

М.Ф. Гамалія

Є.Д. Шишко

І.О. Штонь

М.П. Завелевич

О.О. Фільченков

Н.І. Українська

О.С. Поліщук

Інститут експериментальної  
патології, онкології  
і радіобіології  
ім. Р.Є. Кавецького  
НАН України, Київ, Україна

**Ключові слова:** хронічний  
лімфолейкоз, фотодинамічний  
вплив, амінолевулінова кислота,  
етопозид, клітини лейколізу,  
CD38, Zap-70.

## ФОТОДИНАМІЧНИЙ ВПЛИВ EX VIVO НА ЗЛОЯКІСНІ ЛІМФОЇДНІ КЛІТИНИ ПРИ ХРОНІЧНИХ ЛІМФОПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ

**Мета:** дослідити зв'язок між вмістом клітин лейколізу (ЛЛ) в мазках крові при В-клітинному хронічному лімфолейкозі (В-ХЛЛ), чутливістю злоякісних лімфоїдних клітин до фотодинамічного (ФД) впливу, опосередкованого амінолевуліновою кислотою (АЛК), та проапоптогенної дії етопозиду, а також експресією предиктивних маркерів В-ХЛЛ CD38 і Zap-70. **Об'єкт і методи:** досліджено зразки периферичної крові хворих на хронічні лімфопрولیферативні захворювання, включаючи В-ХЛЛ, центрифужні цитопрепарати клітин крові, лімфоїдні клітини ex vivo. Застосовували методи імуноцитохімії, морфологічного дослідження для виявлення клітин ЛЛ; методи ФД впливу та визначення апоптозу методом проточної цитометрії, статистичні методи. **Результати:** трансформовані лімфоїдні клітини хворих на В-ХЛЛ є чутливими до ФД дії, опосередкованої АЛК, причому чутливість лімфоцитів хворих на В-ХЛЛ до пошкодження внаслідок ФД впливу суттєво перевищує цей показник у пацієнтів із поліклональним лімфоцитозом. Чутливість до ФД впливу обернено корелює зі вмістом клітин ЛЛ в препаратах. Не виявлено кореляції між загубеллю клітин внаслідок ФД впливу, опосередкованого АЛК, та індивідуальною чутливістю до індукції апоптозу етопозидом у первинних культурах. **Висновки:** отримані результати свідчать про високу чутливість злоякісних лімфоїдних клітин хворих на В-ХЛЛ ex vivo до ФД дії, опосередкованої АЛК, та про можливість застосування ФД ефекту як додаткового параметра в комплексній діагностиці хронічних лімфопрولیферативних захворювань.

В-клітинні лімфопрولیферативні захворювання (ЛПЗ), клінічний спектр яких досить різноманітний, привертають значну увагу гематологів. Незважаючи на широке коло генетичних і фенотипових маркерів злоякісних лімфоїдних клітин (ЗЛК), лишається чимало нез'ясованих питань стосовно походження, класифікації та прогнозу різних форм цих захворювань. Згідно з сучасною класифікацією ВООЗ злоякісних пухлин кровотворної та лімфоїдної тканин, В-клітинний хронічний лімфолейкоз (В-ХЛЛ) є єдиною нозологічною формою [1], але характеризується значною гетерогенністю. Індивідуальні біологічні характеристики трансформованих клітин можуть суттєво розрізнятися, завдяки чому В-ХЛЛ може розглядатися як одна з моделей для розробок у галузі персоналізованої медицини [2]. Накопичена на сьогодні інформація щодо біологічної різноманітності В-ХЛЛ вимагає детального аналізу фенотипових та генетичних характеристик, а також біологічних властивостей лейкомічної популяції клітин. Велику увагу приділяють пошуку нових та аналізу відомих фенотипових та генетичних маркерів ЗЛК при В-ХЛЛ, а також аналізу кореляцій між цими ознаками.

Характерним для В-ХЛЛ є наявність в мазках периферичної крові (ПК) хворих пошкоджених лімфоцитів, які відомі під назвою клітин лейколізу (ЛЛ), або тіней Боткіна — Гумпрехта. Хоча цей морфологічний фено-

мен було описано ще наприкінці ХІХ ст.<sup>\*</sup>, лише в роботах початку ХХІ ст. зроблено спроби з'ясувати його можливе прогностичне значення та проаналізувати зв'язок з іншими властивостями ЗЛК. Клітини ЛЛ (а точніше, залишки зруйнованих лімфоцитів) є артефактами, які виникають при розчавленні клітин у процесі приготування мазка, що пов'язано з їхньою підвищеною чутливістю до механічного ушкодження. Загалом відомо, що клітини ЛЛ містяться в мазках ПК при різних формах патології, але в разі В-ХЛЛ їх можна виявити в мазках крові багатьох хворих. Клітини ЛЛ характеризуються зміненою формою, відсутністю видимої цитоплазми та порушенням ядерної мембрани. Наявність у мазках ПК збільшеної кількості таких клітин з характерними морфологічними проявами вважається патогномічною ознакою В-ХЛЛ [3]; їх виявлення у сукупності з іншими клінічними та гематологічними особливостями може стати в пригоді, аби запідозрити наявність цього захворювання та провести належне гематологічне обстеження [4–6].

