

ДОСТИЖЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО И МОЛЕКУЛЯРНОГО ОТВЕТОВ У БОЛЬНЫХ ХМЛ: ПРОГНОЗИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА P53

Лунев Д.А., Овсянникова Е.Г., Заклякова Л.В., Левитан Б.Н.

ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия», Астрахань, Россия (414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121), agma@astranet.ru

В работе изучена концентрация индуктора апоптоза белка p53 в сыворотке крови больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ), получавших терапию гливеком более 24 месяцев. Повышение концентрации белка p53 в сыворотке крови у больных ХМЛ с отсутствием полного цитогенетического и большого/полного молекулярного ответов на всех сроках терапии гливеком направлено на поддержку программы апоптоза для удаления патологического клона. Концентрация p53 в сыворотке крови больных ХМЛ отражает прогноз заболевания, его патогенез (наличие или элиминацию Ph+ клона) и может быть использована в качестве дополнительного метода прогноза ХМЛ.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, гливек, апоптоз, p53.

ACHIEVING CYTOGENETIC AND MOLECULAR RESPONSES IN PATIENTS WITH CML: THE SIGNIFICANCE OF DEFINITION OF P53 CONCENTRATION FOR PROGNOSIS OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Lunyov D.A., Ovsyannikova E.G., Zaklyakova L.V., Levitan B.N.

*SBEI HPE Astrakhan state medical academy, Astrakhan
Astrakhan, Russia (414000), t. Astrakhan, Bakinskaya St. 121, agma@astranet.ru*

In this paper we studied the concentration of inducer of apoptosis protein p53 in the serum of patients with chronic myeloid leukemia (CML), treated with gleevec for more than 24 months. Increasing concentrations of p53 protein in the blood serum of patients with CML in the absence of complete cytogenetic and large / complete molecular responses during the entire period of therapy gleevec is aimed at supporting the program of apoptosis to remove abnormal clone. The p53 concentration in the serum of patients with CML may show the prognosis of disease, its pathogenesis (presence or elimination of Ph+ clone), and can be used as an additional method of prediction of CML.

Key words: chronic myeloid leukemia (CML), gleevec, apoptosis, p53.

Исследование молекулярных механизмов запрограммированной гибели клетки стало в последние годы одной из актуальных проблем в клинике внутренних болезней, и в гематологии в частности [1].

В патогенезе хронического миелолейкоза (ХМЛ) определяющую роль играет патологическая Ph-хромосома и её молекулярный эквивалент – химерный ген BCR-ABL, обладающий тирозинкиназной активностью. Основными патологическими эффектами этого гена являются: нарушение межклеточных взаимодействий, усиленная пролиферация и подавление апоптоза [2]. Одним из центральных звеньев в регуляции клеточного цикла и процесса апоптоза является ген p53 и его продукт – белок p53 [4; 5; 9].

Прогноз больных хроническим миелолейкозом до применения гливека был всегда пессимистичным [2]. Анализ применения ингибитора тирозинкиназ I поколения – гливека продемонстрировал возможности современной таргетной терапии [6; 8]. Однако, несмотря на «целевой» характер терапии, у части больных ХМЛ не удается достичь плановых генетических и молекулярных ответов, заболевание прогрессирует до стадий акселерации и бластного криза [3; 7]. Это обстоятельство указывает на особый интерес и значимость поиска дополнительных прогностических критериев исхода ХМЛ.

Цель исследования: изучить взаимосвязь развития цитогенетических и молекулярных ответов у больных хроническим миелолейкозом и концентрации в сыворотке крови маркера индукции апоптоза белка p53.

Материалы и методы: исследование проводилось на основе собственных наблюдений и данных медицинской документации. Были изучены 72 амбулаторные карты больных ХМЛ. Длительность лечения гливеком составила от 18 до 36 месяцев. Продолжительность заболевания до начала терапии гливеком была от 0 до 87 месяцев. Наблюдение за больными ХМЛ было проведено в гематологическом отделении консультативной поликлиники Государственного учреждения здравоохранения «Александро-Мариинская областная клиническая больница» г. Астрахани и в поликлинике Государственного учреждения здравоохранения «Волгоградский областной клинический онкологический диспансер № 1» в период с 2007 по 2010 г.

На каждого больного заполнялась индивидуальная карта обследования, включающая паспортную часть, развернутый клинический диагноз, результаты первичного осмотра, данные анамнеза, статус на момент диагностики и начала лечения гливеком, а также в динамике, данные лабораторных исследований на момент диагностики заболевания и в динамике. Все больные имели клинико-морфологическое и цитогенетическое подтверждение диагноза хронического миелолейкоза. Характер ответа на лечение определялся согласно критериям Европейского общества по изучению хронического миелолейкоза European Leukemia Net (ELN-2009) [10].

