

Особенности содержания растворимых молекул HLA I класса, CD8 антигена и их комплексов при хроническом миелолейкозе

Е.А. Гостюжова^{1,2}, В.Ф. Ликов³, А.В. Караулов³, В.В. Новиков²

¹ Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского, Россия

² Нижегородская областная больница им. Н.А. Семашко, Россия

³ Московская медицинская академия им. М.И. Сеченова, Россия

Characteristic features of soluble HLA class I molecules, CD8 antigen and soluble complex hla-i-cd8 in chronic myelogenous leukemia

E.A. Gostyuzhova^{1,2}, V.F. Likov,³ A.V. Karaulov³, V.V. Novikov²

¹ N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Russia

² N.A.Semashko Nizhny Novgorod Regional Clinical Hospital, Russia

³ I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Russia

Аннотация

Исследовано сывороточное содержание растворимых молекул HLA I класса, CD8 антигена и растворимого комплекса HLA-I-CD8 при хроническом миелолейкозе до лечения и на фоне современной молекулярно направленной терапии препаратом гливек (иматиниб). Получены данные о значительном повышении уровня растворимой формы HLA-I, а также комплекса HLA-I-CD8 в сыворотке пациентов, получавших препараты б-интерферона в качестве предшествующей гливеку терапии. Установлена корреляция между содержанием sHLA-I, sHLA-I-CD8 и цитогенетическим ответом (количеством Ph-позитивных клеток в костном мозге пациентов), который отражает эффективность проводимой терапии.

Ключевые слова

Растворимые молекулы HLA I класса, CD8 антиген, комплекс HLA-I-CD8, хронический миелолейкоз, гливек, цитогенетический ответ.

Summary

Serum level of soluble HLA class I molecules, CD8 antigen and soluble complex HLA-I-CD8 were studied in patients with chronic myelogenous leukemia before treatment and during molecular targeted therapy with glivec (imatinib). The data about substantial increase of soluble HLA-I and complex HLA-I-CD8 concentration in serum of patients received interferon as previous to glivec therapy were obtained. The correlation between sHLA-I, sHLA-I-CD8 concentration and cytogenetic response (quantity of Ph-positive cells in bone marrow of patients) that reflects the efficiency of carried out therapy was established.

Key words

Soluble HLA class I molecules, CD8, complex HLA-I-CD8, chronic myelogenous leukemia, cytogenetic response.

Антигены главного комплекса гистосовместимости, как и многие другие мембранные белки клеток иммунной системы, имеют растворимые формы. Они могут быть продуктами шеддинга (протеолитического отщепления с мембраны клетки) или альтернативного сплайсинга мРНК. Экспериментально показано, что ра-

створимые молекулы HLA I класса и HLA-DR модулируют реактивность Т-клеток и стимулируют апоптоз *in vitro*. Так, растворимые молекулы HLA I класса связываются с CD8 молекулами на поверхности цитотоксических Т-клеток, препятствуя распознаванию презентруемых антигенных пептидов и вызывая продукцию раствори-

мого Fas-лиганда. Секретирующийся растворимый Fas-лиганд, выступая в роли аутокринного фактора, способен взаимодействовать с мембранным Fas (CD95) антигеном на этих же клетках с последующей инициацией апоптоза цитотоксических CD8-положительных Т-лимфоцитов [1,2].

Сохранение растворимыми дифференцировочными антигенами способности связывать растворимые гомологи мембранных партнеров подразумевает возможность существования в биологических жидкостях белковых комплексов, состоящих из взаимодействующих друг с другом растворимых антигенов. Экспериментально продемонстрировано существование растворимых комплексов, состоящих из молекул HLA I класса и CD8 антигена [3]. Количественное содержание таких комплексов, а также растворимых комплексов CD54 и CD18 антигенов, изменяется при развитии различных заболеваний, и вносит свой нейтрализующий вклад в иммуномодулирующий потенциал общего пула растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы [4,5,6].

