

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

- Milius R.P., Mack S.J., Hollenbach J.A., Pollack J., Heuer M.L., Gragert L., et al. Genotyping List String: a grammar for describing HLA and KIR genotyping results in a text string. *Tissue Antigens*. 2013; 82(2): 106–2.
- Blasczyk R. HLA diagnostic sequencing – conception, application and automation. *J. Lab. Med.* 2003; 27(9/10): 359–68.
- Lee S.J., Klein J., Haagenson M., Baxter L.A., Confer D.L., Eapen M., et al. High resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 2007; 110(13): 4576–83.
- Spellman S.R., Eapen M., Logan B.R., Mueller C.H., Rubinstein P., Shterholm M.I., et al. A perspective on the selection of unrelated donors and cord blood units for transplantation. *Blood*. 2012; 120(2): 259–65.
- Савченко В.Г., Любимова Л.С., Паровичникова Е.Н., Менделеева Л.П., Момотюк К.С., Демидова И.А. и др. Трансплантация аллогенных и аутологичных стволовых клеток при острых лейкозах. *Тер. арх.* 2007; 7: 30–5. [Savchenko V.G., Lyubimova L.S., Parovichnikova E.N., Mendeleeva L.P., Momotyuk K.S., Demidova I.A., et al. Transplantation of allogeneic and autologous stem cells in acute leukemias. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2007; 7: 30–5]. (in Russian)
- Савченко В.Г., ред. *Программное лечение заболеваний крови*. М.: Практика; 2012. [Savchenko V.G., ed. *Program therapy in blood disorders (Programmnoe lechenie zabolevaniy krovi)*. Moscow: Praktika; 2012]. (in Russian)
- Adams S.D., Barracchini K.C., Chen D., Robbins F.M., Wang L., Larsen P., et al. Ambiguous allele combinations in HLA Class I and Class II sequence-based typing: when precise nucleotide sequencing leads to imprecise allele identification. *J. Transl. Med.* 2004; 2(30): 1–6. <http://www.translational-medicine.com/content/2/1/30>.
- Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens*. 2012; 80(1): 1–11. doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01881.x.
- Standards for histocompatibility and immunogenetics testing. Version 5.7. <http://www.efiweb.org>
- Гланц С.А. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика; 1999. [Glantz S.A. *Primer of biostatistics (Mediko-biologicheskaya statistika)*. Moscow: Praktika; 1999]. (in Russian)
- Зарецкая Ю.М., Абрамов В.Ю. *Новые антигены тканевой совместимости человека*. М.: Медицина; 1986. [Zaretskaya Yu.M., Abramov V.Yu. *New human histocompatibility antigens (Novye antigeny tkanevoy sovmestimosti cheloveka)*. Moscow: Meditsina; 1986]. (in Russian)
- Хамаганова Е.Г., Зарецкая Ю.М. Ассоциации строения антигенсвязывающего сайта молекулы HLA-DR с онкогематологическими заболеваниями. *Гематология и трансфузиология*. 2003; 1: 10–6. [Khamaganova E.G., Zaretskaya Yu.M. Associations between antigen binding site of DR molecule and blood disorders. *Hematologiya i transfuziologiya*. 2003; 1: 10–16]. (in Russian)
- Marsh S.G., Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E., Dupont B., Erlich H.A., et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*. 2010; 75(4): 291–455. doi: 10.1111/j.1399-0039.2010.01466.x.
- Gonzalez-Galarza F.F., Christmas S., Middleton D., Jones A.A. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acid Res.* 2011; 39 (Suppl. 1): D913–9.
- Зарецкая Ю.М., Хамаганова Е.Г., Алешенко С.М., Мурашева Л.А. Поиск неродственного донора Российским регистром доноров костного мозга. *Тер. арх.* 2002; 7: 30–5. [Zaretskaya Yu.M., Khamaganova E.G., Aleshchenko S.M., Murasheva L.A. The search for an unrelated donor using Russian registry of bone marrow donors. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2002; 7: 30–5]. (in Russian)
- Pasi A., Crocchiolo R., Bontempelli M., Carcassi C., Carella G., Crespiatico L., et al. The conundrum of HLA-DRB1*14:01/*14:54 and HLA-DRB3*02:01/*02:02 mismatches in unrelated hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2011; 46 (7): 916–22.
- Brand A., Doxiadis I.N., Roelen D.L. On the role of HLA antibodies in hematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens*. 2013; 81(1): 1–11. doi: 10.1111/tan.12040.
- Fernandez-Vina M.A., Klein J.P., Haagenson M., Haagenson M., Aljurf M., Askar M., et al. Multiple mismatches at the low expression HLA loci DP, DQ, and DRB3/4/5 associate with adverse outcomes in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2013; 121(22): 4603–10. doi: 10.1182/blood-2013-02-481945.
- Cano P., Klitz W., Mack S.J., Maiers M., Marsh S.G., Noreen H., et al. Common and well-documented HLA alleles: report of the ad-hoc committee of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. *Human Immunol.* 2007; 68 (5): 392–417.
- Mack S.J., Cano P., Hollenbach J.A., He J., Hurley C.K., Middleton D., et al. Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue. *Tissue Antigens*. 2013; 81(4): 194–203.
- ZKRD, Annual Report 2012. <http://www.zkrd.de>.
- Gourraud P.A., Balère M.L., Faucher C., Loiseau P., Dormoy A., Marry E., Garnier F. HLA phenotypes of candidates for HSCT: comparing transplanted versus non-transplanted candidates, resulting in the predictive estimation of the probability to find a 10/10 HLA matched donor. *Tissue Antigens*. 2014; 83 (1): 17–26. doi: 10.1111/tan.12263.

