

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *BCL-2* ДЛЯ ПРОГНОЗА И МОНИТОРИНГА ОСТРОЙ ФОРМЫ РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ-ПРОТИВ-ХОЗЯИНА» ПРИ АЛЛОГЕННЫХ ТСГК

Зарайский М.И.

Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад И.П. Павлова, Россия

Резюме. Целью работы явилось изучение экспрессии гена *bcl-2* у пациентов с аллогенной неродственной трансплантацией стволовых гемопоэтических клеток (аНТСГК) для оценки динамики острой формы реакции «трансплантат-против-хозяина» (ОРТПХ).

Объектом исследования служила тотальная РНК 19 пациентов с онкогематологическими заболеваниями, выделенная до аНТСГК (Д-Т), на день восстановления лейкоцитов после кондиционирования (Д-В) и на Д+30. Оценка экспрессии проводилась по оригинальному полуколичественному ОТ-ПЦР протоколу, предусматривающему сравнительный анализ электрофоретических сигналов при коампликации исследуемого и референц-гена (бета-актин). Было показано, что в точках Д-Т и Д-В уровень экспрессии гена *bcl-2* у пациентов, у которых ОРТПХ развилась в пост-НТСГК периоде, был примерно в 2 раза выше, чем в группе без ОРТПХ ($P=0,011$ и $P=0,012$, соответственно). Далее, в точках Д-В и Д+30 пациенты были разделены на две группы: I – пациенты, у которых на данных этапах определялись клинические проявления ОРТПХ, и II – пациенты, у которых к данному сроку ОРТПХ не развилась. В точке Д-В у пациентов I группы экспрессия гена *bcl-2* была значительно выше, чем в группе II ($P=0,05$). Напротив, в точке Д+30 у пациентов с ОРТПХ данный параметр был почти в два раза ниже по сравнению с пациентами группы II ($P=0,016$). Таким образом, мониторинг экспрессии гена *bcl-2* позволяет достоверно прогнозировать развитие ОРТПХ и корректировать стратегию иммуносупрессивной терапии, особенно на ранних этапах после аНТСГК.

Ключевые слова: трансплантация, ген *bcl-2*, острая РТПХ.

Zaraiski M.I.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF *BCL-2* GENE EXPRESSION FOR THE PROGNOSIS AND MONITORING OF ACUTE GRAFT-VERSUS-HOST-DISEASE (AGVHD) IN ALLO-HSCT

Abstract. Our general purpose was to investigate *bcl-2* gene expression in patients treated by allogeneic unrelated haematopoietic stem cells transplantation (aUHSCT) for the evaluation of aGVHD. Total RNA from the leukocytes of 19 oncohaematological patients was collected before starting the conditioning regimen (D-T), at the day of hematological recovery (D-R) and at the D+30. An original RT-PCR protocol was developed, by quantifying the signals from the target genes, as compared to beta-actin as a reference gene. We have shown that the levels of *bcl-2* expression in aGVHD patients were higher, as compared to aGVHD-free patients at D-T ($P=0,011$), like as D-R ($P=0,012$) time-points. The patients at the D-R and D+30 were divided into two groups, either with or without clinical signs of aGVHD at these observation terms (resp., groups I and II). At D-R point, *bcl-2* expression in the 1st group was two-fold higher, than in the patients of second group ($P=0,05$). By the contrary, *bcl-2* expression by the D+30 in group I was two-fold lower, as compared to the patients of second group ($P=0,016$). Thus, we suggest the monitoring of *bcl-2* expression to be of certain clinical significance. This criterion could be used as additional approach to prediction of aGVHD development and adjustment of immunosuppressive therapy. We also suppose that the role of the *bcl-2* in the pathogenesis of aGVHD should be analyzed in more details. (Med. Immunol., 2005, vol.7, № 4, pp 381-384)

Адрес для переписки:

Зарайский М.И.
197089, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д.6/8.
Тел.: 234-67-23, факс 234-06-16.
E-mail: mzaraiski@yandex.ru