В группу наблюдения включены 60 больных ХМЛ (23 мужчины и 37 женщин). Средний возраст составил $52,57 \pm 1,59$ лет. Критерии включения больных в исследование: хроническая фаза хронического миелолейкоза (определялась согласно критериям ELN 2009) [10]; терапия ингибитором тирозинкиназ первого поколения – иматинибом мезилатом (гливек). Критерии исключения: больные ХМЛ, имеющие сопутствующую патологию, при которой возможно изменение концентрации белка p53 (сахарный диабет, ишемическая болезнь сердца, хронические заболевания желудочно-кишечного тракта,

хронические заболеваниями органов дыхательной системы, перенесенный инсульт, трансплантация костного мозга).

В контрольную группу были отобраны здоровые доноры – 25 человек (10 мужчин и 15 женщин). Средний возраст доноров составил $49,20 \pm 1,27$ лет, сопоставимый с основной группой.

В процессе работы проводились молекулярно-генетические исследования крови методом ПЦР в реальном времени (количественная оценка экспрессии химерного гена BCR-ABL типа p210), исследования костного мозга: цитологические (миелограмма), цитогенетические – определение транслокации t(9;22)(q34;q11), молекулярно-цитогенетические – флуоресцентная *in situ* гибридизация хромосом (FISH) с ДНК зондом к слитному гену BCR- ABL.

Иммуноферментное исследование сыворотки крови проводилось с использованием наборов для количественного определения белка p53. Были использованы тест-системы фирмы Bender MedSystems (Австрия).

При статистической обработке полученных нами данных была использована статистическая программа SPSS Statistics (Version 17.0). Анализ данных включал в себя среднее значение, ошибку средней арифметической. Для определения достоверности показателей использовали двусторонний критерий Student. Если *t* был больше соответствующих значений по таблице Стьюдента, различия между показателями сравниваемых величин считали достоверными. Проверка выборки на нормальность распределения проводилась по критериям Колмогорова–Смирнова с поправкой по Лилли–Фору.

Результаты исследования и их обсуждение: концентрация индуктора апоптоза – белка p53 в сыворотке крови в контрольной группе здоровых лиц составила $1,16 \pm 0,18$ Е/мл. Полученные нами показатели уровня концентрации p53 оказались сопоставимыми с приведенными данными сопроводительной аннотации к набору реагентов.

Нами определена концентрация p53 у больных ХМЛ, начиная с 18 месяцев терапии, затем в динамике каждые полгода – на 24, 30, 36 месяцев лечения гливеком.

Все больные ХМЛ были распределены по следующим критериям: наличие и отсутствие полного цитогенетического, молекулярного ответов – через 18–36 месяцев от начала терапии гливеком (таблица 1).

Таблица 1 – Средние значения концентрации p53 у больных ХМЛ с наличием и отсутствием полного цитогенетического ответа ($M \pm m$)

Сроки терапии гливеком (мес.)	Средние значения концентрации p53 (Е/мл)		
	Контрольная группа	Пациенты с полным цитогенетическим ответом	Пациенты с отсутствием полного цитогенетического ответа
18	1,16 ± 0,18 (n = 25)	1,19 ± 0,06 (n = 36) (p>0,05)	1,81 ± 0,14 (n = 24) (p<0,005) (p1<0,005)
24	1,16 ± 0,18 (n = 25)	1,44 ± 0,08 (n = 29) (p>0,05)	1,72 ± 0,17 (n = 31) (p<0,05) (p1>0,05)
30	1,16 ± 0,18 (n = 25)	2,42 ± 0,20 (n = 36) (p<0,001)	1,54 ± 0,13 (n = 23) (p>0,05) (p1<0,001)
36	1,16 ± 0,18 (n = 25)	2,54 ± 0,18 (n = 37) (p<0,001)	1,70 ± 0,13 (n = 20) (p<0,05) (p1<0,001)

P – достоверность различия показателей по сравнению с контрольной группой.

P1 – достоверность между группами по изучаемому показателю.

Из представленной таблицы следует, что у больных ХМЛ с ПЦО на 18 и 24 месяца от начала терапии гливеком концентрация p53 практически равна концентрации p53 контрольной группы. К 30 и 36 месяцам данный показатель повышен вдвое, при этом отмечается достоверность различий по отношению к контрольной группе.

У пациентов с отсутствием ПЦО с 18 до 36 месяцев лечения гливеком наблюдается умеренное повышение концентрации p53. Результаты на 18, 24, 36 месяцев достоверно различны по отношению к контрольной группе и к группе больных с наличием ПЦО.

У больных ХМЛ с наличием полного молекулярного, большого молекулярного ответов (ПМО/БМО) и отсутствием ПМО/БМО наблюдается аналогичное распределение средних значений концентрации p53 (таблица 2), как и у пациентов с наличием и отсутствием ПЦО.

