

ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ КАСПАЗЫ 9 И sFas-L ДЛЯ ПРОГНОЗА ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

Овсянникова Е.Г., Ковалинская И.С., Заклякова Л.В.

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

В работе изучена концентрация индукторов апоптоза каспазы 9 и sFas-L в сыворотке крови больных хроническим миелолейкозом, получающих терапию гливеком в течение 24 месяцев. В результате исследования показано, что концентрации каспазы 9 в сыворотке крови больных ХМЛ в группе с неудачей терапии выше по сравнению с контрольной группой. Концентрация sFas-L достоверно повышена по сравнению с контролем в группе больных с отсутствием цитогенетического ответа на период лечения 12,18,24 месяцев. Концентрация каспазы 9 и sFas-L, в сыворотке крови больных ХМЛ отражает прогноз заболевания и его патогенез (наличие или элиминацию Ph+ клона) и может быть использована в качестве дополнительного метода прогноза ХМЛ.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, гливек, апоптоз, каспаза 9, sFas-L.

THE SIGNIFICANCE OF DEFINITION OF CASPAZA 9 AND SFAS-L CONCENTRATION FOR PROGNOSIS OF CHRONIC MYELOLEUKEMIA

Ovsyannikova E.G., Kovalinskaya I.S., Zaklyakova L.V.

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

The investigation deals with the problem of inductors concentration of caspaza 9 and sfas-L in blood serum of patients with chronic myeloleukemia who received the treatment with glivek during 24 months. In conclusion it was shown that concentration of caspaza 9 in blood serum of patients with CML in the group of unfavorable therapy to be higher in comparison with control group. The sFas-L concentration was really increased in comparison with control in group of patients with absence of cytogenetic response during the period of treatment 12, 18, 24 months. The caspaza 9 and sFas-L concentration in blood serum of patients with CML may show the prognosis of disease and its pathogenesis (presence or elimination of Ph+ clone) and should be used as additional method of prognosis in CML.

Key words: chronic myeloleukemia (CML), glivek, apoptosis, caspaza 9, sFas-L.

На современном этапе развития гематологии претерпели значительные изменения взгляды на многие проблемы диагностики, мониторинга, лечения и прогноза больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) [7]. Однако, несмотря на достигнутые за последнее десятилетие успехи терапии ХМЛ в связи с применением ингибиторов тирозинкиназ, у части больных заболевание прогрессирует до бластного криза [5]. Хронический миелолейкоз – первое опухолевое заболевание, при котором была обнаружена постоянная хромосомная перестройка. Цитогенетическим маркером хронического миелолейкоза является Филадельфийская (Ph) хромосома. В результате транслокации t(9;22) образуется химерный ген BCR-ABL, продуцирующий белок p210. Данный белок обладает выраженной тирозинкиназной активностью и влияет на разные этапы жизнедеятельности гемопоэтических клеток. Под действием белка p210 увеличивается пролиферация клеток, их чувствительность к ростовым факторам, снижается чувствительность клетки к проапоптотическим сигналам. В результате этого опухолевые клетки получают преимущество в пролиферативной активности, что приводит к постепенному расширению опухолевого клона и вытеснению нормального гемопоэза. Нарушение процессов апоптоза вызывает накопление огромного количества клеток, как в костном мозге, так и в периферической крови. Таким образом, блокирование индукции апоптоза лежит в основе патогенеза хронического миелолейкоза [4,8]. Современная

терапия ингибитором BCR-ABL тирозинкиназы – гливеком позволяет добиться значительного подавления опухолевого клона и восстановления нормального кроветворения, что приводит к увеличению выживаемости больных [2,3,10]. Однако часть пациентов остается резистентной к лечению гливеком в качестве монотерапии [5,9]. Насущным вопросом становится поиск путей прогнозирования устойчивости к ингибиторам тирозинкиназ на молекулярном и клеточном уровнях. В этой связи нам представляется перспективным изучение особенностей апоптоза при различных ответах на терапию гливеком с целью поиска дополнительных путей диагностики и прогнозирования течения ХМЛ. Немаловажным мы считаем и тот факт, что в литературе имеются единичные работы, посвященные изучению данной проблемы, и основную часть из них представляют экспериментальные исследования *in vitro* [1,6]. Для практического здравоохранения приемлемы доступные, недорогостоящие методики, в частности, метод иммуноферментного анализа.

