

Л. М. Исакова, Г. Н. Дранник, А. И. Гордиенко, Н. Н. Третьяк

Биологическая характеристика опухолевых клеток больных острой миелоидной лейкемией

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Г. М. Бутенко)

It is revealed that, in patients with AML, the amount of CD80⁺ CD33⁺, CD86⁺CD33⁺ monocytes is higher in remission than in the first acute period. This testifies to the activation of mechanisms of control over the expression of costimulatory molecules. It is shown that the duration of the first remission increases at a simultaneous expression of molecules CD80⁺, CD86⁺ on CD33⁺ monocytes of peripheric blood. Restoration of parameters of the T-system of immunity (CD3⁺ CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺ lymphocytes) in patients with AML in a period of remission is revealed.

Острая миелоидная лейкемия (ОМЛ) является заболеванием системы крови, в основе развития которой лежит злокачественная трансформация миелоидных клеток-предшественников. Как правило, ОМЛ сопровождается нарушением противоопухолевого иммунитета. Ведущая роль в реакциях антигенспецифической противоопухолевой защиты принадлежит CD4⁺, CD8⁺ лимфоцитам. Кроме того, эффективность противоопухолевых иммунных реакций во многом зависит от особенностей иммунофенотипического профиля самих опухолевых клеток. Злокачественным клеткам крови свойственна экспрессия мембранных молекул, достаточно активно влияющих на реакции противоопухолевой иммунологической защиты организма. К одним из них относятся костимуляторные молекулы, входящие в семейство В7 (В7-1/CD80, В7-2/CD86). Данные структуры являются сигнальными молекулами, которые способствуют повышению функциональной активности эффекторных клеток с цитотоксическим потенциалом, а также синтезу иммунорегуляторными Т-лимфоцитами спектра цитокинов, участвующих в индукции иммунного ответа [1, 2]. Костимуляторные молекулы усиливают эффекторную функцию цитотоксических лимфоцитов после взаимодействия с лигандом CD28, транслирующим сигнал активации внутрь клетки [1]. Известно, что костимуляторные молекулы экспрессируют антигенпрезентирующие клетки (моноциты/макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты) [2, 3]. Наряду с этим при многих патологических состояниях, в частности при ОМЛ, костимуляторные молекулы несут бластные клетки миеломоноцитарного происхождения. Существует мнение, что низкий уровень экспрессии опухолевыми клетками костимуляторных молекул приводит к их “ускользанию” от иммунологического надзора [4]. Имеются и другие данные, подтверждающие взаимосвязь высокого уровня экспрессии костимуляторных молекул на бластных клетках с неблагоприятным течением ОМЛ [5]. Вместе с тем показано позитивное влияние костимуляторных молекул на индукцию противоопухолевого иммунного ответа [6].

Как видим, сведения относительно роли В7 молекул в индукции противоопухолевой иммунной защиты у больных ОМЛ достаточно противоречивы. Обусловлено это тем, что до настоящего времени недостаточно изучены процессы на молекулярном уровне, происходящие в иммунной системе больных ОМЛ при манифестации заболевания, в частности при взаимодействии лейкоэмических клеток и лимфоцитов. В связи с этим представляются актуальными исследования по изучению механизмов, влияющих на экспрессию самих молекул

CD80, CD86 на злокачественных клетках, а также контролирующих передачу сигнала от костимуляторных молекул через лиганд CD28 [7]. Раскрытие механизмов, управляющих противоопухолевыми иммунными реакциями, необходимо для разработки патогенетически обоснованных подходов к иммунотерапии и прогнозирования течения заболевания у больных ОМЛ.

Цель исследования — определение опухолевых клеток и моноцитов, экспрессирующих молекулы CD80, CD86, а также Т-лимфоцитов, несущих лиганд CD28, в периферической крови (ПК) больных ОМЛ в различные периоды заболевания.

