

Г. С. Маслак¹, Н. С. Паша², О. В. Костюк¹, О. З. Бразалук¹, П. Ю. Каплан²

ВПЛИВ ПРОТИПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ НА ВМІСТ ГЛІКОПРОТЕЇНІВ У ПЛАЗМІ КРОВІ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ЛІМФОЇДНИЙ ЛЕЙКОЗ

¹ ДЗ «Дніпропетровська медична академія», Дніпропетровськ, Україна,

² КЗ «Дніпропетровська міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4» ДОР,
Дніпропетровськ, Україна

УДК 616.155.392-036.1-08:615.277:577.112.85

А. С. Маслак¹, Н. С. Паша², О. В. Костюк¹, А. З. Бразалук¹, П. Е. Каплан²

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ГЛИКОПРОТЕИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

¹ ГУ «Днепропетровская медицинская академия», Днепропетровск, Украина,

² КУ «Днепропетровская городская клиническая больница № 4» ДОР, Днепропетровск, Украина

Исследовали уровни альфа-1 кислого гликопротеина (АГП), фибронектина и их взаимосвязь с биохимическими параметрами в плазме крови больных хроническими лимфоидными лейкозами (ХЛЛ) до лечения и после первого курса химиотерапии по схемам СНОР (циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон) и FC (флударабин, циклофосфамид). В крови больных ХЛЛ на (30,5±3,0) % снижается содержание фибронектина и на (30,9±1,8) % возрастает уровень АГП. Под действием СНОР-терапии возрастают содержание АлАТ, количество тромбоцитов и уровень фибронектина, а содержание АГП снижается на (35,2±2,2) %. После FC-лечения значительно снижаются содержание АсАТ, количество лейкоцитов и АГП, а уровень фибронектина остается неизменным. Коэффициент ФН/АГП в плазме крови может быть использован для оценки результатов терапии ХЛЛ.

Ключевые слова: альфа-1 кислый гликопротеин, фибронектин, хронический лимфоидный лейкоз, СНОР-терапия, FC-терапия.

UDC 616.155.392-036.1-08:615.277:577.112.85

G. S. Maslak¹, N. S. Pasha², O. V. Kostyuk¹, O. Z. Brazaluk¹, P. Yu. Kaplan²

EFFECT OF ANTICANCER DRUGS ON THE CONTENT OF GLYCOPROTEINS IN THE PLASMA OF PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOID LEUKEMIA

¹ SI "Dnipropetrovsk Medical Academy", Dnipropetrovsk, Ukraine,

² CI "Dnipropetrovsk Municipal Multiprofile Clinical Hospital N 4" DOR, Dnipropetrovsk, Ukraine

Actuality. An actual problem of modern hematology is the diagnosis and treatment of chronic lymphoid leukemia (CLL). Despite the fact that a great number of new groups of anticancer drugs have recently appeared, the foundation of most CLL chemotherapy regimes in Ukraine, as before, are alkylating agents CHOP-therapy (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone), which are often toxic. The most effective and the one that causes the least serious adverse events are considered combination with fludarabine and cyclophosphamide (FC-therapy).

The main **task** of the study was to investigate the levels of alpha-1-acid glycoprotein (AGP), fibronectin (FN) and their correlation with biochemical parameters in plasma of patients with chronic lymphoid leukemia before treatment and after the first course of chemotherapy with CHOP and FC.

Materials and Methods. In the blood of patients with CLL the fibronectin level reduces by (30.5±3.0)% and the alpha-1-acid glycoprotein level increases by (30.9±1.8)%. Under the influence of CHOP-therapy ALT, platelet count and the level of fibronectin increased, and the content of alpha-1-acid glycoprotein reduced by (35.2±2.2)%. After the FC-treatment the number of leukocytes and AGP reduced significantly, but fibronectin level remained unchanged. Coefficient of ratio FN/AGP in plasma of CLL patients before treatment was 0.25 and was to the control values at CHOP-therapy. Coefficient of ratio FN/AGP in plasma is doubled when FC-therapy was used. FC-treatment was the most effective against reducing the number of leukocytes.