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) является клональным миелопролиферативным заболеванием, характеризующимся присутствием в лейкозных клетках хромосомной транслокации (9;22)(q34;q11) – так называемой филадельфийской хромосомы (Ph-хромосомы). В результате указанной хромосомной перестройки происходит слияние 9q34 участка гена ABL и 22q11 фрагмента гена BCR с формированием химерного гена BCR/ABL, кодирующего продукцию белка p210, обладающего повышенной тирозинкиназной активностью. В конечном итоге это ведет к блокированию апоптоза и преимущественной выживаемости клеток-носителей BCR/ABL [7]. В связи с этим изучение путей нарушения иммунного ответа при ХМЛ, и, в особенности, механизмов апоптоза приобретает особую актуальность.

Целью настоящей работы явилось исследование сывороточного содержания растворимых молекул HLA I класса, CD8 антигена и растворимого комплекса HLA-I-CD8 при ХМЛ до лечения и на фоне современной молекулярно направленной терапии.

Материалы и методы

Материалом для цитогенетического исследования служили 81 образец костного мозга пациентов с диагнозом ХМЛ, проходивших лечение на базе гематологического отделения Нижегородской областной клинической больницы им. Н.А. Семашко. При этом с целью под-

тверждения диагноза проведено 11 цитогенетических исследований, наличие специфической транслокации t(9;22)(q34;q11) было зафиксировано в 95-100% метафаз. Для динамического мониторинга лечения препаратом гливек исследованы образцы костного мозга 70 пациентов на период 6, 12, 18 и более мес. терапии, из них 17 человек в качестве предшествующей терапии получали препараты б-интерферона.

Продолжительность лечения гливеком на момент исследования составила от 6 до 72 мес., медиана длительности – 18 мес. Эффективность применения гливека оценивали согласно действующим критериям цитогенетического ответа (ЦГО): большой и полный ЦГО – 0-5% Ph-положительных метафаз; частичный и малый ЦГО – 6-90% Ph-положительных метафаз; отсутствие или минимальный ЦГО – 91-100% Ph-положительных метафаз [8]. Препараты хромосом получали после суточного культивирования клеток костного мозга с добавлением колхицина согласно существующей методике [9]. Дифференциальное G-окрашивание проводили по методу Seabright [10]. Препараты анализировали с учетом рекомендаций Международной классификации хромосом ISCN 2005 г. [11] В каждом наблюдении исследовали не менее 20 метафазных пластин.

У всех обследуемых параллельно осуществлялся забор периферической крови для изучения содержания растворимых молекул HLA I класса, CD8 антигена и растворимого комплекса HLA-I-CD8. В качестве контроля использовали образцы сыворотки крови 40 здоровых волонтеров. Определение уровня растворимых молекул HLA I класса и CD8 антигена проводили двухсайтовым иммуноферментным методом с использованием меченых пероксидазой хрена моноклональных антител (МКА) ИКО-53 и ИКО-31, соответственно, и поликлональных антител, специфичных к мембранным антигенам мононуклеарных клеток крови человека, применяемых в качестве «первых» антител и сорбируемых в лунки планшетов для иммуноферментного анализа. Для определения ассоциатов HLA-I-CD8 в качестве первых антител, сорбируемых на твердую фазу, использовали МКА ИКО-53 против молекул HLA I класса; в качестве иммуноферментного конъюгата применяли МКА ИКО-31 против CD8 антигена. Результаты выражали в условных единицах (U/ml).

Статистический анализ проводили с использованием критериев Манна-Уитни, Стьюдента и критерия ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Согласно имеющимся в литературе данным, терапия интерфероном- α приводит к повышению содержания растворимой формы HLA-I у пациентов с ХМЛ [12]. Известно, что концентрация растворимых мембранных антигенов в сыворотке крови может выступать как показатель тяжести течения и прогноза некоторых заболеваний, в том числе онкологических [1]. В связи с этим мы проанализировали уровень этих молекул у больных, получающих только гливек в качестве первой линии терапии, и у больных, предлеченных интерфероном- α , а затем получавшим гливек по стандартной схеме (Рисунок 1). Доля пациентов, достигших полного или большого цитогенетического ответа различалась в этих группах в 1,8 раза и составила 52% и 29%, соответственно ($p < 0,05$). Частичный и малый цитогенетический ответ обнаруживался у больных двух

тестируемых групп с одинаковой частотой, равной 29%. В то же время, отсутствие ответа или минимальный ответ отмечен у 19% пациентов, которые получали только гливек, и в 2,6 раза чаще (42%) у больных, предлеченных интерфероном- α ($p < 0,05$). Таким образом, эффективность применения ингибиторов тирозинкиназ у таких пациентов намного снижена. Вероятно, это может быть связано с развитием цитопении на фоне терапии препаратами интерферона- α , которая является неблагоприятным фактором, ответственным за развитие миелосупрессии [13].

