

ВИЗНАЧЕННЯ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКУ МІЖ ІМУНОЛОГІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ У ПЕРИФЕРИЧНІЙ КРОВІ ТА КІСТКОВОМУ МОЗКУ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ, ЯКІ ОТРИМУЮТЬ ЛІКУВАННЯ ІНГІБІТОРАМИ ТИРОЗИНКІНАЗИ

Т.П. Перехрестенко

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ИММУНОЛОГИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И КОСТНОМ МОЗГЕ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ МИЕЛОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИЕЙ, ПОЛУЧАЮЩИХ ЛЕЧЕНИЕ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗЫ

Т.П. Перехрестенко

ГУ «Інститут гематологии и трансфузиологии НАМН Украины», Киев

RELATION BETWEEN IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF PERIPHERAL BLOOD AND BONE MARROW IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA TREATED WITH TYROSINE KINASE INHIBITORS

T.P. Perekhrestenko

Institute of Hematology and Transfusion of NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Резюме. Резистентність до інгібіторів тирозинкінази (ІТК) досі залишається актуальною проблемою при лікуванні хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ). Зважаючи на результати наших досліджень з вивчення механізму формування відповіді на терапію ІТК для раннього виявлення предикторів незадовільної відповіді, в якості додаткових пропонуються імунологічні клітинно-молекулярні методи дослідження, котрі можна проводити у проміжках часу між стандартизованими дослідженнями, що дозволить у разі виявлення збільшеної експресії показників внести корекцію у діагностичний процес. Мета дослідження - встановити взаємозв'язок між показниками експресії трансмембранного глікопротеїну Pgp-170, антигену CD 34, внутрішньоядерного протеїну Ki-67 у периферичній крові та кістковому мозку для раннього виявлення ознак незадовільної відповіді на лікування хворих з ХМЛ препаратами ІТК. У дослідженні брали участь 68 пацієнтів на ХМЛ, які лікувалися ІТК першого покоління. Експресію імунологічних показників вивчали у кістковому мозку та периферичній крові пацієнтів методом проточної лазерної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл. Аналіз й обробка даних здійснювалась за допомогою методів математичної статистики. Використання кореляційного аналізу дало можливість встановити високий ступінь взаємозв'язків між показниками експресії у периферичній крові та кістковому мозку. У результаті регресійного аналізу побудовані математичні моделі, за допомогою яких можна визначати середнє значення показників кісткового мозку, виходячи з фактичних значень відповідних показників периферичної крові. Це дозволить частіше досліджувати імунологічні маркери резистентності, що сприятиме своєчасному втручанням в діагностичний процес та підвищенню ефективності лікування.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія, резистентність до інгібіторів тирозинкінази, Pgp-170, CD 34, Ki-67, кореляційно-регресійний аналіз.

Резюме. Резистентность к ингибиторам тирозинкиназы (ИТК) до сих пор остается актуальной проблемой при лечении больных хронической миелоидной лейкемией (ХМЛ). Учитывая результаты наших исследований по изучению механизма формирования ответа на терапию ИТК для раннего выявления предикторов неудовлетворительного ответа, в качестве дополнительных, предлагаются иммунологические клеточно-молекулярные методы исследования, которые можно проводить в промежутках времени между стандартизированным исследованием, что позволит в случае обнаружения увеличенной экспрессии показателей внести коррекцию в диагностический процесс. Цель исследования - установить взаимосвязь между показателями экспрессии трансмембранного гликопротеина Pgp-170, антигена CD 34, внутриядерного протеина Ki-67 в периферической крови и костном мозге для раннего выявления признаков неудовлетворительного ответа на лечение больных ХМЛ препаратами ИТК. В исследовании принимали участие 68 пациентов с ХМЛ, которые лечились ИТК первого поколения. Экспрессию иммунологических показателей изучали в костном мозге и периферической крови пациентов методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител. Анализ и обработка данных осуществлялась с помощью методов математической статистики. Использование корреляционного анализа позволило установить высокую степень взаимосвязей между показателями в периферической крови и костном мозге. В результате регрессионного анализа построены математические модели, с помощью которых можно определять среднее значение показателей костного мозга, исходя из фактических значений соответствующих показателей периферической крови. Это позволит чаще исследовать иммунологические маркеры резистентности, что будет способствовать своевременному вмешательству в диагностический процесс и повышению эффективности лечения.

