Apoptotic markers in CD34-positive cells in acute leukemias

Ye.N. Parovichnikova[1], Ye.Ye. Khodunova[1], I.V. Galtseva[1], S.M. Kulikov[1], V.V. Troitskaya[1], L.A. Kuzmina[1], D.V. Shcheblyakov[2], and V.G. Savchenko[1]

ABSTRACT

Objective. To evaluate expression of Bcl-2, Bax, p53, CD95, and ACE on CD34+ cells of peripheral blood and bone marrow during induction chemotherapy in the patients with newly diagnosed acute leukemia. **Materials and methods**. Expression of Bcl-2, Bax, p53, CD95, and ACE on CD34+ cells of the peripheral blood and bone marrow in 23 patients with AL (14 AML and 9 ALL) was measured using flow cytometry analysis. Peripheral blood and bone marrow samples were analyzed before chemotherapy and during the induction course: on Days +8, +21 (blood only), and +36–38. The control group consisted of 8 healthy donors. **Results.** Bcl-2 expression on CD34+ sells in BM was 34.8 ± 6% and significantly higher compared to the donors (11.5 ± 1.8%) at the time of diagnosis. On Days +36–38 after the onset of chemotherapy, no significant difference between the patients and control groups were found. CD34/Bax coexpression in BM cells of ALL patients was significantly higher than in AML patients and donors. ACE and p53 expression on CD34+ cells in AL patients before and during chemotherapy was significantly lower than in the donors. CD34/ACE coexpression in PB and BM cells of AL patients and donors showed no significant differences at any time-points of evaluation. **Conclusion.** The above changes suggest the imbalance between the pro- and anti-apoptotic proteins in AL patients. After chemotherapy, the expression profile of these proteins considerably changed, but did not reach the healthy donor values.

Keywords: acute leukemias, apoptosis, expression of Bcl-2, Bax, p53, CD95, and ACE.

[1] Hematology Research Center, RF Ministry of Health
125167, Novyy Zykovskiy pr., d. 4a, Moscow, Russian Federation
[2] N.F. Gamalei Research Institution of Epidemiology and Microbiology, RF Ministry of Health
123098, ul. Gamalei, d. 18, Moscow, Russian Federation

Ye.N. Parovichnikova, DSci, Head of division of chemotherapy for hematological malignancies, hematopoiesis depression, and BMT
elenap@blood.ru

Ye.Ye. Khodunova, PhD, postgraduate student, Department of chemotherapy for hematological malignancies and hematopoiesis depression

I.V. Galtseva, PhD, Head of laboratory of blood cells and bone marrow immunophenotyping

S.M. Kulikov, PhD, Head of information-and-analysis department

V.V. Troitskaya, PhD, Head of department of chemotherapy for hematological malignancies and hematopoiesis depression

L.A. Kuzmina, PhD, Head of department of high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation

D.V. Shcheblyakov, PhD, Chief scientific worker, Laboratory of molecular biothechnology

V.G. Savchenko, DSci, Academician of RAMS, Professor, Director General, Hematology Research Center, RF MH

Correspondence should be sent to Ye.N. Parovichnikova
125167, Novyy Zykovskiy pr., d. 4a, Moscow, Russian Federation
Tel.: +7 (495) 6124313

Принято в печать: 29 сентября 2013 г.

Маркеры апоптоза в CD34-позитивных клетках при острых лейкозах

Е.Н. Паровичникова[1], Е.Е. Ходунова[1], И.В. Гальцева[1], С.М. Куликов[1], В.В. Троицкая[1], Л.А. Кузьмина[1], Д.В. Щебляков[2], В.Г. Савченко[1]

РЕФЕРАТ

Цель. Определить экспрессию белков Bcl-2, Bax, CD95, p53 и АПФ (ангиотензинпревращающий фермент) в клетках CD34+ периферической крови (ПК) и костного мозга (КМ) у больных с впервые выявленным острым лейкозом (ОЛ) на разных этапах индукционной терапии. **Материалы и методы.** Экспрессию Bcl-2, Bax, p53, CD95 и АПФ определяли в клетках CD34+ ПК и КМ у 23 больных ОЛ (14 — ОМЛ и 9 — ОЛЛ) методом проточной цитофлюориметрии. Образцы ПК и КМ исследовали до начала химиотерапии и в период индукционного лечения: на +8, +21 (только кровь) и +36–38-й дни от начала лечения. В группу контроля включено 8 доноров крови и костного мозга. **Результаты.** Экспрессия Bcl-2 на клетках CD34+ КМ у больных ОЛ (ОМЛ, ОЛЛ) на момент диагностики составила 34,8 ± 6% и была статистически значимо выше, чем в контрольной группе здоровых доноров, — 11,5 ± 1,8%. На +36–38-й день от начала химиотерапии не выявлено существенных отличий в количестве клеток CD34+/Bcl-2+ КМ и ПК как между больными ОЛ и контрольной группой, так и между группами пациентов с ОМЛ и ОЛЛ. Количество клеток CD34+/Bax+ при ОЛЛ в начале заболевания было статистически значимо выше по сравнению с больными ОМЛ и контрольной группой ($p < 0,005$). Экспрессия АПФ и p53 в клетках CD34+ у больных ОЛ на момент диагностики и после курса химиотерапии была значимо ниже, чем у здоровых доноров. При исследовании экспрессии CD95 на клетках CD34+ КМ и ПК у больных ОЛ в период индукционного курса и в контрольной группе значимых отличий как между больными ОМЛ и ОЛЛ, так и между больными ОЛ и контрольной группой нами не обнаружено. **Заключение.** Выявленные изменения свидетельствуют о дисбалансе про- и антиапоптотических белков-регуляторов у больных ОЛ. После химиотерапии профиль экспрессии этих белков существенно меняется, однако не достигает нормальных значений, как у здоровых доноров.