Материал и методы. Объектом исследований были клетки ПК 17 больных ОМЛ, которые находились на обследовании и лечении в отделении заболеваний системы крови Института гематологии и трансфузиологии АМН Украины (зав. проф. Н. Н. Третяк). Больные ОМЛ по ФАБ-классификации распределялись на следующие подварианты лейкемии: М4 — миеломоноцитарная ($n = 8$); М5 — моноцитарная ($n = 9$). Из них 12 человек находились в первом остром периоде (7 женщин и 5 мужчин, в возрасте от 25 до 64 лет; средний возраст $46,1 \pm 3,3$); 5 человек на момент обследования, после проведения химиотерапии по протоколу “7 + 3” (цитарабин, доксирубицин), вышли в ремиссию (3 женщины и 2 мужчин, в возрасте от 28 до 58 лет; средний возраст $40,6 \pm 0,5$).

Диагноз ОМЛ верифицировали на основании клинических признаков заболевания, а также цитоморфологической характеристики бластных клеток согласно ФАБ-классификации и иммунофенотипических критериев, предложенных Европейской группой для иммунологической классификации лейкозиев [8]. Состояние полной ремиссии подтверждалось клиническим статусом больных (отсутствием симптомов интоксикации) и соответствующими лабораторными критериями (нормализацией показателей гемоглобина, тромбоцитов, гранулоцитов и отсутствием бластов в ПК, а также нормоклеточным костным мозгом с количеством бластов, не превышающим 5% порог).

Для оценки коэкспрессии молекул CD80, CD86 на CD13 (маркер миелоидных клеток), CD33 (маркер панмиелоидный и моноцитарный) клетках, а также лиганда CD28 на CD3 лимфоцитах мононуклеары ПК больных ОМЛ и 10 практически здоровых доноров окрашивали в прямом двухцветном иммунофлюоресцентном тесте соответствующими моноклональными антителами (МКА) (фирм “Caltag Laboratories” и “Becton Dickinson”, США), мечеными флюоресцеинизотиоцианатом (FITC) и фикоэритрином (PE). Для контроля уровня неспецифического связывания конъюгатов МКА образцы крови окрашивали мышинными МКА против гемоцианина фиссуреллы (*Keyhole limpet*) субклассов IgG₁ и IgG_{2a}, мечеными соответственно FITC и PE. “Гейты” анализируемых клеток выделяли по переднему и боковому светорассеянию с учетом экспрессии антигенов CD45/CD14.

Сбор данных и статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения LYSYS-II Ver.1.1 (“Becton Dickinson”), WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA) и Microsoft Excel 2000 из пакета Microsoft Office 2000.

Результаты исследований. По данным гемограмм у больных ОМЛ в первом остром периоде отмечено наличие в ПК бластных клеток, содержание которых варьировало от 2,0 до 90,0%, и не соответствующее норме количество лейкоцитов (табл. 1). В 60% случаев снижено количество гранулоцитов и тромбоцитов, что указывает на серьезные изменения системы кроветворения. Количество CD13⁺ и CD33⁺ миелобластов, экспрессирующих костимуляторную молекулу CD80, в среднем было довольно низким (табл. 2). Однако оценка индивидуальных значений свидетельствует о том, что у части больных содержание CD13⁺,

CD33⁺ опухолевых клеток, несущих молекулу CD80, по сравнению со средними величинами было повышенным — в 25 и 16,7% случаев соответственно. Количество CD13⁺, CD33⁺ бластных клеток, экспрессирующих молекулу CD86⁺, в среднем было выше, чем несущих молекулу CD80⁺ (рис. 1, а).

В период полной ремиссии у больных ОМЛ в периферической циркуляции отсутствовали бластные клетки; среднее содержание лейкоцитов, гранулоцитов, моноцитов, а также лимфоцитов и тромбоцитов было в пределах нормативных значений (см. табл. 1). В ПК определялись моноциты, несущие молекулы CD80, CD86, поскольку они потенциально являются субстратными клетками опухоли при М4, М5 подвариантах ОМЛ. По сравнению с первым острым периодом в ПК пациентов в периоде ремиссии повышено количество CD80⁺CD33⁺ моноцитов. Количество CD13⁺ клеток, которые экспрессировали молекулу CD80 было незначительным, что подтверждено анализом средних и индивидуальных значений (см. табл. 2). Из оценки средних значений следует, что у больных в периоде ремиссии количество CD86⁺CD13⁺ клеток и CD86⁺CD33⁺ моноцитов выше, чем у лиц в первом остром периоде (см. табл. 2). Анализ индивидуальных параметров свидетельствует о значительном диапазоне колебаний количества CD86⁺CD33⁺ моноцитов. Выявленные закономерности, характеризующие количественное распределение CD80⁺CD33⁺ и CD86⁺CD33⁺ моноцитов в ПК больного ОМЛ М4 в стадии полной ремиссии представлены на рис. 1, б.

