

ГОСТЮЖОВА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**РАСТВОРИМЫЕ ФОРМЫ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ
КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ
НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ АЛЬТЕРАЦИИ ГОМЕОСТАЗА**

03.00.04 – биохимия

03.00.13 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Нижний Новгород

2009

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Добротина Наталия Аркадьевна
доктор биологических наук, профессор Новиков Виктор Владимирович

Официальные оппоненты

доктор биологических наук, профессор Контрощикова Клавдия Николаевна
доктор медицинских наук, профессор Курников Георгий Юрьевич

Ведущая организация

Государственное учреждение Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН

Защита состоится 24 декабря 2009 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского (603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Автореферат разослан 15 ноября 2009 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук, доцент _____ С.В. Копылова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Физиологические основы сохранения гомеостаза организма, в том числе и защита от неопластических процессов, базируются на эффективной и многосторонней работе молекулярных и клеточных механизмов иммунных реакций. В то же время, анализ данных по биологическим основам развития неоплазий свидетельствует: опухоль возникает в результате многоступенчатого процесса накопления генетических изменений.

В настоящее время растворимые формы мембранных белков клеток иммунной системы рассматриваются в качестве участников глобальной иммунологической сети, тесным образом связанной со всеми физиологическими системами организма. Каждая из растворимых дифференцировочных молекул или растворимых молекул гистосовместимости может быть представлена несколькими изоформами, образующимися за счет шеддинга с мембраны клетки или альтернативного сплайсинга матричной РНК. Они осуществляют множественные функции, модулируя иммунные реакции путем связывания с лигандами своих мембранных гомологов на поверхности клеток, и являются межклеточными белковыми коммутаторами (В.В. Новиков и др., 2007; D. Mason et al., 2001).

Известно, что растворимые формы мембранных протеинов при онкологических заболеваниях участвуют в формировании механизмов ухода опухоли от иммунного надзора. Обнаружено изменение их сывороточного содержания при многих онкозаболеваниях, в том числе при раке молочной железы, раке тела матки, раке легкого и меланоме. Таким образом, растворимые формы мембранных белков, появляющиеся в биологических жидкостях, могут вызывать множественные эффекты, отражающие патогенетические механизмы, с одной стороны, и вносящие свой вклад в нарушение гомеостаза при различных неоплазиях, с другой стороны (В.В. Новиков и др., 2008). Особый интерес представляет исследование состояния пула растворимых форм мембранных белков при нарушениях в системе гемопоза.

Основным молекулярным событием, ведущим к формированию лейкоэмического клона при опухолевых заболеваниях кроветворной системы, является нарушение функционирования нормальных генов в результате мутаций отдельных генов или хромосомных aberrаций, зачастую с вовлечением протоонкогенов (Т.Ф. Westbrook, 2005; J. L. Timothy et al., 2008). Для миелоидных опухолей наиболее характерными являются реципрокные транслокации, при которых происходит обмен генетическим материалом между различными хромосомами с образованием патологических хромосомных структур, самой известной из которых является "филадельфийская хромосома"

(Ph-хромосома), или t(9;22), ведущая к образованию химерного гена BCR-ABL. Продукт этого гена (тирозинкиназа) ведет к фосфорилированию множества протеинов, участвующих в процессе сигнальной трансдукции – передаче сигнала с рецепторов клеточной мембраны ядерному генетическому материалу. Активация различных сигнальных путей ведет к независимой от ростовых факторов пролиферации, нарушению адгезии клеток к стромальному окружению и устойчивости к апоптозу. Ph-хромосома обнаруживается при острых лимфобластных и миелоидных лейкозах с определенной частотой, но является перестройкой, специфичной для хронического миелолейкоза (ХМЛ) – в дебюте заболевания присутствует практически во всех метафазах у 95-98% больных.

Современная терапия ингибитором BCR-ABL тирозинкиназы (иматиниба мезилат, гливек) позволяет добиться значительного подавления опухолевого клона и восстановления нормального кроветворения, что приводит к увеличению выживаемости больных (Н. Kantarjian et al., 2005; Т.Р. Huges et al., 2003). Однако часть пациентов остаются резистентными к лечению гливекком в качестве монотерапии. Насущным вопросом становится поиск путей прогнозирования устойчивости к ингибиторам тирозинкиназ на молекулярном и клеточном уровне.

