

ГЛІКОПРОТЕІН PGP-170 – ПРЕДИКТОР ВІДПОВІДІ НА ТЕРАПІЮ У ХВОРИХ НА ГОСТРУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ

А.І. Гордієнко, Н.В. Горяїнова, В.О. Кубарова, Н.М. Третяк

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

Резюме. *Мета досліджень* полягала у визначенні у хворих на ГМЛ особливостей експресії гемопоетичними стовбуровими клітинами-попередниками ПК з імунотиповим профілем CD117 і CD34 глікопротеїну Pgp-170.

Матеріали та методи. *Об'єктом досліджень* були клітини периферичної крові 39 хворих з різними підваріантами ГМЛ (M2 – 62%, M4 – 27%, M5 – 8%).

Результати досліджень та висновки. *В результаті* проведених досліджень показана низька частота зустрічаємості (9,7%) в периферичній крові хворих на ГМЛ в першому гострому періоді відносного вмісту CD117⁺, CD34⁺ пухлинних клітин, що експресують глікопротеїн Pgp-170, а також встановлено, що сприятливим предиктором позитивної відповіді на хіміотерапію у хворих на ГМЛ є відсутність коекспресії CD117⁺/Pgp-170 пухлинними клітинами периферичної крові.

Ключові слова: ГМЛ, прогноз, резистентність, Pgp-170, імунотипування.

GLYCOPROTEIN PGP-170 – PREDICTOR OF RESPONSE TO THERAPY IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

A.I. Gordienko, N.V. Goryainova, V.A. Kubarova, N.N. Tretyak

SI «Institute of Hematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kiev

Summary. *Aim* – to evaluate the features of AML patients expressing hematopoietic stem progenitor cells PB immunophenotypic profile of CD117 and CD34 glycoprotein Pgp-170.

Materials and methods. *Object of study* is the peripheral blood cells of 39 patients with different sub-variants of AML (M2 – 62%, M4 – 27%, M5 – 8%).

Results and conclusions. *The studies showed* a low incidence (9.7%) in the peripheral blood of patients with AML in first acute period of relative content of CD117⁺, CD34⁺ tumor cells expressing glycoprotein Pgp-170, and also found that a positive predictor of a favorable response to chemotherapy in AML patients is the lack of co-expression of CD117⁺ / Pgp-170 tumor cells in peripheral blood.

Key words: AML, prognosis, resistance, Pgp-170, immunophenotyping.

Несмотря на достигнутые успехи в лечении острой миелоидной лейкемии (ОМЛ), у многих пациентов (приблизительно 35–40%) наблюдается резистентность к проводимой стандартной химиотерапии. Такие больные ОМЛ составляют группу с неблагоприятным прогнозом и плохой выживаемостью. В связи с этим поиск механизмов, лежащих в

основе формирования резистентности, представляет актуальную проблему современной онкогематологии.

Среди возможных причин отсутствия ответа на специфическое лечение особый интерес вызывают клеточные факторы. Так, одним из них является гликопротеин Pgp-170, экспрессия которого опухолевыми клетками может способствовать развитию устойчивости к терапии [10]. Установлено, что важнейшей причиной множественной лекарственной устойчивости является пониженное накопление цитостатиков в клетке, обусловленное активным выведением веществ в межклеточную среду. Этот транспорт осуществляется Р-гликопротеином, белком плазматической мембраны, за счет энергии гидролиза АТФ [4]. Однако роль гликопротеина Р-170 в развитии резистентности к специфической терапии у больных ОМЛ не совсем ясна, что требует продолжения исследований в этом направлении [8, 11].

Цель исследований состояла в оценке у больных ОМЛ особенностей экспрессии гемопоэтическими стволовыми клетками-предшественниками ПК с иммунофенотипическим профилем CD117⁺ и CD34⁺ гликопротеина Pgp-170.