Ключевые слова:
острые лейкозы, программированная клеточная гибель (апоптоз), экспрессия Bcl-2, Bax, p53, CD95 и АПФ.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные достижения в лечении острых лейкозов (ОЛ), количество резистентных форм заболевания и частота развития рецидивов остаются по-прежнему высокими. Актуальной проблемой современной лейкозологии служит поиск новых эффективных подходов к терапии ОЛ. Одно из основных направлений исследований в этой области — это изучение биологических особенностей опухолевых клеток с целью определить новые факторы прогноза для создания эффективных дифференцированных программ химиотерапии (ХТ).

[1] ФГБУ «Гематологический научный центр» МЗ РФ
125167, Новый Зыковский пр., д. 4а, Москва, Российская Федерация
[2] ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ
123098, ул. Гамалеи, д. 18, Москва, Российская Федерация

Доказано, что в развитии большинства злокачественных опухолей важную роль играет нарушение баланса между пролиферацией и способностью клеток к естественной гибели (апоптозу) [1]. Важнейшая функция апоптоза — элиминация трансформированных клеток, например, при канцерогенной трансформации, вирусной инфекции или необратимом повреждении [1–4]. Индукция апоптоза служит основным механизмом действия большинства химиопрепаратов, применяемых при интенсивном лечении ОЛ [5].

В настоящее время наиболее изучены два основных взаимосвязанных пути реализации апоптоза: митохондриальный и рецепторный, в которых заложен принцип сбалансированного взаимодействия про- и антиапоптотических факторов, например белков семейства Bcl-2, белков p53 и CD95 [1, 2, 6, 7]. Последние 10 лет активно обсуждается роль нарушений регуляции митохондриального пути апоптоза в развитии ОЛ и резистентности опухолевых клеток к цитостатическому воздействию [8–10]. Так, D.E. Banker и соавт. выявили снижение спонтанного апоптоза во фракции клеток с повышенной экспрессией Bcl-2 при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) [11]. В своих исследованиях A. Stijn и соавт. определили, что фракция бластных клеток CD34+ при ОМЛ более устойчива к апоптозу по сравнению с фракцией CD34–; в ней выявлен высокий уровень экспрессии Bcl-2, Bcl-xL и низкий уровень белка Bax [12].

Ключевую роль в регуляции рецепторного пути апоптоза занимает белок CD95. В некоторых исследованиях было показано, что в культуре клеток, полученных от больных лейкозами, раком толстой кишки, гепатомой и нейробластомой, после проведения ХТ или лучевого лечения значительно увеличивалась экспрессия CD95 на поверхности клеток [13, 14]. А.Ю. Барышников и соавт. в своих исследованиях определили, что безрецидивная и общая выживаемость в течение 60 мес. у детей, больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), бластные клетки которых экспрессировали CD95, была статистически значимо лучше, чем у детей, у которых CD95 на бластных клетках костного мозга не определялся [15]. S. Molica и соавт. было показано, что при М2- и М3-вариантах ОМЛ повышена экспрессия CD95 и снижена экспрессия Bcl-2, чем, вероятно, и обусловлен высокий процент достижения ремиссий при этих вариантах заболеваниях [16].

Ключевую роль в поддержании геномной стабильности клетки играет так называемый белок бессмертия — транскрипционный фактор p53. Он участвует в регуляции:

- генов рецепторов смерти (*DR5, Fas*);
- генов, отвечающих за остановку клеточного деления (*P21, GADD45* и др.);
- генов, запускающих апоптоз (*BAX, KILLER DR5, PIG* и др.);
- вызывает репрессию генов, ингибирующих апоптоз (*BCL2, RELA*) [17–20].

Мутации гена *TP53* и нарушение функции белка p53 встречаются и при ОЛ. Так, при ОЛЛ у взрослых мутации гена *TP53* отмечаются в 13 % случаев в отличие от ОЛЛ у детей, у которых они составляют 2 %. Это может обусловливать более благоприятный прогноз и высокую частоту достижения ремиссии у детей [21, 22]. G.B. Cavalcanti и соавт., исследуя экспрессию p53 у 223 пациентов с различными гематологическими заболеваниями (ОМЛ, ОЛЛ, ХЛЛ и ХМЛ), выявили повышенную экспрессию белка у больных ОМЛ при развитии рецидивов, а также у больных ХМЛ и ХЛЛ на поздних стадиях заболевания [23].

Ангиотензинпревращающий фермент (АПФ; CD143) хорошо известен как белок, регулирующий АД. Однако участие в регуляции АД, хотя и основная, но не единственная функция АПФ. В недавних исследованиях была выявлена экспрессия АПФ как на поверхности эмбриональных и региональных (взрослых) полипотентных стволовых клеток, так и на бластных клетках при ОЛ [24–26]. Было показано, что АПФ участвует в регуляции концентрации пептида AcSDKP, который служит негативным регулятором пролиферации стволовых кроветворных клеток в костном мозге [27]. В ряде исследований определена повышенная экспрессия фермента на дендритных клетках здоровых доноров и его отсутствие у больных ОМЛ [28, 29].