Введение

Острая форма реакции «трансплантат-против-хозяина» (ОРТПХ) остается одним из тяжелых осложнений аллогенных трансплантаций стволовых гемопоэтических клеток (аТСКГ) [5]. Несмотря на использование различных препаратов и терапевтических схем профилактики и лечения частота встречаемости данного осложнения остается на очень высоком уровне [6]. Основной причиной, инициирующей развитие ОРТПХ, является различная степень несоответствия между системами тканевой совместимости у донора и реципиента [1]. Вследствие этого происходит специфическая активация клеток иммунной системы. Как известно, для реализации своих эффекторных функций эти клетки должны получить два основных сигнала – специфический стимул и сигнал, запускающий механизм апоптоза [4]. Продолжительность функционирования активированных клеток определяется эффективностью антиапоптотических систем. *bcl-2* является одним из основных представителей семейства белков, контролирующих процессы апоптоза в клетках иммунной системы. Совместно с проапоптотическим белком BAX он образует димерные каналы в различных клеточных мембранах (митохондриальных, ядерных и мембранах эндоплазматического ретикулума), препятствуя прохождению ионов кальция и Цитохрома С из митохондрий в ядро. Данные субстраты необходимы для активации и реализации внутриядерных механизмов апоптоза [2]. Таким образом, повышение экспрессии гена *bcl-2* отражает степень специфической стимуляции лимфоцитов и, следовательно, является ранним показателем специфической активации этих клеток на инициирующих этапах развития ОРТПХ. Изучение клинической значимости экспрессии гена *bcl-2* на ранних сроках после аТСКГ у онкогематологических больных для прогнозирования и оценки динамики ОРТПХ и явилось целью настоящей работы.

Материалы и методы

В исследование были включены 19 пациентов с онкогематологическими заболеваниями, получавшими в качестве основного лечения аллогенную неродственную трансплантацию стволовых гемопоэтических клеток (Рис. 1).

Стадирование клинических проявлений острой РТПХ от 0 до 4 проводилось по общепринятым критериям, предложенным Glucksberg Н. с соавторами в 1974 г. [3].

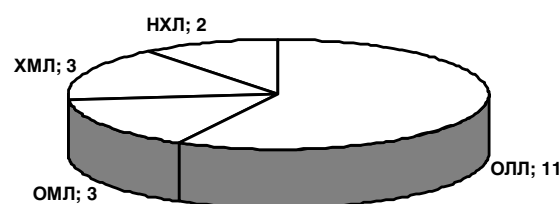


Рис. 1. Распределение пациентов по нозологическим группам (количество пациентов). Примечание: ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз, ОМЛ – острый миелобластный лейкоз, ХМЛ – хронический миелобластный лейкоз, НХЛ – неходжкинская лимфома.

Полуколичественное определение экспрессии гена *bcl-2* проводилось при помощи ОТ-ПЦР метода. Тотальная РНК выделялась из клеток крови с помощью сорбентно-колоночного метода с использованием набора QIAamp RNA Mini Kit (QIAGEN, Германия), согласно прилагаемой инструкции.

Приготовление кДНК проводилось с использованием набора 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Boehringer Mannheim, США), в модификации для рандомизированных праймеров, с использованием фермента обратной транскриптазы М-MLV RT (GibcoBRL, Шотландия). Реакция амплификации проводилась по стандартной четырехпраймерной схеме (Табл. 1) на амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, США). Одна пара праймеров амплифицировала участок гена *bcl-2* (151 п.н.), другая – участок гена бета-актина (241 п.н.). Последний использовался в качестве референс-гена для полуколичественной оценки экспрессии исследуемого гена. Все праймеры были подобраны с помощью компьютерной программы PrimerExpress 3.0 for Macintosh и синтезированы в НПФ «Литех», Москва. ПЦР-смесь в объеме 10 мкл содержала – 100 нГ кДНК, 0,4 мкМ каждого праймера, 200 мкМ каждого дНТФ и 0,4 Ед Taq-полимеразы. Амплификационный профиль был следующий: первичная денатурация 95°C – 2 мин, 35 циклов: 95°C – 50 сек, 55°C – 50 сек, 72°C – 1 мин, заключительная достройка – 72°C – 7 мин. После амплификации ПЦР-продукт подвергали электрофорезу в агарозном геле с последующей окраской в растворе бромистого этидия.