В дебюте заболевания содержание растворимых молекул HLA-I в сыворотке крови пациентов с ХМЛ (Рисунок 2) было достоверно повышено в 2,0 раза по сравнению с нормой ($p < 0,05$). У пациентов, получающих гливек в качестве

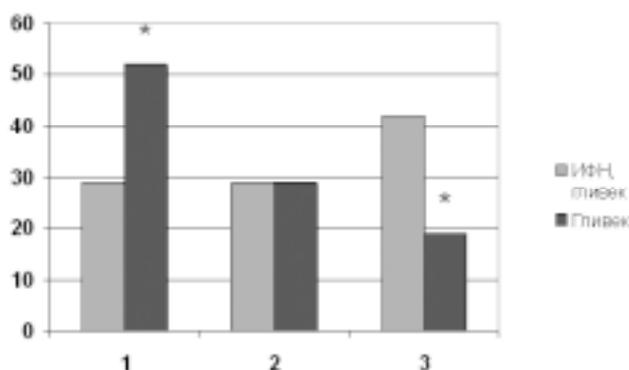


Рис. 1. Цитогенетический ответ на терапию гливеком в зависимости от предлеченности ИФН- α

1 – большой и полный ЦГО (0-5% Ph-позитивных метафаз); 2 – частичный и малый ЦГО (6-90% Ph-позитивных метафаз); 3 – отсутствие или минимальный ЦГО (91-100% Ph-позитивных метафаз)

* – достоверные отличия между группами, $p < 0,05$

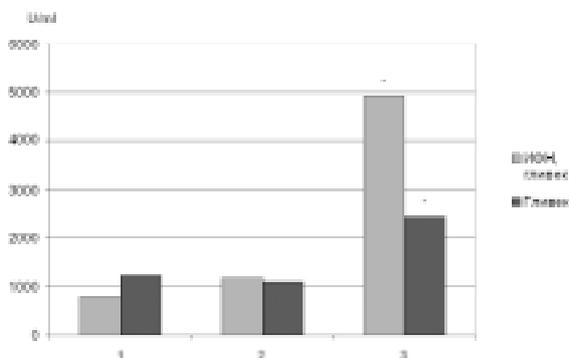


Рис. 2. Содержание растворимой формы HLA-I у больных ХМЛ в зависимости от получаемого лечения (примечание: уровень в норме – 1012 ± 36 U/ml, у первичных больных – 2039 ± 679 U/ml).

1 – большой и полный ЦГО (0-5% Ph-позитивных метафаз); 2 – частичный и малый ЦГО (6-90% Ph-позитивных метафаз); 3 – отсутствие или минимальный ЦГО (91-100% Ph-позитивных метафаз)

* – достоверные отличия по сравнению с нормой, $p < 0,05$

первой линии терапии, выявлено снижение уровня sHLA-I до нормальных значений у больных с большим и частичным цитогенетическим ответом. При отсутствии и минимальном ответе на проводимое лечение отмечена тенденция к повышению содержания этих молекул ($p > 0,05$) в сравнении с первичным ХМЛ, и достоверное повышение в 2,0 раза по сравнению с лицами, характеризующимися большим ЦГО.

У пациентов, ранее получавших препараты α -интерферона, при достижении большого или частичного цитогенетического ответа на фоне лечения гливекком уровень молекул sHLA-I также снижался до нормальных значений. В группе лиц с отсутствием или минимальным цитогенетическим ответом уровень молекул sHLA-I был в 4,5 раза выше, чем в норме и в 2,2 раза выше, чем при первичном ХМЛ. Это повышение было в 2 раза более существенным, чем при монотерапии гливекком. Однако достоверных отличий в содержании растворимого sHLA-I между группами пациентов, получающих разную терапию, выявлено не было ($p > 0,05$).

Корреляционный анализ позволил установить положительную взаимосвязь между сывороточным уровнем sHLA-I и цитогенетическим ответом (долей Ph+ клеток в костном мозге) у пациентов, получавших ранее б-интерферон ($r = 0,62$; $p < 0,05$). При этом в группе больных, леченных гливекком в качестве первой линии терапии, данная корреляционная связь отсутствовала.