Таким образом, определение нарушений в сложных механизмах программированной клеточной гибели обеспечивает понимание чувствительности или резистентности опухолевых клеток к проводимому лечению. В связи с этим мы поставили задачу изучить экспрессию белков Bcl-2, Bax, CD95, p53 и ТПР-2 (Toll-подобные рецепторы) в клетках CD34+ периферической крови (ПК) и костного мозга (КМ) у больных с впервые выявленным ОЛ на разных этапах индукционной терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 23 больных ОЛ (14 — ОМЛ и 9 — ОЛЛ) в возрасте от 17 до 87 лет (медиана 30 лет). Всем больным индукционную ХТ проводили по программам, принятым в ФГБУ «Гематологический научный центр» МЗ РФ. Больным ОМЛ первый индукционный курс выполняли по схеме «7+3», а больным ОЛЛ — по протоколу ОЛЛ-2009. Из больных ОМЛ 1 пациентка умерла на 7-й день терапии, а 1 пациент отказался от лечения на 5-й день. На 36–38-й день после начала индукционной ХТ у больных ОЛ на основании процентной концентрации бластных клеток в КМ оценивали достижение ремиссии заболевания. После первого курса ХТ ремиссия заболевания была достигнута у всех больных ОЛЛ и у 7 из 12 больных ОМЛ.

Образцы ПК и КМ больных ОЛ исследовались до начала ХТ и в период индукционного лечения: на 8, 21 (только кровь) и 36–38-й дни от начала терапии. В группу контроля включено 8 доноров крови и костного мозга. Определение экспрессии маркеров апоптоза и ТПР в клетках CD34+ анализировали на проточном цитофлюориметре Cytomics FC 500 с использованием моноклональных антител CD34 (Per CP, клон 8G12, BD), Bcl-2 (PE, клон 100, BD), Bax (FITC, клон 2D2, Santa Cruz), CD95 (FITC, клон DX2, BD), p53 (PE, клон G59–13, BD), ТПР-2 (FITC, клон 11G7, BD).

Для определения экспрессии поверхностных антигенов (CD34, CD95, ТПР-2) в пробирки со 100 мкл цельной крови и/или КМ добавляли в требуемом объеме моноклональные антитела (мкАТ); в пробирки с изотипическим контролем — неспецифические мышиные иммуноглобулины, меченные соответствующими флюорохромами. Пробы инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. После этого проводили лизис

эритроцитов и фиксацию клеток раствором Immunoprep reagent system (Beckman coulter). Затем выполняли анализ проб на проточном цитометре.

Для окрашивания внутриклеточных антигенов (Bcl-2, Bax, p53) в пробирки со 100 мкл цельной крови и/или КМ добавляли в требуемом объеме мкАТ к CD34; в пробирки с изотипическим контролем — неспецифические мышиные иммуноглобулины, меченные соответствующими флюорохромами. Пробы инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем лизировали эритроциты раствором Lysis Buffer (BD). Нелизированные ядерные клетки осаждали центрифугированием (1000 об./мин, 10 мин при температуре 4 °С). После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в 1 мл солевого фосфатного буфера (PBS) и повторяли осаждение. Пермеабилизация (изменение проницаемости клеточной мембраны) клеток выполнялась раствором Cytofix/Cytoperm Plus (BD). Затем ядерные клетки отмывали раствором Perm/wash (BD) и инкубировали в течение 20 мин с требуемым объемом мкАТ к внутриклеточным белкам Bcl-2, Bax и p53. После инкубации клетки отмывали в фосфатном буфере и анализировали на проточном цитометре. Учитывая применение двух и более флюорохромов, полученные результаты анализировали после коррекции спектральных пересечений (электронная компенсация). В каждом образце исследовали не менее 10 000 клеток.

Статистическая обработка полученных данных выполнена с помощью статистического пакета SAS. Для поиска закономерностей в динамических рядах лабораторных параметров использовались эвристические методы. Кроме того, при анализе данных применяли традиционные методы описательной статистики. Для получения достоверных результатов при статистическом анализе использовался более строгий уровень статистической значимости — менее 0,005.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 представлено процентное содержание клеток CD34+ в бластной популяции ПК и КМ у больных ОЛ. На момент диагностики ОЛ нами не выявлено значительных различий в количестве клеток CD34+ в зависимости от варианта заболевания, но оно было значимо выше, чем у здоровых доноров ($p < 0,005$). На 36–38-й день после начала индукционной ХТ отмечалось существенное снижение числа клеток CD34+ в обеих группах больных ($p < 0,005$). Более высокий процент этих клеток после индукционной ХТ у больных ОМЛ по сравнению с больными ОЛЛ обусловлен, по-видимому, отсутствием ремиссии у 5 человек в этой группе.

Таблица 1. Количество клеток CD34+ в костном мозге и периферической крови у больных острыми лейкозами и здоровых доноров

Группа	Клетки CD34+ в КМ, % M ± m (диапазон)		Клетки CD34+ в ПК, % M ± m (диапазон)	
	До лечения	36–38-й день	До лечения	36–38-й день
ОМЛ (n = 14)	41,5 ± 6,9* (0,2–85,5)	7,7 ± 5,5 (0,6–63,3)	24,8 ± 5,5* (0,5–80,0)	6,2 ± 4,5 (0,2–51,0)
ОЛЛ (n = 9)	39,0 ± 10,6* (1,0–93,2)	2,6 ± 1,4 (0,4–14,0)	24,8 ± 8,6* (0,3–73,1)	0,7 ± 0,2 (0,1–2,4)
Доноры (n = 8)	1,9 ± 0,4 (0,4–3,8)		0,5 ± 0,1 (0,1–1,1)	

* $p \leq 0,005$ при сравнении с аналогичными клетками здоровых доноров.