Затем полученные гели фотографировались и анализировались компьютерной программой GelPro 32, позволяющей проводить сравнительную оценку интенсивности электрофоретических сигналов. Сигнал от бета-актина оценивался в 100%, таким образом, расчетный процент интенсивности сигнала от гена *bcl-2* отражал степень его экспрессии и был оп-

Табл. 1. НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ПРАЙМЕРОВ

Специфичность праймера	Нуклеотидная последовательность	Размер ампликона (п.н.)
BCL-2 F	5-GTGGCCTTCTTTGAGTTCGGT-3	151
BCL-2 R	5-CACCTACCCAGCCTCCGTTA-3	
Бета-актин F	5-CAGCAGATGTGGATCAGCAAG-3	241
Бета-актин R	5-TGCTGTCACCTTCACCGTTC-3	

ределен нами как относительный уровень активации (ОУА) гена.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием «Т-теста» для непараметрических данных при помощи компьютерной программы Winstat 3.1. для Windows.

Результаты

На начальном этапе работы проводилась оценка клинической значимости экспрессии гена *bcl-2* для раннего прогнозирования развития острой формы РТПХ. Для этого все пациенты были разделены на две группы. В первую группу ($n=14$) были включены пациенты, у которых ОРТПХ независимо от стадии (1 – 4) и клинической формы развилась на различных сроках после ТСГК. Группу сравнения ($n=5$) составили больные, у которых в пост-ТСГК периоде не наблюдались клинические проявления ОРТПХ. В обеих группах исследование уровня экспрессии гена *bcl-2* проводили в трех временных точках: «Д-Т» – до начала режима кондиционирования, «Д-В» – на момент восстановления количества лейкоцитов в периферической крови более $0,5 \times 10^9/\text{л}$ после режима кондиционирования и «Д+30» – на 30-й день после ТСГК. Данные по усредненным относительным уровням активации (ОУА) исследуемого гена представлены на рис. 2.

Как видно из представленных графиков на всех этапах исследования уровень экспрессии гена *bcl-2* у пациентов, у которых ОРТПХ развилась в пост-ТСГК периоде, был повышен по сравнению с группой сравнения. Однако, только в двух точках «Д-Т» и «Д-В» это повышение было статистически значимым ($P=0,011$ и $P=0,012$, соответственно).

Кроме оценки прогностической роли уровня экспрессии гена *bcl-2* мы изучали участие данного гена в патогенезе острой формы РТПХ. Для этого было проведено определение уровней активации гена у пациентов в зависимости от ОРТПХ-статуса на момент исследования.

В точках «Д-В» и «Д+30» пациенты были разделены на две группы: I – пациенты, у которых на данных этапах определялись клинические проявления ОРТПХ, и II – пациенты, у которых к данному сроку острая форма РТПХ не развилась. Данные по уров-