Минуло більше сторіччя з часу першого повідомлення щодо тіней Боткіна — Гумпрехта, тепер цей феномен знов привернув до себе увагу. Так, показано,

\*Gumprecht F. Leukozytenzerfall im Blute bei Leukamie und bei schweren Anamien. Deutsches Archiv für klinische Medizin, Leipzig, 1896; 57: 523–48.

що відсоток клітин ЛЛ у мазках крові прямо корелює з виживаністю хворих на В-ХЛЛ і тому може застосовуватися для прогнозування перебігу захворювання [7–9]. Підвищений відсоток клітин ЛЛ у мазках свідчить про ймовірність більш сприятливого прогнозу. На противагу цьому в деяких інших дослідженнях кореляції між часткою клітин ЛЛ і загальною виживаністю пацієнтів із В-ХЛЛ не помічено [10].

Підвищену чутливість ЗЛК до механічного руйнування пояснюють зниженою експресією в них білка цитоскелета віментину порівняно з такою в нормальних лімфоцитах, бо саме віментин забезпечує ригідність поверхневої мембрани та сталу форму клітини [7]. У низці досліджень здійснено спроби з'ясувати кореляції між відсотком клітин ЛЛ та іншими характерними маркерами лімфоїдних клітин, які можуть бути асоційовані з перебігом та прогнозом В-ХЛЛ. Зокрема, продемонстровано, що у хворих на В-ХЛЛ з високим відсотком клітин ЛЛ значно нижчою була експресія CD45 у лімфоїдних клітинах, а також виявлено обернену залежність між відсотком клітин ЛЛ та експресією антигену CD38 [10]. Чутливість до пошкодження під впливом різних фізичних та хімічних факторів теж є важливою ознакою ЗЛК. Зокрема, показано, що лімфоцити хворих на В-ХЛЛ характеризуються підвищеною чутливістю до осмотичного шоку з оберненою залежністю такої чутливості з експресією антигену CD45 [10].

Раніше N.F. Gamaleia та співавтори показали, що, на відміну від лімфоцитів здорових донорів та хворих із поліклональною проліферацією лімфоїдних клітин, ЗЛК людини (як в культурах перещеплюваних ліній клітин, так і в первинних культурах мононуклеарів ПК хворих на ЛПЗ) є дуже чутливими до фотосенсибілізуючої дії амінолевулінової кислоти (АЛК) [11]. Оскільки АЛК є не безпосереднім фотосенсибілізатором, а метаболічним попередником активного продукту протопорфірину IX, в який АЛК перетворюється при введенні в організм, то різниця в чутливості клітин до АЛК-опосередкованої фотодинамічної (ФД) дії, скоріш за все, є наслідком змін у метаболізмі трансформованих лімфоцитів [12]. Підвищена чутливість злов'язісних клітин до АЛК-опосередкованого ФД впливу при інших формах гемобластозів також показана багатьма авторами [13], але слід зазначити, що в ЗЛК відсоток загибелі в результаті ФД впливу був особливо високим.

У нашій попередній роботі показано, що ЗЛК хворих на В-ХЛЛ характеризуються значною гетерогенністю цитотоксичної відповіді та індукції апоптозу *ex vivo* під впливом хіміопрепаратів, зокрема етопозиду або флударабіну [14]. Цікавим є той факт, що чутливість ЗЛК при В-ХЛЛ до індукції апоптозу хіміопрепаратами *ex vivo* корелює із рядом фенотипових ознак цих клітин, які асоціюються зі сприятливістю перебігу захворювання [15]. Метою цієї роботи було з'ясувати, чи існує зв'язок між підвищеною чутливістю до механічного пошкодження ЗЛК при В-ХЛЛ (утворення клітин ЛЛ в мазках), чутливістю цих клітин до АЛК-опосередкованого ФД впливу та проапоптогенної дії етопозиду, а також експресією відомих предиктивних маркерів В-ХЛЛ.

## ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Діагностику хронічних ЛПЗ виконано у відділі онкогематології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України на підставі морфологічних, цитохімічних та імуноцитохімічних досліджень клітин ПК і кісткового мозку пацієнтів із врахуванням клінічних даних. Усього обстежено 57 хворих на В-ХЛЛ і 6 пацієнтів із поліклональним лімфоцитозом (ПКЛ). Хворі перебували на лікуванні у гематологічних відділеннях Київської клінічної лікарні № 9 і Київської обласної клінічної лікарні № 1. Визначення імунофенотипу проводили за допомогою панелі МкАТ («Dako», Данія) для диференціації антигенів Т- (CD3, CD4, CD5, CD8) і В-лімфоцитів (CD19, CD20, CD22, CD23, CD43, CD38) за загальноприйнятими методами [16]. Визначення експресії білка Zap-70 проводили за допомогою проточної цитометрії, використовуючи антитіла проти Zap-70, мічені FITC (клон 1E7.2, «BD Biosciences», США). Клітини фіксували та пермеабілізували в буфері Cytofix/Cytoperm («BD Biosciences»).