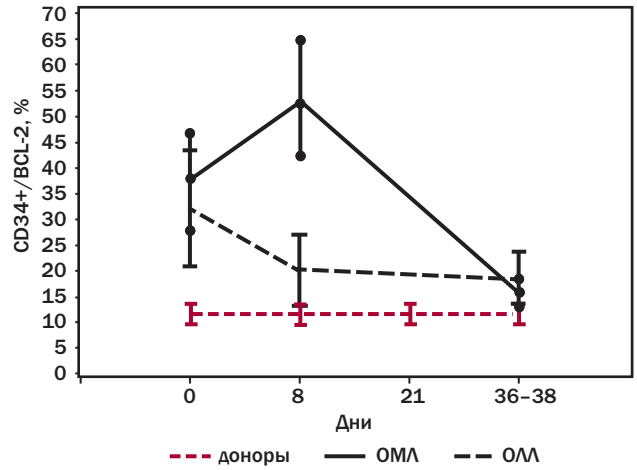

Рис. 1. Динамика экспрессии Bcl-2 в клетках CD34+ костного мозга у больных острыми миелоидными лейкозами (n = 14) и острым лимфобластным лейкозом (n = 9) в период индукционной терапии. Доноры (n = 8)

При анализе экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 было определено, что количество клеток CD34+/Bcl-2+ в КМ у больных ОЛ на момент диагностики составило 34,8 ± 6,0 % и было статистически значимо выше, чем в контрольной группе здоровых доноров, — 11,5 ± 1,8 %. В ПК не было существенных различий в содержании этих клеток между больными ОЛ и контрольной группой, которое составило 37,2 ± 7,4 и 26,3 ± 6,2 % соответственно. Также не было определено существенных отличий в числе клеток CD34+/Bcl-2+ в КМ и ПК между группами больных ОМЛ и ОЛЛ (рис. 1 и 2).

На 8-й день терапии у больных ОМЛ отмечалось увеличение количества клеток CD34+/Bcl-2+ в КМ до 53,1 ± 11,7 %, а затем их снижение к 36–38-му дню до 15,4 ± 2,7 % (см. рис. 1), в то время как у больных ОЛЛ выявлено постепенное уменьшение этих клеток в течение индукционного курса ХТ с 32,0 ± 11,2 до 18,2 ± 6,2 %. Как и в КМ, на 8-й день от начала ХТ у больных ОМЛ отмечалось значительное увеличение количества клеток CD34+/Bcl-2+ в ПК до 62,5 ± 4,5 %, а затем их постепенное снижение к 36–38-му дню до 23,6 ± 4,0 % (см. рис. 2). В отличие от больных ОМЛ у пациентов с ОЛЛ не было выявлено существенных изменений в количестве

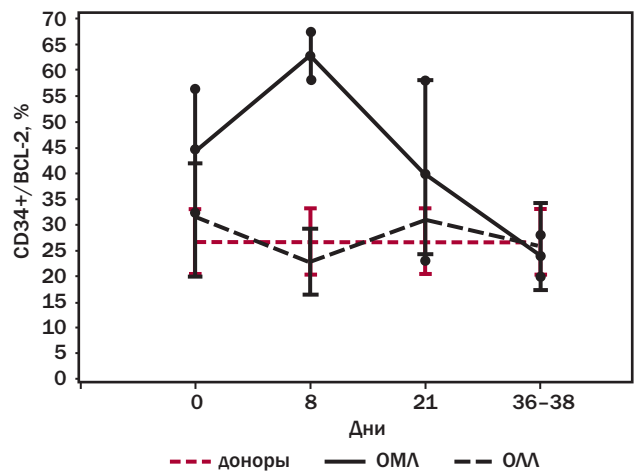

Рис. 2. Динамика экспрессии Bcl-2 в клетках CD34+ периферической крови у больных острыми миелоидными лейкозами (n = 14) и острым лимфобластным лейкозом (n = 9) в период индукционной терапии. Доноры (n = 8)

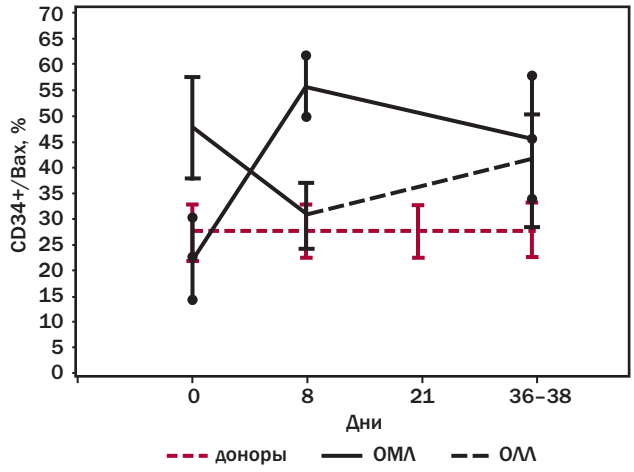

Рис. 3. Динамика экспрессии Bax в клетках CD34+ костного мозга у больных острыми миелоидными лейкозами (n = 14) и острым лимфобластным лейкозом (n = 9) в период индукционной терапии. Доноры (n = 8)

этих клеток в течение индукционного курса ХТ, которое варьировало от 23,4 ± 7,0 до 32,3 ± 7,9 %. На 36–38-й день от начала ХТ не наблюдалось существенных отличий в содержании клеток CD34+/Bcl-2+ в КМ и ПК как в группе больных ОЛ и контрольной, так и в группах больных ОМЛ и ОЛЛ (см. рис. 1 и 2).

