

Панова Тамара Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой госпитальной терапии с курсом функциональной диагностики ГОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121, тел. (8512) 52-41-43, e-mail: agma@astranet.ru

Белопасов Владимир Викторович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нервных болезней ГОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121, тел. (8512) 52-41-43.

УДК 616.155.392.8-036; 616-091.818

© Е.Г. Овсянникова, И.С. Ковалинская, Л.В. Заклякова, 2011

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

ИНИЦИАТОРЫ АПОПТОЗА КАСПАЗА 9 И sFAS-L – РОЛЬ В ОЦЕНКЕ ИСХОДОВ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

ГОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России

В настоящее время достигнуты значительные успехи в терапии хронического миелолейкоза. На фоне лечения ингибиторами тирозинкиназ (гливек) у большинства пациентов возможно достижение стабильной клинко-гематологической и цитогенетической ремиссии. Однако часть пациентов остается резистентной к лечению. В работе изучается роль маркеров апоптоза каспазы 9 и sFAS-L в оценке исходов терапии хронического миелолейкоза.

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

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

THE INITIATORS OF APOPTOSE CASPAZA 9 AND sFAS-L – ROLE IN THE ESTIMATION OF THERAPY OUTCOMES IN CHRONIC MYELOLEUKOSIS

The significant success is achieved in therapy of chronic myeloleukosis. On the base of treatment by inhibitors tirozinkinaza (glivecom) most patients received stable clinico-hematologic and cytogenetic remission. But some patients may be resistant to treatment. The investigation deals with marker's role of apoptoze caspaza 9 and sFAS-L in estimation of therapy out-comes in case with chronic myeloleukosis.

Key words: chronic myeloleukosis, apoptoze, caspaza 9, sFAS-L.

Успехи, достигнутые в лечении хронического миелолейкоза (ХМЛ) за последнее десятилетие, связаны с применением препаратов, обладающих анти tirozinkinазной активностью [4]. Представитель первого поколения ингибиторов тирозинкиназ – иматиниба мезилат или гливек (Glivec, Gleevec) [12].

Гливек блокирует активность белка BCR-ABL, который играет ведущую роль в злокачественной трансформации клеток при хроническом миелолейкозе [1]. Использование гливека в клинической практике, позволило получить высокие показатели достижения гематологической, цитогенетической, молекулярной ремиссии [3]. Однако остается большой процент больных, демонстрирующих резистентность или непереносимость гливека [10]. Это определяет необходимость поиска дополнительных маркеров прогноза и ожидаемого эффекта от терапии.

Предполагается, что развитие лейкоза и опухолевый рост являются результатом дисбаланса между пролиферацией клеток и программированной клеточной смертью [2]. Для оценки апоптоза и основных механизмов, ответственных за его развитие, в практическом плане широко используются маркеры ключевых точек генетической программы клеточной смерти: протеинов p53, Bcl-2, Bax, Fas (APO-1/CD-95) [6]. Центральным звеном в механизме апоптоза является протеолитическая система, включающая семейство белков, называемых каспазами. Инициаторы (каспаза-8 и -9) расщепляют и активируют каспазы эффекторы (каспаза-3). Активация каспаз запускает протеолитический каскад реакций, ведущих к гибели клетки [3, 7].

В настоящее время особое внимание уделяется изучению апоптоза при онкопатологии [8, 9, 11]. Однако роль маркеров апоптоза при хроническом миелолейкозе освещена в единичных работах [5].

Цель исследования: определить значение маркеров апоптоза (каспазы 9 и sFAS-L) в оценке исходов терапии гливеком у больных хроническим миелолейкозом.

Материалы и методы: в исследование вошли 54 больных хроническим миелолейкозом (хроническая фаза). Средний возраст обследованных составил 55 лет, соотношение мужчин и женщин 1:1. Все больные имели клинко-морфологическое и цитогенетическое подтверждение диагноза. В процессе исследования было проведено 270 цитогенетических и 200 молекулярных исследований. Характер ответа на лечение определялся согласно критериям Европейского общества по изучению хронического миелолейкоза European Leukemia Net (ELN-2009). Иммуноферментное исследование сыворотки крови проводилось с использованием наборов для

количественного определения каспазы 9 и sFAS-лиганда. Были использованы тест-системы фирмы Bender MedSystems (Австрия). Чувствительность тест-системы для определения концентрации каспазы 9 менее 0,4 нг/мл, sFAS-лиганда – 0,07 нг/мл.