Материалы и методы исследований. Объектом исследований являлись клетки периферической крови 39 больных с разными подвариантами ОМЛ (М2 – 62%, М4 – 27%, М5 – 8%). Возраст обследованных пациентов с ОМЛ колебался от 42 до 70 лет. Из них у 19 пациентов была достигнута клинико-гематологическая ремиссия.

Для иммунофенотипических исследований использовали моноклональные антитела (МКА), детектирующие антигены стволовых клеток-предшественников анти-CD34 и анти-CD117 МКА, меченые флюоресцеинизотиоцианатом (FITC) и фикоэритрином (PE), а также анти-Pgp-170 (FITC) (Becton Dickinson, США). Для контроля неспецифического связывания (изотипический контроль) МКА изучаемые образцы окрашивали мышиными IgG 1 и IgG 2, а МКА – мечеными соответственно FITC и PE. Окрашивание клеток периферической крови (ПК) МКА проводили с учетом рекомендаций фирмы-производителя. Цитофлюориметрические исследования осуществляли на проточном лазерном цитофлюориметре FACScan (Becton Dickinson, США) с использованием программы LYSYS-II Ver.1.1. (Becton Dickinson, США); WinMDI 2,8 (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, США) и Microsoft Excel 2000 из пакета Microsoft Office 2000. Статистический анализ был проведен с использованием коэффициента Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Проведенные цитофлюориметрические исследования показали, что у больных ОМЛ при всех ФАБ-

вариантах в периферической крови часть бластных клеток экспрессирует маркеры гемопоэтических стволовых клеток-предшественников. Обнаружено, что в среднем на $(24,7 \pm 1,5)\%$ бластных клетках выявлялся мембранный маркер стволовых клеток-предшественников антиген CD117 (c-Kit). Вместе с тем, опухолевые клетки экспрессировали поверхностный антиген CD34, также являющийся маркером стволовых клеток-предшественников. Анализ результатов показал, что число таких клеток в периферической крови больных в первом остром периоде составляет в среднем $(29,7 \pm 1,8)\%$.

Итак, на основании полученных данных можно отметить, что в периферической крови части больных ОМЛ более чем 50% бластов в сумме экспрессируют CD34 и CD117 маркеры гемопоэтических стволовых клеток-предшественников. Анализ индивидуальных значений свидетельствует о достаточно широком диапазоне колебаний в периферической крови больных ОМЛ в первом остром периоде относительного содержания бластных клеток, экспрессирующих маркеры стволовых клеток-предшественников. Так, обнаружено, что в крови количество CD117 позитивных гемопоэтических стволовых клеток-предшественников колебалось от 3,8 до 44,4%, а CD34 – от 0,3 до 36,1%. Выявлено, что у одного из больных процентное содержание клеток с указанными выше маркерами значительно превышало аналогичные индивидуальные значения других пациентов.

У больных ОМЛ в первом остром периоде оценивали особенности экспрессии CD117, CD34-позитивными клетками мембранного гликопротеина Pgp-170. Анализ средних значений показал низкое содержание в периферической крови количества CD117⁺ бластных клеток, экспрессирующих гликопротеин Pgp-170 $((0,8 \pm 0,01)\%)$. Следует отметить, что из общего количества CD117⁺ клеток только 3,1% экспрессировали мембранный гликопротеин Pgp-170. Результаты показали, что CD34 позитивные бластные клетки также экспрессировали гликопротеин Pgp-170, что составляло $(2,1 \pm 0,02)\%$. Из общего числа CD34⁺ клеток 6,6% имели мембранный гликопротеин Pgp-170.

Таким образом, в группе обследованных больных ОМЛ в первом остром периоде характерной особенностью опухолевых клеток с иммунологическим профилем CD117⁺, CD34⁺ является низкая экспрессия гликопротеина Pgp-170.