Поступила 07.02.14
Received 07.02.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014
УДК 616.419-007.17-092:612.014.1]-07

СОДЕРЖАНИЕ АКТИВИРОВАННОЙ ФОРМЫ АНТИАПОПТОТИЧЕСКОГО ПРОТЕИНА АКТ1 В ЛИЗАТАХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ПЕРВИЧНЫХ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИХ СИНДРОМАХ

Климкович Н.Н.¹, Пивень Н.В.², Красько О.В.³, Козарезова Т.И.¹, Тишкевич М.Н.²

¹ГУО Белорусская медицинская академия последипломного образования; ²ГНУ Институт биоорганической химии НАН Беларуси; ³ГНУ Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Резюме. Исследовано содержание антиапоптотического протеина Akt1 в лизатах клеток костного мозга при первичных миелодиспластических синдромах и обнаружено его высокое значение при прогрессировании заболевания. Уровень Akt1 в лизатах клеток костного мозга более 500 пг/мл является пороговым для биологических процессов, характеризующихся снижением апоптотической готовности и высокой клоновой пролиферативной активностью. Повышение содержания активированной формы Akt1 в лизатах клеток костного мозга при первичных миелодиспластических синдромах является дополнительным фактором, отражающим степень поражения гемопоэза, и может служить прогностическим критерием.

Ключевые слова: миелодиспластические синдромы; антиапоптотический протеин Akt1; костный мозг.

THE CONTENT OF ACTIVE AKT1 ANTIAPOPTOTIC PROTEIN IN BONE MARROW CELL LYSATE IN PRIMARY MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

Klimkovich N.N.¹, Piven N.V.², Krasko O.V.³, Kozarezova T.I.¹, Tishkevich M.N.²

¹Byelorussian Medical Academy for Continuous Education; ²Institute of Organic Biochemistry; ³United Institute of Informatics Problems, 220013, Minsk, Belarus Republic

S u m m a r y. Measurements of Akt1 protein in bone marrow cell lysates from patients with the primary myelodysplastic syndrome have shown its high significance in the disease progress. The Akt1 level above 500 pg/ml in bone marrow cell lysates is the threshold value for biological processes characterized by reduction of apoptotic readiness and high clonal proliferative activity. High level of Akt1 active form in lysates from patients with the primary myelodysplastic syndrome is an additional factor reflecting the hemopoiesis involvement which can serve as a prognostic sign.

Key words: myelodysplastic syndromes; Akt1 antiapoptotic protein; bone marrow.

При неопластическом процессе клетки отличаются отсутствием ограничения процессов пролиферации, что приводит к их неконтролируемому росту и распространению в организме. Кроме того, при любой форме опухолевого процесса клетки синтезируют повышенное число некоторых белков, не характерных для нормальной клетки, и среди них киназа Akt. Этот онкопротеин способствует выживаемости опухолевых клеток, из-за чего их довольно сложно уничтожить с помощью стандартной химиотерапии, и в настоящее время многие исследования направлены на создание лекарственного препарата – ингибитора Akt, однако получаемые вещества крайне токсичны [1–3]. Процесс идентификации протеинкиназ этого семейства протекал сложно, поэтому у молекул множество названий, а само семейство в разных источниках называется и АКТ, и РКВ, и РКВ/АКТ. Семейство протеинкиназ В (РКВ) человека включает в себя три внутриклеточных белка, кодируемых генами *Akt1*, *Akt2*, *Akt3*. Белки семейства протеинкиназ В присоединяют остатки фосфорной кислоты к разнообразным цитозольным белкам, регулируя таким образом их активность, и играют важную роль в регуляции клеточного цикла, апоптоза, метаболизма глюкозы и ангиогенеза [4, 5]. Наибольший интерес из этого семейства протеинкиназ вызывает Akt1, поскольку продукт гена *Akt1* блокирует апоптоз и повышенный уровень экспрессии Akt1 отмечается в клетках различных опухолей. Помимо ингибирующего действия на процессы апоптоза, протеинкиназа Akt1 принимает участие в регуляции клеточного цикла, индуцирует синтез белка, следовательно, является ключевым белком, регулирующим рост тканей. Первоначально, в 1990 г., Akt1 был охарактеризован как онкоген в трансформирующем ретровирусе АКТ8. В физиологических условиях активированная ростовыми факторами форма Akt служит для фосфо-

рилирования белков, поддерживающих основные функции клеток, такие как транспорт и окисление глюкозы. Изменения Akt-сигнального пути обычно происходят при нарушении гомеостаза и вызывают апоптоз путем блокирования жизненно необходимых обменных процессов (например, легочного дыхания) и активирования компонентов механизма апоптоза. Стресс-индуцированный механизм связан с повреждением клетки или потерей факторов роста, он может ослабить или полностью блокировать Akt-сигнальный механизм. Продемонстрировано [6, 7], что различные регуляторы апоптоза зависят от активности Akt на уровнях транскрипции или посттрансляционных изменений. В частности, фосфорилирование факторов транскрипции FoxO (Forkhead-факторы) Akt-киназой и их инактивация приводят к подавлению экспрессии ингибиторов циклинзависимых киназ и, следовательно, к промоции клеточного цикла. В то время как в отсутствие Akt-опосредованного фосфорилирования Forkhead-факторы могут транслоцироваться в ядро и повышать экспрессию проапоптотических регуляторных генов, таких как лиганд Fas. Akt также напрямую взаимодействует с прокаспазой-9. Точный механизм, путем которого каспаза-9 инактивируется из-за фосфорилирования Akt, неизвестен, но предполагается, что каталитическая активность каспазы-9 блокируется напрямую, а участок фосфорилирования Akt (RXRXXS/T) идентифицирован также в других белках-регуляторах апоптоза, действующих на каждом уровне апоптотического каскада (каспаза-8, Bcl-2, Araf-1, IAP, каспаза-7) [7, 8].

