

УДК 57.085.23+616.71-018.46-006

Д. І. Білько¹, канд. біол. наук,

І. О. Жалейко¹,

Т. П. Перехрестенко², канд. мед. наук,

І. С. Дягіль³, д-р мед. наук

ВИЗНАЧЕННЯ РИЗИКУ РЕЦИДИВУ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ ЗА ПОКАЗНИКАМИ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ІНДЕКСУ SOKAL

¹ Центр молекулярних та клітинних досліджень Національного університету «Киево-Могилянська академія», Київ,

² ДУ «Інститут гематології та трансфізіології НАМН України», Київ,

³ ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) — це клональне мієлопроліферативне захворювання, що характеризується походженням усього лейкемічного клону з однієї непластично трансформованої стовбурової клітини. Причиною трансформації є поява в кровотворній клітині реципрокної транслокації між 9-ю та 22-ю хромосомами. Утворену при цій перебудові дериватну 22-гу хромосому називають філадельфійською (Ph) [7; 9]. На молекулярному рівні транслокація супроводжується формуванням химерного онкогену BCR-ABL, що кодує онкобілок BCR-ABL-тирозинкіназу, яка має здатність фосфорилювати білки, що беруть участь практично в усіх процесах життєдіяльності клітини [6; 7]. У результаті такої трансформації у клітинах лейкемічного клону процеси проліферації переважають над процесами диференціювання, і, як наслідок, порушується нормальна ієрархія клітин, а з часом бластні клітини лейкемічного клону витісняють пул нормальних гемопоетичних клітин [7].

Сьогодні замість знищення всіх мієлоїдних клітин за допомогою неспецифічного цитостатичного впливу почали застосовувати терапію інгібітора-

ми тирозинкінази (ТКІ), тобто лікування препаратами таргетної дії. До першого покоління ТКІ належить Іматиніб мезилат, який конкурує з АТФ у його специфічному сайті зв'язування на BCR-ABL-тирозиновій кіназі. Діючи вибірково, він блокує підвищену проліферативну активність і стимулює апоптоз лише лейкемічних клітин [9].

Однак клітини лейкемічного клону можуть мати нестабільний геном, внаслідок чого у гені BCR-ABL може відбутися мутація, котра призведе до зміни конформації BCR-ABL-тирозинкінази. Тоді Іматиніб втрачає здатність блокувати її, і клітини набувають резистентності до препарату [9]. Вкрай необхідними є своєчасне виявлення розвитку нечутливості до Іматинібу та корекція лікувальної тактики хворого, тому розробка адекватних методів моніторингу індивідуальної відповіді пацієнта на терапію препаратами групи ТКІ актуальна.

Метою нашої роботи було порівняння показників функціональної активності клітин кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ, що належать до різних груп ризику відповідно до значення прогностичного індексу Sokal (SI), у культурі клітин *in vitro* із

результатами цитогенетичного моніторингу індивідуальної відповіді хворих на терапію ТКІ.

Матеріали та методи дослідження

Обстежено 53 пацієнти, яким проводилося лікування препаратом групи ТКІ першого покоління — Іматиніб мезилатом. Для підтвердження діагнозу ХМЛ і оцінки ефективності терапії ТКІ використовували клініко-гематологічні показники та визначення процентного вмісту Ph-позитивних метафаз у клітинах кісткового мозку. Відповідно до критеріїв оцінки ефективності терапії ТКІ Європейського співтовариства з лікування лейкемій (The European LeukemiaNet (ELNet), 2010), розрізняють оптимальну, субоптимальну відповідь і відсутність відповіді на терапію ТКІ у певні терміни [2]. Оптимальна відповідь на лікування полягає у досягненні цілковитої відсутності у кістковому мозку Ph⁺-клітин після 12 міс. прийому препаратів ТКІ. Субоптимальною вважають відповідь за наявності у кістковому мозку хворого Ph⁺-клітин у кількості від 1 до 35 % на 12-й місяць лікування, відсутність відповіді на терапію — за наявності у кіст-

ковому мозку хворого 95–100 % Ph⁺-клітин.