Цель исследования: изучить взаимосвязь развития плановых гематологических, генетических и молекулярных ремиссий у больных хроническим миелолейкозом и концентрации в сыворотке крови маркеров апоптоза каспазы 9 и sFas-L.

Материалы и методы: исследование проводилось в ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России на кафедре факультетской терапии и профессиональных заболеваний с курсом последипломного образования. Клиническое наблюдение за больными хроническим миелолейкозом, проводилось в гематологическом отделении, консультативной поликлинике Государственного учреждения здравоохранения «Александрo-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. Исследование проводилось на основе собственных наблюдений и данных медицинской документации. Были изучены 72 амбулаторные карты больных ХМЛ. Длительность лечения гливеком составила от 1 до 24 месяцев. Продолжительность заболевания до начала терапии гливеком была от 0 до 87 месяцев.

При проведении работы 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) [9].

В группу наблюдения включены 54 больных ХМЛ. Возраст больных колебался от 23 до 78 лет, большинство – лица среднего возраста (41–60 лет). Средний возраст составлял 55 лет, соотношение мужчин и женщин в исследовании 1:1. Критерии включения больных в исследование: хроническая фаза хронического миелолейкоза (определялась согласно рекомендациям ELN-2009) [9].

В контрольную группу вошли 30 практически здоровых доноров: 20 мужчин (60 %) и 10 женщин (30 %) в возрасте от 18 до 55 лет, жители Астраханской области.

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), цитохимические, 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 каспазы 9 и sFAS-лиганда. Были использованы

тест-системы фирмы Bender MedSystems (Австрия). Чувствительность тест-системы для определения концентрации каспазы 9 менее 0,4 ng/ml, sFAS-лиганда – 0,07 ng/ml.

Для определения показателя достоверности результатов был использован непараметрический критерий Манна – Уитни. Статистическая обработка данных проводилась при помощи статистической программы STATISTICA 7. Для каждого показателя и групп наблюдения вычисляли среднее значение, ошибку средней арифметической. Учитывая небольшой объем наблюдений, при статистических расчетах использовались формулы для малых групп.

Результаты исследования и их обсуждение: в процессе исследования нами было проведено 280 стерильных пункций с изучением миелиограмм, 270 цитогенетических и 200 молекулярных исследований в динамике. Такой обширный объем исследований необходим для четкого мониторинга ХМЛ согласно критериям ELN 2009г. Нами определена концентрация каспазы 9 и sFas-L, начиная с 6 месяцев терапии, затем в динамике каждые полгода – на 12, 18, 24 месяцев лечения гливекком. Наиболее важная точка обследования в нашей работе – 18 месяцев терапии гливекком, так как, согласно критериям ELN-2009 г., это тот срок, когда проводится окончательная клиническая оценка ответа на терапию гливекком. Через 24 месяца терапии гливекком мы оценивали цитогенетический ответ.

Исследование проспективное, продольное. Больные ХМЛ были разделены на группы в зависимости от динамики ответов на лечение гливекком.

Концентрации каспазы 9 и sFas-L в сыворотке крови, полученные в ходе исследования в контрольной группе здоровых лиц, варьировали в диапазоне: каспаза 9 - от 0,97 до 4,17 ng/ml; sFas-L - от 0,042 до 0,182 ng/ml. Среднее значение каспазы 9 составило $2,03 \pm 0,13$ ng/ml. Среднее значение sFas-L составило $0,11 \pm 0,01$ ng/ml. Полученные нами показатели уровня концентрации каспазы 9 и sFas-L в сыворотке крови в группе здоровых доноров оказались сопоставимыми с приведенными данными сопроводительной аннотации к набору реагентов.

При анализе полученных результатов у больных ХМЛ максимальное значение концентрации каспазы 9 в сыворотке крови на 18 месяцев лечения гливекком зарегистрировано в группе больных с неудачей терапии $2,87 \pm 0,05$ ng/ml (табл.1).