Для дослідження ФД впливу виділені з гепаринізованої крові клітини переносили в сольовий розчин Хенкса (рН 7,2). АЛК («Synbias», Україна) розчиняли безпосередньо перед експериментами в буферному сольовому розчині, рН 7,2. Суспензію клітин інкубували протягом 4 год з 1,0 ммоль/л АЛК при 37 °С, а потім опромінювали світлом гелій-неонового лазера (довжина хвилі 633 нм). Доза опромінення — 25 Дж/см<sup>2</sup>. Опромінені клітини інкубували при 37 °С у середовищі RPMI-1640 із додаванням ембріональної сироватки великої рогатої худоби («Sigma», США) протягом 20 год для закінчення індукованих ФД впливом процесів апоптозу. Кількість загиблих клітин визначали за допомогою трипанового синього або в тесті з МТТ («Sigma»). Підрахунок клітин ЛЛ у нових та архівних мазках ПК проводили рутинним методом із використанням світлового мікроскопа. Такими клітинами вважали пошкоджені лімфоцити зі зміненою формою, без видимої цитоплазми та з порушеною ядерною мембраною.

Дослідження апоптогенної активності етопозиду проводили в первинних культурах мононуклеарів ПК хворих на В-ХЛЛ, які культивували за загальноприйнятими методиками у суспензії при 37 °С в атмосфері, що містила 5% CO<sub>2</sub>, у поживному середовищі RPMI-1640 із додаванням 10% сироватки ембріонів великої рогатої худоби («Сангва», Україна), 2 ммоль/л L-глутаміну та 40 мкг/мл гентаміцину. Етопозид («Bristol-Myers Squibb Spa», Італія) вносили в середовище на 24 год в концентрації 5 мкмоль/л. Вміст гіподиплоїдних клітин визначали методом проточної цитометрії за I. Nicoletti та співавторами [17].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Лімфоїдні клітини ПК усіх хворих на В-ХЛЛ мали характерний фенотип CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD23<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>; кількість пацієнтів зі значним вмістом позитивних за CD38 лімфоцитів (рис. 1) становила близько 10%. У забарвлених за Романовським — Гімзою мазках ПК хворих на В-ХЛЛ постійно виявля-

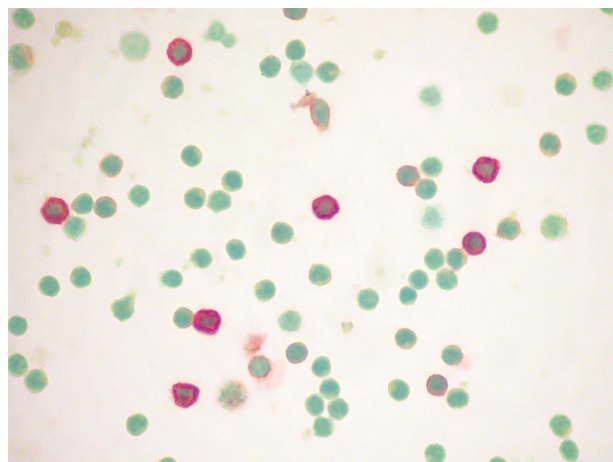
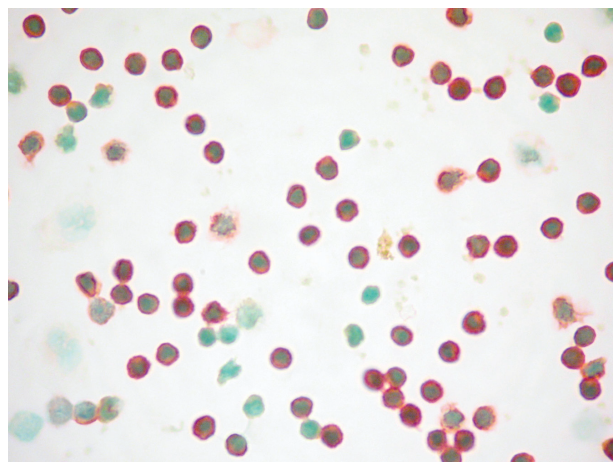
ли артефактні клітини ЛЛ із характерними брилуватими зруйнованими ядрами та залишками нуклеол (рис. 2); чисельність цих структур коливалася в межах 1,0–51,5% з медіаною 9,3%. Клітини ЛЛ виявляли в мазках крові хворих як позитивних, так і негативних за CD38. Певну частку цих клітин (2–10%) знаходили також у мазках частини хворих на інші форми ЛПЗ, гострий лімфобластний лейкоз, а також пацієнтів, у яких не виявлено онкогематологічної патології, зокрема у хворих із ПКЛ. Кількість клітин ЛЛ у мазках крові здорових донорів (8 осіб) зазвичай не перевищувала кількох відсотків. За допомогою непараметричного *U*-критерію Манна — Уїтні показано наявність вірогідної різниці як щодо медіани, так і розподілу індивідуальних значень вмісту клітин ЛЛ у препаратах крові хворих на В-ХЛЛ та пацієнтів із ПКЛ (рис. 3, *a*;  $U = 81,5$ ;  $p < 0,05$ ).