Достоверных изменений в содержании растворимых форм CD8 антигена у пациентов с ХМЛ как в дебюте заболевания, так и при лечении гливекком выявлено не было (Рисунок 3). Однако при отсутствии ЦГО была отмечена выраженная тенденция к повышению содержания sCD8 как в общей группе, так и среди пациентов, получающих гливек в качестве первой линии терапии.

Наряду с анализом сывороточного содержания растворимых молекул HLA I класса и CD8 антигена, был определен уровень растворимых комплексов, состоящих из данных молекул. Исследование содержания растворимого комплекса HLA-I-CD8 обнаружило тенденцию к его повышению при первичном ХМЛ (Рисунок 4). У больных, предлеченных интерфероном-б и имевших большой и полный цитогенетический ответ на фоне терапии гливекком, наблюдалась тенденция к понижению сывороточного уровня тестируемого молекулярного комплекса. Менее выраженный цитогенетический ответ характеризовался повышением его уровня и при отсутствии цитогенетического ответа сывороточное содержание растворимого комплекса sHLA-I-CD8 было в 2,7 раза выше, чем в норме и в 2,3 раза выше, чем при первичном ХМЛ ($p < 0,05$).

В то же время, в случае применения гливека в качестве первой линии терапии было отмечено менее выраженное повышение концентрации данного комплекса у пациентов с отсутствием цитогенетического ответа – в 1,5 раза ($p < 0,05$).

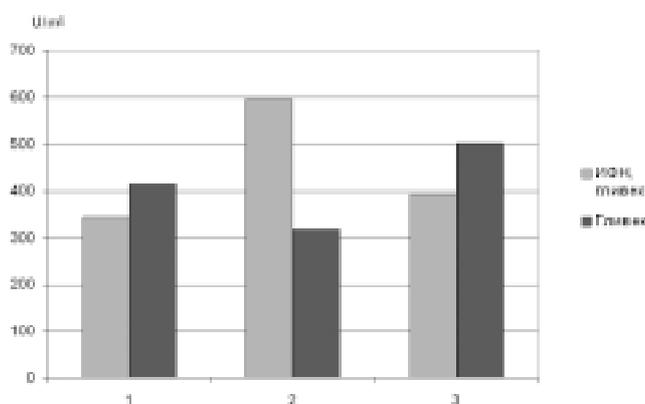


Рис. 3. Содержание растворимой формы CD8 антигена у больных ХМЛ в зависимости от получаемого лечения (примечание: уровень в норме – 378 ± 17 U/ml, у первичных больных – 382 ± 45)

1 – большой и полный ЦГО (0-5% Ph-позитивных метафаз); 2 – частичный и малый ЦГО (6-90% Ph-позитивных метафаз); 3 – отсутствие или минимальный ЦГО (91-100% Ph-позитивных метафаз)

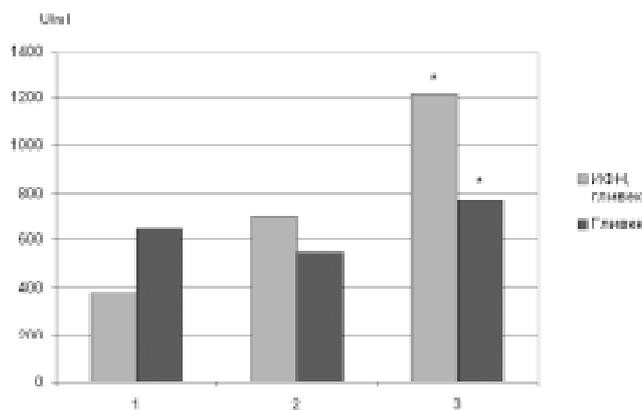


Рис. 4. Содержание растворимого комплекса HLA-I-CD8 у больных ХМЛ в зависимости от получаемого лечения (примечание: уровень в норме – 513 ± 22 U/ml, у первичных больных – 520 ± 74 U/ml)

1 – большой и полный ЦГО (0-5% Ph-позитивных метафаз); 2 – частичный и малый ЦГО (6-90% Ph-позитивных метафаз); 3 – отсутствие или минимальный ЦГО (91-100% Ph-позитивных метафаз)

* – достоверные отличия по сравнению с нормой, $p < 0,05$

Обнаружена значимая положительная корреляция между сывороточным содержанием растворимого комплекса HLA-I-CD8 и долей Ph+ клеток в пунктате костного мозга ($r=0.52$; $p < 0.05$) у пациентов, предлеченных интерфероном. Среди тех, кто получал гликек в качестве монотерапии, значимой связи между уровнем растворимого HLA-I-CD8 и цитогенетическим ответом выявлено не было.