При исследовании экспрессии проапоптотического белка Bax в клетках CD34+ КМ на момент диагностики заболевания выявлены отличия в процентном содержании клеток CD34+/Bax+ у больных разных групп (рис. 3). Так, количество этих клеток у больных ОЛЛ составило 48,2 ± 9,3 % и было статистически значимо выше по сравнению с больными ОМЛ — 24,7 ± 7,5 % ($p < 0,005$). На 8-й день от начала ХТ наблюдалось значимое повышение числа клеток CD34+/Bax+ КМ у больных ОМЛ до 62,2 ± 11,8 % и его снижение у больных ОЛЛ до 28 ± 7,0 %. На 36–38-й день от начала ХТ отмечено примерно одинаковое количество клеток CD34+/Bax+ в КМ у больных ОМЛ и ОЛЛ (46,3 ± 12,3 и 38,0 ± 12,8 % соответственно). Таким образом, на 36–38-й день от начала ХТ не выявлено статистически значимой разницы между больными ОЛ и контрольной группой.

Как показано на рис. 4, в ПК на момент диагностики заболевания не было выявлено существенных отличий в количестве клеток CD34+/Bax+ между больными ОМЛ и ОЛЛ (35,9 ± 9,8 и 39,8 ± 4,5 % соответственно), но оно было статистически значимо меньше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,005$). Кроме того, у больных ОМЛ на 8, 21 и 36–38-й дни процент клеток CD34+/Bax+ был незначительно больше, чем у больных ОЛЛ (см. рис. 4), однако статистически значимых отличий получено не было. К 36–38-му дню от начала ХТ количество клеток CD34+/Bax+ в ПК у больных ОМЛ составило 50,2 ± 11,8 %, а у больных ОЛЛ — 39,9 ± 11,2 %. Таким образом, на 36–38-й день у больных ОЛ значений контрольной группы достигнуто не было.

При анализе экспрессии p53 на клетках CD34+ КМ не было выявлено существенных отличий между больными ОЛ и контрольной группой как на момент диагностики заболевания, так и в течение всего курса индукционной ХТ, в то время как в ПК процентное содержание клеток CD34+/p53+ у больных ОЛ на момент диагностики заболевания был статистически значимо ниже, чем у здоровых доноров (рис. 5). На 8-й и 21-й дни у больных ОМЛ отмечено повышение числа клеток CD34+/p53+ в 2 раза (55,6 ± 7,8 и 52,7 ± 9,4 %), а затем снижение их числа на 36–38-й день до 29,9 ± 8,6. У больных ОЛЛ наблюдалось постепенное увеличение клеток CD34+/p53+ с 25,4 ± 7,7 % на 8-й день до 46,0 ± 9,2 % на 36–38-й день. Таким образом, не было статистически значимых отличий в количестве клеток CD34+/p53+ между группами больных на 36–38-й день, но у больных ОМЛ оно было меньше. Так же как и в начале заболевания, на 36–38-й день процентное содержание клеток CD34+/p53+ у больных ОЛ было статистически значимо ниже по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,005$).

При анализе экспрессии АПФ на клетках CD34+ КМ нами не обнаружено существенных отличий в количестве клеток CD34+/АПФ+ как между группами больных ОЛЛ и ОМЛ в течение индукционного курса ХТ, так и между больными ОЛ и контрольной группой на момент диагностики заболевания и после индукционной ХТ. В отличие от КМ в ПК выявлены различия в экспрессии АПФ на клетках CD34+ между больными ОЛ и контрольной группой в течение индукционного курса ХТ (рис. 6). Так, количество клеток CD34+/АПФ+ ПК у больных ОЛ в начале заболевания было статистически значимо меньше по сравнению

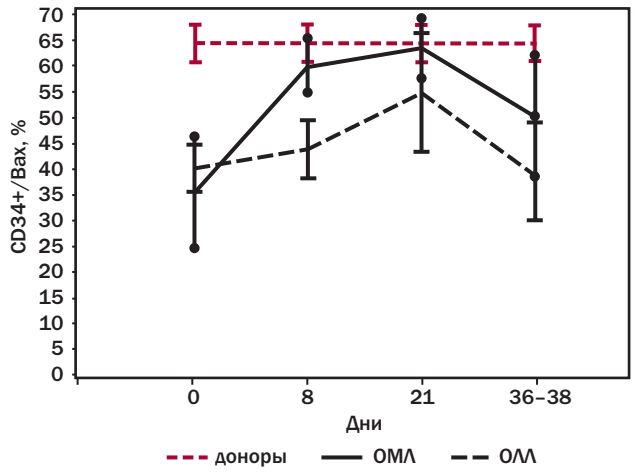

Рис. 4. Динамика экспрессии Bax в клетках CD34+ периферической крови у больных острыми миелоидными лейкозами (n = 14) и острым лимфобластным лейкозом (n = 9) в период индукционной терапии. Доноры (n = 8)

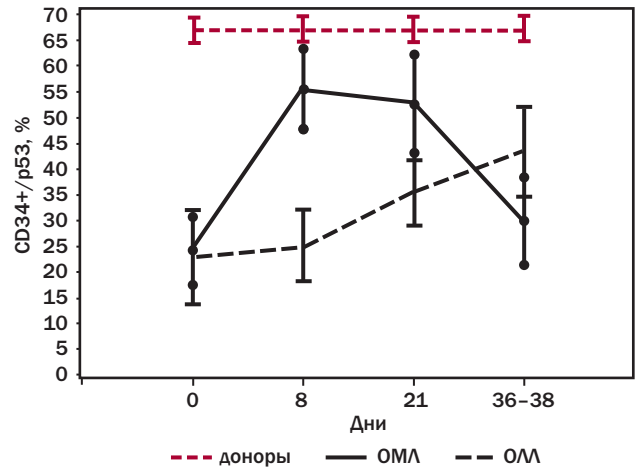

Рис. 5. Динамика экспрессии p53 в клетках CD34+ периферической крови у больных острыми миелоидными лейкозами (n = 14) и острым лимфобластным лейкозом (n = 9) в период индукционной терапии. Доноры (n = 8)