Паралельно досліджували чутливість ЗЛК до ФД дії, опосередкованої АЛК. У нашій вибірці хворих на В-ХЛЛ чутливість лімфоцитів до ФД впливу варіювала та знаходилася в межах 17,2–100,0%, хоча більшість індивідуальних показників чутливості були досить високими (медіана 60,5%; рис. 3, *б*). Загибель клітин внаслідок АЛК-опосередкованої ФД дії у хворих із ПКЛ різного генезу коливалася від 5,7 до 64,4% з медіаною 21,6%. Важливим є той факт, що лімфоцити крові здорових донорів не проявляли підвищеної чутливості до такого впливу.

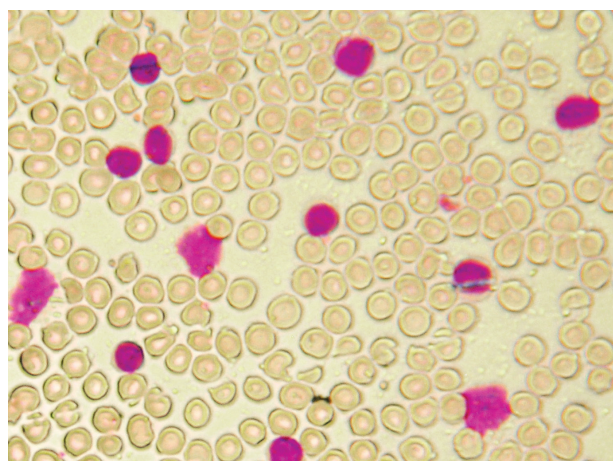
Кореляційний аналіз вмісту клітин ЛЛ та загибелі клітин внаслідок ФД впливу для хворих на В-ХЛЛ за допомогою непараметричного критерію — коефіцієнта рангової кореляції Спірмена — показав наявність суттєвої оберненої кореляції між цими показниками ( $r = -0,44$ ; 95% довірчий інтервал (ДІ)  $-0,63 \dots -0,2$ ; рис. 4, *a*). На відміну від В-ХЛЛ, для інших ЛПЗ показники чутливості до АЛК-опосередкованого ФД впливу та відсоток клітин ЛЛ не корелювали між собою (рис. 4, *б*).

Також проаналізовано можливу наявність зв'язку характеристик чутливості ЗЛК хворих на В-ХЛЛ до механічного та ФД ушкодження з відомими прогностичними маркерами В-ХЛЛ. Ми проаналізували, як зіставляються вміст клітин ЛЛ та рівень експресії антигену CD38. Результати, наведені на рис. 5, свідчать про наявність суттєвої оберненої кореляції цих показників ( $r = -0,64$ ; 95% ДІ  $-0,9 \dots -0,05$ ). Попередні дані для обмеженої вибірки хворих свідчать про наявність певної прямої залежності між рівнем експресії антигену CD38 та загибеллю клітин внаслідок ФД дії (дані не наведені).

Кореляційний аналіз не виявив помітної кореляції між вмістом клітин ЛЛ та експресією іншого прогностичного маркера Zap-70 ( $r = 0,12$ ; рис. 6, *a*). Кореляція між чутливістю клітин до АЛК-опосередкованого ФД впливу та рівнем експресії Zap-70 теж була відсутня ( $r = -0,055$ ; рис. 6, *б*). Крім того, не зареєстровано помітної кореляції між чутливістю клітин до індукції апоптозу етопозидом та загибеллю клітин внаслідок ФД дії (рис. 7). У мазках ПК обстеженої групи хворих на В-ХЛЛ (як позитивних, так і негативних за CD38)

*a**б*

**Рис. 1.** Різний рівень експресії CD38 на поверхні лімфоїдних клітин ПК хворих на В-ХЛЛ: *a* — поодинокі клітини з експресією антигену CD38 у типовому випадку В-ХЛЛ; *б* — значна кількість клітин, позитивних за CD38



**Рис. 2.** Клітини ЛЛ у мазку ПК хворого на В-ХЛЛ (забарвлення за Романовським — Гімзою, зб.  $\times 400$ )

постійно виявляли характерні клітини ЛЛ. Кількісні показники в обстежених пацієнтів, зокрема медіана відсотка вмісту клітин ЛЛ, збігаються з даними, наведеними в роботах інших авторів [18, 19]. Клітини ЛЛ виявляли і в мазках хворих на інші гемобластози, зокрема на різні форми хронічних ЛПЗ. У нашому дослідженні показано, що медіана розподілу відсотка