Цель работы

Изучение сывороточного содержания растворимых форм мембранных белков клеток крови человека в норме и при альтерации гомеостаза неопластического генеза с изменением кариотипа опухолевых клеток.

Задачи

1. Исследовать особенности кариотипа гемопоэтических клеток больных хроническим миелолейкозом до терапии и на фоне терапии ингибитором тирозинкиназы.

2. Провести анализ уровня суммарной и олигомерной фракций растворимого CD95 (Fas) протеина в сыворотке крови и спектра альтернативных форм матричной РНК Fas белка при хроническом миелолейкозе.

3. Оценить уровень растворимых форм активационных молекул CD25 и CD38 в сыворотке крови в дебюте хронического миелолейкоза и при различном цитогенетическом ответе на проводимую терапию.

4. Изучить содержание в сыворотке крови растворимых белков адгезии CD50, CD54, CD18 и растворимых комплексов CD18-CD54, CD18-CD50 у пациентов с хроническим миелолейкозом.

5. Проанализировать сывороточное содержание растворимых форм молекул главного комплекса гистосовместимости (HLA-I, HLA-DR), CD8 протеина и растворимого комплекса HLA-I-CD8 при хроническом миелолейкозе.

6. Провести сравнительный анализ содержания исследуемых молекул при хроническом миелолейкозе и некоторых других неоплазиях кроветворной системы с поражением миелоидного и лимфоидного ростков кроветворения.

Научная новизна

На основе данных о содержании растворимых форм мембранных белков гемопоэтических клеток и результатов кариологического исследования при хроническом миелолейкозе впервые установлена взаимосвязь между уровнем цитогенетического ответа в процессе терапии ингибитором тирозинкиназы и структурно-функциональным состоянием пула растворимых форм мембранных белков клеток иммунной системы.

Впервые показано, что в дебюте хронического миелолейкоза и в случае минимального цитогенетического ответа и/или его отсутствия наблюдается наиболее высокое содержание исследуемых растворимых молекул: суммарной и олигомерной фракций sCD95, сывороточного содержания растворимых форм CD25 и CD38 протеинов, белка адгезии CD54, а также растворимых молекул HLA I класса.

Впервые обнаружено, что полный цитогенетический ответ на фоне терапии гливекком характеризуется нормализацией сывороточного содержания олигомерного белка CD38, суммарной фракции белка CD95, растворимых молекул HLA I класса, растворимого комплекса CD18-CD54, повышением уровня растворимого CD18, при этом содержание суммарной фракции растворимого белка CD54 также сохраняется повышенным.

Впервые продемонстрированы особенности спектра альтернативных форм матричной РНК Fas белка при хроническом миелолейкозе: в дебюте заболевания спектр форм мРНК отличался вариабельностью (от полного спектра до отсутствия альтернативных форм), при полном цитогенетическом ответе спектр форм мРНК Fas белка совпадал с донорским, в то время как при частичном ответе и отсутствии ответа отмечены изменения в спектре мРНК минорных альтернативных форм, а именно, в 50% образцов крови у больных выявлялась единственная минорная форма (FasExo3,4Del или FasExo3,4,6Del).

Впервые показано, что острый лимфобластный лейкоз сопровождается повышением сывороточного содержания не только суммарных, но и олигомерных фракций растворимых белков CD95 и CD38, а также суммарной фракции CD50 протеина. При остром миелолейкозе впервые обнаружено повышение сывороточного уровня растворимого CD38 олигомера и растворимых ассоциатов HLA-I-CD8.

Научно-практическая значимость работы

Сведения о содержании растворимых форм мембранных белков гемопоэтических клеток могут быть использованы в изучении механизмов иммуносупрессии при неопластической альтерации гомеостаза с поражением

системы кроветворения и природы резистентности опухолевых клеток к ингибиторам тирозинкиназ.

Полученные данные о повышении уровня суммарной фракции sCD95, растворимых активационных молекул CD25 и CD38, CD54 протеина адгезии, а также молекул HLA I класса в сыворотке крови лиц с хроническим миелолейкозом в дебюте заболевания и при отсутствии ответа на терапию гливеком имеют прогностическую значимость и могут быть использованы для разработки новых подходов к оценке эффективности таргетной терапии хронического миелолейкоза ингибиторами тирозинкиназ.

Положения, выносимые на защиту

1. В дебюте хронического миелолейкоза наблюдается повышение сывороточного содержания суммарной фракции sCD95 и sCD38, белка адгезии CD54, а также растворимых молекул HLA I класса.