В контрольную группу вошли 30 практически здоровых доноров: 20 мужчин (66,7%) и 10 женщин (33,3%) в возрасте от 18 до 55 лет, жители Астраханской области.

Наблюдение за больными проводилось в амбулаторных и стационарных условиях. Начальная доза гливек составляла 400 мг/сут. При недостаточном первичном ответе на терапию или потере полной клинико-гематологической и полной цитогенетической ремиссий проводилась эскалации дозы гливек до 600 мг/сутки.

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. Также были использованы непараметрические методы статистической обработки - критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение: на первом этапе работы оценивался клинико-гематологический ответ через 3 месяца терапии гливек. Полный гематологический ответ получен у 45 больных ХМЛ (83,3%), не удалось достичь гематологического ответа у 9 больных (16,7%). Через 6 месяцев терапии оценивалась клинико-гематологическая ремиссия и цитогенетический ответ. Оптимальный ответ достигнут у 30 больных (55,6%), субоптимальный у 6 (11,1%) больных ХМЛ. Неудача терапии зафиксирована у 18 больных (33,3%). В следующей контрольной точке – 12 месяцев терапии гливеком значительно снизился процент достижения оптимального ответа с 55,6% до 35,2% ($p<0,05$). Снижение произошло за счет перехода больных в группу субоптимального ответа и неудачи терапии. Процент достижения субоптимального ответа вырос с 11,1% до 20,4% ($p<0,05$), неудачи терапии с 33,3% до 44,4% ($p<0,05$). Через 18 месяцев терапии гливеком оптимальный ответ достигнут у 14 (25,9%), субоптимальный у 19 (18,9%) больных ХМЛ. Неудача терапии зафиксирована у 30 (55,6%) больных. Анализируя полученные данные, мы пришли к выводу: максимальный процент (55,6%) оптимального ответа регистрируется в 6 месяцев терапии, прогрессивно снижается к 18 месяцам в два раза до 25,9% ($p<0,05$). Неудача терапии, в свою очередь, вырастает с 33,3% до 55,6% ($p<0,05$) в связи с прогрессией заболевания.

На момент начала терапии всем больным был назначен гливек в дозе 400 мг. Показано, что число пациентов, получавших гливек в дозе 600 мг, увеличилось с 18% до 69% ($p<0,05$) к 24 месяцам терапии. Для более детального анализа ответа на терапию гливеком и влияния увеличенной дозы гливек, была изучена динамика цитогенетических ответов в срок 24 месяца. Полный цитогенетический ответ (ПЦО) достигнут у 24 больных (44,4%), отсутствие ПЦО регистрируется у 30 больных (55,6%).

Несмотря на увеличение дозы гливек до 600 мг, остается группа больных, резистентных к лечению гливек, что требует поиска дополнительных предикторов ответа на терапию. С этой целью мы проанализировали концентрацию каспазы 9 у больных ХМЛ в зависимости от достижения цитогенетического ответа через 24 месяца терапии гливеком (табл. 1).

Таблица 1

Динамика концентрации каспазы 9 у больных ХМЛ, достигших полного цитогенетического ответа через 24 месяца терапии гливеком

	Контрольная группа (n=30)	Больные ХМЛ, достигшие ПЦО	
		6 мес. (n=20)	24 мес. (n=24)
Концентрация каспазы 9, (нг/мл)	2,03±0,13	2,81±0,02	2,27±0,04
Достоверность различия		$p<0,05$ $p_2<0,05$	$p>0,05$ $p_1<0,05$

Примечание:

p – достоверность различия показателей по сравнению с контрольной группой

p₁ - достоверность различия показателей по сравнению с группой 6 месяцев

p₂ - достоверность различия показателей по сравнению с группой 24 месяцев

Из таблицы 1 следует, что у больных ХМЛ с полным цитогенетическим ответом концентрация каспазы 9 достоверно повышена в срок 6 месяцев лечения. К 24 месяцам терапии концентрация каспазы 9 приближается к нормальным значениям – 2,27±0,04 нг/мл, достоверных отличий нет ($p>0,05$). Этот факт подтверждает уменьшение патологического клона ХМЛ в результате лечения гливеком, приводящее к нормализации тонких механизмов апоптоза. Далее мы оценили различия концентрации каспазы 9 в тех же контрольных точках лечения у больных ХМЛ, не достигших полного цитогенетического ответа (табл. 2).