Таблица 1

Концентрация каспазы 9 в сыворотке крови у больных ХМЛ в контрольной точке 18 месяцев терапии гливекком

| Концентрация каспазы 9, ng/ml | | | |
|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--|
| Контроль (n=30) | Оптимальный ответ (n=14) | Субоптимальный ответ (n=10) | Неудача терапии (n=30) |
| $2,03 \pm 0,13$ | $2,70 \pm 0,07$ | $1,86 \pm 0,17$ | $2,87 \pm 0,05$ |
| Достоверность различия | $p < 0,05$ | $p < 0,05$ $p1 < 0,05$ | $p < 0,05$ $p2 < 0,05$ $p3 > 0,05$ |

Примечание:

p – достоверность различия показателей по сравнению с контрольной группой;

p1 - достоверность различия показателей группы субоптимального ответа по сравнению с группой оптимального ответа;

p2 – достоверность различия показателей группы неудачи терапии по сравнению с группой субоптимального ответа;

p3 - достоверность различия показателей группы неудачи терапии по сравнению с группой оптимального ответа.

Анализируя значения концентрации каспазы 9 в контрольных точках лечения, мы проследили определенную закономерность: значительное повышение по сравнению с контролем концентрации в группе с неудачей терапии. Эта закономерность подтверждена при изучении концентрации каспазы 9 больных с различным цитогенетическим ответом через 24 месяца терапии: у больных с отсутствием полного цитогенетического ответа отмечается достоверное повышение концентрации каспазы 9 - $2,45 \pm 0,03$ ng/ml ($p < 0,05$). Мы считаем, что это свидетельствует о том, что при неудаче терапии (согласно критериям ELN 2009) концентрация каспазы 9 выше контрольного уровня и отражает активность патологического процесса, активацию механизмов апоптоза.

Несколько иной, абсолютно непрогнозируемый нами результат получен при изучении концентрации другого выбранного нами маркера, индуктора апоптоза – sFas-L. Этот результат еще раз указал на сложность и непредсказуемость, но в то же время взаимосвязь механизмов, регулирующих апоптотические процессы клетки. В нашем исследовании, где мы изучаем процессы апоптоза не в норме, а при заболевании, при котором патогенетически обусловлено угнетение апоптоза, в том числе на фоне лечения гливекком, который «должен» (но не всегда «может») восстановить нормальные процессы апоптоза.

Максимальное значение концентрации sFas-L в сыворотке крови больных ХМЛ на 18 месяцев лечения гливекком определено в группе больных с оптимальным ответом на терапию – $0,32 \pm 0,12$ ng/ml (табл.2).

Таблица 2

Концентрация sFas-L в сыворотке крови у больных ХМЛ в контрольной точке 18 месяцев терапии гливекком

| Концентрация sFas-L, ng/ml | | | |
|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--|
| Контрольная группа (n=30) | Оптимальный ответ (n=14) | Субоптимальный ответ (n=10) | Неудача терапии (n=30) |
| $0,11 \pm 0,01$ | $0,32 \pm 0,12$ | $0,15 \pm 0,02$ | $0,16 \pm 0,01$ |
| Достоверность различия | $p < 0,05$ | $p < 0,05$ $p1 < 0,05$ | $p < 0,05$ $p2 > 0,05$ $p3 < 0,05$ |

Примечание:

p – достоверность различия показателей по сравнению с контрольной группой;

p1 - достоверность различия показателей группы субоптимального ответа по сравнению с группой оптимального ответа;

p2 – достоверность различия показателей группы неудачи терапии по сравнению с группой субоптимального ответа;

p3 - достоверность различия показателей группы неудачи терапии по сравнению с группой оптимального ответа.