2. В случае большого цитогенетического ответа на фоне терапии гливеком отмечается возрастание уровня растворимой формы CD18 белка, при частичной цитогенетической ремиссии имеет место повышение олигомерной фракции sCD95 протеина.

3. Минимальный цитогенетический ответ или его отсутствие ассоциируется при лечении гливеком с наибольшим повышением содержания исследованных растворимых форм мембранных белков: суммарной и олигомерной фракций sCD95, растворимых молекул CD25 и CD38, CD54 протеина адгезии, а также молекул sHLA-I; при этом отмечается снижение сывороточного уровня sCD18.

4. За исключением растворимого комплекса HLA-I-CD8, острый лимфобластный лейкоз характеризуется более высоким сывороточным содержанием тестированных растворимых белков в сравнении с хроническим миелолейкозом и другими миелопролиферативными заболеваниями.

Апробация работы

Результаты работы представлены на Российской научно-практической конференции "Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии" (Санкт-Петербург, 2007), Всероссийской научно-практической конференции "Высокотехнологичные методы диагностики и лечения заболеваний сердца, крови и эндокринных органов" (Санкт-Петербург, 2008), Всероссийской научной конференция с международным участием «Нанотехнологии в диагностике опухолей» (Москва, 2009), 3-ей международной научной конференции "Актуальные проблемы спортивной морфологии и генетики человека" (Москва, 2009).

Апробация диссертации состоялась на расширенном заседании кафедры молекулярной биологии и иммунологии ННГУ им. Н.И. Лобачевского 25 июня 2009 года.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 работы в ведущих отечественных журналах, рекомендованных ВАК, и 6 статей и тезисов докладов региональных и всероссийских конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа в объеме 150 листов состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Библиографический указатель включает 245 источников литературы (38 отечественных и 207 иностранных). Диссертация иллюстрирована 14 таблицами и 18 рисунками.

За коллегиальную помощь и содействие в выполнении работы автор выражает искреннюю благодарность н.с. лаборатории молекулярной иммунологии ННИИЭМ Н.Б. Пресняковой, зав. гематологическим отделением ГУЗ НОКБ им. Н.А. Семашко О.С. Самойловой, доц. каф. госпитальной терапии НижГМА, к.м.н. С.А. Волковой, с.н.с. НИИ МБРЭ ННГУ, к.б.н. А.А. Бабаеву, рук. лаб. НИИ МБРЭ ННГУ к.б.н. Д.В.Новикову, с.н.с. ННИИЭМ, к.б.н. О.В. Уткину, зав. гематологическим отделением МУЗ БСМП г. Дзержинска И.Н. Самариной, зав. клинико-диагностической лабораторией ГУЗ НОКБ им. Н.А.Семашко М.Ю.Серопян.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Материалом для цитогенетического исследования служили 192 образца костного мозга пациентов с диагнозом ХМЛ, проходивших лечение и/или диспансерное наблюдение на базе гематологического отделения Нижегородской областной клинической больницы им. Н.А. Семашко (заведующая О.С. Самойлова). При этом 37 образцов получено в дебюте заболевания и 155 проб исследовано на фоне лечения препаратом гливек на период 6, 12, 18 и более месяцев терапии. Костный мозг получали путем стерильной пункции. Продолжительность лечения гливеком на момент исследования составила от 6 до 86 месяцев, медиана длительности – 24 месяца.

В работе также использовали 22 образца костного мозга и сыворотки крови пациентов с диагнозом миелодиспластический синдром (МДС), 40 образцов от лиц с Rh-негативными миелопролиферативными заболеваниями (МПЗ), 19 образцов от больных с диагнозом острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и 7 образцов от лиц с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ).

Препараты хромосом получали после суточного культивирования клеток костного мозга с добавлением колхицина согласно общепринятой методике (И.С. Мартынкевич и др., 2007). Дифференциальное окрашивание проводили

по методу GTG (дифференциальная G-окраска). Препараты анализировали с учетом рекомендаций Международной классификации хромосом (ISCN, 2005). Цитогенетический ответ оценивали по содержанию Ph-положительных клеток в пунктате костного мозга согласно действующим критериям (H. Kantarjian et al., 2003). При этом выделяли:

1. Полный ЦО (ПЦО) – 0% Ph-положительных клеток
2. Частичный ЦО (ЧЦО) – 1-35% Ph-положительных клеток
3. Минимальный ЦО (МЦО) – 36-95% Ph-положительных клеток
4. Отсутствие ЦО – больше 95% Ph-положительных клеток.

