

УДК 616.155.392.8-036; 616-091.818

РОЛЬ КАСПАЗЫ 9 В РЕАЛИЗАЦИИ ПРОЦЕССОВ АПОПТОЗА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ

Овсянникова Е.Г., Накстхоева Э.Б., Заклякова Л.В., Левитан Б.Н.

ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия»,
Астрахань, e-mail: agma@astranet.ru

В работе изучается проблема резистентности к лечению гливеком больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ). Определено значение изменения концентрации в сыворотке крови больных ХМЛ каспазы 9, относящейся к классу инициирующих каспаз. У больных, достигших полного цитогенетического ответа через 36 месяцев терапии гливеком, концентрация каспазы 9 повышена по сравнению с контрольной группой. В группе больных с отсутствием цитогенетического ответа концентрация каспазы 9 не превышает значения концентрации в контрольной группе. Снижение концентрации каспазы 9 на более поздних сроках лечения у больных ХМЛ, не реагирующих на лечение гливеком, говорит о снижении процессов апоптоза и подавлении нормального поликлонального кроветворения более сильной системой – системой опухолевых (лейкозных) клеток.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, гливек, апоптоз, каспаза 9

THE ROLE OF CASPAZA 9 IN REALIZATION OF APOPTOSIS PROCESSES IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOLEUKEMIA

Ovsyannikova E.G., Naksthoeva E.B., Zaklyakova L.V., Levitan B.N.

SBEI HPE «Astrakhan state medical academy», Astrakhan, e-mail: agma@astranet.ru

The work deals with the problem of resistance to treatment with glivek for patients with chronic myeloleukemia (CML). There were determined the changes of concentration in blood serum of patients with CML of caspaza 9 referred to the class of initiating caspaza. In patients having full cytogenetic response in 36 months of glivek therapy the concentration of caspaza 9 was increased in comparison with control group. In group of patients with absence of cytogenetic response the concentration of caspaza 9 was not increased in connection with meaning of concentration in the control group. The decrease of caspaza 9 concentration during the late periods of treatment in patients with CML not having reaction to glivek therapy may demonstrate decrease of apoptosis processes and suppression of normal polyclonal blood formation of stronger system- system of tumours (leucosis cells).

Keywords: chronic myeloleukemia (CML), glivek, apoptosis, caspaza 9

Цель терапии хронического миелолейкоза (ХМЛ) на современном этапе – достижение цитогенетических и молекулярных ремиссий. Это стало возможным с внедрением в клиническую практику ингибиторов тирозинкиназ. С момента применения гливек для лечения ХМЛ прошло уже более 10 лет, за это время глобально изменилось отношение к проблеме хронического миелолейкоза в целом [2, 8]. В настоящее время важен не только факт достижения одной из конечных точек лечения – полного цитогенетического ответа (ПЦО), но и срок, к которому достигается этот ответ [4, 9]. Получение полного цитогенетического и большого молекулярного (БМО) ответов к 12 месяцам терапии гарантирует 100%-ю безрецидивную выживаемость [10].

Такого результата удастся достичь не у всех больных. В основе развития резистентности к гливеку лежат несколько механизмов, которые подразделяют на BCR-ABL-зависимые и BCR-ABL-независимые. К BCR-ABL-зависимым механизмам относят мутации и амплификацию гена BCR-ABL. BCR-ABL-независимые механизмы включают в себя «клональную эволюцию» (появление дополнительных хромосомных aberrаций в Ph-позитивных лейкозных клет-

ках), активацию BCR-ABL-независимых путей, например, членов семейства Src-киназ, избыточное связывание иматинибна с сывороточным α -1-кислым гликопротеином, дисбаланс между клеточными белками-переносчиками препарата [3, 7].

Первичная резистентность (или рефрактерность) определяется как отсутствие полного цитогенетического через 12 месяцев, большого молекулярного ответа – через 18 месяцев терапии. Вторичная, или приобретенная, резистентность – это потеря гематологического, цитогенетического или молекулярного ответов, либо прогрессия заболевания до фазы акселерации или бластного криза [2, 8]. Увеличение дозы гливек до 600–800 мг/день позволяет преодолеть резистентность и улучшить результаты терапии у 25–40% больных в хронической фазе ХМЛ [5]. Изучение механизмов резистентности к гливеку и путей ее преодоления является чрезвычайно актуальным.