Results. Since the reducing tumor cells number is the major task in the treatment of patients with chronic lymphoid leukemia, the ratio FN/AGP can be used to evaluate the results of therapy.

Key words: alpha 1-acid glycoprotein, fibronectin, chronic lymphocytic leukemia, CHOP-therapy, FC-therapy.

Хронічний лімфоїдний лейкоз (ХЛЛ) — зріла лімфоїдна пухлина периферичних органів імунної системи, морфологічним субстратом якої є лейкоцитні В-клітини з низькою про-

ліферативною активністю, які не здатні до апоптозу, що призводить до їх нагромадження. Актуальною проблемою сучасної гематології є діагностика та лікування ХЛЛ [1].

Основа більшості режимів поліхіміотерапії (ПХТ) ХЛЛ в Україні становлять алкілюючі препарати (циклофосфамід, хлорамбуцил та ін.) — найбільш вивчений клас цито-



статиків. До комбінованих лікувальних схем на основі цих препаратів належать поєднання циклофосфаміду з вінкристином і преднізолоном (COP), циклофосфаміду, доксорубіцину, вінкристину та преднізолону (CNOP) і CNOP, які дозволяють збільшити кількість повних ремісій до 15–60 % залежно від стадії хвороби. Суттєвим недоліком даного виду терапії хворих на ХЛЛ є висока токсичність вибраних препаратів [2].

Найбільш ефективним і таким, що викликає найменш серйозні побічні явища, вважається поєднання флударабіну з циклофосфамідом (FC-терапія) [3]. Хоча в сучасній літературі ці дві лінії хіміотерапій в основному порівнюються з точки зору токсичності й ефективності впливу на пухлинні клони клітин [4], зовсім відсутня інформація щодо молекулярно-біологічних процесів, які їх супроводжують, а саме щодо вмісту білків та інших компонентів у плазмі крові, до яких належать α_1 -кислий глікопротеїн (АГП), фібронектин (ФН).

Метою роботи було дослідження рівнів АГП, ФН та їх взаємозв'язку з біохімічними параметрами в плазмі крові хворих на ХЛЛ до лікування та після проведення першого курсу хіміотерапії за схемами CNOP та FC.

Матеріали та методи дослідження

Матеріалом для дослідження слугувала плазма крові хворих на ХЛЛ віком 58–66 років у стадії II–III згідно з класифікацією K. R. Rai. Пацієнти до лікування входили до групи I (n=25), далі залежно від схеми лікування їх поділили на групу II — за програмою CNOP (n=13); групу III — за програмою FC (n=12). Групу контролю утворили гематологічно здорові волонтери (n=20) віком від 55 до 65 років. Усі пацієнти проходили лікування у спеціалізованому відділенні онкогематологічного центру КЗ «Міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4» ДОР Дніпропетровська (2011–2012 рр.). Діагноз онкологічних захворювань крові у хворих досліджуваної групи був верифікований згідно із загальноприйнятими клінічними та морфологічними критеріями, що закріплені Наказом МОЗ України № 554 від 17.09.2007 р. «Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю “онкологія”» із доповненнями згідно з Наказом МОЗ України № 645 від 30.07.2010 р. Взяття біологічного матеріалу для досліджень виконували згідно з принципами біоетики та медичної деонтології. Усі обстежувані в письмовому вигляді давали згоду на участь у дослідженні.

Визначення параметрів загального аналізу крові проводили на гематологічному аналізаторі Swelab Alfa (Boule Medical AB, Швеція), біохімічних показників крові — на автоматичному біохімічному аналізаторі FLEXOR E (Vitalab Scientific, Нідерланди).

Концентрацію ФН та АГП у плазмі крові визначали методом імунодоту з використанням поліклональних кролячих антитіл до ФН і АГП відповідно. Отримані результати обробляли за допомогою програми GelProAnalyser 3.1.