Полный и частичный ЦО ответ объединены под названием большой ЦО (БЦО).

Для исследования содержания растворимых форм мембранных белков гемопоэтических клеток использовали 148 образцов сыворотки крови лиц с диагнозом ХМЛ. Оценивался сывороточный уровень CD95 (Fas) протеина и его олигомерной формы, растворимых форм белков CD25 и CD38, олигомерной формы белка CD38, растворимых форм мембранных белков адгезии CD18, CD50, CD54 и растворимых комплексов CD18-CD54, CD18-CD50, а также сывороточное содержание растворимых форм молекул главного комплекса гистосовместимости I и II класса (HLA-I, HLA-DR), CD8 протеина и растворимого комплекса (HLA-I-CD8). В качестве контроля использовали образцы сыворотки крови 40 здоровых волонтеров.

Определение уровня растворимых форм мембранных белков гемопоэтических клеток проводили двухсайтовым иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител серии ИКО и поликлональных антител, специфичных к мембранным протеинам мононуклеарных клеток крови человека. Результаты выражали в условных единицах (U/ml).

Для исследования спектра альтернативных форм матричной РНК Fas (CD95) протеина материалом служили образцы мононуклеарных клеток крови 13 пациентов с диагнозом ХМЛ (в дебюте заболевания 2 человека, терапия гливеком у 11 человек) и 74 здоровых доноров. Оценку спектра экспрессии альтернативных форм мРНК Fas белка проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Метод основан на использовании в полимеразной цепной реакции праймеров, комплементарных местам соединения экзонов при сплайсинге Fas мРНК (табл. 1).

Выделение РНК осуществляли методом фенол-хлороформенной депротеинизации. Реакцию обратной транскрипции проводили в объеме 5 мкл. В пробирку объемом 0,5 мл вносили 4,5 мкл РНК, 0,5 мкл обратного олигонуклеотидного праймера GR-20 и покрывали минеральным маслом. Полученную смесь денатурировали при 94°C в течение одной минуты и

охлаждали при комнатной температуре. К РНК под масло вносили 5 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл пятикратного (5x) M-MuLV буфера для обратной транскрипции, 0,5 мкл дезоксинуклеотидтрифосфата (дНТФ), 0,2 мкл M-MuLV обратной транскриптазы и 2,3 мкл воды, после чего смесь выдерживали при 42°C в течение 30 минут для синтеза комплементарной ДНК (кДНК), а затем при 94°C – 5 минут для инактивации фермента.

Таблица 1

Использованные в работе праймеры и зонды

Праймеры и зонды	Нуклеотидная последовательность (5'-3')
0F	CGGAGGATTGCTCAACAACC (20 н.о.)
GR-20	GGATTTAAGGTTGGAGATT (19 н.о.)
1F	ATCCTGGGCATCTGGACCCT (20 н.о.)
Fas A	TTCCTTTCTCTTCACCCAA (19 н.о.)
Fas B	TTCCTTTCTCTTCACTTCC (19 н.о.)
FasTMDel	Fam-AgTgCAAAGAgAggAAgTgAAgAgAAAggAA-3-BHQ1
mFas	Rox-AgATCTAACTTgggggTggCTTTgTCTTCTT-BHQ2

Реакционная смесь для проведения ОТ-ПЦР содержала 5 мкл 5X ПЦР буфера (10 mM Трис-НСI (pH 8,8), 50 mM КСI, 1,5 mM MgCl₂), 2 мкл дНТФ, 0,5 мкл Таq-полимеразы («Силекс», Москва), 14,5 мкл бидистиллированной Н₂О, по 0,5 мкл прямого и обратного олигонуклеотидного праймера. В пробирку объемом 0,5 мкл добавляли 23 мкл реакционной смеси и 2 мкл исследуемой кДНК. Полученную смесь покрывали минеральным маслом, и инкубировали в амплификаторе «Терцик» фирмы «ДНК-технология». Первый раунд проводили по программе: 35 циклов (94°C – 30", 55°C – 30", 72°C – 40"). После окончания первого раунда 2 мкл продукта реакции переносили в реакционную смесь для второго раунда амплификации в качестве матрицы, чтобы детектировать растворимые и мембранную формы мРНК Fas белка. Второй раунд проводили по программе: 30 циклов (94°C – 30", 55°C – 30", 72° – 30").