В этой связи мы изучили концентрацию каспазы 9, отражающую проявление одного из ведущих эффектов химерного гена BCR-ABL. К настоящему времени хорошо известна функция индуктора апоптоза каспазы 9, которая относится к классу инициирующих каспаз [1, 6]. Однако роль каспазы

9 при гемобластозах и, в частности ХМЛ, практически не изучалась. Определение концентрации каспазы 9 принципиально значимо для уточнения одного из важнейших звеньев патогенеза ХМЛ – угнетения апоптоза.

Цель исследования: изучить концентрацию инициатора апоптоза каспазы 9 в сыворотке крови у больных хроническим миелолейкозом, получающих лечение гливекком.

Материалы и методы исследования

Исследование проспективное, продольное. Работа выполнена на основе собственных наблюдений в период с 2006 по 2011 г. В исследование включено 53 больных ХМЛ. Возраст больных колебался от 23 до 78 лет. Средний возраст больных составлял $52,1 \pm 1,72$ лет. Длительность лечения гливекком варьировалась от года до 5 лет. Продолжительность заболевания до начала терапии гливекком была от 0 до 87 месяцев. Диагноз, распределение по фазам заболевания и характер ответа на лечение определялись согласно критериям Европейского общества по изучению хронического миелолейкоза European Leukemia Net (ELN-2009) [9].

Критерии включения больных в исследование: хроническая фаза хронического миелолейкоза, терапия гливекком в течение 24 и более месяцев. Критерии исключения из исследования: пациенты, не получающие гливек; пациенты, получающие гливек менее 24 месяцев; пациенты в стадии акселерации и бластного криза; пациенты с сопутствующей патологией, при которой может повышаться концентрация маркера апоптоза каспазы 9.

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. Был использован непараметрический метод статистической обработки – критерий Манна-Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

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.

Количественное определение каспазы 9 в сыворотке крови проводилось иммуноферментным методом. Были использованы тест-системы фирмы Bender MedSystems (Австрия). Чувствительность тест-системы для определения концентрации каспазы 9 менее 0,4 ng/ml.

В контрольную группу были включены 30 здоровых доноров, жителей Астраханской области. По половому признаку и возрасту группа сопоставима с исследуемой группой больных ХМЛ. Полученные в ходе исследования результаты варьировались в диа-

пазоне – от 0,97 до 4,17 нг/мл. Среднее значение данного показателя составило $2,03 \pm 0,68$ нг/мл. Таким образом, полученные нами показатели уровня каспазы 9 в группе здоровых доноров оказались сопоставимыми с приведенными данными сопроводительной аннотации к набору реагентов. Это дало нам основание использовать полученные значения в дальнейшем в качестве контроля в проводимом исследовании.

Результаты исследования и их обсуждение

Первичная точка обследования в нашей работе – 18 месяцев терапии гливекком взята в связи с планом комплексной научной работы нашей кафедры: «Современные аспекты диагностики, мониторинга лечения и прогноза у больных хроническим миелолейкозом в отдельных популяциях Южного Федерального округа», частью которой является данное исследование. Кроме того, согласно критериям ELN-2009 г., это тот срок, когда проводится окончательная клиническая оценка ответа на терапию гливекком и именно к этому времени больной с оптимальным ответом на терапию гливекком должен достичь большого молекулярного ответа.

Полученные нами в ходе исследования значения концентрации каспазы 9 в сыворотке крови у 53 обследованных больных ХМЛ варьировались в диапазоне – от 0,84 до 15,84 нг/мл. Нами определена концентрация каспазы 9 на каждую контрольную точку лечения больных ХМЛ – 18, 24, 30, 36 месяцев терапии гливекком.

При проведении статистической обработки мы объединили группу больных с неудачей терапии с группой субоптимального ответа. Основанием для объединения групп послужило то, что при субоптимальном ответе (как и при неудаче терапии) ведущий критерий – большой молекулярный ответ в срок 18 месяцев не достигается. На данном этапе работы мы сравнили концентрацию каспазы 9 на 18 месяцев терапии гливекком у больных с оптимальным ответом и с неудачей терапии (табл. 1).