Доказано, что Akt активен при многих типах злокачественных новообразований у человека [9–11]. Активация протеинкиназы В может произойти из-за генных аномалий или в результате мутаций компонентов сигнального пути, контролирующего Akt. Полагают [12, 13], что передача сигналов РКВ/Akt инициирует пролиферацию и выживание клетки, способствуя тем самым прогрессии опухолевого процесса. У протеинкиназ В есть широкий диапазон клеточных целей, и их участие в онкогенезе является результатом активации пролиферативных и антиапоптотических сигналов. Конечными эффекторами Akt-киназного сигнального каскада являются ядерные факторы транскрипции. Они прямо или опосредованно стимулируют экспрессию генов, контролирующих пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, адгезию и кле-

Для корреспонденции:

Климкович Наталья Николаевна, кандидат мед. наук, доцент кафедры детской онкологии и гематологии ГУО Белорусская медицинская академия последипломного образования
det.hematology@mail.ru
Адрес: 220013, Республика Беларусь, Минск, ул. П.Бровки, д.3/3.
Телефон: +375(17) 265-42-09
E-mail: det.hematology@mail.ru

Corresponding author:

Klimkovich Nataliya, MD, PhD, docent (det.hematology@mail.ru).

точную подвижность, т. е. процессы, определяющие митогенную и инвазивную активность клеток. Показано [14, 15], что прогрессия нормального эпителия в высокопролиферирующий, а затем и в карциному, сопровождается активацией киназы Akt. Значительное повышение (в 5–6 раз относительно нормы) уровня экспрессии Akt отмечается в образцах опухолей, имеющих 8–10-балльную оценку по шкале Глисона [16]. Более того, есть мнение [15, 17], что количественный уровень фосфорформы киназы Akt можно рассматривать как независимый прогностический маркер при некоторых видах злокачественных новообразований человека. Установлено также, что активация онкогена *Akt* имеет существенное значение для переключения опухолевых клеток на путь аэробного гликолиза. Показано прямое влияние Akt на метаболизм глюкозы в трансформированных клетках, в частности обнаружена стимуляция гликолиза, коррелирующая с агрессивностью клеток *in vivo* [18]. Протеин Akt находится в синергизме с антиапоптотическим онкогеном *Bcl-2*, что предполагает наличие у Akt дополнительных функций, влияющих на биологические характеристики трансформированных клеток [18]. Активация пути PI3K/Akt, превалирующего во многих типах злокачественных опухолей, в определенной степени может служить универсальным объяснением характерного метаболизма опухолевой клетки. Примечательно, что HIF, причастный, как известно, к усилению метаболизма глюкозы в опухолевых клетках, может активироваться сигнальными путями, включающими путь PI3K/Akt, хотя эти данные противоречивы [18, 19]. В целом можно заключить, что экспрессия онкогена *Akt* существенна для усиления автономной опухолевой клеткой аэробного гликолиза, являющегося важным звеном выживания опухоли в организме. При этом изучение активированного протеина Akt и возможных путей его инактивации проводится в основном при солидных опухолях. В онкогематологии подобные исследования весьма малочисленны, а открывающиеся прогностические и терапевтические перспективы делают их еще более актуальными. Целью настоящей работы явилось исследование содержания активированной формы антиапоптотического белка Akt1 в костном мозге больных первичными миелодиспластическими синдромами и определение его прогностического потенциала.

Материалы и методы

В настоящем исследовании анализ содержания активированной формы антиапоптотического белка Akt1 проведен у 74 больных первичными миелодиспластическими синдромами (МДС) и у 11 больных острыми миелобластными лейкозами (ОМЛ) (варианты M_1 и M_2), составивших группу сравнения. В качестве контроля при исследовании содержания Akt1 использованы образцы костного мозга 10 здоровых доноров. Активированную форму Akt1 в лизатах клеток костного мозга определяли иммуноферментным методом с помощью набора Total-Akt1 DuoSet IC ("R&D Systems, Inc.", США) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве материала для исследования использовали пунктат костного мозга в объеме от 2 до 4 мл, который помещали в специальные пробирки с антикоагу-