Таким образом, можно резюмировать, что наиболее существенные отклонения в содержании растворимой формы HLA-I и растворимого комплекса HLA-I-CD8 отмечены в дебюте заболевания и при отсутствии цитогенетического ответа на проводимое лечение гликеком. Высокие значения sHLA-I в дебюте ХМЛ и при отсутствии ответа на проводимое лечение согласуются с имеющимися в литературе сведениями об увеличении уровня sHLA-I при гемобластозах [14, 15]. Показано, что растворимые молекулы HLA-I модулируют реактивность Т-клеток и стимулируют апоптоз *in vitro*. При этом, повышенная продукция растворимых молекул гистосовместимости может осуществляться одними клетками, а эффекторное воздействие может оказываться на другие клетки [16,17]. Продемонстрировано также, что распознавание клеток-мишеней CD8-положительными натуральными киллерами ингибируется растворимыми молекулами HLA I класса. Наряду с этим, растворимые молекулы HLA I класса вызывают Fas/FasL-зависимый апоптоз CD8+ NK-клеток,

взаимодействуя с CD8 антигеном на их поверхности [18,19]. Следовательно, повышенный уровень молекул sHLA-I способен вызвать анергию или гибель CD8-положительных цитотоксических Т-лимфоцитов и/или натуральных киллеров, что может явиться важным фактором угнетения противолейкемического иммунного ответа и привести к последующей прогрессии заболевания.

Снижение повышенного уровня sHLA-I до нормальных значений в случае успешной терапии гликеком является, таким образом, звеном механизма нормализации апоптотических процессов, касающихся активированных Т-клеток. Это позволяет предположить возможность использования данного протеина для иммунологического мониторинга пациентов с ХМЛ.

Корреляционный анализ позволил выявить наличие достоверной положительной связи между уровнем растворимой формы HLA-I и относительной концентрацией растворимого комплекса HLA-I-CD8 ($r=0,52$; $p < 0,05$), а также между сывороточным содержанием sCD8 и комплекса HLA-I-CD8 ($r=0,46$; $p < 0,05$). Наличие такой корреляции указывает на высокую вероятность того, что sHLA-I и sCD8 в значительном количестве содержатся в сыворотке в составе растворимых комплексов HLA-I-CD8. Белки, входящие в состав растворимых ассоциатов, лишены способности обеспечивать модулирующие эффекты, свойственные свободным растворимым формам мембранных антигенов,

поскольку их центры связывания взаимно блокированы. То есть, увеличение содержания растворимых молекул HLA I класса, вероятно, происходит в большей степени за счет связанных с лигандами молекул, не способных взаимодействовать с мембранными партнерами и оказывать проапоптотический эффект. Результатом может явиться ограничение программированной клеточной смерти CD8-положительных цитотоксических Т-лимфоцитов и обеспечение более эффективной работы противолейкемического клеточного иммунного ответа.

Таким образом, в ходе исследования было выявлено значительное повышение содержания растворимых молекул HLA I класса, а также комплекса HLA-I-CD8 в сыворотке пациентов с ХМЛ, получавших препараты б-интерферона в

качестве предшествующей гливеку терапии; была установлена корреляционная взаимосвязь между уровнем sHLA-I, sHLA-I-CD8 и цитогенетическим ответом, который является главным маркером эффективности проводимого лечения ингибитором тирозинкиназы. Эффективность применения гливека была закономерно выше у пациентов, получавших этот препарат в качестве терапии первой линии. Следовательно, уровень растворимой формы HLA-I и его комплекса с растворимым CD8-антигеном отражают особенности патогенеза ХМЛ и формирования резистентности к гливеку, что позволяет рассматривать эти белки в качестве возможных прогностических маркеров при данной тяжелой онкогематологической патологии.