Ключевые слова: хроническая миелоидная лейкемия, резистентность к ингибиторам тирозинкиназы, Pgp-170, CD 34, Ki-67, корреляционно-регрессионный анализ.

Abstract. Resistance to tyrosine kinase inhibitors (TKI) is still a pressing problem in the treatment of patients with chronic myeloid leukemia (CML). Taking into account the results of our studies on the mechanism of response formation to TKI therapy for early detection of poor response predictors we offered cell-molecular methods of investigation as additional that could be performed in the intervals between standardized researches. In the case of increased indices expression correction in the diagnostic process could be made.

The objective was to establish the relationship between indicators of transmembrane glycoprotein expression Pgp-170, CD 34 antigen, intranuclear protein Ki-67 in peripheral blood and bone marrow for the early detection of signs of poor response to treatment of CML patients. The study involved 68 CML patients treated with first generation TKI. Expression of immunological parameters was studied in bone marrow and peripheral blood of patients by flow cytometry using monoclonal antibodies. Analysis was performed using the methods of mathematical statistics. Using correlation analysis a high degree of interrelation between Pgp 170, CD 34, Ki-67 in peripheral blood and bone marrow was established. As a result of the regression analysis, mathematical models were created that could be used to determine the average value of f bone marrow parameters based on the actual values of the corresponding peripheral blood. This would allow investigating immunological markers of resistance more often facilitating timely intervention in the diagnostic process and treatment efficacy.

Key words: chronic myeloid leukemia, resistance to tyrosine kinase inhibitors, Pgp-170, CD 34, Ki-67, correlation and regression analysis.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.

Резистентність до лікування інгібіторами тирозинкінази (ІТК) хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ) досі залишається актуальною проблемою сучасної гематології. Поява на початку 2000-х років якісно нового класу препаратів цілеспрямованої дії для лікування пацієнтів з ХМЛ відкрило нові можливості у подоланні злоякісного клону. Першим лікарським засобом класу ІТК став імаїніб мезилат, застосування котрого дозволило отримати повну цитогенетичну відповідь у більшості хворих, крім того вдалося у частині з них досягти велику молекулярну відповідь [8]. Такі обнадійливі результати стали передумовою можливого вилікування даного захворювання. Однак, як виявилось при подальшому спостереженні, близько 30 % пацієнтів не досягають очікуваної мети протягом першого року лікування, дехто втрачає отриманий позитивний ефект у подальшому [6, 8]. Стало незрозумілим, чому частина пацієнтів незадовільно відповідає на терапію, адже дія препарату спрямована безпосередньо на подолання аномальної тирозинкінази, з підвищеною активністю якої пов'язані розвиток захворювання та виникнення рецидиву. Провідними фахівцями усього світу було розпочато дослідження з визначення механізмів резистентності до дії препаратів таргетної дії. Вважають, що однією з причин нечутливості лейкемічних клітин до ІТК є мутації гену BCR-ABL, що унеможлиблює здійснення повноцінних міжмолекулярних взаємодій імаїнібу і ABL-кінази та, як наслідок, призводить до втрати чутливості клітин, що експресують мутантні гени BCR-ABL, до препарату [10]. Іншими можливими причинами резистентності вважаються клональна еволюція, гіперекспресія білків-транспортних, маркерів проліферативної активності, порушення апоптотичної програми клітин, вплив попереднього лікування, що було показано нами у низці робіт [2, 5, 7, 9].