Залежно від групи ризику, яка визначалася шляхом підрахунку прогностичного SI під час встановлення діагнозу, пацієнтів було розділено на три групи: пацієнти з низьким ризиком (SI<0,8), пацієнти з проміжним ризиком (SI=0,8–1,2) та пацієнти з високим ризиком (SI>1,2) [8]. Індекс Sokal підраховували за формулою:

$$SI = 0,0116 \cdot (B_p - 43,4) + 0,0345 \cdot (P_c - 7,51) + 0,188 \cdot [(T \div 700) \cdot 2 - 0,563] + 0,0887 \cdot (B - 2,10),$$

де B_p — вік пацієнта в роках; P_c — розмір селезінки нижче краю реберної дуги, см; T — кількість тромбоцитів; B — кількість бластів.

Одночасно з рутинним для ХМЛ обстеженням досліджували функціональну активність мононуклеарів кісткового мозку пацієнтів у напіврідкому агарі ("Difco", США) концентрацією 0,33 % у культурі клітин *in vitro* із додаванням гранулоцитомакрофагального колоніестимулювального фактора росту (GM-CSF ("Sigma", США)) у концентрації 50 нг/мл, 20 % фетальної телячої сироватки ("Sigma", США) і антибіотиків (50 МО/мл пеніцилін, 50 мг/мл стрептоміцин). Культивування здійснювали у 24-комірковому планшеті (Nunc, США) за температури 37 °С, умов абсолютної вологості та 5 % CO₂. Функціональна активність визначалася шляхом підрахунку клітинних агрегатів на 14-ту добу культивування. За кластер приймали клітинні агрегати, до складу яких входило не більше 40 клітин, а за колонію — клітинні агрегати, що містили від 40 до кількох сотень клітин.

Результати дослідження та їх обговорення

Той факт, що сучасні терапевтичні засоби, які застосовуються при ХМЛ, вибірково впливають на клітини-попередники кісткового мозку [2; 6],

спонукав вчених досліджувати гемопоетичні стовбурові клітини та їх попередники в культурі клітин *in vitro* як критерій оцінки ефективності лікування. Так, у попередніх дослідженнях було показано, що особливості функціональної активності клітин кісткового мозку при ХМЛ мають прогностичне значення для встановлення імовірності отримання ремісії та її глибини або прогресії захворювання [3; 5; 9]. Цей феномен був використаний нами для з'ясування особливостей перебігу ХМЛ під час лікування Іматинібом.

З метою діагностики ХМЛ і моніторингу відповіді на терапію препаратом Іматиніб здійснювали цитогенетичний аналіз клітин кісткового мозку пацієнтів за стандартною методикою на 12-й та 18-й місяці від початку прийому препарату. Результати обстеження на етапі діагностики виявили характерний для ХМЛ цитогенетичний маркер — філадельфійську хромосому. Додаткових хромосомних аномалій у клітинах кісткового мозку досліджуваної групи хворих на ХМЛ не виявлено. Крім того, було встановлено, що у групі з низьким значенням SI на момент дослідження, тобто на 12-й місяць терапії препаратом Іматиніб, у кістковому мозку Ph⁺-клітин не виявлялося (рис. 1). У свою чергу, у групах із проміжним і високим значенням SI достовірної різниці між кількістю Ph⁺-клітин не було, їхня кількість становила 49 та 52 % відповідно. Подібні результати були оприлюднені у дослідженнях A. Lennard et al. [4].