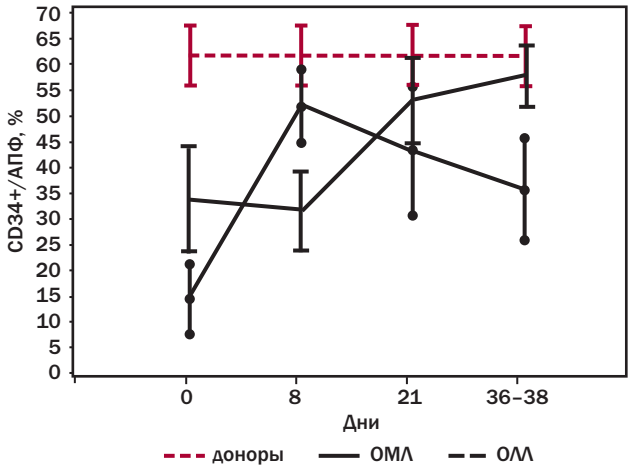

Рис. 6. Динамика экспрессии ангиотензинпревращающего фермента в клетках CD34+ периферической крови у больных острыми миелоидными лейкозами (n = 14) и острым лимфобластным лейкозом (n = 9) в период индукционной терапии. Доноры (n = 8)

с контрольной группой ($p < 0{,}005$) и составило 22,7 ± 5,9 и 67,0 ± 11,4 % соответственно. На момент диагностики заболевания не было статистически значимых отличий в экспрессии АПФ клетками CD34+ ПК между группами больных. Однако у больных ОЛЛ она была в среднем выше (ОМЛ — 15,9 ± 6,7 %, ОЛЛ — 33,2 ± 10,3 %). На 8-й день терапии отмечалось статистически значимое повышение числа клеток CD34+/АПФ+ у больных ОМЛ до 51,5 ± 7,0 % ($p < 0{,}005$), а у больных ОЛЛ количество этих клеток не изменилось и составило 26,7 ± 8,7 %. На 21-й день от начала ХТ выявлена практически одинаковая экспрессия АПФ на клетках CD34+ (ОМЛ — 46,2 ± 12,6 %, ОЛЛ — 53,7 ± 9,3 %). На 36–38-й день от начала ХТ определена статистически значимая высокая экспрессия АПФ у больных ОЛЛ в связи с увеличением количества клеток CD34+/АПФ+ до 65,9 ± 13,3 % и уменьшением этих клеток у больных ОМЛ до 35,2 ± 9,8 %. Таким образом, на 36–38-й день от начала ХТ у больных ОЛ отмечено увеличение клеток CD34+/АПФ+ в ПК до 39,0 ± 7,1 %, но значений контрольной группы достигнуто не было.

При исследовании экспрессии CD95 на клетках CD34+ в КМ и ПК у больных ОЛ в течение индукционного курса и в контрольной группе нами не выявлено значимых отличий как между больными ОМЛ и ОЛЛ, так и между больными ОЛ и контрольной группой.

ОБСУЖДЕНИЕ

Семейство клеточных белков Bcl-2 играет важную роль в регуляции митохондриального пути апоптоза. Повышение экспрессии белка Bcl-2 на бластных клетках КМ при ОМЛ подтверждено в ряде исследований. Аналогично нашим данным A. Stijn и соавт. в своих исследованиях выявили более высокую экспрессию белка Bcl-2 и низкий уровень экспрессии Bax именно на бластных клетках CD34+ у больных ОМЛ [11, 12]. На этом основании можно заключить, что для ОЛ с высоким числом бластных клеток CD34+ в большей степени характерна резистентность опухоли к цитостатическому воздействию. Кроме того, в ряде исследований подтверждено, что высокая экспрессия Bcl-2 ассоциируется с незрелым вариантом ОМЛ и плохим прогнозом заболевания [16, 30]. Предполагается, что прогностическую значимость при ОМЛ имеет не экспрессия этих маркеров по отдельности, а соотношение их экспрессии. Так, Del Poeta и соавт. определили, что при соотношении экспрессии Bax/Bcl-2 менее 0,3 ОМЛ относился к низкодифференцированному варианту и характеризовался наличием хромосомных аберраций, а индекс экспрессии более 0,3 коррелировал с высокой частотой достижения ремиссии и ее продолжительностью [30]. В отличие от ОМЛ при ОЛЛ рядом исследователей не было подтверждено корреляции между высокой экспрессией Bcl-2, а также индексом экспрессии Bax/Bcl-2 и плохим прогнозом заболевания [31, 32]. По данным H.A. El-Mahallawy и соавт., в этой группе больных была выявлена связь только между высокой экспрессией Bcl-2 и возрастом старше 18 лет [31]. Однако в литературе не найдены работы, посвященные экспрессии Bcl-2 и Bax у больных ОЛ в динамике. Нами же выявлены значимые изменения в экспрессии этих белков у больных ОЛ в период индукционного курса ХТ, а также отличия в их экспрессии у больных ОМЛ и ОЛЛ, которые могут быть связаны как с разной тактикой химиотерапевтического воздействия в этих группах, так и с биологическими различиями собственно бластных клеток.

При исследовании экспрессии p53 на клетках CD34+ нами не выявлено существенных различий в количестве этих клеток в КМ между больными в течение индукционной ХТ и контрольной группой. Однако в контрольной группе в ПК процент клеток CD34+/p53+ был статистически значимо выше. Это может свидетельствовать о том, что у здоровых доноров клетки CD34+, выходящие в кровоток, имеют другие биологические характеристики по сравнению с костномозговыми клетками CD34+. Можно также предположить, что в этих клетках активирована программа апоптоза. Эти данные согласуются с результатами исследований G.B. Cavalcanti и соавт., в которых было показано, что для впервые выявленных ОЛ повышение экспрессии белка p53 в бластных клетках нехарактерно [23].