На сьогоднішній день існують чіткі рекомендації, що стосуються моніторингу ефективності лікування пацієнтів з ХМЛ препаратами ІТК. Вони засновані, перш за все, на проведенні цитогенетичних та молекулярно-генетичних досліджень у певні проміжки часу. Зважаючи на результати наших досліджень з вивчення механізму формування відповіді на терапію ІТК для раннього виявлення предикторів незадовільної відповіді [4], в якості додаткових пропонуються імунологічні клітинно-молекулярні методи дослідження, котрі можна проводити у проміжках часу між стандартизованими дослідженнями, що дозволить у разі виявлення збільшеної експресії показників внести корекцію у діагностичний процес. Разом з тим, ми досліджували кореляційні взаємозв'язки між показниками експресії глікопротеїну Pgp-170, антигену CD 34, маркеру проліферації Ki-67 у периферичній крові та кістковому мозку. Використовуючи кореляційно-регресивний аналіз, ми створили математичну модель, за допомогою якої можна розрахувати досліджуваний показник у кістковому мозку за відповідним показником у периферичній крові, зменшуючи тим самим кількість кістково-мозкових пункцій. Це дозволило б частіше досліджувати імунологічні показники та при необхідності вносити корективи у діагностичний та лікувальний процеси. Отже, мета нашого дослідження - встановити взаємозв'язок між показниками експресії трансмембранного глікопротеїну Pgp-170, антигену CD 34, внутрішньоядерного протеїну Ki-67 у периферичній крові та кістковому мозку для раннього виявлення ознак незадовільної відповіді на лікування хворих з ХМЛ препаратами ІТК.

Матеріал і методи

У дослідженні брали участь 68 пацієнтів на ХМЛ, які лікувалися ІТК першого покоління імаїнібом. У цих пацієнтів вивчали експресію транспортного глікопротеїну Pgp-170, антигену CD 34, маркеру проліферації Ki-67 у кістко-

вому мозку та периферичній крові методом проточної лазерної цитофлуориметрії у прямому імунофлуоресцентному тесті з використанням моноклональних антитіл. Дослідження проводилися на проточному лазерному цитометрі FACScan (Becton Dickinson, USA), що дозволяє враховувати 5 параметрів для кожної клітини: 2 параметри світлорозсіювання – пряме світлорозсіювання (FSC), що відображає розмір клітини і бічне світлорозсіювання (SSC), яке характеризує внутрішньоклітинну структуру клітини, а також 3 параметри флуоресценції залежно від застосовуваних флуорохромів.

Аналіз й обробка даних здійснювалась за допомогою методів математичної статистики. Зокрема, для визначення взаємозв'язків між кількісними показниками, що підлягали нормальному закону розподілу, використовували кореляційний аналіз, розраховуючи коефіцієнт кореляції Пірсона. Для визначення форми взаємозв'язків між кількісними показниками застосовували регресійний аналіз, в результаті чого були отримані відповідні математичні моделі, на основі яких можна визначити прогностичні значення певних показників [1, 3].