лянтом (ЭДТА натрия). Выделение клеток костного мозга для исследования выполняли с предварительным лизисом эритроцитов. Выделенные из костного мозга клетки отмывали 2 раза в фосфатно-солевом буфере (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 8,1 мМ Na_2HPO_4 , 1,5 мМ KH_2PO_4 , pH 7,2–7,4, пропущенном через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм), готовили раствор клеток с концентрацией $1 \cdot 10^7$ /мл и инкубировали на льду в течение 15 мин в лизирующем буфере (1 мМ ЭДТА, 0,5% тритон X-100, 5 мМ NaF, 6 М мочевины, 1 мМ активированного ортованадата натрия, 2,5 мМ натрия пиррофосфата, 10 мкг/мл лейпептина, 10 мкг/мл пепстатина, 100 мкМ фенилметилсульфонилфлюорида, 3 мкг/мл апротинина в фосфатно-солевом буфере, pH 7,2–7,4). Перед использованием образцы центрифугировали при 2000 g в течение 5 мин, разводили 6-кратно в растворе (1 мМ ЭДТА, 0,5% тритон X-100, 5 мМ NaF в фосфатно-солевом буфере, pH 7,2–7,4) и готовили последующую серию разведений в растворе (1 мМ ЭДТА, 0,5% тритон X-100, 5 мМ NaF, 1 М мочевины в фосфатно-солевом буфере, pH 7,2–7,4). Конечная концентрация мочевины в образцах и стандартах перед внесением в лунки планшета была 1 М. Измерения проводили на фотометре для микропланшетов iMark ("BioRad", Япония). Концентрацию Akt1 выражали в пикограммах на 1 мг. Экспрессию CD95, CD135 клетками костного мозга определяли методом многоцветной проточной цитофлюориметрии на проточном цитометре FACSCantoII ("Becton Dickinson", США), оснащенный тремя лазерами (488; 633 и 405 нм), исследования проводили на популяции $CD34^+ CD45^{low} SSC^{low}$ -клеток. При статистическом анализе результаты измерений количественных переменных исследования представлены в виде медианы и разброса величин (мин–макс), категориальных переменных – как количество и процент от численности группы – n (%). Сравнение переменных двух групп проводили с помощью критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Сравнения в трех и более группах проводили по критерию Краскела–Уоллиса. Парные сравнения групп проводили с поправкой на множественные сравнения, как описано в литературе [20]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Графическая аппроксимация зависимостей представлена с помощью алгоритма LOESS [21]. Расчеты и рисунки выполнены в статистическом пакете R версия 3.0.1 [22].

Результаты и обсуждение

В исследование были включены больные первичным МДС (40 женщин и 34 мужчины) в возрасте от 21 года до 59 лет (медиана возраста 45,9 года). Когорта лиц, включенных в данное исследование, ограничена возрастом до 60 лет с целью получения наиболее однородной группы по биологическим и физиологическим параметрам. Вариант заболевания установлен согласно критериям ВОЗ-классификации миелоидных неоплазий [23], по которой у 13,5% больных диагностирована рефрактерная анемия (РА) как вариант рефрактерной цитопении с однолинейной дисплазией, у 5,4% – 5q-синдром, у 36,5% – рефрактерная цитопения с мультилинейной множественной дисплазией (РЦМД), у 44,6% – рефрактерная анемия с избытком бластов (РАИБ); **табл. 1**.

Клинические проявления заболевания характеризовались анемическим, геморрагическим, пролиферативным и интоксикационным синдромами

Клинико-гематологическая характеристика больных первичными миелодиспластическими синдромами

Показатель	Вариант МДС			МДС
	РА, 5q- синдром	РЦМД	РАИБ	
Число больных	14 (18,9%)	27 (36,5%)	33 (44,6%)	74
Возраст на момент установления диагноза, годы	52 (27–60)	48 (22–60)	47 (22–59)	48 (22–60)
Пол:				
мужчины	3 (21,4%)	15 (55,6%)	16 (48,5%)	34 (45,9%)
женщины	11 (78,6%)	12 (44,4%)	17 (51,5%)	40 (54,1%)
Длительность додиагностического периода, мес	6 (2–38)	4 (2–21)	3 (1–8)	4 (1–38)
Концентрация гемоглобина, г/л	71 (61–97)	84 (48–137)	87 (57–104)	83,5 (48–137)
Количество эритроцитов ПК, · 10 ¹² /л	2,3 (1,58–3,37)	2,68 (1,9–4,4)	2,7 (1,5–3,9)	2,6 (1,5–4,4)
МСН, пг	33,5 (30–37,6)	33 (27–36)	33 (27–37)	33 (27–37,6)
MCV, мкм ³	102,5 (92–109)	101 (85–116)	101 (86–107,5)	101 (85–116)
Количество лейкоцитов ПК, · 10 ⁹ /л	4,09 (1,4–11)	4,2 (1,1–15,4)	4,7 (1,1–11,5)	4,53 (1,1–15,4)
Количество нейтрофилов ПК, · 10 ⁹ /л	2,05 (0,5–5,6)	1,8 (0,6–9,4)	2,2 (0,1–5,8)	2,05 (0,1–9,4)
Количество тромбоцитов ПК, · 10 ⁹ /л	193 (73–354)	63 (9–355)	83 (8–271)	85 (8–355)
Количество миелокариоцитов КМ, · 10 ⁹ /л	205,5 (56–428)	269 (78–457)	215 (142–468)	245,5 (56–468)
Гиперплазия эритроидного ростка КМ	11 (78,6%)	16 (59,3%)	20 (60,6%)	47 (63,5%)
Гиперплазия гранулоцитарного ростка КМ	3 (21,4%)	9 (33,3%)	15 (45,5%)	27 (36,5%)
Омоложение гранулоцитарного ростка КМ	8 (57,1%)	25 (92,6%)	31 (93,9%)	64 (86,5%)
Фиброз стромы КМ	0	14 (51,9%)	12 (36,4%)	26 (35,1%)
Скопление бластов в КМ	1 (7,1%)	9 (33,3%)	18 (54,5%)	28 (37,8%)
Цитогенетические аномалии:				
нет	8 (57,1%)	16 (61,5%)	23 (69,7%)	47 (64,4%)
del 5q31 (-1)	4 (28,6%)	0	0	4 (5,5%)
единичные	2 (14,3%)	6 (23,1%)	5 (15,2%)	13 (17,8%)
множественные	0	4 (15,4%)	5 (15,2%)	9 (12,3%)
Прогностическая группа IPSS:				
низкий риск	9 (64,3%)	0	0	9 (12,2%)
помежуточный-1	5 (35,7%)	24 (88,9%)	31 (93,9%)	60 (81,1%)
промежуточный -2	0	3 (11,1%)	2 (6,1%)	5 (6,8%)

Примечания. ПК – периферическая кровь, КМ – костный мозг, МСН – среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCV – средний объем эритроцита.