В недавних исследованиях определено, что АПФ через регуляцию пептида AcSDKP активирует пролиферацию кроветворных клеток костного мозга [27]. Так, A. Jokubatis и соавт. в своих исследованиях показали, что стволовые кроветворные клетки пуповинной крови, которые экспрессируют АПФ, образуют в 10 раз больше колоний, чем клетки без экспрессии этого белка [26]. Повышение экспрессии АПФ и других пептидов ренин-ангиотензиновой системы на мононуклеарных клетках КМ также выявлено при истинной полицитемии [33]. По данным литературы, экспрессия АПФ обнаруживается и на бластных клетках при ОЛ [24–26]. Так, S. Aksu и соавт. отметили повышение экспрессии АПФ на бластных клетках при ОМЛ по сравнению с контрольной группой [34]. Однако мы не обнаружили существенной разницы в экспрессии АПФ на клетках CD34+ КМ между больными ОЛ и контрольной группой.

Известно, что проапоптотический белок CD95 играет ключевую роль в регуляции апоптоза. Его экспрессия определена на фибробластах, кератиноцитах, клетках печени, сердца, яичников, на дендритных клетках и клетках иммунной системы (кортикальные тимоциты, клетки памяти, активированные Т- и В-лимфоциты и др.). Повышенная экспрессия CD95 выявлена на опухолевых клетках при HTLV-I — ассоциированном Т-клеточном лейкозе/лимфоме, Т-ОЛЛ, лимфоме Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфоме пожилых, ассоциированной

с вирусом Эпштейна—Барр [35, 36]. В ряде исследований было показано, что уровень экспрессии CD95 на лимфоцитах ПК зависит от возраста людей. У новорожденных этот антиген экспрессируется очень слабо, у старших детей и здоровых взрослых отмечается повышение его экспрессии [37]. В некоторых исследованиях показано, что в культуре клеток, полученных от больных лейкозами, раком толстой кишки, гепатомой и нейробластомой, после проведения ХТ или лучевого лечения значительно увеличивалась экспрессия CD95 на поверхности клеток [13, 14]. T. Kotani и соавт. при исследовании ПК больных Т-ОЛЛ выявили значительное повышение экспрессии CD95 на мононуклеарах больных по сравнению с контрольной группой здоровых доноров [38]. А.Ю. Барышников и соавт. в своих исследованиях показали, что безрецидивная и общая выживаемость в течение 60 мес. у детей, больных ОЛЛ, бластные клетки которых экспрессировали CD95, была статистически значимо лучше, чем у детей, у которых CD95 на бластных клетках костного мозга не определялся [15]. В нашем исследовании при анализе экспрессии этого белка во взрослой популяции не выявлено существенных отличий в его экспрессии на клетках CD34+ у больных ОЛ и здоровых доноров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимо отметить, что полученные нами данные свидетельствуют о дисбалансе про- и антиапоптотических белков-регуляторов в бластных клетках CD34+ КМ и ПК у больных ОЛ. Однако, учитывая небольшое число больных и достижение ремиссии у 19 из 23 пациентов, определить прогностическую значимость экспрессии исследуемых белков на течение заболевания не представляется возможным. Тем не менее выявленные нами тенденции показывают необходимость продолжения дальнейших исследований в этой области.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hengartner M.O.* The biochemistry of apoptosis. Nature 2000; 407(6805): 770–6.

2. *Lodish H., Berk A., Matsudaira P. et al.* Molecular cell biology, 5th edn. New York: W.H. Freeman and Company, 2003: 961.

3. *Salminen A., Ojala J., Kaarniranta K.* Apoptosis and aging: increased resistance to apoptosis enhances the aging process. Cell. Mol. Life Sci. 2011; 68(6): 1021–31.

4. *Spencer S.L., Sorger P.K.* Measuring and modeling apoptosis in single cells. Cell 2011; 144(6): 926–39.

5. *Herr I., Debatin K.-M.* Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. Blood 2001; 98(9): 2603–14.

6. *Chao D.T., Korsmeyer S. J.* BCL-2 family: regulators of cell death. Ann. Rev. Immunol. 1998; 16: 395–419.

7. *Green D.R.* Apoptotic pathways: The roads to ruin. Cell 1998; 94: 695–8.

8. *Chauncey T.R.* Drug resistance mechanisms in acute leukemia. Curr. Opin. Oncol. 2001; 13(1): 21–6.

9. *Del Poeta G., Bruno A., Del M.I.* Principe et al. Deregulation of the mitochondrial apoptotic machinery and development of molecular targeted drugs in acute myeloid leukemia. Curr. Cancer Drug Targets 2008; 8(3): 202–7.

10. *Testa U., Riccioni R.* Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. Haematologica 2007; 92(1): 81–94.

11. *Banker D.E., Groudine M., Norwood T., Appelbaum F.R.* Measurement of spontaneous and therapeutic agent-induced apoptosis with BCL-2 protein expression in acute myeloid leukemia. Blood 1997; 89(1): 243–55.

12. *Stijn A., Pol M.A., Kok A. et al.* Differences between the CD34+ and CD34– blast compartments in apoptosis resistance in acute myeloid leukemia. Haematologica 2003; 88(5): 497–508.

13. *Fulda S., Los M., Friesen C., Debatin K.M.* Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system. Int. J. Cancer 1998; 76(1): 105–14.