Результати та їх обговорення

У результаті виявлення взаємозв'язків між показниками експресії Pgp-170, CD 34, Ki-67 у периферичній крові та кістковому мозку ми отримали відповідні коефіцієнти кореляції Пірсона, що показали високий ступінь взаємозв'язку між ними. Так, між даними експресії CD 33⁺ Pgp-170⁺ у периферичній крові та кістковому мозку $r=0,74$ ($p<0,05$); між показниками експресії CD 34⁺ Pgp-170⁺ $r=0,84$ ($p<0,05$). Високий ступінь кореляційного взаємозв'язку був визначений при дослідженні показника експресії CD 34 у периферичній крові та кістковому мозку, на що вказує розрахований коефіцієнт кореляції Пірсона ($r=0,83$, $p<0,05$). Показник експресії Ki-67 у периферичній крові тісно взаємопов'язаний з аналогічним показником кісткового мозку ($r=0,85$, $p<0,05$). Використовуючи регресійний аналіз, нами були створені математичні моделі типу $y=f(x)$. В якості залежної змінної Y виступає показник кісткового мозку, а в якості незалежної змінної X – відповідний показник периферичної крові. Таким чином були побудовані математичні моделі, за допомогою яких можна визначати усереднене значення показників кісткового мозку, виходячи з фактичних значень відповідних показників периферичної крові. Так, для показника експресії CD33⁺ Pgp-170⁺ математична модель мала такий вигляд: $Y=0,578X+3,564$ (рис. 1). Значення коефіцієнта апроксимації $R^2=0,55$ вказує на високий ступінь достовірності підбраної функції. Для показника експресії CD 34⁺ Pgp 170⁺ математична модель була наступною: $Y=0,827X+1,175$ (рис. 2) (ко-

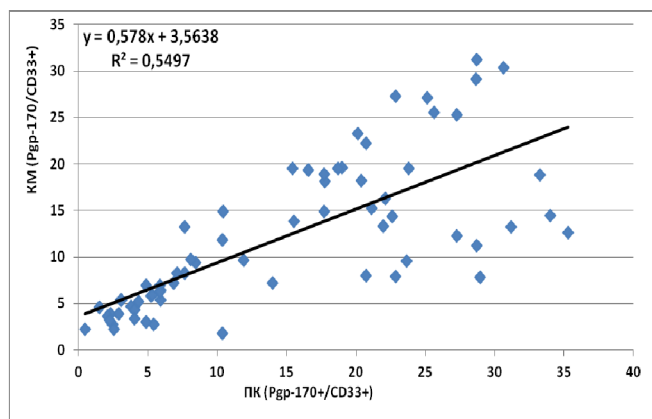


Рис.1. Взаємозв'язок між показником Pgp 170⁺/CD33⁺ кісткового мозку та аналогічним показником периферичної крові

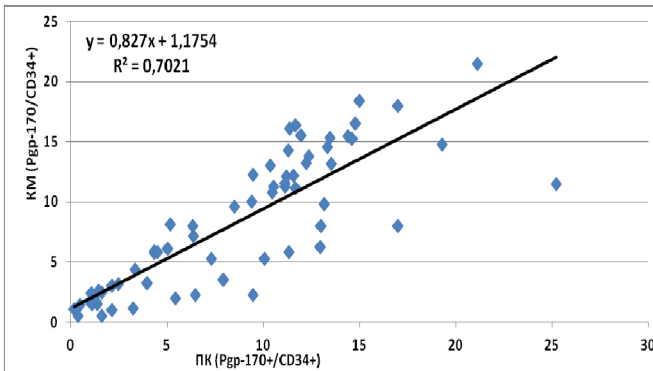


Рис. 2. Взаємозв'язок між показником Pgp 170⁺/CD34⁺ кісткового мозку та аналогічним показником периферичної крові

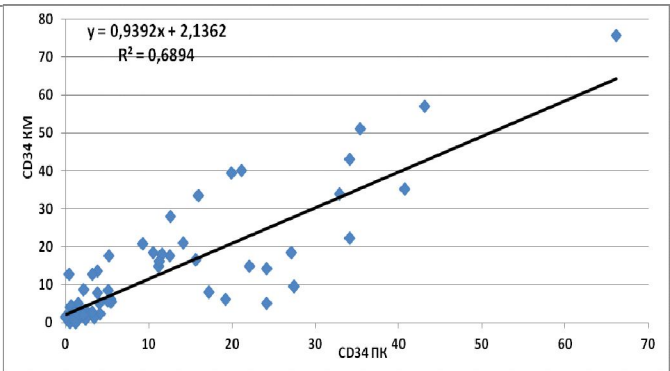


Рис. 3. Взаємозв'язок між показником експресії антигену CD34 кісткового мозку та аналогічним показником периферичної крові