Статистична обробка даних виконана за допомогою пакета програм Statistica 6.0. Вірогідність відмінностей у досліджуваних групах встановлювали за t-критерієм Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення

Вимірювання загальних та біохімічних показників крові у здорових донорів і хворих на ХЛЛ показало, що після проведення лікування деякі з них порізному змінюються залежно від вибраної схеми (табл. 1). Так, рівень АлАТ у групі II значно знижувався ($p < 0,01$) до контрольних значень, а в групі III, навпаки, зростав і майже в чотири рази перевищував норму. Рівень АсАТ майже не змінювався у групі II і значно знижувався ($p < 0,01$) у групі III. Оскільки зміни цих біохімічних показників свідчать про пору-

Таблиця 1

Вибрані дані із загального аналізу та біохімічні показники крові гематологічно здорових донорів і хворих на хронічний лімфоїдний лейкоз

Показники, одиниці виміру	Контрольна група, n=20	I група, n=25		II група, n=13	III група, n=12
		I (II)	I (III)		
Кількість еритроцитів (RBC), $\cdot 10^{12}/л$	4,2 \pm 0,4	2,8 \pm 0,1	4,4 \pm 0,8	2,5 \pm 0,2	4,0 \pm 0,6
Вміст гемоглобіну (HGB), г/л	134,3 \pm 13,8	94,7 \pm 5,1	129,5 \pm 22,5	82,3 \pm 5,1	120,5 \pm 19,5
Кількість лейкоцитів (WBC), $\cdot 10^9/л$	5,8 \pm 0,9	176,1 \pm 75,0	32,3 \pm 12,3	139,5 \pm 93,5	3,9 \pm 2,0 [#]
Кількість тромбоцитів (PLT), $\cdot 10^9/л$	235,3 \pm 33,1	88,7 \pm 48,9	166,5 \pm 13,5	129,0 \pm 38,0*	153,0 \pm 12,0
АлАТ, Е/л	12,3 \pm 3,1	53,7 \pm 37,6	39,0 \pm 14,0	16,7 \pm 2,9**	50,0 \pm 23,3
АсАТ, Е/л	15,0 \pm 4,0	42,7 \pm 24,2	66,0 \pm 4,0	34,3 \pm 21,8	12,0 \pm 7,7 [#]

Примітка. * — вірогідна різниця між вибіркою групи I (II) — хворі на ХЛЛ до лікування за програмою CNOP і групою II ($p < 0,05$); ** — при $p < 0,01$; # — вірогідна різниця між вибіркою групи I (III) — хворі на ХЛЛ до лікування за програмою FC і групою III ($p < 0,01$).



Концентрація фібронектину та α_1 -кислого глікопротеїну в плазмі крові гематологічно здорових донорів і хворих на хронічний лімфоїдний лейкоз

Група	Рівень ФН, мкг/мл	Рівень АГП, мг/л	Коефіцієнт співвідношення ФН/АГП	Коефіцієнт кореляції Пірсона між рівнями АГП і ФН
Контрольна, n=20	350,0±12,9	820,0±59,8	0,43	-0,36
Група I, n=25	268,0±18,9*	1074,0±72,6*	0,25	-0,14
Група II, n=13	347,0±10,4	697,0±26,6	0,72	-0,46
Група III, n=12	266,0±19,0*	484,0±20,1*	0,38	0,6

Примітка. * — вірогідна різниця між вибірками порівняно з нормою ($p < 0,05$).

шення функціонування печінки або серця, можна зробити висновок, що використання FC-або СНОР-терапій по-різному впливає на організм хворого на ХЛЛ. Показники загального аналізу крові також розрізнялися залежно від типу обраної терапії: кількість тромбоцитів підвищувалася на 44,9 % під дією СНОР-терапії і не змінювалася внаслідок FC-лікування. За результатами зниження кількості лейкоцитів FC-терапія є більш дієвою (див. табл. 1).

Показник рівня ФН в плазмі крові хворих на ХЛЛ до терапії (група I) був вірогідно ($p < 0,05$) нижчим, ніж у контрольній групі (табл. 2). Фібронектин є основним компонентом екстрацелюлярного матриксу. За його концентрацією можна оцінити швидкість процесів протеолізу міжклітинного матриксу, яка значно змінюється за умов розвитку проліферативних процесів [5]. За даними, отриманими в нашій лабораторії, при хронічних мієлопроліферативних захворюваннях (еритремія) також спостерігається зниження рівня ФН, а при гострому лейкозі цей показник не змінюється [6; 7].