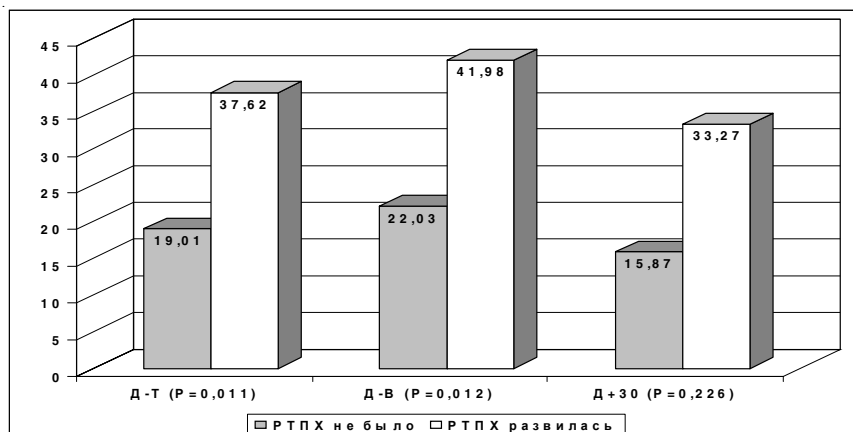


Рис. 2. Динамика уровня экспрессии гена *bcl-2* (ОУА) на разных сроках после ТСГК в зависимости от ОРТПХ-статуса

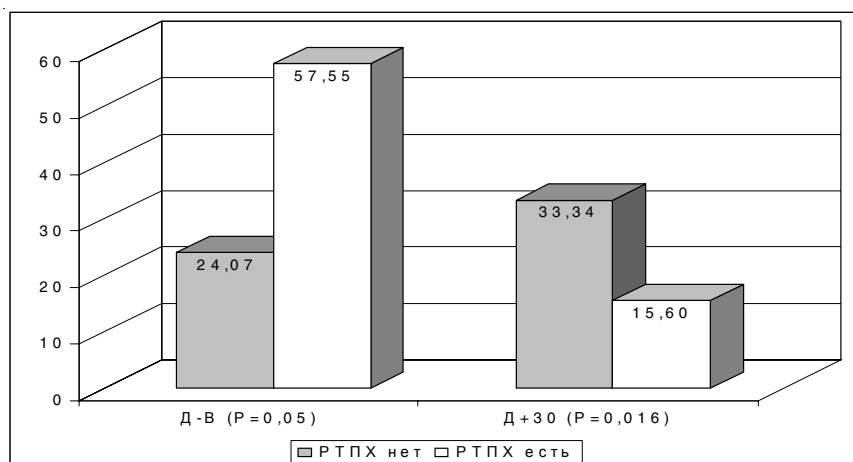


Рис. 3. Уровень экспрессии гена *bcl-2* (ОУА) у пациентов в зависимости от ОРТПХ-статуса на момент исследования

ням экспрессии гена BCL-2 в этих группах представлены на рис. 3.

Как видно, различия по уровню экспрессии исследуемого гена в обеих группах были статистически значимы, однако, отмечались следующие особенности. Так в точке «Д-В» у пациентов с ранними клиническими проявлениями ОРТПХ, наступившими до момента восстановления уровня лейкоцитов в периферической крови, ОУА гена *bcl-2* был значительно выше ($\text{ОУА} = 57,55$), чем в сравниваемой группе ($\text{ОУА} = 24,07$; $P=0,05$). С другой стороны, в точке «Д+30» у пациентов с ОРТПХ, развившейся к 30-у дню, данный параметр показал абсолютно противоположное соотношение, снизившись почти в два раза ($\text{ОУА} = 15,60$) по сравнению с пациентами без проявлений осложнения ($\text{ОУА} = 33,34$; $P=0,016$).

Обсуждение

Как известно, уровень экспрессии гена *bcl-2* отражает степень активации клеток иммунной системы чужеродным агентом. В случае ТСГК таким сти-

мулом являются клетки донора или наличие у пациентов инфекционных осложнений. Кроме того, немаловажным аспектом активации данного гена является включение его в патогенез лимфопролиферативных заболеваний.

В предварительных исследованиях (данные не представлены) мы изучили различия ОУА гена *bcl-2* в обследованной выборке в зависимости от наличия инфекции (вирусной или невирусной природы) у пациентов и их нозологического статуса. Полученные результаты не показали статистически значимых различий. Таким образом, было предположено, что все изменения в экспрессии гена должны в большей степени определяться иммунным конфликтом между клетками пациента и донора, каким является оРТПХ.