и отражали имеющиеся изменения в периферической крови. В дебюте заболевания у 83,7% больных на первый план выступали симптомы, связанные с анемией. Инфекционные осложнения наблюдались у 16,2%. Геморрагический синдром при первичном обследовании диагностирован у 39,1% больных. Гемограмма характеризовалась цитопенией в различных сочетаниях. Анемия установлена у 97,3% больных, при этом макроцитоз отмечен у 91,9%. Изменения количества лейкоцитов имелись у 55,4% больных: лейкопения ($1,7 \pm 0,53 \cdot 10^9/\text{л}$) диагностирована у 28,4%. Выход бластных клеток в периферическую кровь наблюдался у 37,8% больных, тромбоцитопения ($41,9 \pm 14,3 \cdot 10^9/\text{л}$) – у 78,4%. При исследовании морфологии клеток периферической крови у всех больных МДС выявлены признаки дисгемопоза: смешанный анизоцитоз эритроцитов с преобладанием макроцитоза, полихроматоз эритроцитов, базофильная пунктация и тельца Жолли эритроцитов, нарушение сегментации ядер нейтрофилов, агранулярные участки, вакуолизация и пылевидная

зернистость цитоплазмы нейтрофилов, макроформы тромбоцитов. Количественный анализ костно-мозгового кроветворения по данным миелограммы показал, что гипопластическое состояние костного мозга отмечалось у 2,7% больных, гиперпластическое состояние (количество миелокариоцитов $284,2 \pm 84,6 \cdot 10^9/\text{л}$) – у 79,7%. Гиперплазия эритроидного ростка установлена у 63,5%, при этом признаки мегалобластоидного кроветворения костного мозга наблюдались у 100% больных. Кроме того, для 86,5% больных МДС была характерна задержка созревания эритроидных клеток на уровне полихроматофильных нормобластов. Максимальный процент снижения индекса созревания эритробластов отмечен при вариантах РА и РЦМД. Количество мегакариоцитов было снижено у 82,4% больных различными вариантами МДС. У 86,5% первичных больных МДС наблюдалось омоложение гранулоцитарного ростка. Анализ данных гистологического исследования костного мозга при МДС показал, что повышение клеточности костного мозга происходит, в основном,

за счет гранулоцитарного ростка. Существенной особенностью гемопоэтической ткани при МДС является омоложение кроветворных ростков и появление бластных клеток, при этом последние могут располагаться как диффузно, так и скоплениями. Важным показателем является фиброз стромы, который был установлен у 35,1% больных (при вариантах РАИБ и РЦМД); см. **табл. 1**.

Группа сравнения представлена больными ОМЛ. Клиническая картина острых лейкозов характеризовалась преимущественно анемическим (81,8%) и геморрагическим (72,7%) синдромами. Гиперпластический синдром в виде спленомегалии диагностирован у 36,4% больных. В гемограмме тромбоцитопения ($34,7 \pm 9,3 \cdot 10^9/\text{л}$) выявлена у 81,8% больных, количество лейкоцитов периферической крови варьировало от лейкопении у 54,5% больных до лейкоцитоза у 27,3% больных. Бластная инфильтрация костного мозга составила от 62 до 98 % с высокой экспрессией CD34. У большинства больных ОМЛ (81,8%) имелся промежуточный риск по кариотипу.

В результате исследования содержания активированной формы Akt1 в лизатах клеток костного мозга установлен высокий уровень протеинкиназы B как при ОМЛ, так и при первичных МДС по сравнению с контролем: 1428 (103–2319); 528,25 (225,9–1788,3) и 165,95 (104,5–236,1) пг/мл соответственно. При этом в зависимости от варианта МДС отмечена высокая вариабельность изучаемого параметра. Наблюдалось возрастание уровня протеинкиназы B по мере прогрессирования заболевания. При вариантах РА, 5q-синдром и РЦМД содержание Akt1 было статистически значимо ($p < 0,05$) ниже, чем при варианте РАИБ: 286,95 (225,9–1788,3) пг/мл при РА и 5q-синдроме, 526,7 (235,8–1765,8) пг/мл при РЦМД. Максимальная концентрация Akt1 наряду с ОМЛ характеризовала вариант РАИБ – 714,3 (235,8–1775,3) пг/мл; **рис. 1**.

Цитогенетический анализ занимает одно из ведущих мест в диагностике и прогнозировании течения МДС. К настоящему времени имеется обширная информация об особенностях кариотипа и основных хромосомных аномалиях при разных вариантах МДС, при этом наиболее часто нарушения касаются хромосом 5, 7, 8, 11, 13, 20 [24, 25]. В настоящем исследовании цитогенетический анализ, проведенный у 73 больных МДС, выявил нормальный кариотип у 64,4% больных. У 38,5% больных с аномальным кариотипом наблюдались несбалансированные аномалии, у 19,2% – сбалансированные, у 42,3% – комбинированные аномалии кариотипа (см. **табл. 1, 2**).