Дослідження рівня ФН після проведення ПХТ показало, що він змінювався по-різному залежно від схеми лікування (рис. 1). Так, СНОР-терапія нормалізувала цей показник, він майже не відрізнявся від значень, отриманих у контрольній групі, а FC-терапія не впливала на рівень ФН, який залишався у тому самому діапазоні, що й до лікування. Щодо впливу ПХТ на рівень ФН відомо небагато. Досліджено, що фібронектинові фрагменти можуть сприяти ретровірусній передачі глутатіон-S-трансферази гена π в CD34⁺-клітинах для захисту їх від алкілюючих агентів [8]. Оскільки СНОР-терапія належить до алкілюючих схем лікування, можливо, підвищення рівня ФН і пов'язане зі збільшенням кількості його фрагментів, що свідчить про

включення захисних механізмів у організмі хворого внаслідок введення токсичних препаратів. Крім того, відомо, що RGD-фібронектинові фрагменти відповідають за адгезію тромбоцитів [5]. Проведений нами розрахунок критерію Пірсона (r) між рівнем ФН та кількістю тромбоцитів показав, що до лікування хворих ці показники не пов'язані ($r=0,25$), проте після введення хворому хіміотерапевтичних препаратів за схемами FC або СНОР виявлявся негативний кореляційний зв'язок, що становив -0,45 та -0,91 відповідно (див. рис. 1).

Рівень АГП у плазмі крові хворих на ХЛЛ до лікування вірогідно ($p < 0,05$) підвищувався. За нашими даними, при еритремії цей показник у плазмі крові знижується на (32,3±0,6) %, а за умов гострих лейкозів, як і при ХЛЛ, зростає майже вдвічі [6; 7], що, можливо, свідчить про його залежність від типу патологічного процесу.

Проведення ПХТ за схемами FC та СНОР приводило до зниження рівня АГП порівняно з контролем і з групою хворих до лікування. α_1 -Кислий глікопротеїн — гострофазовий білок, зміна концентрації та властивостей якого свідчить про порушення з боку медіаторної та гуморальної регуляції механізмів мобілізації захисних реакцій організму. Існує думка, що підвищення експресії АГП пов'язане саме із блокуванням імунної відповіді завдяки активації проліферації пухлинних клітин, тому зниження його рівня при проведенні лікування може бути наслідком

а за умов гострих лейкозів, як і при ХЛЛ, зростає майже вдвічі [6; 7], що, можливо, свідчить про його залежність від типу патологічного процесу.

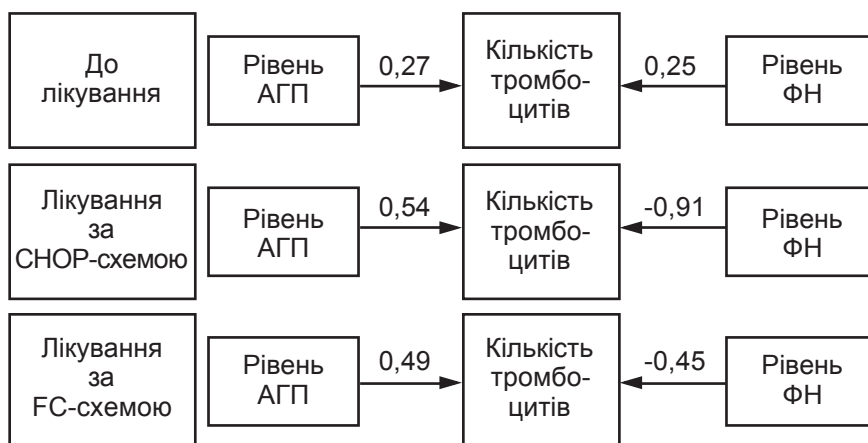


Рис. 1. Коефіцієнти кореляції Пірсона (r) між рівнями α_1 -кислого глікопротеїну і фібронектину та кількістю тромбоцитів