14. *Fulda S., Sieverts H., Friesen C. et al.* The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. Cancer Res. 1997; 57(17): 3823–9.

15. *Барышников А.Ю., Полосухина Е.Р., Шишкин Ю.В. и др.* Новый прогностический маркер острого лимфобластного лейкоза — антиген CD95 (FAS/APO-1). Гематол. и трансфузиол. 1998; 2: 8–11.

Baryshnikov A.Yu., Polosukhina Ye.R., Shishkin Yu.V. i dr. Novyy prognosticheskiy marker ostrogo limfoblastnogo leykoza — antigen CD95 (FAS/APO-1) [New prognostic marker of acute lymphoblastic leukemia — CD95 antigen (FAS/APO-1). In: Hematol. & transfusiol.] Gematol. i transfuziol. 1998; 2: 8–11.

16. *Molica S., Mannella A., Dattilo A. et al.* Differential expression of BCL-2 oncoprotein and Fas antigen on normal peripheral blood and leukemic bone marrow cells. A flow cytometric analysis. Haematologica 1996; 81(4): 302–9.

17. *Greenblatt M.S., Bennett W.P., Hollstein M., Harris C.C.* Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res. 1994; 54(18): 4855–78.

18. *Ko L.J., Prives C.* p53: puzzle and paradigm. Genes & Dev. 1996; 10(9): 1054–72.

19. *Levine A.J.* p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 1997; 88(3): 323–31.

20. *Resnick M.A., Tomso D., Inga A. et al.* Functional diversity in the gene network controlled by the master regulator p53 in humans. Cell. Cycle 2005; 4(8): 1026–9.

21. *Prokocimer M., Rotter V.* Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages. Blood 1994; 84(8): 2391–411.

22. *Wada M., Bartram C.R., Nakamura H. et al.* Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. Blood 1993; 82(10): 3163–9.

23. *Cavalcanti G.B., Scheiner M.A., Simoes Magluta E.P. et al.* p53 flow cytometry evaluation in leukemias: correlation to factors affecting clinical outcome. Cytometry B. Clin. Cytom. 2010; 78(4): 253–9.

24. *Beyazit Y., Aksu S., Haznedaroglu I.C. et al.* Overexpression of the local bone marrow renin-angiotensin system in acute myeloid leukemia. J. Natl. Med. Assoc. 2007; 99: 57–63.

25. *Goker H., Haznedaroglu I.C., Beyazit Y. et al.* Local umbilical cord blood renin-angiotensin system. Ann. Hematol. 2005; 84: 277–81.

26. *Jokubaitis V.J., Sinka L., Driessen R. et al.* Angiotensin-converting enzyme (CD143) marks hematopoietic stem cells in human embryonic, fetal, and adult hematopoietic tissues. Blood 2008; 111: 4055–63.

27. *Li J., Volkov L., Comte L. et al.* Production and consumption of the tetrapeptide AcSDKP, a negative regulator of hematopoietic stem cells, by hematopoietic microenvironmental cells. Exp. Hematol. 1997; 25: 140–6.

28. *Гальцева И.В., Пашин Л.Е., Савченко В.Г.* Лейкемические дендритные клетки. Тер. арх. 2008; 80(7): 84–8.

Galtseva I.V., Pashin L.Ye., Savchenko V.G. Leykemicheskiye dendritnyye kletki [Leukemic dendritic cells. In: Ther. archive]. Ter. arkh. 2008; 80(7): 84–8.

29. *Danilov S.M., Sadovnikova E., Scharenborg N. et al.* Angiotensin-converting enzyme (CD 143) is abundantly expressed by dendritic cells and discriminates human monocyte-derived dendritic cells from acute myeloid leukemia-derived dendritic cells. Exp. Hematol. 2003; 31(12): 1301–9.

30. *Del Poeta G., Venditti A., Del Principe M.I. et al.* Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). Blood 2003; 101(6): 2125–31.

31. *El-Manallawy H.A., El-Shkankiry N.H., El-Guindy S. et al.* The Expression of Bcl-2 and Bax Proteins and Their Clinical Relevance in ALL and CLL Patients. J. Egypt. Nat. Cancer Inst. 2001; 13(1): 35–42.

32. *Hogarth L.A., Hall A.G.* Increased BAX expression is associated with an increased risk of relapse in childhood acute lymphocytic leukemia. Blood 1999; 93(8): 2671–8.

33. *Aksu S., Beyazit Y., Haznedaroglu I.C. et al.* Enhanced expression of the local haematopoietic bone marrow renin-angiotensin system in polycythemia rubra vera. J. Int. Med. Res. 2005; 33(6): 661–7.

34. *Aksu S., Beyazit Y., Haznedaroqlu I.C. et al.* Over-expression of angiotensin-converting enzyme (CD 143) on leukemic blasts as a clue for the activated local bone marrow RAS in AML. Leuk. Lymphoma 2006; 47(5): 891–6.

35. *Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В.* Иммунологические проблемы апоптоза. М., 2002.

Baryshnikov A.Yu., Shishkin Yu.V. Immunologicheskiye problemy apoptoza [Immunological problems of apoptosis]. M., 2002.

36. *Miyawaki T., Uehara T., Nibu R. et al.* Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. J. Immunol. 1992; 149(11): 3753–8.

37. *Lechner H., Amort M., Steger M.M. et al.* Regulation of CD95 (APO-1) expression and the induction of apoptosis in human T cells: changes in old age. Int. Arch. Allergy Immunol. 1996; 110(3): 238–43.

38. *Kotani T., Aratake Y., Kondo S. et al.* Expression of functional Fas antigen on adult T-cell leukemia. Leuk. Res. 1994; 18(4): 305–10.