Литература

1. Новиков В.В., Евсегнеева И.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы при социально - значимых заболеваниях. Сообщение II. Исследование их роли при вирусных инфекциях. Российский биотерапевтический журнал 2005; 3: 131-142.
2. Puppo F, Contini P, Ghio M, Indiveri F. Soluble HLA class I molecules/CD8 ligation trigger apoptosis of CD8+ cells by Fas/Fas-ligand interaction. ScientificWorld Journal 2002; 2:421-423.
3. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы. Иммунология 2007; 4: 249-253.
4. Бабаев А. А., Кравченко Г. А., Ятманова Т. А. и др. Растворимые комплексы молекул адгезии в сыворотке крови человека. Вестник Нижегородского университета им. Н.И.Лобачевского, серия Биология 2006; 11 (1): 128-132.
5. Бабаев А. А., Ятманова Т. А., Кравченко Г. А., Новиков В. В. Обнаружение растворимых комплексов молекул адгезии в сыворотке крови человека и их уровень у больных острым гепатитом В. (Мат-лы науч. конф. «Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний», посв. 85-летию со дня рожд. акад. РАМН И.Н. Блохиной, Нижний Новгород) 2006а; 211-215.
6. Кравченко Г.А., Пашева Л.А., Манакова Э.А., Абдрахманова Г.А., Новиков В.В. Растворимые комплексы «CD8-HLA I класса» как возможный фактор модуляции иммунного ответа при вирусных гепатитах В и С (Труды Национальной конференции «Аллергология и клиническая иммунология – Междисциплинарные проблемы, Москва) 2008; 140-141.
7. Faderl S., Talpaz M., Estrov Z. et al. Mechanism of disease: the biology of chronic myelogenous leukemia. N.Engl.J.Med 1999; 341:164-172.
8. Kantarjian H.M., O'Brien S., Cortes J. et al. Imatinib mesylate therapy improves survival in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in the chronic phase: comparison with historic data. Cancer 2003; 12: 2636-2642.
9. Мартынкевич И.С., Мартыненко Л.С., Иванова М.П. Дополнительные хромосомные aberrации у больных хроническим миелолейкозом. Гематол. и трансфузиол 2007; 52 (2): 28-34.
10. Seabright M. Improvement of trypsin method for banding chromosomes. Lancet 1973; 1(7814): 1249-1250.
11. ISCN: International System Human Cytogenetic Nomenclature (2005). Eds. Lisa G. Shaffer, Niels Tommarup 2005.
12. Hillebrand K., Moritz T., Westhoff U., Niederle N., Grosse-Wilde H. Soluble HLA class I and beta-2-microglobulin plasma concentrations during interferon treatment of chronic myelogenous leukemia. Vox Sang 1994; 67(3):310-314.
13. Зарицкий А. Ю., Ломаиа Е.Г., Виноградова О.Ю. и др. Факторы прогноза при терапии иматиниба мезилатом у больных в хронической фазе Ph-положительного хронического миелолейкоза: данные многоцентрового нерандомизированного исследования в России. Тер. архив 2007; 8: 17-22.
14. Albitar M., Johnson M., Do KA et al. Levels of soluble HLA-I and beta2M in patients with acute myeloid leukemia and advanced myelodysplastic syndrome: association with clinical behavior and outcome of induction therapy. Leukemia 2007; 3:480-488.
15. Contini P., Zocchi M.R., Pierri I. et al. In vivo apoptosis of CD8(+) lymphocytes in acute myeloid leukemia patients: involvement of soluble HLA-I and Fas ligand. Leukemia 2007; 2: 253-260.
16. Zavazava N., Kronke M. Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes. Nature Med 1996; 2: 1005-1007.
17. Заславская М.И., Крыжанова М.А., Новиков В.В. (Матер. Четвертого Всеросс. конгр. по медицинской микологии, Москва) 2006; 7: 47-48.
18. Carbone E. et al. Natural killer clones recognize specific soluble HLA class I molecules // Eur. J. Immunol. 1996; 3:683-689.
19. Spaggiari G.M. et al. Soluble HLA class I induces NK cell apoptosis upon the engagement of killer-activating HLA class I receptors through FasL-Fas interaction. Blood 2002;100(12): 4098-4107.