пригнічення процесів проліферації за умов ХЛЛ. Крім того, відома дія АГП, спрямована на зниження адгезії й агрегації тромбоцитів, що, за даними літератури, є протилежною дією ФН [9]. Розрахунок коефіцієнта кореляції між кількістю тромбоцитів і рівнем АГП показав, що якщо до лікування хворих $r=0,27$, то після проведення ФС- або СНОР-терапій визначався кореляційний зв'язок, який дорівнював 0,49 і 0,54 відповідно (див. рис. 1).

Отже, у хворих на ХЛЛ на $(30,5 \pm 3,0)$ % знижується вміст ФН та на $(30,9 \pm 1,8)$ % зростає рівень АГП. Отримані дані загального та біохімічного аналізів крові у цих пацієнтів відповідають загальноприйнятим межах, визначеним для ХЛЛ. Показано, що при введенні хіміотерапевтичних препаратів по-різному змінюються як показники біохімічного аналізу, так і вміст досліджуваних білків. Так, під дією СНОР-терапії зростають показник АЛАТ, кількість тромбоцитів і рівень ФН, а вміст АГП знижується на $(35,2 \pm 2,2)$ %. Внаслідок ФС-лікування значно знижуються вміст АСАТ (у 5,5 разу), кількість лейкоцитів (у 8 разів) та АГП (у 2,2 разу), тимчасом як рівень ФН не змінюється.

Оскільки, за даними літератури, ФН й АГП можуть мати протилежну дію, впливаючи на процеси адгезії та агрегації тромбоцитів [5; 9], нами був проведений кореляційний аналіз між цими показниками. Так, між рівнями АГП, ФН і кількістю тромбоцитів виявлені кореляційні зв'язки, що мають найбільше значення після проведення ПХТ, особливо СНОР-терапії. У попередніх роботах нами запропоновано коефіцієнт співвідношення поверхнево-асоційованих ФН/АГП лейкоцитів для діагностики еритремії [6]. Розрахунок коефіцієнта ФН/АГП у плазмі хворих після проведення лікування показав його підвищення до контрольних значень при СНОР-терапії та майже вдвічі — при лікуванні за ФС-схемою, яка є найбільш ефективною за резуль-

татами зниження кількості лейкоцитів. Оскільки саме зниження кількості пухлинних клітин є основним завданням при лікуванні хворих на ХЛЛ, то коефіцієнт співвідношення ФН/АГП може бути використаним для оцінки результатів терапії у пацієнтів із цими захворюваннями.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Вибрані лекції з лабораторної медицини*: ч. I. Гематологічні дослідження / Л. Є. Лаповеці, Г. Б. Лебедь, О. О. Ястремська [та ін.]. — Львів, 2013. — С. 192–193.
2. Семочкин С. В. Бендамустин: новый взгляд на терпию хронического лимфолейкоза и индолентных лимфом // Онкогематология. — 2011. — Спец. вып. — С. 92–98.
3. *The Combination of Fludarabine, Cyclophosphamide, and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in the Treatment of Patients with Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia and Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma* / Ruta Rao, Jamile M. Shammo, Sari H. Enschede [et al.] // *Clinical Lymphoma*. — 2005. — Vol. 6, N 1. — P. 26–30.
4. *Phase III Trial of Fludarabine Plus Cyclophosphamide Compared With Fludarabine for Patients With Previously Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia: US Intergroup Trial E2997* / Ian W. Flinn, Donna S. Neuberg, Michael R. Grever [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. — 2007. — Vol. 25, N 7. — P. 793–798.
5. Pankov R. Fibronectin at a glance / R. Pankov, Kenneth M. Yamahada // *Journal of Cell Science*. — 2002. — N 10. — P. 3861–3863.
6. *Перерозподіл популяції лейкоцитів за експресією фібронектину та альфа-1 кислого глікопротеїну при еритремії* / Г. С. Маслак, І. В. Машейко, А. О. Кулініч [та ін.] // *Одеський медичний журнал*. — 2010. — Т. 122, № 6. — С. 4–5.
7. *Експонування фібронектину та альфа-1 кислого глікопротеїну на поверхні лейкоцитів крові у хворих на гострий лейкоз* / Г. С. Маслак, О. В. Костюк, А. О. Кулініч [та ін.] // *Медична хімія*. — 2011. — Т. 13, № 4 (49). — С. 42–44.
8. *Fibronectin fragment-facilitated retroviral transfer of the glutathione-S-transferase pi gene into CD34+ cells to protect them against alkylating agents* / T. Kuga, S. Sakamaki, T. Matsunaga [et al.] // *Hum Gene Ther.* — 1997. — Nov 1, N 8 (16). — P. 1901–1910.
9. *The orosomucoid 1 protein ($\alpha 1$ acid glycoprotein) is overexpressed in odontogenic myxoma* / Alejandro García-Muñoz, Mario A. Rodríguez, Ronell