Продукты реакции анализировали в 1,5 и 2 % агарозном геле.

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel, Statistica 6.0 и BIostat. Нормальность распределения данных проверяли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Дальнейший анализ проводили с использованием критериев Манна–Уитни, Стьюдента с поправкой

Бонферрони и критерия ранговой корреляции Спирмена. При статистической обработке данных цитогенетических исследований различия проверялись по точному критерию Фишера.

Результаты и их обсуждение

Исследование особенностей кариотипа опухолевых клеток стало первым этапом работы. Клетки костного мозга при хроническом миелолейкозе характеризуются повышенным уровнем мутаций, чему способствует нарушение контроля со стороны стромального микроокружения (M.Y. Gordon, J.M. Goldman, 1996). При кариологическом анализе до начала лечения стандартная транслокация **t(9;22)(q34;q11)** выявлена в 89% случаев хронического миелолейкоза. Вариантная транслокация (с вовлечением каких-либо других хромосом) отмечена в 1 случае: кариотип **46,XX,del(17)(q12),add(19)(p13),der(22)t(9;22)(q34;q11)[15]** – имеет место делеция длинного плеча хромосомы 17 в сегменте q12, дополнительный материал неизвестного происхождения на коротком плече хромосомы 19 в регионе p13. При этом обе 9 хромосомы выглядят неизменными. Согласно имеющимся сведениям, наличие вариантных транслокаций не влияет на достижение большого или полного цитогенетического ответа при дальнейшей терапии препаратами, ингибирующими тирозинкиназу (И.С. Мартынкевич и др., 2007). Полученные нами данные это подтверждают: большой цитогенетический ответ был зафиксирован спустя 12 месяцев терапии гливекком.

Дополнительные хромосомные аномалии, обнаруживаемые при ХМЛ, могут усиливать генетическую нестабильность популяции стволовых клеток и способствовать селекции наиболее резистентных клонов. До начала терапии гливекком атипичные хромосомные aberrации были выявлены у 3 пациентов (8,3%): трисомия по хромосоме 8, добавочная Ph-хромосома, комплексные аномалии кариотипа – **46,XX,-4,t(9;22),+mar[5]/45,XX,?del(8)(q22),t(9;22),-9,+mar[4]**. Двойная Ph-хромосома является неблагоприятным прогностическим признаком в отношении достижения ответа на терапию и выживаемости, поскольку сопровождается спонтанной амплификацией гена BCR-ABL, обуславливающего формирование и дальнейшее прогрессирование заболевания. Трисомия хромосомы 8 – наиболее часто встречающаяся дополнительная генетическая аномалия при ХМЛ. Данная мутация может быть ассоциирована с гиперэкспрессией онкогена MYC, локализующегося на длинном плече хромосомы 8. Его продукты – цитоплазматические протеины – участвуют в каскаде реакций, запускаемых ABL-тирозинкиназой, что способствует клеточной пролиферации, независимой от регулирующего влияния ростовых факторов (Ю.В. Ольшанская, Е.В. Домрачева, 2006). По нашим данным, ни в одном случае обнаружения на этапе диагностики

дополнительных хромосомных аномалий достичь в дальнейшем полного или большого цитогенетического ответа не удалось, хотя гематологическая ремиссия сохранялась.

В одном случае в дебюте заболевания число Ph-позитивных клеток составило 20%. Несколько подобных наблюдений описано в литературе (Н.Д. Хорошко. и др., 1998). Особенностью при этом является высокая эозинофилия в крови. Повторное цитогенетическое исследование проведено спустя 12 месяцев, Ph-хромосома выявлена в 100% клеток.

Восстановление Ph-негативного кроветворения как фактора длительной выживаемости является важнейшей задачей при терапии ХМЛ, так как величина Ph-позитивного клона есть прямой и объективный показатель наличия и количества опухолевых клеток в организме (А.Г. Туркина и др., 2005). В исследуемой группе больных за все время наблюдения достижение большого цитогенетического ответа при лечении гливекком отмечено у 60% пациентов (табл. 2). При этом не выявлено достоверных различий в частоте достижения большого цитогенетического ответа в группе пациентов, получающих гливек в качестве первой линии терапии, по сравнению с теми, кто имел предлеченность в течение 6 месяцев и более.