Анализ содержания Akt1 в лизатах клеток костного мозга в зависимости от цитогенетического статуса костного мозга больных МДС показал соответствие максимально высокой концентрации активированной формы Akt1 – 726,8 (289,6–1316,7) пг/мл множественным аномалиям кариотипа (см. **табл. 2**). Минимальная концентрация протеинкиназы B зарегистрирована в группе больных с наличием del 5q31 – 286,25 (225,9–289,5) пг/мл. В группах больных с нормальным кариотипом и изолированными хромосомными аномалиями содержание Akt1 в лизатах клеток костного мозга имело практически

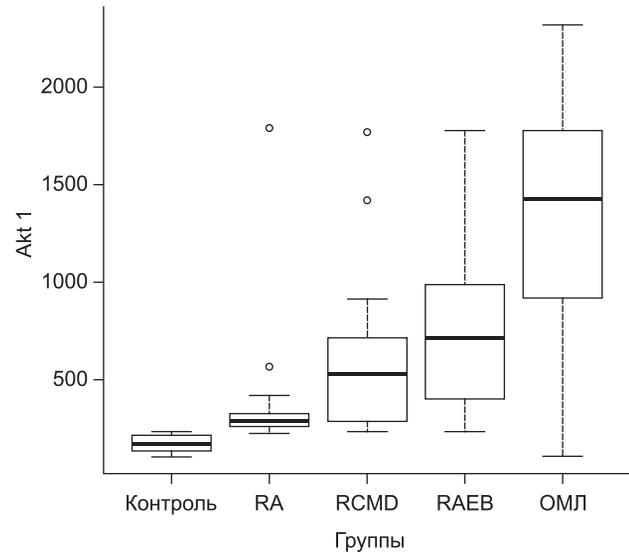


Рис. 1. Содержание активированной формы протеина Akt1 в лизатах клеток костного мозга при первичных миелодиспластических синдромах ($p < 0,001$ – критерий Краскела—Уоллиса).

одинаковые значения – 520,6 (235,8–1788,3) и 538,9 (235,8–1765,8) пг/мл соответственно; см. **табл. 2**. Таким образом, увеличение концентрации активированной формы протеина Akt1 в лизатах клеток костного мозга соответствует неблагоприятным вариантам МДС, характеризующимся высоким риском по системе IPSS. Наряду с этим отсутствие различий уровня Akt1 в группах больных с нормальным кариотипом и изолированными хромосомными аномалиями, на наш взгляд, демонстрирует ограничение использования кариотипа в качестве независимого прогностического критерия при МДС. Это предположение подкрепляется данными исследований [26, 27], согласно которым нередко встречается несоответствие варианта кариотипа и течения заболевания и прогностическая ценность большинства цитогенетических aberrаций остается неизвестной. Кроме того, выживаемость больных в группе благоприятного прогноза при МДС не всегда высока, а в группе плохого прогноза у отдельных больных наблюдается благоприятное течение заболевания [28].

Полученные данные по исследованию содержания активированной формы Akt1 в лизатах клеток костного мозга не противоречат известной патогенетической концепции МДС, согласно которой избыточный апоптоз является процессом, ограничивающим клональную прогрессию при МДС, хотя и приводит к неэффективному гемопоэзу и костно-мозговой недостаточности [29]. Во время прогрессии МДС экспансия патологического клона ассоциирована со сниженным апоптозом гемопоэтических клеток, уменьшением контроля за клеточным циклом и трансформацией в острый лейкоз. Таким образом, можно предположить, что при МДС процесс клеточной клоновой пролиферации нарастает параллельно с угасанием апоптотической активности. Известно, что в пролиферации и выживании лейкемических клеток может играть роль экспрессия FLT3. Кроме того, при ОМЛ высокая степень экспрессии FLT3 коррелирует со значительным

Содержание Akt1 в лизатах клеток костного мозга больных первичными миелодиспластическими синдромами в зависимости от цитогенетической характеристики костного мозга

Группа по цитогенетической характеристике	Кариотип	Количество больных		Содержание Akt1, пг/мл
		абс.	%	
Отсутствие цитогенетических аномалий	46, XX	47	64,4	520,6 (235,8–1788,3)
	46, XY			
Делеция 5	del 5q31	4	5,5	286,25 (225,9–289,5)
Изолированные цитогенетические аномалии	del(9q)	2	2,7	538,9 (235,8–1765,8)
	t(2;11) (p21;q23)	3	4,1	
	del(13q)	2	2,7	
	inv(3) (q21q26.2)	1	1,4	
	del(11q)	1	1,4	
	t(3;21) (q26.2;q22.1)	2	2,7	
	Гиперплоидный набор хромосом	2	2,7	
Комплексные цитогенетические аномалии	46,XX -7; nuc ish 7p 11.1-q11.1	1	1,4	726,8 (289,6–1316,7)
	+14; -17; -21; + mar[16]	1	1,4	
	del(12p); del(11q)	1	1,4	
	del(12p); t(1;3) (p36.3; q21.1)	1	1,4	
	t(1;3) (p36.3; q21.1); del(9q)	1	1,4	
	del(12p); t(1;3) (p36.3; q21.1); i(17q); del(11q)	1	1,4	
	Множественные числовые	3	4,1	

лейкоцитозом и высоким количеством бластных клеток в костном мозге [30].

В настоящем исследовании анализ показателей апоптотической и пролиферативной готовности клеток костного мозга у больных МДС и содержания Akt1 в лизатах клеток костного мозга продемонстрировал наличие нелинейной зависимости. Количество клеток костного мозга, экспрессирующих CD95, резко снижается, достигая значения менее 20%, при повышении содержания Akt1 в клеточных лизатах более 500 пг/мл (рис. 2, а). В то же время при значениях Akt1 в лизатах клеток костного мозга свыше 500 пг/мл степень экс-

прессии FLT3 (CD135) клетками костного мозга повышается до значения более 40% (рис. 2, б).