З метою встановлення функціональної активності клітин кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ культивували гемопоетичні стовбурові клітини та їх попередники у культуральній системі *in vitro*. У результаті підрахунку кількості клітинних агрегатів на 14-ту добу культивування у напіврідкому агарі *in vitro* виявили, що у групі пацієнтів з низьким значенням SI кількість колоній становила 5,1

(від 4,2 до 6,3) на 1·10⁵ експлантованих клітин (рис. 2). Таку закономірність підтвердили також A. Ashariati et al. [1]. У групі пацієнтів із проміжним значенням SI кількість колоній бу-

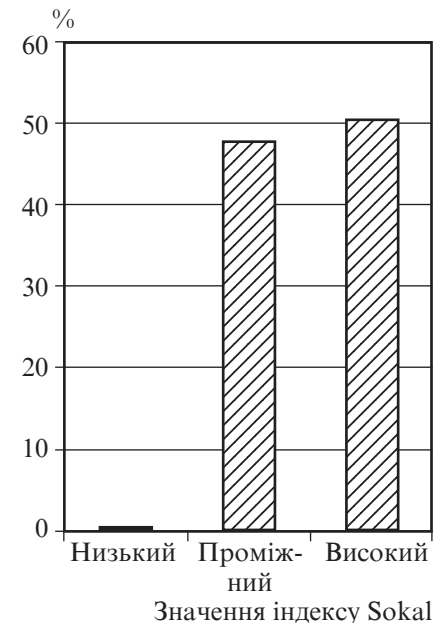


Рис. 1. Кількість клітин, що містять філадельфійську хромосому мозку, у пацієнтів із різним значенням індексу Sokal, %

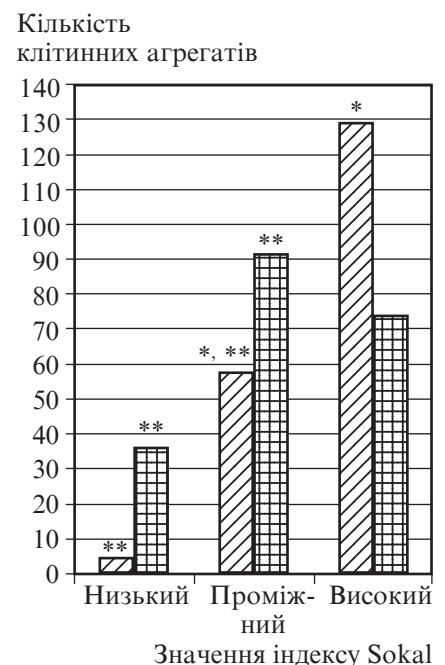


Рис. 2. Функціональна активність клітин кісткового мозку у пацієнтів з різним значенням індексу Sokal на 12-й місяць терапії препаратом Іматиніб: *, ** — відмінності між порівнюваними показниками статистично вірогідні (p<0,05)

ла в 11 разів більшою та становила 57,9 (від 44,1 до 67,6) на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин. У свою чергу, у групі з високим значенням SI кількість колоній в 2,3 разу була більшою, ніж у групі з проміжним значенням SI, і дорівнювала 129,8 (від 66 до 142,5) на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин.

На відміну від колонієутворювальної активності гемопоетичних стовбурових клітин та їх попередників пацієнтів різних груп, кластероутворювальна активність клітин кісткового мозку хворих дещо відрізнялася. Так, кількість кластерів у групі з низьким значенням SI становила 36,1 (від 19 до 24) на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин. У пацієнтів з проміжним значенням SI середня кількість кластерів була найвищою і сягала 91,6 (від 29 до 198) на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин. У групі хворих, які на момент встановлення діагнозу мали високе значення SI, середня кількість кластерів була дещо меншою і становила

73,9 (коливалася в межах 39–156) на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин.

За даними деяких авторів, зміна функціональної активності клітин-попередників кісткового мозку є специфічним маркером лейкемічної трансформації, та може спостерігатися й при деяких нейтропеніях, а також апластичній анемії [5; 9]. Саме тому, у даному дослідженні ми вважали за доцільне порівняти функціональну активність гемопоетичних стовбурових клітин та їх попередників у пацієнтів на 12-й місяць терапії препаратом Іматиніб зі значенням SI на момент встановлення діагнозу та результатами цитогенетичного дослідження клітин кісткового мозку на 12-й та 18-й місяці від початку лікування. У результаті порівняння було встановлено, що між кількістю гранулоцито-макрофагальних кластерів у культурі *in vitro* та індивідуальною відповіддю пацієнта на терапію жодної залежності не спостерігалось (табл. 1).