Таблица 2

Полный и большой цитогенетический ответ при хроническом миелолейкозе на фоне терапии гливекком в зависимости от наличия предлеченности

Группы обследованных	Полный ЦО, %	Большой ЦО, %
Гливек, I линия (n=49)	36	64
Гливек, II линия (n=65)	45	58
Гливек (усреднен.)	43	60

Мы проанализировали уровень цитогенетического ответа в зависимости от длительности терапии гливекком, поскольку время достижения большого или частичного ЦО является критерием оптимального, субоптимального или отсутствия ответа на терапию гливекком (European LeukemiaNet, 2006). С увеличением длительности проводимого лечения частота достижения полного или большого ЦО растет с 27% спустя 6 месяцев до 57% спустя 3 года и более (рис. 1).

Дополнительные хромосомные аномалии на фоне терапии гливекком выявлены у 14 пациентов, что составило 17% от общего числа больных в данной группе. При этом в 57% случаев хромосомные нарушения были обнаружены в Ph-положительных клетках, и в 43% – в Ph-отрицательных.

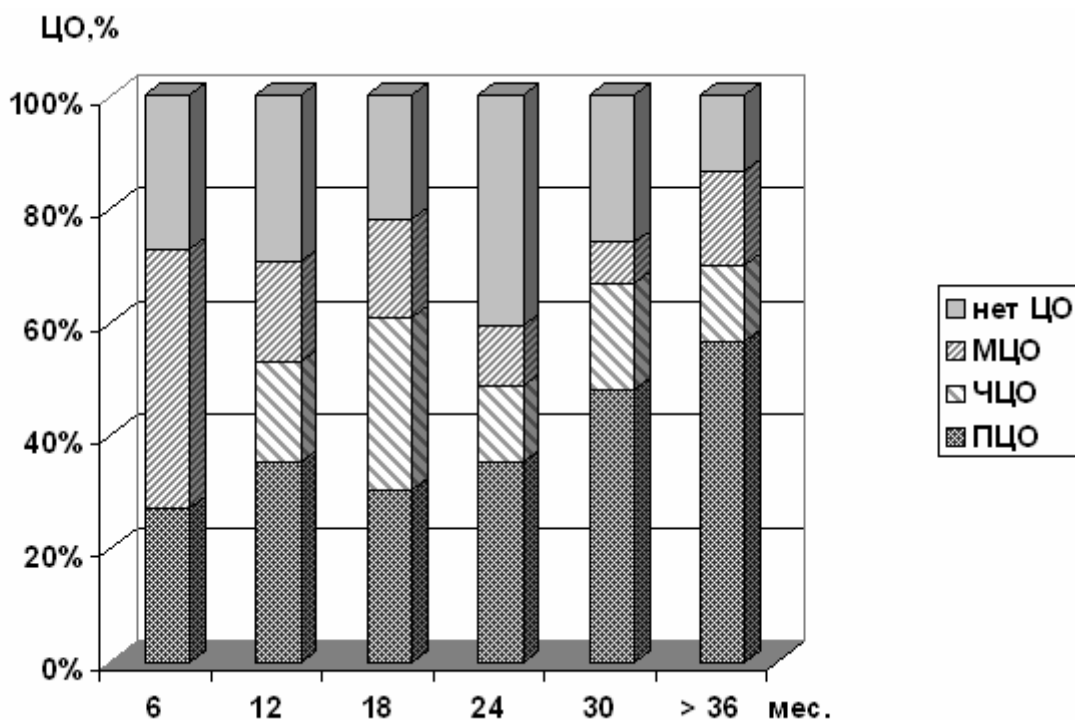


Рис. 1. Цитогенетический ответ у пациентов с хроническим миелолейкозом в зависимости от длительности терапии гливеком

Среди больных с дополнительными хромосомными аномалиями в 23% случаев наблюдалась резистентность к гливеку. У 2 из 14 пациентов отмечалась прогрессия заболевания в фазу акселерации и бластного криза. Малый или минимальный ЦО обнаружен у 4 больных, частичный ЦО был достигнут в 5 случаях (38%). Полный ЦО удалось получить лишь 2 пациентам.