Сравнительная оценка средних значений изучаемых параметров показала, что у больных ОМЛ в первом остром периоде количество CD33⁺ опухолевых клеток (опухолевый клон

Таблица 1. Показатели ПК больных ОМЛ в различные периоды заболевания: средние значения ($M \pm m$) и диапазон колебаний (% позитивных клеток)

Группа	Показатели гемограммы					
	бласты, %	лейкоциты, $1 \cdot 10^9/\text{л}$	гранулоциты, %	моноциты, %	лимфоциты, %	тромбоциты, $1 \cdot 10^9/\text{л}$
Больные ОМЛ						
первый острый период ($n = 12$)	$49,0 \pm 15,3$	$46,1 \pm 10,1$	$26,3 \pm 6,4$	$4,8 \pm 0,7$	$21,7 \pm 3,5$	$123,6 \pm 36,1$
полная ремиссия ($n = 5$)	0	$6,6 \pm 0,7$	$57,8 \pm 4,2$	$7,8 \pm 1,6$	$29,4 \pm 4,1$	$213 \pm 67,5$
Контроль ($n = 10$)	0	4,0 – 8,8	55,0 – 70,0	3,0 – 11,0	25,0 – 40,0	150,0 – 450,0

Таблица 2. Содержание в ПК клеток, экспрессирующих молекулы CD80, CD86, у больных ОМЛ в различные периоды заболевания ($M \pm m$) и индивидуальный диапазон колебаний (% позитивных клеток)

Группа	Количество клеток, несущих CD антигены			
	CD80 ⁺ CD13 ⁺	CD80 ⁺ CD33 ⁺	CD86 ⁺ CD13 ⁺	CD86 ⁺ CD33 ⁺
Больные ОМЛ				
первый острый период ($n = 12$)	$8,0 \pm 3,1$	$7,0 \pm 2,2^*$	$40,6 \pm 8,4$	$39,5 \pm 10,3^*$
полная ремиссия ($n = 5$)	$1,3 \pm 0,5$	$40,2 \pm 22,4^{**}$	$81,0 \pm 4,9$	$63,7 \pm 21,0^{***}$
Контроль ($n = 10$)	$2,6 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,2$	$51,2 \pm 2,9$	$58,2 \pm 2,4$
	0 – 5,4	0 – 2,6	39,4 – 70,7	49,4 – 72,5

* $p < 0,05$, значения достоверны по сравнению с пациентами в периоде ремиссии и лицами контрольной группы. ** $p < 0,05$, значения достоверны по сравнению с лицами контрольной группы. *** $p > 0,05$, значения достоверны по сравнению с лицами контрольной группы.

