуцкая, А. П. Бурлака, Ю. И. Прилуцкий [и др.] // Биотехнология. – 2011. – Т. 4, № 6. – С. 82-87.

71. Ставровская, А. А. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток [Текст] / А. А. Ставровская // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 1. – С. 26-112.

72. Ставровская, А. А. Механизмы лекарственной устойчивости опухолевых клеток [Текст] / А. А. Ставровская. – Москва : Медицина, 2004. – 558 с.

73. Толпыгина, О. А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты (обзор) [Текст] / О. А. Толпыгина // Бюллетень Восточно-Сибирского

научного центра Сибирского отделения Российской Академии медицинских наук. – 2012. – Т. 84, №. 2-2. – С. 178-180.

74. Физиологические и клинические аспекты р- гликопротеина [Текст] / С. В. Чубарова, А. Ю. Крапошина, Е. А. Собко [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2012. – № 45. – С. 94-97.

75. Фиясь, А. Т. Т-лимфобластный лейкоз-лимфома / А. Т. Фиясь Е. В. Зуховицкая, О. П. Чайковская // Журнал Гродненского медицинского университета. – 2013. – Т. 42, № 2. – С. 109-111.

76. Характеристика цитогенетических изменений в клетках костного мозга, мезенхимальных стромальных клетках и лимфоцитах периферической крови у больных миелодиспластическим синдромом и острым миелобластным лейкозом [Текст] / М. А. Пименова, А. В. Кохно, Е. В. Домрачева [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2012. – Т. 57, № 3. – С. 70-71.

77. Ходулева, С. А. Современные аспекты лабораторной диагностики острых лейкозов [Текст] / С. А. Ходулева, Д. В. Кравченко // Проблемы здоровья и экологии. – 2010. – Т. 26, № 4. – С. 96-101.

78. Хромосомные перестройки при острых лимфобластных лейкозах [Текст] / Е. В. Зотова, А. С. Лукьянова, М. А. Вальчук [и др.] // Вестник гематологии. – 2013. – Т. 9, № 2. – С. 18-19.

79. Хуснутдинов, Р. Р. Получение клона клеток гастроинтестинальной стромальной опухоли с признаками множественной лекарственной устойчивости и оценка его свойств [Текст] / Р. Р. Хуснутдинов, А. Р. Галембикова, С. В. Бойчук // Современные технологии в медицине. – 2016. – Т. 8, № 4. – С. 36-41.

80. Цитотоксические эффекты комбинированного действия ионизирующего излучения и конъюгатов доксорубина с дендритным полимером и векторным белком на опухолевые клетки *in vitro* [Текст] / И. А. Замулаева, К. А. Чурюкина, О. Н. Матчук [и др.] // Радиация и риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра. – 2016. – Т. 25, № 3. – С. 46-56.

81. Чехун, В. Ф. Современные взгляды на механизмы формирования лекарственной устойчивости опухолей [Текст] / В. Ф. Чехун, Ю. В. Шишова // Онкология. – 2000. – Т. 2, № 1-2. – С. 11-15.
82. Шиффман, Ф. Д. Патология крови [Текст] / Ф. Д. Шиффман. – М. : Бином, 2001. – 448 с.
83. Штиль, А. А. Развитие множественной лекарственной устойчивости как срочный ответ клетки на экзогенные воздействия [Текст] / А. А. Штиль // Биологические мембраны. – 2003. – Т. 20, № 3. – С. 43-236.
84. Экспрессия генов MDR1 и MRP у больных лимфомой с первичным поражением костного мозга [Текст] / А. Н. Зенков, Н. В. Скворцова, Е. Л. Черноловская [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2004. – № 4. – С. 110-113.
85. A novel hydrolysis-resistant lipophilic folate derivative enables stable delivery of targeted liposomes in vivo [Текст] / Y. Huang, T. Yang, W. Zhan // International Journal of Nanomedicine. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 4581-4594.
86. A therapeutic dose of doxorubicin activates ubiquitin-proteasome system-mediated proteolysis by acting on both the ubiquitination apparatus and proteasome [Текст] / J. Liu, H. Zheng, M. Tang [и др.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2008. – Vol. 295, № 6. – P. 2541-2550.
87. Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid [Текст] / P. Spiterler, W. Kem, J. Reiner [и др.] // Biochimica et Biophysica Acta. – 2001. – Vol. 1531, № 3. – P. 188-208.
88. Alpha2 beta1 integrin promotes chemoresistance against doxorubicin in cancer cells through extracellular signal-regulated kinase (ERK) [Текст] / D. Naci, M. A. Azreq, N. Chetoui // Journal of Biological Chemistry. – 2012. – Vol. 287, № 21. – P. 17065-17076.
89. Aredia, F. Poly (ADP-ribose): a signaling molecule in different paradigms of cell death [Текст] / A. Aredia, A. I. Scovassi // Biochemical Pharmacology. – 2014. – Vol. 92, № 1. – P 157-163.
90. Callaghan, R. Inhibition of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein :

Time for a Change of Strategy [Текст] / R. Callaghan, F. Luk, M. Bebawy // *Drug Metab Dispos.* – 2014. – Vol. 4, № 42. – P. 623-631.