фіцієнт апроксимації $R^2=0,70$). Взаємозв'язок між показником експресії антигену CD 34 кісткового мозку та периферичної крові представлено таким рівнянням: $Y=0,939X+2,136$ (рис. 3) (значення $R^2=0,69$). Кількість клітин у кістковому мозку, що експресують протеїн Ki-67, пов'язана з аналогічним показником у периферичній крові за такою математичною моделлю: $Y=0,944X+5,257$ (рис. 4) при значенні коефіцієнта апроксимації $R^2=0,72$.

Таким чином, використання кореляційного аналізу дало можливість встановити високий ступінь взаємозв'язків між показниками експресії глікопротеїну Pgp 170, антигену CD 34, протеїну Ki-67 у периферичній крові та кістковому мозку. Відомо, що гіперекспресія Pgp-170 пухлинними клітинами асоційована з резистентністю до терапії за рахунок внутрішньоклітинного зниження концентрації медикаментозних препаратів. Підвищена кількість антигену CD 34 може свідчити про те, що з прогресуванням ХМЛ під час набуття клітинами лейкоемічного клону стійкості до ІТК розширюється пул раних клітин-попередників, які у великій кількості потрапляють до кровотоку, сприяючи появі малодиференційованих гемопоетичних клітин у периферичній крові пацієнта [6]. Збільшення експресії внутрішньоклітинного протеїну Ki-67 у хворих на ХМЛ із незадовільною відповіддю на терапію свідчить про високу проліферативну активність лейкоемічних клітин та пов'язане із втраченою чутливістю клітин до дії препаратів, у тому числі таргетної дії. Отже, дані показники мають важливе значення при формуванні відповіді на терапію ІТК у хворих на ХМЛ. Запропоновані нами математичні моделі дозволяють обраховувати значення експресії досліджуваних показників у кістковому мозку пацієнтів, використовуючи фактичні значення аналогічних показників

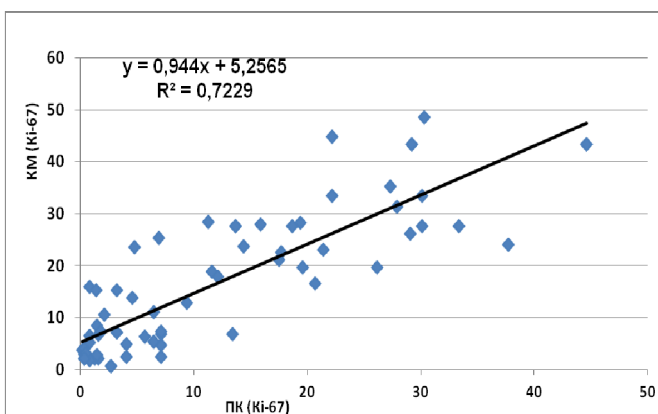


Рис. 4. Взаємозв'язок між експресією Ki-67 клітинами кісткового мозку та периферичної крові

у периферичній крові. Це дозволить частіше досліджувати імунологічні маркери резистентності, що сприятиме своєчасному втручанням в діагностичний процес та підвищенню ефективності лікування. Використання кореляційно-регресійного аналізу дозволить обчислити показники кісткового мозку у пацієнтів з ХМЛ, що слугуватиме зменшенню інвазивних, тобто більш травматичних (стерильна пункція, трепанобіопсія), методів дослідження для визначення глікопротеїну Pgp 170, антигену CD 34, протеїну Ki-67.