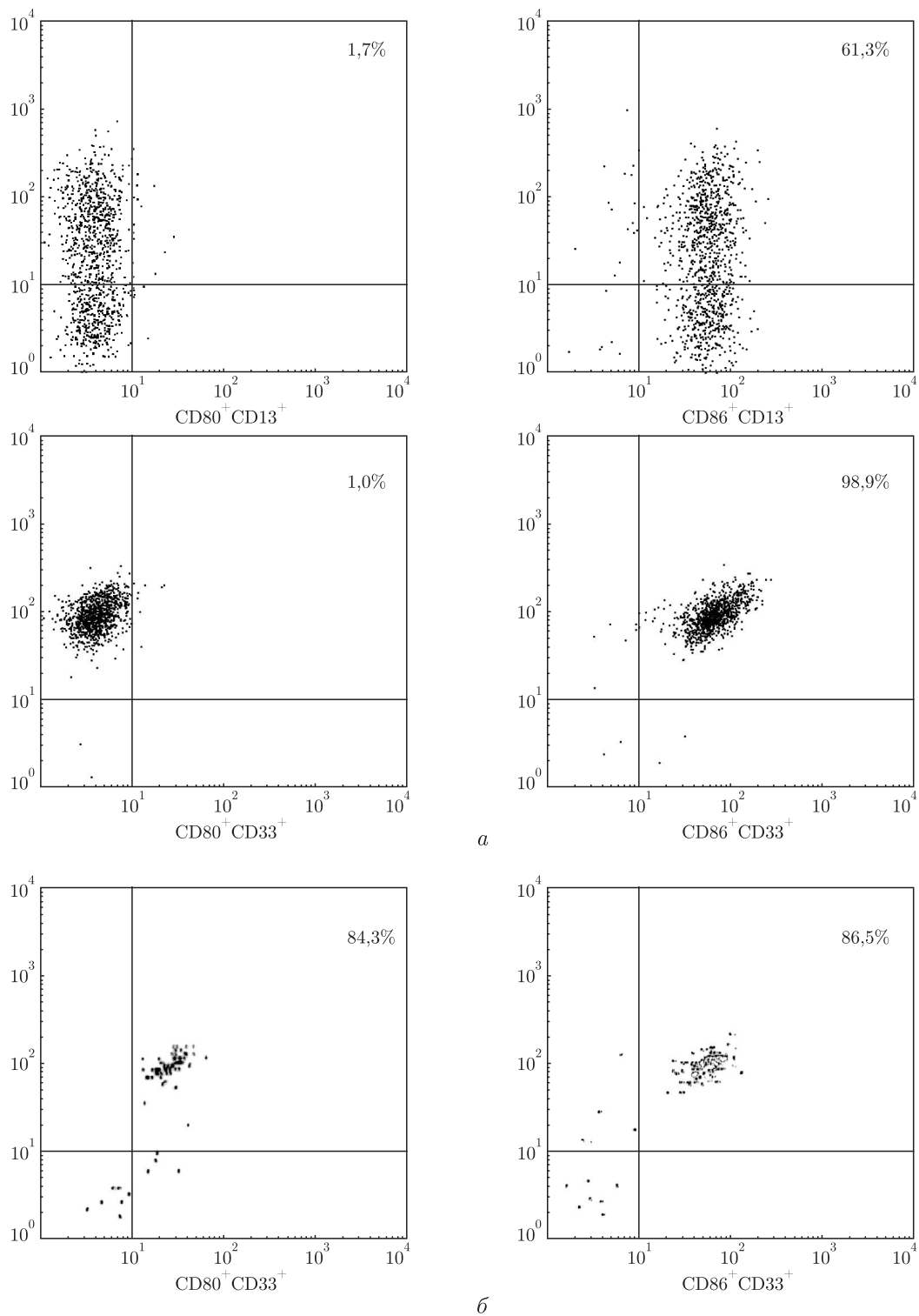


Рис. 1. Количество $CD13^+$ и $CD33^+$ (PE) бластных клеток периферической крови в первый острый период (а) и $CD33^+$ (PE) моноцитов в период полной ремиссии (б), экспрессирующих костимуляторные молекулы CD80, CD86 (FITC), у больных ОМЛ, М4 (миеломоноцитарная лейкемия). На графиках в правом верхнем квадранте указано число $CD13^+$, $CD33^+$ клеток, коэкспрессирующих молекулы $CD80^+$, $CD86^+$

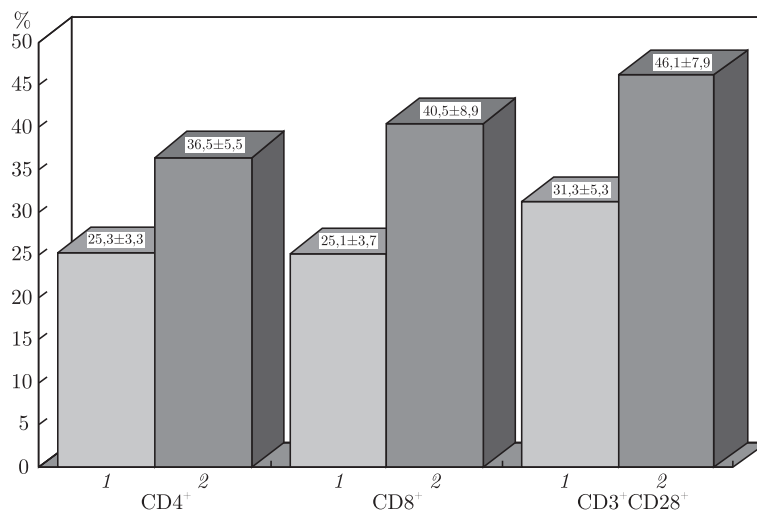


Рис. 2. Количество CD4⁺, CD8⁺ и CD3⁺CD28⁺ лимфоцитов в ПК больных ОМЛ (% позитивных клеток, $M \pm m$) в первый острый период (1) и в период полной ремиссии (2)