Как представлено в табл. 1, концентрация каспазы 9 у больных с оптимальным ответом составила $2,09 \pm 0,03$ нг/мл, у больных с неудачей терапии $3,21 \pm 0,07$ нг/мл, т.е. отмечено значительное повышение концентрации каспазы 9 в группе неудачи терапии. Данные статистически значимы по сравнению со значениями в контрольной группе и группе оптимального ответа ($p < 0,05$). Полученные данные говорят об активации процессов апоптоза. В группе с оптимальным ответом достоверных отличий от данных в контрольной группе нет, что говорит о нормализации процессов апоптоза.

Таблица 1

Концентрация каспазы 9 у больных ХМЛ, в зависимости от ответа на лечение в срок 18 месяцев терапии гливеком

Показатель	Группа контроль (n = 30)	Больные ХМЛ	
		оптимальный ответ (n = 20)	неудача терапии (n = 33)
Концентрация каспазы 9 в сыворотке крови (нг/мл)	2,03 ± 0,68	2,09 ± 0,03 <i>p</i> > 0,05 <i>p</i> 1 < 0,05	3,21 ± 0,07 <i>p</i> < 0,05 <i>p</i> 1 < 0,05

Примечания:

p – достоверность различия показателей по сравнению с контрольной группой;

*p*1 – достоверность различия показателей группы оптимального ответа по сравнению с группой неудачи терапии.

Далее мы провели прицельный анализ – в контрольной точке 24 месяца терапии гливеком проанализировали различия концентрации каспазы 9

в зависимости от достижения полного цитогенетического, большого молекулярного и полного молекулярного ответов (ПМО) (табл. 2).

Таблица 2

Концентрация каспазы 9 у больных ХМЛ в зависимости от цитогенетического и молекулярного ответов в срок 24 месяца лечения гливеком

Показатель	Группа контроль (n = 30)	Больные ХМЛ			
		ПЦО (n = 28)	Нет ПЦО (n = 25)	ПМО/БМО (n = 31)	Нет ПМО/БМО (n = 22)
Концентрация каспазы 9 в сыворотке крови (нг/мл)	2,03 ± 0,06	2,05 ± 0,07 <i>p</i> > 0,05	2,63 ± 0,03 <i>p</i> < 0,05 <i>p</i> 1 < 0,05	1,96 ± 0,06 <i>p</i> > 0,05	3,80 ± 0,02 <i>p</i> < 0,05 <i>p</i> 2 < 0,05

Примечания:

p – достоверность различия показателей по сравнению с контрольной группой;

*p*1 – достоверность различия показателей группы ПЦО и нет ПЦО;

*p*2 – достоверность различия показателей группы ПМО и нет ПМО/БМО.

Как представлено в табл. 2, у больных ХМЛ, достигших полного цитогенетического ответа в срок 24 месяца терапии гливеком, концентрация каспазы 9 не отличается от данных контрольной группы.

В группе больных ХМЛ, не достигших полного цитогенетического ответа в срок 24 месяца терапии гливеком, концентрация каспазы 9 значительно выше контроля, что подтверждается и данными в группе отсутствия полного или большого молекулярного ответов: 2,63 ± 0,03 и 3,80 ± 0,02 нг/мл (*p* < 0,05) соответственно. При статистиче-

ском анализе показаны достоверные различия концентрации каспазы 9 между группами ПЦО и нет ПЦО также, как и между группами ПМО и нет ПМО/БМО (*p*1 < 0,05; *p*2 < 0,05).

В задачи нашего исследования входило проанализировать колебания концентрации каспазы 9 в сыворотке крови больных ХМЛ на поздних сроках лечения гливеком. В связи с этим мы изучили концентрацию каспазы 9 через 30 месяцев лечения у больных ХМЛ в зависимости от достижения цитогенетического и молекулярного ответов (табл. 3).