Натомість виявилось, що у пацієнтів із низьким показником SI спостерігаються невелика кількість колоній та оптимальна відповідь на терапію препаратом Іматиніб на 12-й місяць і збереження її на 18-й місяць від початку лікування. Наводимо такий приклад: у пацієнта із групи низького значення SI у культурі невелика кількість колоній (7,0 на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин) та субоптимальна відповідь на терапію після 12 міс. лікування, однак на 18-й місяць від початку прийому препарату відповідь стала оптимальною, тобто у кістковому мозку цього пацієнта не виявлялося Ph⁺-клітин. У цьому разі вирішальну роль відіграв вплив попереднього хіміотерапевтичного лікування впродовж 15 міс. до початку терапії ТКІ, що свідчить про його негативний вплив на своєчасну відповідь. У пацієнтів із проміжним значенням SI середня кількість колоній становила 57,9, а відповідь на лікування Імати-

Таблиця 1

Залежність подальшої відповіді клітин кісткового мозку на терапію від кількості колоній у культурі *in vitro* та значення індексу Sokal на момент встановлення діагнозу хронічної мієлоїдної лейкемії

Значення індексу Sokal	Кількість колоній у культурі клітин <i>in vitro</i>	Кількість кластерів у культурі клітин <i>in vitro</i>	Цитогенетична відповідь на 12-й місяць терапії	Цитогенетична відповідь на 18-й місяць терапії
Терапія препаратом Іматиніб мезилат				
Низький	6,0	21,0	Оптимальна	Оптимальна
Низький	4,4	10,0	Оптимальна	Оптимальна
Низький	5,0	6,5	Оптимальна	Оптимальна
Низький	7,0	16,0	Субоптимальна	Оптимальна
Проміжний	57,0	51,0	Оптимальна	Неефективність
Проміжний	73,5	28,5	Субоптимальна	Неефективність
Проміжний	61,0	5,0	Субоптимальна	Неефективність
Високий	142,5	69,1	Неефективність	Неефективність
Високий	89,7	8,0	Субоптимальна	Неефективність
Високий	188,0	35,2	Субоптимальна	Неефективність
Високий	122,5	171,5	Неефективність	Неефективність
Альтернативне лікування гідроксисечовиною				
Низький	98,5	94,5	Субоптимальна	Оптимальна
Високий	10,25	78,3	Неефективність	Неефективність

нібом на 12-й місяць терапії була оптимальною чи субоптимальною, однак на 18-й місяць лікування цим препаратом виявилось неефективним у частини пацієнтів. У групі пацієнтів із високим значенням SI спостерігалася висока кількість колоній, а на 12-й місяць терапії Іма-тинібом відзначалася неефективність чи субоптимальна відповідь у більшості випадків.

В експериментах також було показано, що у пацієнтів, які отримували альтернативне лікування гідроксисечовиною, залежності між кількістю колоній у культурі клітин *in vitro* та індивідуальною відповіддю на терапію не спостерігалось.

Висновки

На основі проведених досліджень виявилось, що існує залежність між SI, який розраховується на момент встановлення діагнозу, та кількістю колоній у культурі клітин *in vitro* для пацієнтів, яким проводять лікування препаратами групи ТКІ. У пацієнтів, що отримують альтернативне лікування гідроксисечовиною, такої залежності не виявлено. Виходячи з отриманих даних та опублікованих у літературі результатів щодо

позитивної кореляції SI з рівнем експресії *BCR-ABL* [1], ми можемо зробити припущення, що запропоновані нами додаткові критерії оцінки функціональної активності клітин кісткового мозку знаходяться у позитивній кореляції з SI-прогнозом отримання адекватної та своєчасної відповіді на лікування інгібіторами тирозинкінази та прогностичної значущості розвитку рецидиву. Такі дані спонукають до подальшого вивчення корелятивного співвідношення між показниками відповіді на терапію та ефективністю колонієутворення у культурі клітин при ХМЛ у динаміці спостереження.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Ashariati A.* Profile of *BCR-ABL* transcript levels based on Sokal Prognostic Score in chronic myeloid leukemia patients treated with Imatinib / A. Ashariati, S. Ugroseno // *Acta Med. Indones-Indones J. Intern. Med.* – 2013. – Vol. 45, N 2. – P. 107–113.
2. *Baccarani M.* Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet / M. Baccarani, G. Saglio, J. Goldman // *Blood.* – 2006. – Vol. 108, N 6. – P. 1809–1820.
3. *Hughes T. P.* Frequency of major molecular response to imatinib or inter-