Данный результат явился для нас неожиданностью, так как из предыдущих данных (на 6 и 12 месяцев лечения) выстраивалась закономерность: значительное повышение концентрации sFas-L в группе с неудачей терапии по сравнению с контролем и группой оптимального ответа (аналогичная данным по концентрации каспазы 9). Что означает такое повышение sFas-L у больных, где ситуация довольно стабильна? Объяснение мы нашли, вернувшись к данным по мониторингу терапии: в срок 6 месяцев терапии гливекком больных с оптимальным ответом было 56 %, с неудачей терапии 33 %. К 18 месяцам больных с оптимальным ответом – 26 %, значительно увеличилось количество больных с неудачей терапии – 55 %. Важно отметить, что именно в срок 18 месяцев большинство пациентов – 69 % стали получать гливек в дозе 600 мг (в срок 6 месяцев

получали 18 % больных). Возможно, именно это явилось толчком для активации апоптоза, и 18 месяцев терапии является своеобразной «критической точкой» – активация FAS-опосредованного апоптоза в этот период необходима для удержания оптимального ответа на терапию. В дальнейшем при стабилизации процесса концентрация sFas-L снизится до нормального уровня. Это мы подтвердили, изучив концентрацию sFas-L у больных ХМЛ, достигших и не достигших полного цитогенетического ответа, на 24 месяца терапии. Проведенный анализ показал, что концентрация sFas-L достоверно повышена по сравнению с контролем в группе больных с отсутствием цитогенетического ответа на период лечения 12, 18, 24 месяца – $0,16 \pm 0,01$; $0,17 \pm 0,01$; $0,18 \pm 0,01$ ng/ml ($p < 0,05$) соответственно. Достоверно более высокие значения концентрации sFas-L в данной группе является важным патогенетическим критерием ХМЛ, следствием того, что у этих больных сохраняется клон опухолевый клеток и сохраняется синтез патологического гена BCR-ABL.

В группе больных с полным цитогенетическим ответом отмечаются колебания концентрации, в срок 18 месяцев регистрируется максимальное значение концентрации sFas-L- $0,25 \pm 0,11$ ng/ml. Однако к 24 месяцам терапии концентрация sFas-L снижается до нормальных показателей (аналогично у больных ХМЛ с оптимальным ответом через 18 месяцев). Эти данные созвучны с результатами концентрации каспазы 9 у больных ХМЛ с оптимальным ответом через 18 месяцев терапии и полным цитогенетическим ответом через 24 месяца терапии: у больных с полным цитогенетическим ответом концентрация каспазы 9 к 24 месяцам терапии приближается к нормальным значениям – $2,27 \pm 0,04$ ng/ml, достоверных отличий нет ($p > 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о нормализации процесса апоптоза и восстановлении нормального поликлонального кроветворения.

Таким образом, нормализация значений концентрации каспазы 9 и sFas-L в сыворотке крови у больных ХМЛ в процессе терапии гливекком является благоприятным прогностическим признаком, свидетельствующим об элиминации опухолевого клона. Повышение концентрации каспазы 9 и sFas-L, определяемое в плановых точках контроля всех видов ремиссий, отражает неблагоприятный прогноз заболевания у больного (сохранение Ph+ клона).

В своем исследовании, непосредственно в клинической практике мы попытались найти ответы на очень сложные и актуальные вопросы: почему одни больные отвечают оптимальным ответом на лечение, а другие демонстрируют резистентность? Какие факторы ингибиторов тирозинкиназ способствуют разному ответу на лечение: от оптимального до неудачи терапии? Почему, начав лечение при одних и тех же условиях (предлеченность, возраст, количество Ph+ клеток), мы получаем разные, не всегда предсказуемые ответы? Мы предприняли попытку ответить на эти вопросы, несколько отступая от традиционной трактовки анализа эффекта лечения больных ХМЛ. Были оценены не только доказательные точки лечения (цитогенетический и молекулярный ответ), но и исследованы патогенетические аспекты ХМЛ, используя ведущий из них – нарушение процессов апоптоза.