Динамика концентрации каспазы 9 у больных ХМЛ, не достигших полного цитогенетического ответа через 24 месяца терапии гливеком

	Контрольная группа (n=30)	Больные ХМЛ, не достигшие ПЦО	
		6 мес. (n=34)	24 мес. (n=30)
Концентрация каспазы 9, (нг/мл)	2,03±0,13	2,61±0,07	2,45±0,03
Достоверность различия		p<0,05 p ₂ >0,05	p<0,05 p ₁ >0,05

Примечание:

p – достоверность различия показателей по сравнению с контрольной группой

p₁ - достоверность различия показателей по сравнению с группой 6 месяцев

p₂ - достоверность различия показателей по сравнению с группой 24 месяцев

Как представлено в таблице 2, у больных ХМЛ с отсутствием полного цитогенетического ответа отмечается достоверное повышение концентрации каспазы 9, по сравнению с контролем (p<0,05), в срок 6 и 24 месяца терапии гливеком. Статистически значимых отличий между значениями концентрации каспазы 9 у больных ХМЛ в срок 6 и 24 месяца не выявлено. Это подтверждает наше предположение о том, что при неудаче терапии (согласно критериям ELN 2009), концентрация каспазы 9 выше контрольного уровня и отражает активность патологического процесса, необходимость поддержания апоптоза на высоком уровне.

Следующим этапом работы было определение уровней концентрации sFAS-L в сыворотке крови больных ХМЛ, в контрольных точках оценки лечения 6, 12, 18, 24 месяца (табл. 3). Полученные результаты варьировали в диапазоне от 0,058 до 1,108 нг/мл.

Таблица 3

Динамика концентрации sFAS-L у больных ХМЛ, достигших и не достигших полного цитогенетического ответа через 24 месяца терапии гливеком

Ответ на лечение	Концентрация sFAS-L (нг/мл)				
	Контрольная группа (n=30)	Больные ХМЛ, достигшие и не достигшие полного цитогенетического ответа (n=54)			
		6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.
ПЦО	0,11±0,01	0,17±0,04*	0,12±0,01**	0,25±0,11	0,12±0,01
Нет ПЦО	0,11±0,01	0,13±0,01	0,16±0,01* **	0,17±0,01*	0,18±0,01* **

Примечание:

*p – достоверность различия показателей по сравнению с контрольной группой

**p₁ - достоверность различия показателей между группами ПЦО и нет ПЦО

Из таблицы 3 следует, что концентрация sFAS-L в сыворотке крови больных ХМЛ, не достигших полного цитогенетического ответа, достоверно повышена, по сравнению с контролем, на период лечения 12, 18, 24 месяца. В группе больных ХМЛ, достигших полного цитогенетического ответа, отмечаются колебания концентрации, и в срок 18 месяцев регистрируется максимальное значение концентрации sFAS-L – 0,25±0,11 нг/мл. Однако к 24 месяцам терапии концентрация sFAS-L в данной группе больных ХМЛ снижается до нормальных показателей, чего не наблюдается у больных ХМЛ с отсутствием цитогенетического ответа.

Выводы. Установлено, что через 24 месяца терапии гливеком полный цитогенетический ответ достигнут 44,4% больных хроническим миелолейкозом. Несмотря на увеличение дозы гливека до 600 мг, остается группа больных, резистентных к лечению гливеком. Концентрация каспазы 9 и sFAS-L в сыворотке крови больных ХМЛ, не достигших полного цитогенетического ответа, достоверно выше, по сравнению с контрольной группой и группой больных ХМЛ, достигших полного цитогенетического ответа (p<0,05). Определение концентрации каспазы 9 и sFAS-L у больных хроническим миелолейкозом может быть использовано в качестве дополнительного прогностического критерия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абелев Г.И., Андреева Н.Е., Афанасьев Б.В. [и др.]. Клиническая онкогематология: Руководство для врачей / под ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина, 2001. – 576 с.