feron alpha plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia / T. P. Hughes, J. Kaeda, S. Brandford // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 349. – P. 1423–1432.

4. *Collection of Philadelphia-negative peripheral blood progenitor cells in unselected patients with chronic granulocytic leukaemia.* Northern Regional Haematology Group / A. Lennard, N. Storey, A. M. Dickinson [et al.] // *Leukemia.* – 1988. – Vol. 12, N 5. – P. 746–752.

5. *Lidbeck J.* Studies on Hemopoietic Dysplasia (the Preleukemic Syndrome) / J. Lidbeck // *Acta Medica Scandinavica.* – 1980. – Vol. 208. – P. 459–462.

6. *Marley S. B.* Chronic myeloid leukaemia: stem cell derived but progenitor cell driven / S. B. Marley, M. Y. Gordon // *Clin. Sci.* – L., 2005. – Vol. 1, N 109. – P. 13–25.

7. *Seke Etet P. F.* Signaling pathways in chronic myeloid leukemia and leukemic stem cell maintenance: Key role of stromal microenvironment / P. F. Seke Etet, L. Vecchio, A. H. Nwabo Kamdje // *Cellular Signalling.* – 2012. – Vol. 24. – P. 1883–1888.

8. *Sokal J. E.* Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia / J. E. Sokal, E. B. Cox, M. Baccarani // *Blood.* – 1984. – Vol. 63. – P. 789–799.

9. *Dynamics of chronic myeloid leukemia response to long-term targeted therapy reveal treatment effects on leukemic stem cells* / M. Tang, M. Gonen, A. Quintas-Cardama [et al.] // *Blood.* – 2011. – Vol. 118, N 6. – P. 1622–1631.

УДК 57.085.23+616.71-018.46-006

Д. І. Білько, І. О. Жалейко, Т. П. Перехрестенко, І. С. Дягіль

ВИЗНАЧЕННЯ РИЗИКУ РЕЦИДИВУ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ ЗА ПОКАЗНИКАМИ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ІНДЕКСУ SOKAL

Досліджено функціональну активність клітин-попередників кісткового мозку при терапії препаратами групи інгібіторів тирозинкінази. Встановлено, що існує залежність між індексом Sokal, який розраховується на момент встановлення діагнозу, та кількістю колоній у культурі клітин *in vitro* для пацієнтів, що отримують лікування препаратами цієї групи у динаміці спостереження: що вищий індекс Sokal, то більша кількість колоній виявляється у культурі. Залежності між індексом Sokal і кількістю кластерів у культурі *in vitro* виявлено не було.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія, культура клітин *in vitro*, інгібітори тирозинкінази, індекс Sokal.

UDC 57.085.23+616.71-018.46-006

D. I. Bilko, I. O. Zhaleiko, T. P. Perekhrestenko, I. S. Dyagil
THE DETERMINATION OF THE RELAPSE RISK OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA USING THE INDICATORS OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF BONE MARROW AND SOKAL INDEX

The functional activity of progenitor cells in the bone marrow under the first-line tyrosine kinase inhibitors therapy was investigated. The results show that there is a correlation between Sokal index, calculated at the time of diagnosis, and the number of colonies in cell culture *in vitro* for patients who were treated with tyrosine kinase inhibitors therapy. The higher the rate of Sokal index, the greater the number of colonies detected in culture. The dependency between Sokal index and the number of clusters in culture *in vitro* has not been identified.

Key words: chronic myeloid leukemia, cell culture *in vitro*, tyrosine kinases inhibitors, Sokal index.