Таблица 3

Концентрация каспазы 9 у больных ХМЛ, в зависимости от цитогенетического и молекулярного ответов, в срок 30 месяцев лечения гливеком

Показатель	Группа контроль (n = 30)	Больные ХМЛ			
		ПЦО (n = 29)	Нет ПЦО (n = 24)	ПМО/БМО (n = 33)	Нет ПМО/БМО (n = 20)
Концентрация каспазы 9 в сыворотке крови (нг/мл)	2,03 ± 0,06	2,92 ± 0,06 <i>p</i> < 0,05 <i>p</i> 1 < 0,05	2,02 ± 0,02 <i>p</i> > 0,05 <i>p</i> 1 < 0,05	2,62 ± 0,05 <i>p</i> < 0,05 <i>p</i> 2 < 0,05	2,09 ± 0,04 <i>p</i> > 0,05 <i>p</i> 2 < 0,05

Примечания:

p – достоверность различия показателей по сравнению с контрольной группой;

*p*1 – достоверность различия показателей группы ПЦО и нет ПЦО;

*p*2 – достоверность различия показателей группы ПМО и нет ПМО/БМО.

Как представлено в табл. 3, у больных, достигших полного цитогенетического ответа, концентрация каспазы 9 составила $2,92 \pm 0,06$ нг/мл, что статистически значимо по сравнению с контрольной группой. В группе больных с отсутствием цитогенетического ответа концентрация каспазы 9 не превышает значения концентрации в контрольной группе и составляет $2,02 \pm 0,02$. Различия между группами ПЦО и нет ПЦО достоверны ($p < 0,05$).

При анализе молекулярного ответа имеются сопоставимые результаты: у больных, достигших большого или полного молекулярного ответа, концентрация каспазы 9 составила $2,62 \pm 0,02$ нг/мл, что достоверно отличается от контроля. У больных, не достигших большого или полного молеку-

лярного ответа, концентрация каспазы 9 – $2,09 \pm 0,04$ нг/мл, что достоверно не выше значений в контрольной группе. Различия между группами ПМО и нет ПМО/БМО достоверны ($p < 0,05$).

Уменьшение концентрации каспазы 9 у больных, не достигших полного цитогенетического и большого молекулярного ответов, по нашему мнению, говорит о том, что терапия гливекком в данном случае, недостаточна для сдерживания патологического клона, который подавляет естественный и индуцированный гливекком механизм апоптоза.

Следующим этапом работы было изучить концентрацию каспазы 9 в конечной точке нашего исследования – 36 месяцев терапии гливекком. Полученные данные представлены в табл. 4.

Таблица 4

Концентрация каспазы 9 у больных ХМЛ, в зависимости от цитогенетического и молекулярного ответов, в срок 36 месяцев лечения гливекком

Показатель	Группа контроль (n = 30)	Больные ХМЛ			
		ПЦО (n = 32)	Нет ПЦО (n = 21)	ПМО/БМО (n = 35)	Нет ПМО/БМО (n = 18)
Концентрация каспазы 9 в сыворотке крови (нг/мл)	$2,03 \pm 0,06$	$4,04 \pm 0,1$ $p < 0,05$ $p1 < 0,05$	$2,41 \pm 0,03$ $p > 0,05$ $p1 < 0,05$	$4,04 \pm 0,1$ $p < 0,05$ $p2 < 0,05$	$2,41 \pm 0,03$ $p > 0,05$ $p2 < 0,05$

Примечания:

p – достоверность различия показателей по сравнению с контрольной группой;

$p1$ – достоверность различия показателей группы ПЦО и нет ПЦО;

$p2$ – достоверность различия показателей группы ПМО и нет ПМО/БМО.

Из данной таблицы следует, что у больных, достигших полного цитогенетического ответа на 36 месяцев терапии гливекком, концентрация каспазы 9 составила $4,04 \pm 0,1$ нг/мл, что статистически значимо по сравнению с контрольной группой. В группе больных с отсутствием цитогенетического ответа концентрация каспазы 9 не превышает значения концентрации в контрольной группе и составляет $2,41 \pm 0,03$ нг/мл. Такие же уровни концентрации каспазы 9 мы видим при анализе молекулярного ответа. У больных, достигших большого или полного молекулярного ответов, концентрация каспазы 9 составила $4,04 \pm 0$ нг/мл, что достоверно отличается от контроля. У больных, не достигших большого или полного молекулярного ответов, концентрация каспазы 9 – $2,41 \pm 0,03$ нг/мл, что не отличается от значений в контрольной группе. Здесь мы видим достоверное увеличение концентрации каспазы 9 у больных с ПЦО и ПМО/БМО по сравнению с группами больных, не достигших этих ответов ($p1 < 0,05$; $p2 < 0,05$).