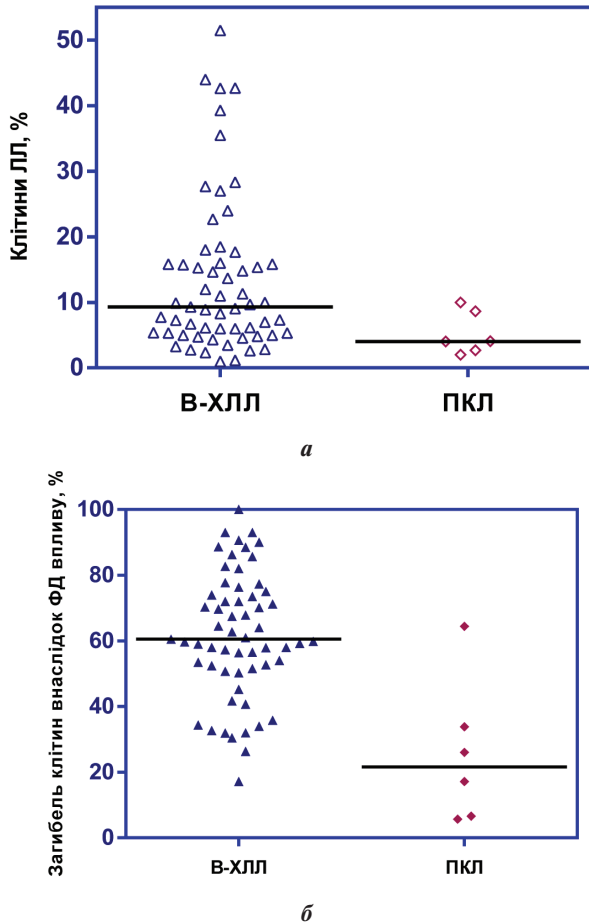


Рис. 3. Розкид відсотка клітин ЛЛ у мазках ПК (а) та відсотка загибелі клітин ПК за АЛК-опосередкованого ФД впливу (б) при В-ХЛЛ та ПКЛ

клітин ЛЛ для В-ХЛЛ є вірогідно відмінною від такої в разі розподілу відсотка клітин ЛЛ для випадків ПКЛ. Разом з тим слід зважити на думку D.M. Matos та співавторів [20], що за індивідуальними значеннями лише цього показника навряд чи можна віддиференціювати В-ХЛЛ від інших хронічних ЛПЗ.

Як і в попередніх дослідженнях N.F. Gamaleia та співавторів [11], у середньому загибель лімфоцитів внаслідок АЛК-опосередкованої ФД дії була суттєво вищою в разі В-ХЛЛ, аніж при інших хронічних ЛПЗ. Цілком припустимо, що індивідуальний показник чутливості до ФД впливу може мати більшу роздільну здатність щодо диференціації В-ХЛЛ від інших ЛПЗ, ніж індивідуальний показник вмісту клітин ЛЛ, хоча це припущення потребує додаткової експериментальної перевірки. У нашому дослідженні показано, що медіана розподілу відсотка загибелі внаслідок ФД впливу в разі В-ХЛЛ вірогідно більша за таку для ПКЛ, причому різниця між медіанами розподілу відсотка загибелі внаслідок ФД впливу при В-ХЛЛ та ПКЛ є суттєво більшою, ніж у разі аналогічного порівняння показників вмісту клітин ЛЛ (див. рис. 3). Слід зауважити, що значення індивідуальних показників чутливості до ФД дії у більшості хворих були досить високими. Високі показники загибелі ЗЛК *ex vivo* при АЛК-опосередкованій ФД дії у більшості пацієнтів із В-ХЛЛ

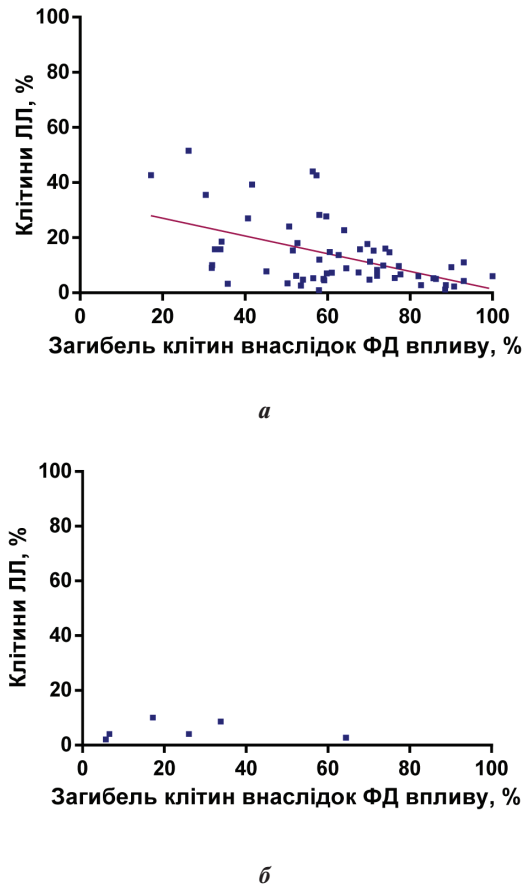


Рис. 4. АЛК-опосередкована ФД чутливість лімфоцитів та відсоток клітин ЛЛ у хворих на В-ХЛЛ (а) та пацієнтів із ПКЛ (б)