Клинико-гематологический мониторинг больных ОМЛ после 1-го курса индукционной терапии подтверждает достижение ремиссии у 19 из 39 обследованных пациентов. Два пациента в процессе лечения умерли. Как видно из таблицы, у пациентов с ОМЛ в ремиссии происходит элиминация клона опухолевых клеток под действием химиопрепаратов и

последующее восстановление гематологических показателей. Показатели ПК больных ОМЛ, не достигнувших ремиссии, достоверно не отличались от данных, полученных до начала лечения.

Таблица

Показатели периферической крови у больных ОМЛ

Показатель	Пациенты до терапии, n=39	Пациенты, после терапии (ремиссия), n=19	Пациенты после терапии (нет ремиссии), n=18	Нормальные значения показателей ПК
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	2,8 \pm 0,3	3,6 \pm 0,4	2,9 \pm 0,5	4,0–5,1
Гемоглобин, г/л	75,5 \pm 2,7	115,1 \pm 3,8*	75,9 \pm 2,8	132,0–164,0
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	30,2 \pm 3,8	5,6 \pm 0,7*	4,7 \pm 0,9	4,0–8,8
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	130,0 \pm 9,1	241,0 \pm 18,5*	102,0 \pm 14,5	150,0–450,0
Лимфоциты, %	18,7 \pm 0,9	32,6 \pm 2,1*	12,9 \pm 0,7	25,0–40,0
Бласты ПК, %	68,7 \pm 4,3	0*	6,8 \pm 1,6	–

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с данными до начала терапии

Как известно, к развитию ОМЛ приводят существенные нарушения гемопоэза, имеющие свои особенности при данном заболевании. Изменения гематологических показателей (гемограмма) у больных ОМЛ в первом остром периоде до лечения и после проведения им индукционной терапии также представлены в таблице.

Как следует из вышеприведенных данных, у больных ОМЛ в первом остром периоде отмечается снижение в крови количества эритроцитов в среднем в 1,4 раза и в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с данными пациентов, достигших ремиссии после проведения индукционной химиотерапии. Для больных ОМЛ в первом остром периоде характерно в среднем уменьшение содержания гемоглобина в 1,7 раза относительно нижней границы нормальных значений для этого показателя. Из данных, представленных в таблице видно, что после завершения индукционной химиотерапии, при положительном ответе на лечение, содержание гемоглобина в крови восстанавливается и в среднем превышает в 1,5 раза ($p < 0,05$) аналогичное значение, наблюдаемое у пациентов до лечения. Анализ результатов гемограммы показал существенное увеличение в ПК больных ОМЛ в первом остром периоде количества лейкоцитов. Так, у больных до начала лечения данный показатель превышает аналогичные значения в 7,6 раза по сравнению с нижней границей нормы и в 5,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с данными

пациентов в ремиссии после завершения курса индукции ремиссии. У пациентов в первом остром периоде ОМЛ отмечается незначительное снижение тромбоцитов по сравнению с нижней границей нормы (в 1,2 раза), тогда как после курса индукционной терапии данный показатель достигает предела нормальных значений при достижении ремиссии.

Из научной литературы известно, что гиперэкспрессия гликопротеина Pgp-170 опухолевыми клетками приводит к формированию резистентности к терапии. Это объясняется тем, что гликопротеин Pgp-170 функционирует как насос, выталкивающий лекарственные препараты из клетки, значительно снижая при этом их концентрацию. Поэтому результатом такого процесса может быть развитие Pgp-опосредованной резистентности к проводимой терапии [2, 3, 9, 12]

По результатам, полученным в ходе исследований, у обследованных больных ОМЛ наблюдается низкая частота встречаемости в ПК количества CD117⁺, CD34⁺ опухолевых клеток, экспрессирующих гликопротеин Pgp-170, однако наличие такой ассоциации сопровождается отсутствием ответа на терапию, что совпадает с данными литературы [1, 5, 7, 9, 10, 12].