Анализ возможных событий, происходящих с больными МДС (летальный исход и трансформация в лейкоз), показал, что летальный исход при содержании Akt1 в лизатах клеток костного мозга более 500 пг/мл зарегистрирован у 33 (82,5%) из 40 больных, а при концентрации Akt1 менее 500 пг/мл – у 15 (44,1%) из 34 больных ($p < 0,001$). Трансформация в острый лейкоз также происходила чаще при содержании Akt1 более 500 пг/мл – у 25 (62,5%) из 40 больных, чем при более низких значениях этого

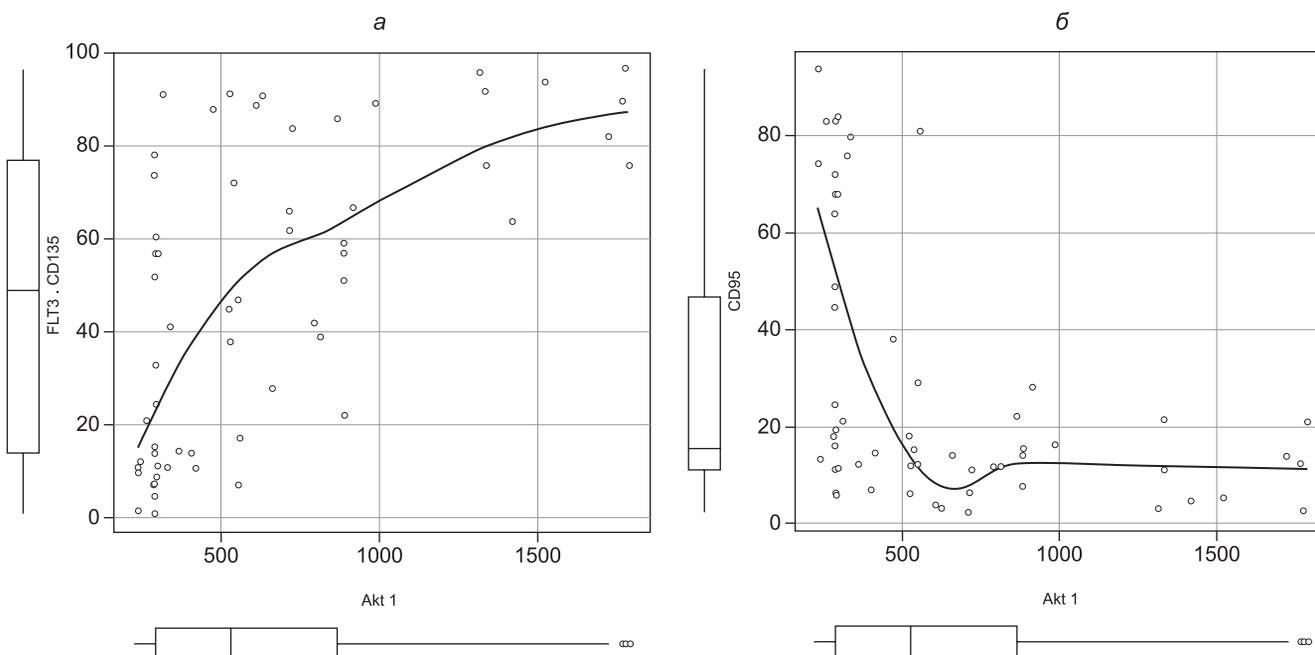


Рис. 2. Взаимосвязь содержания активированной формы протеина Akt1 в лизатах клеток костного мозга со степенью экспрессии FLT3 (CD135) (а) и CD95 (б) при первичных миелодиспластических синдромах.

параметра – у 14 (41,2%) из 34 больных ($p = 0,067$). При этом статистически значимо различны сроки наступления трансформации МДС в лейкоз: 71 (6–340) нед при Akt1 менее 500 пг/мл и 23,5 (3–133) нед при Akt1 более 500 пг/мл ($p < 0,001$). Следовательно, количественные значения содержания Akt1 в лизатах клеток костного мозга можно рассматривать как независимый прогностический маркер прогрессирования первичных МДС.

Таким образом, содержание Akt1 в лизатах клеток костного мозга при МДС имеет высокое значение при неблагоприятных вариантах, отражает апоптотическую готовность и определяет прогрессирование заболевания. Уровень Akt1 в лизатах клеток костного мозга более 500 пг/мл является пороговым для начала неуправляемых и неконтролируемых биологических процессов, влекущих за собой снижение апоптотической готовности и высокую клоновую пролиферативную активность. Повышенный уровень активированной формы Akt (более 500 пг/мл) в лизатах клеток костного мозга при первичных МДС является дополнительным фактором, отражающим степень поражения гемопоэза, и может быть использован в качестве прогностического критерия.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCE]