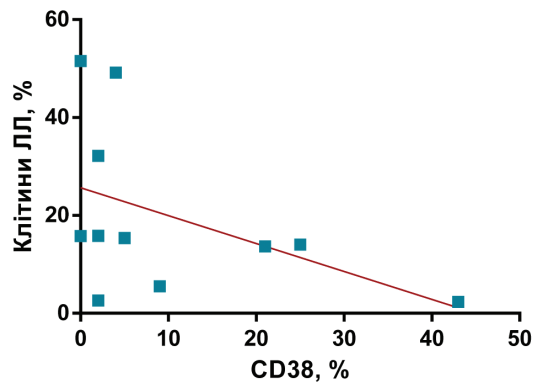


Рис. 5. Кореляція між відсотком клітин ЛЛ у мазках ПК та експресією антигену CD38 у хворих на В-ХЛЛ

можуть свідчити про суттєві та, можливо, однотипні зрушення в метаболізмі АЛК у процесі біосинтезу гем у цих клітинах, зокрема пов'язані з низькою активністю ферохелатази в ЗЛК [12].

Водночас ми показали наявність чіткої оберненої кореляції між вмістом клітин ЛЛ та загибеллю клітин внаслідок ФД впливу. Ймовірно, що загибель ЗЛК у результаті АЛК-опосередкованої ФД дії визначається не тільки власне фотохімічними процесами внаслідок впливу лазерного опромінення на фотосенсибілізатори, але й особливостями біохімічних процесів у клітинах, які зумовлюють наявність у них кінцевого фо-

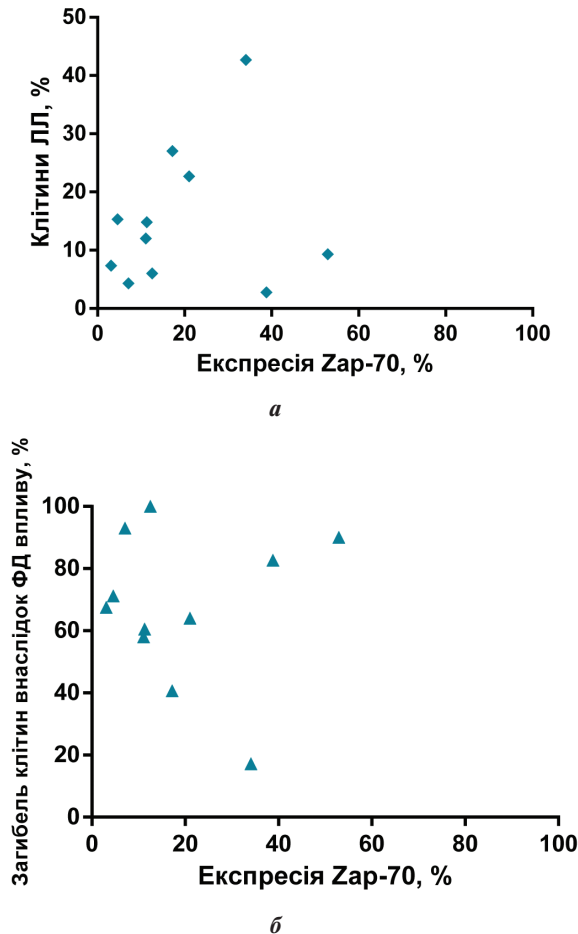


Рис. 6. Залежність між експресією антигену Zap-70 у лімфоїдних клітинах хворих на В-ХЛЛ та наявністю клітин ЛЛ в мазках ПК цих хворих (а) або загибеллю лімфоїдних клітин внаслідок ФД впливу (б)

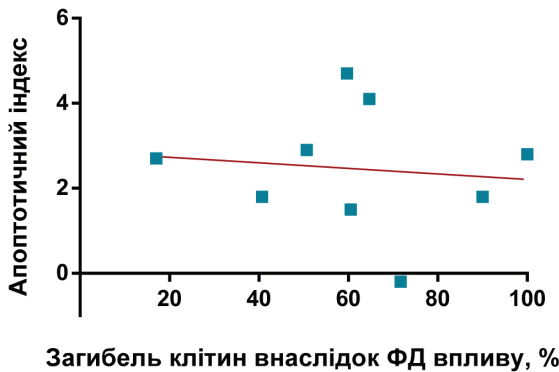


Рис. 7. Індукція апоптозу під впливом етопозиду та загибель внаслідок ФД впливу в первинних культурах лімфоїдних клітин ПК хворих на В-ХЛЛ

тосенсибілізатора внаслідок перетворень АЛК. Саме доступність фотосенсибілізатора є лімітуючим фактором, що визначає чутливість клітин до ФД впливу.