Bologna-Molina [et al.] // *Proteome Science*. — 2012. — N 10. — P. 1186–1193.

REFERENCES

1. Lapovetsi L.E., Lebed G.B., Yastremska O.O. Vybrani lektsiyi z laboratornoyi meditsini. Part I. Gematologichni doslidzhennya [Selected lectures on laboratory medicine. Part I. Hematological Research]. Lviv, 2013. 340 p.
2. Semochkin S.V. Bendamustin: New in therapy of chronic lymphoid leukemia and lymphoma. *Onkogematologia* 2011; Special iss.: 92–98.
3. Rao R., Shammo J.M., Enschede S.H., Porter C., Adler S.S., Venugopal P., Gregory S.A. The Combination of Fludarabine, Cyclophosphamide, and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in the Treatment of Patients with Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia and Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma. *Clin Lymphoma* 2005 Jun; 6 (1): 26–30.
4. Flinn I.W., Neuberg D.S., Grever M.R., Dewald G.W., Bennett J.M., Palletta E.M., Hussein M.A., Appelbaum F.R., Larson R.A., Moore D.F. Jr, Tallman M.S. Phase III Trial of Fludarabine Plus Cyclophosphamide Compared With Fludarabine for Patients With Previously Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia: US Intergroup Trial E2997. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25 (7): 793–798.
5. Roumen Pankov, Kenneth M. Yamahada. Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science* 2002; 10: 3861–3863.
6. Maslak G.S., Masheyko I.V., Kylinich A.O., Nikolaienko-Kamyshevaya T.P., Brazaluk A.Z., Shevtsova A.I. Rearrangement of leukocyte population on alpha-1-acid glycoprotein and fibronectin expression in erythremia. *Odeskiy medichnyi zhurnal* 2010; 122 (6): 4–5.
7. Maslak G.S., Kostyuk O.V., Kylinich A.O., Pasha N.S., Brazaluk O.Z. Exponation of fibronectin and alpha-1 acid glycoprotein on the surface of leucocytes of blood in patients with acute leukemia. *Medychna khimiya* 2011; 13; N 4 (49): 42–44.
8. Kuga T., Sakamaki S., Matsunaga T., Hirayama Y., Kuroda H., Takahashi Y., Kusakabe T., Kato I., Niitsu Y. Fibronectin fragment-facilitated retroviral transfer of the glutathione-S-transferase pi gene into CD34+ cells to protect them against alkylating agents. *Hum Gene Ther* 1997; 8 (16): 1901–1910.
9. Alejandro García-Muñoz, Mario A. Rodríguez, Ronell Bologna-Molina, Febe E. Cizares-Raga, Fidel C. Hernández-Hernández, J. Eduardo Farfán-Morales, Juan J. Trujillo, Carlos Licéaga-Escalera and Guillermo Mendoza-Hernández. The orosomucoid 1 protein ($\alpha 1$ acid glycoprotein) is overexpressed in odontogenic myxoma. *Proteome Science* 2012; 10: 1186–1193.

Надійшла 12.08.2013