- Nogueira V., Park Y., Chen Ch.-Ch., Xu P.-Zh., Chen M.-L., Tonic I., et al. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell*. 2008; 14(6): 458–70.
- Hidalgo M., Rowinsky E., Erlichman C., Drenkler C., Mashall B., Adjei A., et al. CCI-779, a rapamycin analog and multifaceted inhibitor of signal transduction: A phase I study. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2000; 19(187a): abstr. 726.
- Hill M.M., Hemmings B.A. Inhibition of protein kinase B/Akt. Implications for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 2002; 93 (2–3): 243–51.
- Kandel E.S., Skeen J., Majewski N., Di Cristofano A., Pandolfi P.P., Feliciano C.S., et al. Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 2002; 22(22): 7831–41.
- Somanath P.R., Razorenova O.V., Chen J., Byzova T.V. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle*. 2006; 5(5): 512–8.
- Accili D., Arden K.C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*. 2004; 117(4): 421–6.
- Северин Е.С. *Биохимия*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008. [Severin E.S. *Biochemistry (Biokhimiya)*. Moscow: GEOTAR-Media; 2008]. (in Russian)
- Brognaard J., Sierrecki E., Gao T., Newton A.C. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol. Cell*. 2007; 25(6): 917–31.
- Sun M., Wang G., Paciga J.E., Feldman R.I., Yuan Z.Q., Ma X.L., et al. Akt1/PKB alpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am. J. Pathol.* 2001; 159(2): 431–7.
- Schlieman M.G., Fahy B.N., Ramsamooj R., Beckett L., Bold R.J. Incidence, mechanism and prognostic value of activated Akt in pancreas cancer. *Br. J. Cancer*. 2003; 89(11): 2110–5.
- Davies M.A., Stemke-Hale K., Lin E., Tellez C., Deng W., Gopal Y. N., et al. Integrated Molecular and Clinical Analysis of AKT Activation in Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15(24): 7538–46.
- Zhou B.P., Liao Y., Xia W., Spohn B., Lee M.H., Hung M.C. Cytoplasmic localization of p21Cip/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell Biol.* 2001; 3(3): 245–52.
- Nicholson K.M., Anderson N.G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.* 2002; 14(5): 381–95.
- Sheng S., Qiao M., Pardee A.B. Metastasis and AKT activation. *J. Cell. Physiol.* 2009; 218(3): 451–4.
- Ayala G., Thompson T., Yang G., Frolov A., Li R., Scardino P., et al. High levels of phosphorylated form of Akt-1 in prostate cancer and non-neoplastic prostate tissues are strong predictors of biochemical recurrence. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10(19): 6572–8.
- Bjornsti M.A., Houghton P.J. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. 2004; 4(5): 335–48.
- Kreisberg J.I., Malik S.N., Prihoda T.J., Bedolla R.G., Troyer D.A., Kreisberg S., et al. Phosphorylation of Akt (Ser⁴⁷³) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res.* 2004; 64(15): 5232–6.
- Elstrom R.L., Bauer D.E., Buzzai M., Karnauskas R., Harris M.H., Plas D.R., et al. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 64(11): 3892–9.
- Cairns R.A., Harris I.S., Mak T.W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer*. 2011; 11(2): 85–95. doi: 10.1038/nrs2981.
- Gao X., Alvo M., Chen J., Li G. Nonparametric multiple comparison procedures for unbalanced one-way factorial designs. *J. Stat. Plan. Inference*. 2008. 138(8): 2574–91.
- Cleveland W.S., Grosse E., Shyu W.M. *Local regression models*. In: Chambers J.M., Hastie T.J., eds. *Statistical models in S. Wadsworth & Brooks/Cole, Pacific Grove*. California; 1992: 309–76.
- Core Team. Development R. *A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria. 2013. <http://www.R-project.org>.
- Brunning R.D., Orazi A., Germing U., Le Beau M.M., Porwit A., Bauman L., et al. *Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview*. In: Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., et al., eds. *WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC; 2008; vol. 2: 88–93.
- Лозинська М.Р., Виговська Я.І., Томашевська Н.Я., Масляк З.В., Лозинський Р.Ю., Новак В.Л. Особливості спектра цитогенетичних змін при різних варіантах мієлодиспластичного синдрому. *Цитологія і генетика*. 2009; 1: 61–8. [Lozins'ka M.R., Vigovs'ka Ya.I., Tomashevs'ka N.Ya., Maslyak Z.V., Lozins'kiy R.Yu., Novak V.L. The characteristics of the spectrum of cytogenetic changes in different variants of myelo-dysplastic syndrome. *Citologiya i genetika*. 2009; 1: 61–8]. (in Ukrainian)
- Rigolin G.M., Bigoni R., Milani R., Cavazzini F., Roberti M.G., Bardi A., et al. Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia*. 2001; 15(12): 1841–7.
- Bernasconi P., Klersy C., Boni M., Cavigliano P.M., Calatroni S., Giardini I., et al. World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with de novo primary myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 2007; 137(3): 193–205.
- Грицаєв С.В., Мартынкевич І.С., Петрова Е.В., Мартыненко Л.С., Иванова М.П., Аксенова В.Ю. и др. Цитогенетический профиль больных с первичным миелодиспластическим синдромом. *Терапевтический архив*. 2013; 7: 43–9. [Gritsaev S.V., Martynkevich I.S., Petrova E.V., Martynenko L.S., Ivanova M.P., Aksenova V.Yu., et al. Cytogenetic profile of patients with primary MDS. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2013; 7: 43–9]. (in Russian)
- Czibere A., Bruns I., Junge B., Singh R., Kobbe G., Haas R., et al. Low RPS14 expression is common in myelodysplastic syndromes without 5q- aberration and defines a subgroup of patients with prolong survival. *Haematologica*. 2009; 94(10): 1453–5.
- Rosenfeld C., List A. A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies. *Leukemia*. 2000; 14: 2–8.
- Kuchenbauer F., Kern W., Schoch C., Kohlmann A., Hiddemann W., Haferlach T., et al. Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2005; 90(12): 1617–25.

Поступила 27.01.14

Received 27.01.14