91. Cancer statistics, 2014 [Текст] / R. Siegel, J. Ma, Z. Zou [и др.] // *Cancer Journal for Clinicians.* – 2014. – Vol. 1, № 64. – P. 9-29.

92. Cheng, Z. Y. What is responsible for the initiating chemistry of iron-mediated lipid peroxidation: an update [Текст] / Z. Y. Cheng, Y. Z. Li // *Chemical Reviews.* – 2007. – Vol. 107, № 3. – P. 748-766.

93. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems [Текст] / J. M. Lü, P. H. Lin, Q. Yao [и др.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* – 2010. – Vol. 14, № 4. – P. 840-860.

94. Constitutive phosphorylation of Akt PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable [Текст] / Y. H. Min, J. I. Eom, J. W. Cheong [и др.] // *Leukemia.* – 2003. – Vol. 17. – P. 995-997.

95. Differences between the CD34+ and CD34 blast compartments in apoptosis resistance in acute myeloid leukemia [Текст] / A. Stijn, A. Marjolein, V. D. Pol [и др.] // *Haematologica.* – 2003. – Vol. 88, № 5. – P. 497-508.

96. Differentiation-dependent doxorubicin toxicity on H9c2 cardiomyoblasts [Текст] / A. F. Branco, S. F. Sampaio, A. C. Moreira [и др.] // *Cardiovascular Toxicology.* – 2012. – Vol. 12, № 4. – P. 326-340.

97. 3,5-Dimethyl-H-furo[3,2-g]chromen-7-one as a potential anticancer drug by inducing p53-dependent apoptosis in human hepatoma HepG2 cells [Текст] / J. G. Sun, C. Y. Chen, K. W. Luo [и др.] // *Chemotherapy.* – 2011. – Vol. 57, № 2. – P. 162-172.

98. Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1 [Текст] / B. Denard, C. Lee, J. Ye // *eLife.* – 2012. № 1. – P. 22-35.

99. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies [Текст] / Y. Octavia, C. G Tocchetti., K. L Gabrielson [и др.] // *Journal Molecular and Cellular. Cardiology.* – 2012. – Vol. 52, № 6. – P. 1213-1225.

100. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamiss [Текст] / F. Yang, S. S. Teves, C. J. Kemp [и др.] // *Biochim Biophys Acta*. – 2014. – Vol. 84, № 9. – P.66-89.

101. Drug-resistance Profile in Multiple-relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia [Текст] / M. Pogorzala, M. Kubica, B. Rafinska // *Anticancer Res*. – 2015. – Vol. 10, № 10. – P. 344-377.

102. Effects of Somatic Mutation Are Associated with SNP the Progression of Individual Acute Myeloid Leukemia Patient [Текст] / S. Park, Y. Koh, S. S. Yoon // *Genom Inform*. – 2014. – Vol. 34, № 1. – P. 7-34.

103. Escin augments the efficacy of gemcitabine through down-regulation of nuclear factor-kappaB and nuclear factor-kappaB-regulated gene products in pancreatic cancer both in vitro and in vivo [Текст] / Y. W. Wang, S. J. Wang, Y. N. Zhou [и др.] // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2012. – Vol. 138, № 5. – P. 785-797.

104. Fullerene – conjugated doxorubicin in cells [Текст] / J. H. Liu, L. Cao, P. G. Luo [и др.] // *ACS Appl. Mater Interfaces*. – 2010. – Vol. 2, № 5. – P. 1384-1389.

105. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis [Текст] / M. O Hengartner. // *Nature*. – 2000. – Vol. 407. – P. 770-776.

106. Importance of the difference insurface pressure of the cell membrane in Doxorubicin resistant cells that do not express Pgp and ABCG2 [Текст] / C. Bell, C. Hill, C. Burton [и др.] // *Cell Biochemistry Biophysics*. – 2013. – Vol. 66. – P. 499-512.

107. Increased expression of P-glycoprotein is associated with doxorubicin chemoresistance in the metastatic 4T1 breast cancer model [Текст] / L. Bao, A. Haque, K. Jackson // *Am. J. Pathol*. – 2011. – Vol. 178, № 2. – P. 838-852.

108. In vivo and in vitro sensitization of leukemic cells to adriamycin-induced apoptosis by pentoxifylline. Involvement of caspase cascades and I kappa-β-alpha phosphorylation [Текст] / J. M. Lerma-Diaz, G. Hernandez-Flores,

J. R. Dominguez-Rodriguez [и др.] // *Immunol Lett.* – 2006. – Vol. 103, № 2. – P. 149-158.

109. Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme [Текст] / R. Udomsinprasert, S. Pongjaroenkit, J. Wongsantichon [и др.] // *Biochemical Journal.* – 2005. – № 3. – P. 763-771.