Ми не досліджували зв'язку між вмістом клітин ЛЛ в препаратах або індивідуальною чутливістю до АЛК-опосередкованої ФД дії, з одного боку, та клінічними показниками (тяжкість перебігу, стадія захворювання, показники виживаності), з іншого. Разом з тим ми спробували проаналізувати наявність асоціації між чутливістю до ФД впливу та відомими маркерами, що роз-

глядаються як опосередковані прогностичні та предиктивні показники, зокрема ті з них, що корелюють з мутаційним статусом генів важких ланцюгів імуноглобулінів [21]. Ми виявили статистично вірогідну обернену кореляцію між вмістом клітин ЛЛ та рівнем експресії антигену CD38. Разом із тим помітної кореляції між вмістом клітин ЛЛ (а також загибеллю клітин внаслідок ФД впливу) та експресією Zap-70 не відзначено. Виявлену тенденцію до прямої залежності між рівнем експресії антигену CD38 та ФД чутливістю клітин слід проаналізувати на більшій вибірці хворих.

Кореляції між вмістом клітин ЛЛ та експресією CD38 чи Zap-70 у хворих на В-ХЛЛ проаналізовано в інших дослідженнях. G.S. Nowakowski зі співавторами [22] показали наявність оберненої кореляції відсотка клітин ЛЛ у мазках крові пацієнтів із показниками, що асоціюються з гіршим перебігом та прогнозом, до яких належить наявність немутованих генів важких ланцюгів імуноглобуліну. Показано також обернену кореляцію між відсотком клітин ЛЛ та експресією CD38 чи Zap-70 [8, 23]. На противагу цьому, деякі дослідники [24] не виявили такої асоціації.

Подальше вивчення цього питання може бути важливим у плані встановлення кореляцій між відносно нескладними для визначення показниками, таким як наявність клітин ЛЛ, імунологічними або молекулярно-біологічними маркерами ЗЛК, що визначають особливості патогенезу, а також значну гетерогенність В-ХЛЛ. Щодо цього особливої інтерес може становити визначення зв'язку між молекулярно-біологічними характеристиками ЗЛК при В-ХЛЛ та інших формах хронічних ЛПЗ і чутливістю до АЛК-опосередкованої ФД дії з огляду як на виявлені у попередніх дослідженнях [11] суттєві відмінності такої чутливості для В-ХЛЛ та інших форм ЛПЗ, так і на встановлену зараз відмінність у ефективності ФД впливу на лімфоцити хворих на В-ХЛЛ та пацієнтів із ПКЛ.

## ВИСНОВКИ

1. Лімфоцити хворих на В-ХЛЛ є чутливими не тільки до механічного пошкодження при приготуванні мазків крові з утворенням тіней Боткіна — Гумпрехта (клітин ЛЛ), але й до пошкодження через ФД ефект, опосередкований АЛК.

2. Чутливість до пошкодження внаслідок ФД впливу лімфоцитів хворих на В-ХЛЛ суттєво перевищує таку у пацієнтів із ПКЛ. Чутливість до ФД дії обернено корелює із вмістом клітин ЛЛ в препаратах.

3. Не виявлено кореляції між загибеллю клітин внаслідок ФД впливу, опосередкованого АЛК, та індивідуальною чутливістю до індукції апоптозу етопозидом у первинних культурах.

4. Одержані результати свідчать про можливість застосування ФД ефекту як додаткового параметра в комплексній діагностиці хронічних ЛПЗ.