2. Владимирская Е.Б. Механизмы апоптотической смерти клеток // Гематология и трансфузиология. – 2002. – Т. 47, № 2. – С. 35-40.
3. Зарицкий А.Ю., Ломаиа Е.Г., Виноградова О.Ю. [и др.] Результаты многоцентрового исследования терапии гливекком больных хроническим миелолейкозом в хронической фазе // Гематология и трансфузиология. – 2007. – Т. 52, № 2. – С. 13-17.
4. Ломаиа Е.Г., Моторин Д.В., Романова Е.Г., Зарицкий А.Ю. Хронический миелолейкоз – до и после применения иматиниба (часть I) // Онкогематология. – 2009. – № 2. – С. 4-16.
5. Петухов В.Е. Роль Fas-опосредованного апоптоза в реализации противоопухолевого эффекта α -интерферона при хроническом миелолейкозе // Гематология и трансфузиология. – 2000. – Т. 45, № 4. – С. 29-33.
6. Полосухина Е.Р., Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. [и др.]. Исследование экспрессии антигена CD95 (Fas/APO-1), опосредующего апоптоз, с помощью моноклональных антител ICO-160 при гемобластозах // Гематология и трансфузиология. – 2000. – Т. 45, № 4. – С. 3-6.
7. Райхлин Н.Т., Райхлин А.Н. Регуляция и проявления апоптоза в физиологических условиях и в опухолях // Вопросы онкологии. – 2002. – Т. 48, № 2. – С. 159-171.
8. Рыжов С.В., Новиков В.В. Молекулярные механизмы апоптотических процессов // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, № 3. – С. 27-33.
9. Торубарова Н.А., Семикина Е.Л., Копыльцова Е.А. [и др.]. Fas-рецептор и апоптозконтролирующие протеины при остром миелобластном лейкозе у детей // Гематология и трансфузиология. – 2003. – Т. 48, № 3. – С. 3-8.
10. Туркина А.Г., Хорошко Н.Д., Дружкова Г.А. [и др.]. Эффективность терапии иматиниба мезилатом (Гливекком) в хронической фазе миелолейкоза // Терапевтический архив. – 2003. – № 8. – С. 62-67
11. Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз: краткая история, молекулярные механизмы, методы выявления и возможное значение в онкологии // Экспериментальная онкология. – 1996. – Т. 18. – С. 435-448.
12. Druker B.J., Lydon N.B. Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia // J. Clin. Invest. – 2000. – Vol. 105. – P. 3-7.

Овсянникова Елена Георгиевна, кандидат медицинских наук, докторант кафедры факультетской терапии и профессиональных болезней с курсом последипломного образования ГОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121, elenaagma@mail.ru, тел. (8512) 26-07-10.

Ковалинская Ирина Сергеевна аспирант кафедры факультетской терапии и профессиональных болезней с курсом последипломного образования ГОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121, тел. (8512) 52-41-43, e-mail: agma@astranet.ru

Заклякова Людмила Владимировна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры факультетской терапии и профессиональных болезней с курсом последипломного образования ГОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121, тел. (8512) 52-41-43, e-mail: agma@astranet.ru

УДК 616.248-07

© М.М. Спирина, А.В. Беднякова, Л.П. Воронина, О.С. Полунина, И.В. Севостьянова, 2011

М.М. Спирина¹, А.В. Беднякова², Л.П. Воронина², О.С. Полунина², И.В. Севостьянова²

АНАЛИЗ УРОВНЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

¹НУЗ «Медико-санитарная часть», г. Астрахань

²ГОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России

В статье представлены результаты исследования уровня интерлейкина-8 (ИЛ-8) у 25 соматически здоровых лиц и 67 больных бронхиальной астмой (БА). Выявлена зависимость уровня ИЛ-8 как от степени тяжести обострения БА, так и от длительности заболевания. На основе данного исследования удалось доказать высокую диагностическую значимость интерлейкина-8 как прогностического маркера продолжительности приступного периода БА.

Ключевые слова: бронхиальная астма, интерлейкин-8, приступный период.