С учетом данных литературы, а также полученных собственных результатов, есть основания считать, что отсутствие экспрессии опухолевыми клетками гликопротеина Pgp-170 в сочетании с CD117-негативностью может рассматриваться в качестве иммунологического критерия прогнозирования позитивного ответа на терапию.

Выводы

1. Показана низкая частота встречаемости (9,7%) в периферической крови больных ОМЛ в первом остром периоде относительного содержания CD117⁺, CD34⁺ опухолевых клеток, экспрессирующих гликопротеин Pgp-170.

2. Установлено, что благоприятным предиктором позитивного ответа на химиотерапию у больных ОМЛ является отсутствие коэкспрессии CD117⁺/Pgp-170 опухолевыми клетками периферической крови.

3. Анализ экспрессии гликопротеина Pgp-170 опухолевыми клетками больных ОМЛ желателно проводить перед назначением курса индукционной терапии.

Литература

1. Chemotherapeutic drug-induced ABCG2 promoter demethylation as a novel mechanism of acquired multidrug resistance / E.E. Bram, M. Stark, S. Raz [et al.] // Neoplasia. – 2009. – Vol. 11, № 12. – P. 1359–1370.

2. Differences between the CD34+ and CD34- blast compartments in apoptosis resistance in acute myeloid leukemia / van Stijn A., van der Pol M.A., Kok A. [et al.] // *Haematologica*. – 2003. – Vol. 88, № 5. – P. 497–508.
3. Doxorubicin activates FOXO3a to induce the expression of multidrug resistance gene ABCB1 (MDR1) in K562 leukemic cells / R.C. Hui, R.E. Francis, S.K. Guest [et al.] // *Mol. Cancer Ther.* – 2008. – Vol. 7, № 3. – P. 670–678.
4. Fetoprotective activity of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2): expression and function throughout pregnancy / L. Hahnova-Cygalova, M. Ceckova, F. Staud [et al.] // *Drug Metab. Rev.* – 2011. – Vol. 43, № 1. – P. 53–68.
5. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system / A. Balazs, L. Homolya, G. Szakazs [et al.] // *Physiol. Rev.* – 2006. – Vol. 86. – P. 1179–1236.
6. Kalalinia F., Potential role of cyclooxygenase-2 on the regulation of the drug efflux transporter ABCG2 in breast cancer cell lines / F. Kalalinia, F. Elahian, J. Behravan // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 137. – № 2. – P. 321–330.
7. MicroRNAs as biomarkers for the diagnosis and prognosis of human cancer / D. Asslaber, J.P. Hofbauer, R. Greil et al. // *JNAI*. – 2010. – Vol. 1, № 1. – [Journal of nucleic acids investigation].
8. MRP3, BCRP, and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia / Z. Benderra, A.M. Faussat, L. Sayadaye [et al.] // *Clin. Cancer. Res.* – 2005. – Vol. 11. – P. 7764–7772.
9. P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein-1 activity in 132 acute myeloid leukemias according to FAB subtypes and cytogenetics risk groups / O. Legrand, S. Zompi, J.Y. Perrot [et al.] // *Haematologica*. – 2004. – Vol. 89, № 1. – P. 34–41.
10. The prognostic value of P-glycoprotein (ABCB) and breast cancer resistance protein (ABCG2) in adults with de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype / D. Damiani, M. Tiribelli, E. Calistri [et al.] // *Haematologica*. – 2006. – Vol. 91. – P. 825–828.
11. The temporal relationship between ABCB1 promoter hypomethylation, ABCB1 expression and acquisition of drug resistance / K. Reed, S.L. Hembruff, J.A. Sprowl [et al.] // *Pharmacogenomics J.* – 2010. – Vol. 10, № 6. – P. 489–504.
12. Zemruski N.C., Potential of novel antiretrovirals to modulate expression and function of drug transporters in vitro / N.C. Zemruski, G. Büchel, L.J. Jödicke // *Antimicrob. Chemother.* – 2011. – Vol. 66, № 4. – P. 802–812.