Роботу виконано в рамках цільової програми наукових досліджень ВБФМБ НАН України «Функціональна геноміка і метаболоміка в системній біології» (державної реєстрації теми № 0112U002192; 2012–2016 рр.).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; **127** (20): 2375–90.
2. Mertens D, Stilgenbauer S. Prognostic and predictive factors in patients with chronic lymphocytic leukemia: relevant in the era of novel treatment approaches? *J Clin Oncol* 2014; **32** (9): 869–72.
3. Nabhan C, Rosen ST. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical review. *JAMA* 2014; **312** (21): 2265–76.
4. Dokic M, Urosevic I, Savic I, *et al.* A case of chronic lymphocytic leukaemia occurring during treatment of chronic myeloid leukaemia. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2016; **32** (Suppl 1): 156–8.
5. Shvidel L, Berrebi A. Pitting new treatments for chronic lymphocytic leukemia against old ones: how do they fare? *Expert Rev Hematol* 2016; **9** (3): 245–54.
6. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol* 2015; **90** (5): 446–60.
7. Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, *et al.* Percentage of smudge cells on routine blood smear predicts survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2009; **27** (11): 1844–9.
8. Johansson P, Eisele L, Klein-Hitpass L, *et al.* Percentage of smudge cells determined on routine blood smears is a novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2010; **34** (7): 892–8.
9. Gogia A, Raina V, Gupta R, *et al.* Prognostic and predictive significance of smudge cell percentage on routine blood smear in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014; **14** (6): 514–7.
10. Rizzo D, Lotay A, Gachard N, *et al.* Very low levels of surface CD45 reflect CLL cell fragility, are inversely correlated with trisomy 12 and are associated with increased treatment-free survival. *Am J Hematol* 2013; **88** (9): 747–53.
11. Gamaleia NF, Shishko ED, Gluzman DF, *et al.* Sensitivity of normal and malignant human lymphocytes to 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic damage. *Exp Oncol* 2008; **30** (1): 65–9.
12. Ohgari Y, Nakayasu Y, Kitajima S, *et al.* Mechanisms involved in delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of tumor cells: relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin. *Biochem Pharmacol* 2005; **71** (1–2): 42–9.
13. Hrkal Z, Grebenová D, Cajthamlová H, *et al.* Use of photodynamic therapy for elimination of residual leukemic cells in autologous transplants of hematopoietic progenitor cells. *Cas Lek Cesk* 2002; **141** (Suppl): 41–6 (in Czech).
14. Завелевич МП, Куява ЛМ, Фільченков ОО та ін. Відповідь *ex vivo* злоякісних клітин пацієнтів із В-клітинним хронічним лімфолейкозом на протипухлинні хіміопрепарати. *Онкологія* 2014; **16** (4): 262–8.
15. Castejón R, Yebra M, Citores MJ, *et al.* Drug induction apoptosis assay as predictive value of chemotherapy response in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2009; **50** (4): 593–603.
16. Глузман ДФ, Абраменко ИВ, Складенко ЛМ и др. Диагностика лейкозов. Атлас и практическое руководство. К: Морион, 2000. 224 с.
17. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, *et al.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991; **139** (2): 271–9.
18. Fumi M, Martins D, Pancione Y, *et al.* Automated quantification of apoptosis in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: a prognostic variable obtained with the Cell-Dyn Sapphire (Abbott) automated hematology analyzer. *Int J Lab Hematol* 2014; **36** (6): 628–35.
19. Szerafin L, Jakó J, Riskó F, Hevessy Z. The prognostic value of smudge cells (Gumprecht shadows) in chronic lymphocytic leukaemia. *Orv Hetil* 2012; **153** (44): 1732–7.
20. Matos DM, Perini G, Kruzich C, *et al.* Smudge cells in peripheral blood smears did not differentiate chronic lymphocytic leukemia

from other B-cell chronic lymphoproliferative diseases. *Rev Brasil Hematol Hemoter* 2009; **31** (5): 333–6.

21. Wiggers TG, Westra G, Westers TM, *et al.* ZAP70 in B-CLL cells related to the expression in NK cells is a surrogate marker for mutational status. *Cytometry B Clin Cytom* 2014; **86** (4): 280–7.

22. Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, *et al.* Using smudge cells on routine blood smears to predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: a universally available prognostic test. *Mayo Clin Proc* 2007; **82** (4): 449–53.

23. Amr Z, Basma E. Peripheral blood smudge cells percentage in de novo CLL: A comparison with other established laboratory prognostic markers. *Life Sci J* 2011; **8** (4): 239–44.

24. Herishanu Y, Kay S, Joffe E, *et al.* Integration of automated morphological features resolves a distinct group of atypical chronic lymphocytic leukemias with chromosomal aberrations. *Leuk Res* 2014; **38** (4): 484–9.

## EX VIVO PHOTODYNAMIC TREATMENT OF MALIGNANT LYMPHOID CELLS IN CHRONIC LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASES

M.F. Gamaleia, E.D. Shishko, I.O. Shton, M.P. Zavelevych, O.O. Philchenkov, N.I. Ukrainka, O.S. Polishchuk

**Summary. Aim:** To study the relations between the content of smudge cells in blood smears of the patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), the responsiveness of the malignant lymphoid cells to aminolevulinic acid (ALA) mediated photodynamic (PD) treatment and proapoptogenic effect of vepesid as well as the expression CD38 and Zap-70 as the predicative markers of B-CLL. **Object and methods:** the peripheral blood samples of patients with chronic lymphoproliferative diseases including B-CLL were examined (smears, cytopspin specimens, suspension of lymphoid cells). The immunocytochemical techniques and morphological methods, PD treatment and flow cytometry analysis of apoptosis were used. **Results:** the malignant lymphoid cells of B-CLL patients are responsive to ALA-PD treatment *ex vivo*. The percentage of B-CLL cell death caused by ALA-PD treatment exceeds significantly that in the cases of polyclonal lymphocytosis. The responsiveness to ALA-PD treatment is inversely related to the content of smudge cells in the smears. The cell death caused by ALA-PD treatment does not correlate with the individual susceptibility to apoptosis induction by vepesid in primary B-CLL cell cultures. **Conclusion:** the results obtained demonstrate the high susceptibility of the malignant lymphoid cells of B-CLL patients to ALA-PD treatment *ex vivo*.

**Key Words:** chronic lymphocytic leukemia, photodynamic treatment, aminolevulinic acid, etoposide, smudge cells, CD38, Zap-70.

Адреса для листування:

Шишко Є.Д.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України  
E-mail: shyshko.e@gmail.com

Держано: 02.12.2016