моноцитарного происхождения), экспрессирующих молекулы CD80⁺, CD86⁺, соответственно в 5,7 и 1,6 раза ниже, чем у лиц в периоде ремиссии ($p < 0,05$). У больных в первом остром периоде количество CD80⁺CD33⁺ моноцитов в 4,7 раза выше, а CD86⁺CD33⁺ в 1,5 раза ниже, чем у лиц контрольной группы ($p < 0,05$). У пациентов в периоде ремиссии количество CD80⁺CD33⁺ и CD86⁺CD33⁺ моноцитов выше в 26,8 раза ($p < 0,05$) и 1,1 раза ($p > 0,05$) соответственно по сравнению с аналогичными значениями группы контроля.

Таким образом, увеличение количества моноцитов, несущих костимуляторные молекулы, у больных ОМЛ в периоде полной ремиссии по сравнению с таковым у лиц в первом остром периоде и контрольной группы отражает активацию механизмов, влияющих на их экспрессию. Одновременная экспрессия молекул CD80, CD86 на моноцитах выявляется у той части больных ОМЛ, у которых имеет место большая длительность периода ремиссии, что объясняется их важной ролью, осуществляющей контроль опухолевого процесса [9]. В наших исследованиях также наиболее длительный период первой полной ремиссии (10–14 мес.) отмечался у 40% обследованных больных ОМЛ при одновременной экспрессии на моноцитах костимуляторных молекул семейства В-7 (CD80 и CD86).

Известно, что наличие костимуляторных молекул модифицирует биологические свойства бластов и они приобретают иммунофенотип и функции антигенпрезентирующих клеток [10], способных передавать сигнал для активации Т-лимфоцитов через молекулу CD28 [11–13]. Поэтому дальнейшие исследования были направлены на изучение состояния Т-клеточного иммунитета у больных ОМЛ в различные периоды заболевания с последующей оценкой содержания зрелых лимфоцитов с иммунофенотипическим профилем CD3⁺CD28⁺ и субпопуляций лимфоцитов (CD4⁺, CD8⁺), наделенных хелперной и супрессорно-цитотоксической функцией (рис. 2). Согласно полученным данным, у больных в первом остром периоде количество CD3⁺CD28⁺ лимфоцитов было снижено в 1,7 раза ($p < 0,05$), CD4⁺ — в 1,4 раза ($p < 0,05$), CD8⁺ лимфоцитов — в 1,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичными показателями у больных в периоде полной ремиссии. Увеличение содержания CD3⁺CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺ лимфоцитов ПК пациентов в периоде ремиссии отражает процесс восстановления показателей Т-системы иммунитета, что прямо связано с элиминацией клона опухолевых клеток в результате полихимиотерапии.

Несмотря на успехи в лечении ОМЛ остается реальным возникновение рецидива. Для его своевременного предупреждения у больных ОМЛ в периоде ремиссии вместе с клинико-гематологическими признаками заболевания необходимо проводить мониторинг состояния противоопухолевого иммунитета. В связи с этим у больных ОМЛ в ремиссии в ПК необходимо определять количество моноцитов, экспрессирующих костимуляторные молекулы, поскольку они потенциально являются субстратными клетками опухолевого процесса, а также участвуют в иммунных реакциях как антигенпрезентирующие клетки. Анализируя полученные нами результаты и данные литературы [14, 15], считаем, что повышение в ПК количества $CD80^+CD33^+$, $CD86^+CD33^+$ моноцитов с одновременным увеличением числа $CD3^+CD28^+$ лимфоцитов является одним из механизмов, регулирующих продолжительность периода ремиссии у больных ОМЛ.