Таблица 2 – Средние значения концентрации р53 у больных ХМЛ с наличием ПМО/БМО и отсутствием молекулярного ответа ($M \pm m$)

Сроки терапии гливеком (мес.)	Средние значения концентрации р53 (Е/мл)		
	Контрольная группа	Пациенты с наличием ПМО/БМО	Пациенты с отсутствием ПМО/БМО
18	1,16 ± 0,18 (n = 25)	1,32 ± 0,09 (n = 21) (p>0,05)	1,51 ± 0,09 (n = 39) (p>0,05) (p1>0,05)
24	1,16 ± 0,18 (n = 25)	1,29 ± 0,08 (n = 25) (p>0,05)	1,78 ± 0,15 (n = 35) (p<0,01) (p1<0,005)
30	1,16 ± 0,18 (n = 25)	2,61 ± 0,24 (n = 30) (p<0,001)	1,58 ± 0,11 (n = 29) (p>0,05) (p1<0,001)
36	1,16 ± 0,18 (n = 25)	2,81 ± 0,21 (n = 30) (p<0,001)	1,55 ± 0,10 (n = 27) (p>0,05) (p1<0,001)

P – достоверность различия показателей по сравнению с контрольной группой.

P1 – достоверность между группами по изучаемому показателю.

Повышение концентрации р53 в сыворотке крови у больных ХМЛ с отсутствием ПЦО и МО на всех сроках терапии гливеком направлено на поддержку программы апоптоза через индуктор апоптоза р53 для удаления патологического клона.

Среднестатистические показатели концентрации р53 у пациентов, достигших ПЦО, ПМО/БМО на 18 и 24 месяца терапии гливеком близки к цифрам контрольной группы и подтверждают элиминацию патологических клеток. Однако через 30 и 36 месяцев терапии значения р53 повышены. Увеличение концентрации р53 связано с тем, что количество пациентов на 30 и 36 месяцев терапии гливеком с ПЦО 36 и 37 соответственно, но при этом больных с ПМО/БМО к данному сроку 30, т.е. 6 и 7 больных через 30 и соответственно 36 месяцев терапии гливеком не имеют ПМО/БМО. С другой стороны, данный факт может расцениваться как присутствие в организме больного ХМЛ

минимального количества Ph-позитивных клеток, не определяемых при цитогенетических и молекулярных исследованиях.

Заключение: определение концентрации p53 в сыворотке крови больных ХМЛ может быть использовано в качестве дополнительного метода прогнозирования исхода ХМЛ. Определение концентрации p53 необходимо проводить в динамике каждые 6 месяцев терапии гливекком.

Список литературы

1. Барышников А.Ю. Иммунологические проблемы апоптоза / А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин. – М. : Эдиториал УРСС, 2002. – 320 с.
2. Волкова М.А. Хронический миелолейкоз // Клиническая онкогематология / под ред. М.А. Волковой. – М. : Медицина, 2007. – С. 552–585.
3. Долгосрочные результаты применения иматиниба (Гливек) в лечении больных хроническим миелолейкозом в фазе акселерации / Л.А. Антипова [и др.] // Онкогематология. – 2009. – № 1. – С. 14–20.
4. Желтухин А.О. Повседневные и индуцируемые функции гена p53 / А.О. Желтухин, П.М. Чумаков // Успехи биологической химии. – 2010. – Т. 50. – С. 447–454.
5. Копнин Б.П. Многоликий p53: разнообразие форм, функций, опухольсупрессирующих и онкогенных активностей / Б.П. Копнин, П.Б. Копнин, Н.В. Хромова и др. // Клиническая онкогематология. – 2008. – Т. 1. – № 1. – С. 2–9.
6. Отдаленные результаты выживаемости больных в поздней хронической фазе Ph+ хронического миелолейкоза при лечении иматиниб мезилатом (Гливек®) / Стахина О.В., Туркина А.Г., Гусарова Г.А. и др. // Вестник гематологии. – 2009. – Т. 5. – № 2. – С. 42.
7. Резистентность при терапии гливекком у больных хроническим миелолейкозом в фазе акселерации / С.С. Круглов, А.Г. Туркина, Н.Д. Хорошко и др. // Гематология и трансфузиология. – 2007. – Т. 52. – № 2. – С. 17–25.
8. Результаты многоцентрового исследования терапии гливекком больных хроническим миелолейкозом в хронической фазе / Зарицкий А.Ю., Ломаиа Е.Г., Виноградова О.Ю. и др. // Гематология и трансфузиология. – 2007. – Т. 52. – № 2. – С. 13–17.
9. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме // Успехи биологической химии. – 2007. – Т. 47. – С. 3–52.

10. Vaccarani M., Cortes J., Pane F. et al. / Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. // J Clin Oncol 2009. – 27 (35) : 6041 – 51.

Рецензенты:

Ларина Н.Н., д.м.н., заместитель главного врача по медицинской части ГУЗ «Александро-Мариинская областная клиническая больница», г. Астрахань.

Эсаулова Т.А., д.м.н., профессор, заведующая терапевтической службой НУЗ «Медико-санитарная часть», г. Астрахань.