Выводы:

1. Через 18 месяцев терапии гливекком больных ХМЛ оптимальный ответ достигнут у 26 % больных, субоптимальный ответ – у 19 % больных. Неудача терапии зарегистрирована у 55 % больных. Через 24 месяца терапии гливекком полный цитогенетический ответ зарегистрирован у 44 %, не удалось достичь полного цитогенетического ответа у 56 % больных.
2. Концентрация каспазы 9 в сыворотке крови больных ХМЛ в группе с неудачей терапии через 18 месяцев лечения гливекком составила $2,87 \pm 0,05$ ng/ml, что достоверно выше по сравнению с контрольной группой здоровых лиц ($p < 0,05$). Высокий уровень концентрации сохранялся и через 24 месяца лечения гливекком в группе больных с отсутствием цитогенетического ответа $2,45 \pm 0,03$ ng/ml, что

- свидетельствует о сохранение Ph+ клона и необходимости поддержания апоптотических механизмов на высоком уровне.
3. Концентрация каспазы 9 в сыворотке крови больных ХМЛ в группе с полным цитогенетическим ответом через 24 месяца терапии гливекком составила $2,27 \pm 0,03$ ng/ml и не отличалась от группы здоровых доноров, что соответствует нормализации апоптоза вследствие элиминации опухолевого клона и восстановления нормального поликлонального кроветворения.
 4. 18 месяцев терапии является «критической точкой» для больных с оптимальным ответом на терапию гливекком – активация FAS-опосредованного апоптоза в этот период необходима и способствует удержанию ответа на терапию, в дальнейшем при стабилизации процесса концентрация sFas-L снижается до нормальных показателей.
 5. Концентрация sFas-L достоверно повышена по сравнению с контролем в группе больных с отсутствием цитогенетического ответа на период лечения 12, 18, 24 месяцев – $0,16 \pm 0,01$; $0,17 \pm 0,01$; $0,18 \pm 0,01$ ng/ml ($p < 0,05$) соответственно. Достоверно более высокие значения концентрации sFas-L в данной группе являются важным патогенетическим критерием ХМЛ, свидетельствующие о том, что у этих больных сохраняется клон опухолевой клеток.
 6. Концентрация sFas-L в сыворотке крови больных ХМЛ в группе с полным цитогенетическим ответом через 24 месяца терапии гливекком составила $0,12 \pm 0,01$ ng/ml и не отличалась от группы здоровых доноров ($p > 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о нормализации процесса апоптоза.
 7. Концентрация каспазы 9 и sFas-L в сыворотке крови больных ХМЛ отражает прогноз заболевания и его патогенез (наличие или элиминацию Ph+ клона).

Литература

1. Барышников, А.Ю. Иммунологические проблемы апоптоза / А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин. – М.: Эдиториал УРСС, 2002. – 320 с.
2. Долгосрочные результаты применения иматиниба (Гливек) в лечении больных хроническим миелолейкозом в фазе акселерации / Л.А. Антипова, С.С. Лория, С.В. Семочкин, А.Г. Румянцев // Онкогематология. – 2009. – №1. – С.14-20.
3. Достижения в диагностике и лечении больных хроническим миелолейкозом в Российской Федерации (2004-2008 гг.)/ Туркина А.Г., Виноградова О.Ю., Хорошко Н.Д., Воробьев А.И. // Бюллетень Сибирской медицины. – 2008. – Приложение 3. – С.76-80.
4. Клиническая онкогематология: Руководство для врачей / Под ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина, 2001. – 576 с.
5. 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.
6. Полосухина Е.Р., Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. [и др.]. Исследование экспрессии антигена CD95 (Fas/APO-1), опосредующего апоптоз, с помощью моноклональных антител ICO-160 при гемобластозах // Гематология и трансфузиология. – 2000. – Т. 45, № 4. – С. 3-6.
7. 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.
8. Хронический миелолейкоз – до и после применения иматиниба (часть I)/ Е.Г. Ломаиа, Д.В. Моторин, Е.Г. Романова, А.Ю. Зарицкий // Онкогематология. – 2009. – №2. – С.4-16.
9. Vassaranı 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.
10. Druker, B.J. Imatinib as a paradigm of targeted therapies / B.J. Druker // Adv. Cancer. Res. – 2004. – Vol. 91. – P.1-30.

Рецензенты:

- Эсаулова Т. А., д.м.н., профессор, заведующая терапевтической службой НУЗ «Медико-санитарная часть», г. Астрахань.
- Астахин А.В., д.м.н., профессор, заместитель главного врача по клинко-экспертной работе ГУЗ Александрo-Мариинская областная клиническая больница, г.Астрахань.