Механизм повышения исходного уровня экспрессии гена *bcl-2* у пациентов до начала кондиционирования рассматривался нами в контексте предыдущих курсов химиотерапии. Как известно, при проведении последней в организме пациента вследствие массивного разрушения опухолевой массы образуется большое количество измененных белков, которые распознаются иммунной системой как чужеродные. Это приводит к активации лимфоидных клеток и повышению продукции белка *bcl-2*. Таким образом, исследование ОУА данного гена до начала режима кондиционирования, особенно у пациентов, недавно получавших полихимиотерапию, позволят на раннем этапе выделить группу высокого риска развития оРТПХ.

Связь повышения экспрессии гена *bcl-2* у пациентов на момент восстановления уровня лейкоцитов в периферической крови с риском развития оРТПХ рассматривалась нами с двух точек зрения. С одной стороны, активация лимфоцитов донора происходит на фоне высокодозной терапии по вышеописанному механизму. С другой стороны, лимфоидные клетки, как донора, так и реципиента реагируют на неизбежное в аллогенной системе несоответствие систем тканевой совместимости. Отсрочка клинических проявлений, в основном, определяется эффективностью иммуносупрессивной терапии.

Изучение патогенетической роли активации гена *bcl-2* в развитии оРТПХ показало следующее. Значимое повышение экспрессии данного гена после ТСГК, отмечавшееся у пациентов, у которых оРТПХ независимо от клинической формы развивалась на ранних сроках (до Д+30), отражало процессы специфической стимуляции лимфоидных клеток на фоне иммунологического конфликта. Напротив, развитие оРТПХ на 30-й – 35-й день от ТСГК, характеризовалось статистически достоверным снижением уровня экспрессии *bcl-2* по срав-

нению с пациентами без клинических проявлений данного осложнения. Мы полагаем, что данный феномен может быть обусловлен не супрессорными механизмами, а процессом перераспределения активированных клеток в организме. Патологический фокус РТПХ находится в тканях (кожа, печень, кишечник и др.) и формируется под воздействием селективного «хоминга» специфически активированных лимфоцитов, количество которых в периферической крови падает.

Таким образом, изучение динамики уровня экспрессии гена *bcl-2* у пациентов независимо от нозологии позволяет не только достоверно прогнозировать развитие острой РТПХ, но и корректировать стратегию иммуносупрессивной терапии, особенно на ранних этапах после ТСГК.

Список литературы

1. Couriel D, Caldera H, Champlin R, Komanduri K. Acute graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management // *Cancer*.- 2004.- Nov 1; 101(9).- P.1936-1946.
2. Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI, Maurillo L, Buccisano F, Tamburini A, Cox MC, Franchi A, Bruno A, Mazzone C, Panetta P, Suppo G, Masi M, Amadori S. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML) // *Blood*.- 2003.- Mar 15; 101(6).- P.2125-2131.
3. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors // *Transplantation*.- 1974.- Oct; 18(4).- P.295-304.
4. Janeway C., Travers P. Immunobiology // Second edition/- 1996/- PP-8:11-8:13.
5. Jinqi Liu, Josef G. Heuer, Songqing Na, Elizabeth Galbreath, Tonghai Zhang, Derek D. Yang, Andrew Glasebrook, Ho Yeong Song. Accelerated onset and increased severity of acute graft-versus-host disease following adoptive transfer of DR6-deficient T cells // *J. Immunol*.- 2002.- Oct 1; 169(7).- P.3993-3998.
6. Ogawa N, Kanda Y, Matsubara M, Asano Y, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto M, Kandabashi K, Izutsu K, Imai Y, Hangaishi A, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Hirai H. Increased incidence of acute graft-versus-host disease with the continuous infusion of cyclosporine A compared to twice-daily infusion // *Bone Marrow Transplant*.- 2004.- Mar;33(5).-P.549-52.

поступила в редакцию 08.02.2005

принята к печати 05.03.2005