110. Inhibition of c-myc expression induced by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, in the HL-60 human leukemic cell line [Текст] / G. Barrera, R. Muraca, S. Pizzimenti [и др.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 1994. – Vol. 203, № 1. – P. 553-561.

111. Kiyomiya, K. Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex [Текст] / K. Kiyomiya, S. Matsuo // *Cancer Res.* – 2001. – № 61. – P. 2467–2471.

112. Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death [Текст] / G. Barrera, S. Pizzimenti, M. U. Dianzani // *Molecular Aspects of Medicine.* – 2008. Vol. 29, № 1-2. – P. 1-8.

113. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes [Текст] / M. K. Misra, M. Sarwat, P. Bhakuni // *Medical Science Monitor.* – 2009. – Vol. 15, № 10. – P. 209-219.

114. NF-kappaB and the link between inflammation and cancer [Текст] / J. A. DiDonato, F. Mercurio, M. Karin // *Immunol. Rev.* – 2013. – Vol. 246, № 1. – P. 379-400.

115. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation [Текст] / B. M. Hybertson, B. Gao, S. K. Bose [и др.] // *Molecular Aspects of Medicine.* – 2012. – № 32. – P. 234-246.

116. Rauch, C. Endocytosis switch controlled by transmembrane osmotic pressure and phospholipid number asymmetry [Текст] / C. Rauch, E. Farge // *Biophysical Journal.* – 2000. – Vol. 78. – P. 3036-3047.

117. Reduced reactive O₂ species formation and preserved mitochondrial HADH and Ca²⁺ levels during short-term 17°C ischemia in intact hearts [Текст] / M. L. Riess, A. K. S. Camara, L. G. Kevin [и др.] // *Cardiovascular Research.* –

2004. – Vol. 3, № 61. – P. 580-590.

118. Roninson, I. B. Structure and evolution of P-glycoprotein [Текст] / I. B. Roninson // Plenum Press, New York. – 1991. – P. 189-209.

119. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly specific drug binding [Текст] / S. G. Aller, J. Yu, A. Ward [и др.] // Science. – 2009. – № 323. – P.1718-1722.

120. Vesicular antracycline accumulation in Doxorubicin-selected U-937 cells: participation of lysosomes [Текст] / By S. J Hurwitz, M. Terashima, N. Mizunuma // Blood. – 1997. – Vol. 89, № 10. – P. 3745-3754.

121. Sensitization of U937 leukemia cells to doxorubicin by the MG132 proteasome inhibitor include an increase in apoptosis by supperessing NF-kappa β and mitochondrial membrane potential loss [Текст] / P. C. Ortiz-Lazrenko, A. Bravo-Cedlar, J. M. Lerma-Diaz [и др.] // Cancer Cell International. – 2014. – №. 14. – P.1-13.

122. Skovsgaard, T. Membrane transport of anthracyclinclines in Goldman ID (ed): Membrane Transport of Antineoplastic Agents [Текст] / T. Skovsgaard, N. I. Nissen // Oxford, UK, Pergamon. – 1986. – P. 195.

123. Steinbach, D. ABC transporters and drug resistance in leukemia: was P-gp nothing but the first head of the Hydra? [Текст] / D. Steinbach, O. Legrand // Leukemia. – 2007. – V. 21. – P. 1172–1176.

124. Synergistic effects of combination treatment witch bortezomib and doxorubicin in human neuroblastoma cell lines [Текст] / B. Y. Du, W. Song, L. Bai [и др.] // Chemotherapy. – 2012. – Vol. 58, № 1. – P. 44-51.

125. The influence of alliin on actin cytoskeleton reorganization in H1299 cell line in the presence of low doses of doxorubicin [Текст] / A. Glinska, M. Izdebska, M. Halas // Medical and Biological Sciences. – 2015. – Vol. 29, № 1. – P. 25-31.

126. TRAIL and taurolidine enhance the anticancer activity of doxorubicin, trabectedin and mafosfamide in HT1080 human fibrosarcoma cells [Текст] /

K. Harati, A. M. Chromik, D. Bulut [и др.] // *Amticancer Res.* – 2012. – Vol. 32, № 7. – P. 2967-2984.

127. You eat what are: autophagy inhibition as a therapeutic strategy in leukemia [Текст] / A. R. Sehgal, H. Konig, D.E. Johnson // *Leukemia.* – 2015. – Vol. 29. – P.517-525.

128. Wheeler, R. Membrane alterations associated with progressive Adriamycin resistance [Текст] / R. Wheeler, R. Rader, D. Kessel // *Biochemical. Pharmacology.* – 1982. – V. 31. – P.2691-2693.