Висновки

Для більш глибокого вивчення механізму резистентності до терапії ІТК хворих на ХМЛ та раннього виявлення факторів незадовільної відповіді ми пропонуємо використовувати не лише додаткові імунологічні методи дослідження, а й застосовувати математичні моделі, що сприятиме комплексному дослідженню взаємозв'язків між показниками експресії глікопротеїну Pgp 170, антигену CD 34, протеїну Ki-67 у кістковому мозку та периферичній крові. Це дасть можливість визначити імунологічні показники у проміжках часу між стандартизованими цитогенетичними та молекулярно-генетичними дослідженнями, що дозволить запідозрити первинну або вторинну резистентність на лікування ІТК та своєчасно внести корективи у діагностичну тактику та лікувальний процес.

Перспективи подальших досліджень

На підставі дослідження динаміки показників експресії маркерів резистентності та оцінки ефективності терапії планується встановити прогностичні параметри відповіді на терапію при лікуванні хворих на ХМЛ препаратами ІТК.

Література

1. Гойко О.В. Практичне використання пакета STATISTICA для аналізу медико-біологічних даних: Навч. посібник / О.В. Гойко. – К.: Київська медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, 2004. – 76 с.
2. Експресія апоптоз-асоційованих маркерів у хворих на ХМЛ з різною відповіддю на терапію інгібіторами тирозинкінази / Т.П. Перехрестенко, А.І. Гордієнко, Н.М. Третяк, Є.В. Шороп // Галицький лікарський вісник. – 2013. – Т. 20 (3). – С. 67-70.
3. Жилина Н.М. Приложения математической статистики к медицинским научным исследованиям: учебное пособие / Н.М. Жилина. – Новокузнецк: Изд-во МОУ ДПО ИПК, 2005. – 41 с.
4. Изучение резистентности при лечении больных ХМЛ ингибиторами тирозинкиназы / Т.П. Перехрестенко, А.И. Гордиенко, Н.Н. Третяк, И.С. Дягиль // Гематол. и трансфузиол. (Материалы II конгресса гематологов России, 17-19 апреля, Москва). – 2014. – Т. 59, № 1. – С. 58.
5. Проліферативна активність гемопоетичних клітин у хворих на хронічну мієлоїдну лейкоемію при лікуванні інгібіторами тирозинкінази / Т.П. Перехрестенко, Є.В. Шороп, А.І. Гордієнко

та співавт. // Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П.Л.Шупика. – 2012. – Вип. 21, кн. 4. – С.115-121.

6. A gene expression signature of CD 34+ cells to predict major cytogenetic response in chronic-phase chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib / S.K. McWeeney, L.C. Pemberton, M.M. Loriaux et al. // Blood. – 2010. - 115. – P. 315 – 325.

7. Expression of glycoprotein Pgp-170 by the hemopoietic peripheral blood and bone marrow cells in the CML patients with different response to tyrosine kinase inhibitors therapy / Т. Perekhrestenko, А. Gordienko, I. Dmytrenko et al. // Haematologica. – 2012. - 97(s1). – P. 71.

8. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to

imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity / A.S. Corbin, A. Agarwal, M. Loriaux et al. // J.Clin.Invest. – 2011. – 121 (1). – P. 396-409.

9. The Study of The Influence of Prior Therapy on Response To Tyrosine Kinase Inhibitors Therapy in CML Patients / Т. Perekhrestenko, I. Dyagil, I. Dmytrenko et al. // Haematologica. – 2013. - 98(s1). – P. 566.

10. Suboptimal response to or failure of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia: what is the optimal strategy? / E. Jabbour, J.E. Cortes, H.M. Kantarjian et al. // Mayo Clin Proc. – 2009. – Vol. 84, № 2. – P. 161-169.

Одержано 23.03.2015 року.