Таким образом, можно заключить, что оценка экспрессии костимуляторных молекул на $CD33^+$ моноцитах ПК и состояния клеточно-опосредованного иммунитета является важным этапом “слежения” за опухолевым процессом на молекулярном уровне. Иммунологический мониторинг свидетельствует о том, что у части обследованных больных ОМЛ в периоде ремиссии снижалось количество $CD33^+$ моноцитов, экспрессирующих молекулы $CD80$, $CD86$, и число $CD3^+CD28^+$ лимфоцитов, что являлось ранним предвестником рецидива. Итак, уменьшение количества моноцитов ПК, несущих обе костимуляторные молекулы, а также $CD3$ лимфоцитов с лигандом $CD28$ может рассматриваться в качестве прогностического фактора развития болезни.

1. *Harrison B. D., Adams J. A., Briggs M. et al.* Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by leukemic dendritic cells derived from blast cells in acute myeloid leukemia // *Blood*. – 2001. – **97**. – P. 2764–2771.
2. *Бережная Н. М., Чехун В. Ф.* Иммунология злокачественного роста. – Киев: Наук. думка, 2005. – 790 с.
3. *Дранник Г. Н.* Клиническая иммунология и аллергология. – Киев: Полиграф ПЛЮС, 2006. – 481 с.
4. *Matsumoto K., Anasetti C.* The role of T-cell costimulation by $CD80$ in the initiation and maintenance of the immune response to human leukemia // *Leuk. Lymphoma*. – 1999. – **35**, No 5–6. – P. 427–435.
5. *Maeda A., Yamamoto K., Yamashita K. et al.* The expression of costimulatory molecules and their relationship to the prognosis of human acute myeloid leukemia: poor prognosis of $B7-2$ positive leukemia // *Brit. J. Haematol.* – 1998. – **102**. – P. 1257–1262.
6. *LaBelle J. L., Hanke S. A., Blazar B. R. et al.* Negative effect of CTLA-4 on induction of T-cell immunity in vivo to $B7-1^+$, but not $B7-2^+$, murine myelogenous leukemia // *Blood*. – 2002. – **99**, No 6. – P. 2146–2153.
7. *Graf M., Reif S., Hecht R. et al.* High expression of costimulatory molecules correlates with low relapse-free survival probability in acute myeloid leukemia (AML) // *Ann. Hematol.* – 2005. – **84**. – P. 287–297.
8. *Bene M. C., Bernier M., Cactolidi G. et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias // *Leukemia*. – 1995. – **9**. – P. 1783–1788.
9. *Whiteway A., Corbett T., Anderson R. et al.* Expression of co-stimulatory molecules on acute leukemia blasts may effect duration of first remission // *Brit. J. Haematol.* – 2003. – **120**, No 3. – P. 442–451.
10. *Hicks C., Keoshkerian E., Gaudry L. et al.* $CD80$ ($B7-1$) expression on human acute myeloid leukaemic cells cultured with GM-CSF, IL-3 and IL-6 // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2001. – **50**, No 4. – P. 173–180.
11. *Costello R. T., Mallet F., Sainty D. et al.* Regulation of $CD80/B7-1$ and $CD86/B7-2$ molecule expression in human primary acute myeloid leukemia and their role in allogenic immune recognition // *Eur. J. Immunol.* – 1998. – **8**, No 1. – P. 90–103.
12. *Hirano N., Takahashi T., Azuma M. et al.* Protective and therapeutic immunity against leukemia induced by irradiated $B7-1$ ($CD80$) – transduced leukemic cells // *Hum. Gene Ther.* – 1997. – **8**, No 11. – P. 1375–1384.
13. *Tsukada N., Aoki S., Maruyama S. et al.* The heterogeneous expression of $CD80$, $CD86$ and other adhesion molecules on leukemia and lymphoma cells and their induction by interferon // *Exp. Clin. Cancer Res.* – 1997. – **16**, No 2. – P. 171–176.

14. *Brouwer R. E., Zwinderman K. H., Kluin-Nelemans H. C. et al.* Expression and induction of costimulatory and adhesion molecules on acute myeloid leukemia cells of various FAB subclasses // *Hum. Immunol.* – 2000. – **61**. – P. 565–574.
15. *Chen L., McGoven P., Ashe S. et al.* B7-1/CD80 transduced tumor cells elicit better systemic immunity than wild type tumor cells admixed with *Corynebacterium parvum* // *Cancer Res.* – 1994. – **54**. – P. 5420–5423.

*Институт гематологии и трансфузиологии
АМН Украины, Киев
Институт урологии АМН Украины, Киев*

Поступило в редакцию 14.03.2007