Проведя анализ полученных данных, можно сделать следующий вывод: концентрация каспазы 9 у больных ХМЛ в контрольной

точке – 24 месяца терапии выше в группе больных, у которых отсутствовал ответ на лечение гливекком. На 30 и 36 месяцев концентрация каспазы 9 меняется противоположным образом: выше в группе с полным цитогенетическим и молекулярным ответом.

Как показали результаты нашего исследования, определить концентрацию маркеров апоптоза (в данном случае каспазы 9) в одной контрольной точке лечения и сделать на основании этого окончательное заключение невозможно.

Своим исследованием мы показали, что концентрация ведущего инициатора каспазозависимого пути апоптоза – каспазы 9, колеблется на различных этапах лечения в зависимости от степени эффективности гливека.

В конечной точке нашего исследования – 36 месяцев терапии гливекком, полученные данные укладываются в определенную логическую цепочку: у больных с полным цитогенетическим ответом концентрация каспазы 9 удерживается на уровне нормальных показателей или несколько выше нормы, что говорит о результативности действия гливека и эффективности процессов апоптоза.

У больных, не достигших полного цитогенетического ответа к сроку 36 месяцев лечения, гливек не сдерживает массы опухоли, процессы апоптоза подавлены, заболевание прогрессирует. И хотя у данной группы больных сохраняются нормальные показатели крови и объективные данные – в любой момент зыбкая система равновесия «апоптоз-опухоль» может рухнуть и гливек полностью потеряет контроль над опухолевым клоном, заболевание начнет прогрессировать до фазы акселерации и бластного криза.

Заключение

Концентрация каспазы 9 в сыворотке крови больных ХМЛ отражает патогенез заболевания. Снижение концентрации каспазы 9 на поздних сроках лечения (более 3 лет) у больных ХМЛ, не реагирующих на терапию гливек, указывает на снижение процессов апоптоза и подавление нормального поликлонального кроветворения более сильной системой – системой опухолевых (лейкозных) клеток. Полученные нами данные подтверждаются клиническими проявлениями и могут использоваться в прогнозировании исходов хронического миелолейкоза.

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. Гливек при хроническом миелолейкозе – достижения, неудачи, проблемы / М.А. Волкова // Гематология и трансфузиология. – 2003. – Т.49, № 2. – С. 35–41.
3. Клиническая онкогематология: руководство для врачей / под ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина, 2001. – 576 с.
4. Куцев С.И. Эволюция мониторинга лечения хронического миелодного лейкоза / С.И. Куцев // Гематология и трансфузиология. – 2009. – Т. 54, № 4. – С. 37–44.
5. Отдаленные результаты выживаемости больных в поздней хронической фазе Ph⁺ хронического миелолейкоза при лечении иматиниб мезилатом (Гливек®) / О.В. Стахина, А.Г. Туркина, Г.А. Гусарова и др. // Вестник гематологии. – 2009. – Т.5, №2. – С. 42.
6. Райхлин, Н.Т. Регуляция и проявления апоптоза в физиологических условиях и в опухолях / Н.Т. Райхлин, А.Н. Райхлин // Вопросы онкологии. – 2002. – Т. 48. – № 2. – С. 159–171.
7. Раннее выявление цитогенетического рецидива при динамическом исследовании уровня BCR-ABL-транскрипта у больного хроническим миелолейкозом / Е.Ю. Чельшева, А.Г. Туркина, А.В. Мисюрин, А.В. Захарова // Гематология и трансфузиология. – 2007. – №2. – С. 50–51.
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. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet / M. Vascari, J. Cortes, F. Pane et al. // J. Clin Oncol. – 2009. – №27(35). – P. 6041–51.
10. Hughes et al. NEJM. – 2003. – №349. – P. 1423–32.

Рецензенты:

Ларина Н.Н., д.м.н., зам главного врача по медицинской части ГУЗ «Александр-Маринская областная клиническая больница», г. Астрахань;

Эсаулова Т.А., д.м.н., профессор, зав. терапевтической службой Негосударственного учреждения здравоохранения «Медико-санитарная часть», г. Астрахань.

Работа поступила в редакцию 23.11.2011.