УДК: 618.3+616-005.1+618.89+618.174

СТАН СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ У ВАГІТНИХ ПРИ ЗАГРОЗІ ПІЗЬНОГО МИМОВІЛЬНОГО ВИКИДНЮ НА ФОНІ МЕТРОРАГІЇ ТА ВИСХІДНОГО ІНФІКУВАННЯ

О.І. Поліщук, І.П. Поліщук, Н.І. Генік

Івано-Франківський національний медичний університет

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА У БЕРЕМЕННЫХ С УГРОЗОЙ ПОЗДНЕГО НЕПРОИЗВОЛЬНОГО ВЫКИДЫША НА ФОНЕ МЕТРОРРАГИИ И ВОСХОДЯЩЕГО ИНФИЦИРОВАНИЯ

О.И. Полищук, И.П. Полищук, Н.И. Генік

Ивано-Франковский национальный медицинский университет

HEMOSTASIS CONDITION IN PREGNANT WOMEN WITH A THREAT OF LATE SPONTANEOUS MISCARRIAGE ASSOCIATED WITH METRORRHAGIA AND ASCENDING INFECTION

O.I. Polishchuk, I.P. Polishchuk, N.I. Genik

Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine

Резюме. Предмет, тема работи. Стан гемостазиограми при хронічній кровотечі та стан мікробіоценозу піхви у вагітних із загрозою пізнього мимовільного викидня (ЗПМВ).

Мета работи. Визначити стан мікробіоценозу піхви у вагітних з ЗПМВ за наявності хронічної метрорагії й дослідити зміни системи гемостазу

Матеріали і методи. Під спостереженням знаходилось вагітні жінки із початковим пізнім мимовільним викиднем. У дослідженні використовувались такі методи: клінічні, мікробіологічні, гемостазіологічні та статистичні.

Результати работи. У ході дослідження виявлено, що у жінок при загрозі пізнього мимовільного викидня за наявності хронічної метрорагії знижується чисельність лакто бактерії і збільшується ріст облигатних та факультативних анаеробів. Причому із пролонгацією кровотечі мікроекосистема піхви, тільки погіршується й виникає ризик розвитку висхідного інфікування плода і, як наслідок, втрати вагітності.

Висновок. Локальна запальна відповідь на виникле інфікування проявляється активацією згортальної системи крові. Генералізована гіперкоагуляція на фоні зниження фібринолітичних властивостей крові призводить до розвитку хронічного ДВЗ-синдрому. У свою ж чергу більшість компонентів коагуляційного каскаду стимулюють запальну відповідь. Отже метрорагію під час ЗПМВ слід розглядати як грізний фактор, що спричиняє зміни мікроекосистеми піхви та сприяє висхідному інфікуванню плаценти і плода й вимагає специфічних антиінфекційних заходів та використання антигеморагічних засобів.

Ключові слова: невинювання вагітності (НВ), метрорагія, висхідне інфікування.

Резюме. Предмет, тема работы. Состояние гемостазиограммы при хроническом кровотечении и состоянии микробиотоза влагалища у беременных с угрозой позднего непроизвольного выкидыша (УПНВ).

Цель работы. Определить состояние микробиотоза влагалища у беременных с УПНВ при наличии хронической метроррагии и исследовать изменения системы гемостаза.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось беременные женщины с УПНВ. В исследовании использовались следующие методы: клинические, микробиологические, гемостазиологических и статистические.

Результаты работы. В ходе исследования обнаружено, что у женщин с УПНВ при наличии хронической метроррагии снижается численность лактобактерий и увеличивается рост облигатных и факультативных анаэробов. При этом с пролонгацией кровотечения микроэкология влагалища только ухудшается и возникает риск развития восходящего инфицирования плода и, как следствие, потери беременности.

Вывод. Локальный воспалительный ответ на возникшее инфицирование проявляется активацией свертывающей системы крови. Генерализованная гиперкоагуляция на фоне снижения фибринолитических свойств крови приводит к развитию хронического ДВЗ-синдрома. В свою же очередь большинство компонентов коагуляционного каскада стимулируют воспалительный ответ. Следовательно метрорагию при УПНВ следует рассматривать как грозный фактор, который вызывает изменения микроэкологии влагалища и способствует восходящему инфицированию плаценты и плода и требует специфических антиинфекционных мероприятий