Наиболее часто из дополнительных хромосомных aberrаций встречалась трисомия по хромосоме 8 – 6 случаев (43%), добавочная Ph-хромосома – 3 случая (23%). Отсутствие Y-хромосомы отмечено у 1 пациента. Комплексные аномалии кариотипа (числовые и структурные) выявлены в 3 случаях (23%). Полный ЦО удавалось получить лишь при трисомии по хромосоме 8. При наличии нескольких хромосомных aberrаций большого ЦО не было достигнуто ни в одном случае. Таким образом, при лечении ингибиторами тирозинкиназ наличие клонов с дополнительными хромосомными аномалиями может быть ассоциировано с клиническими особенностями течения хронического миелолейкоза.

На втором этапе работы у первичных больных ХМЛ и пациентов с разным цитогенетическим ответом на терапию ингибитором тирозинкиназы BCR-ABL (гливеком) исследовано сывороточное содержание растворимых форм ряда мембранных белков клеток иммунной системы.

Мембранная форма CD95 (Fas) протеина является одним из клеточных рецепторов, инициирующих апоптоз. В сыворотке крови этот белок может

находиться как в мономерной, так и в олигомерной (тримерной) форме, причем обладает множественным воздействием на инициацию Fas-опосредованного апоптоза, зависимым от его структурного состояния (Proussakova O.V. et al., 2003). Сывороточное содержание суммарной фракции растворимого CD95 протеина у первичных больных ХМЛ превышало нормальные значения в 1,6 раза ($p < 0,05$) (табл. 3). При большом цитогенетическом ответе на фоне терапии гливекком достоверных изменений в содержании суммарного sCD95 не наблюдалось. Однако при минимальном ЦО и отсутствии ЦО уровень данного белка в сыворотке крови возрастал соответственно в 1,7 и 1,9 раза выше нормы ($p < 0,05$).

Нами исследовано изменение сывороточного уровня олигомерной фракции растворимого CD95 протеина. Если у первичных больных ХМЛ наблюдалась лишь тенденция к его повышению, то у больных с полным и минимальным ЦО он находился в пределах значений, характерных для здоровых волонтеров. При частичном ЦО сывороточный уровень sCD95 возрастал в 1,6 раза, при отсутствии ЦО в 1,2 раза по сравнению с нормой ($p < 0,05$).

Таким образом, при недостаточно успешном лечении гливекком повышение уровня растворимого суммарного CD95 протеина более показательно, нежели олигомера, и может иметь прогностическую значимость.

Таблица 3

Уровень суммарной и олигомерной формы растворимого CD95 протеина при хроническом миелолейкозе в зависимости от цитогенетического ответа, U/ml ($M \pm m$)

Белок	Норма	Первич. пациенты, n=37	Полный ЦО, n=44	Частичный ЦО, n=19	Миним. ЦО, n=19	Отсутствие ЦО, n=19
CD95 суммарный	374±23	586±135*	490±80	450±128	632±161*	723±144*
CD95 олигомер	250±6	403±184	288±19	394±73*	238±13	310±29*

* – статистически значимые отличия по сравнению с нормой ($p < 0,05$)

Мы провели анализ уровня суммарной фракции растворимого CD95 протеина у пациентов с опухолями кроветворной системы различной биологической природы (табл. 4).

Таблица 4

Сывороточное содержание растворимых форм мембранных белков при опухолях кроветворной системы различного происхождения, U/ml (M±m)

Белок	Норма	ХМЛ, n=37	МПЗ, n=40	МДС, n=22	ОМЛ, n=19	ОЛЛ, n=7
CD95 сумм.	374±23	586±135*	640±113*	587±146*	311±60	1918±861 * **
CD95 олиг.	250±6	403±184	236±13	306±43	329±72	343±38*
CD25	407±27	539±97	470±31	384±23	654±173	1275±427 * **
CD38 олиг.	257±14	435±135*	313±42	317±72	531±152*	1673±905 *
CD38 сумм.	200±17	231±18	230±23	196±9	233±22	411±131 * **
CD54 сумм.	65±10	145±25*	162±27*	217±41*	88±17**	211±66*
CD50	353±65	292±47	287±36	219±34	450±110	674±151 * **
HLA-I	1012±36	2193±424*	1918±245*	1391±297 *	1722±229 *	4010±165 * **
HLA- DR	99±11	151±45	110±14	119±16	144±36	367±129* **
CD8	378±17	419±51	370±26	377±26	512±123	669±148 * **
HLA-I -CD8	513±22	560±63	671±87	788±113	752±131*	497±90

* – статистически значимые отличия по сравнению с нормой (p<0,05)

** – статистически значимые отличия по сравнению с группой пациентов с первичным ХМЛ (p<0,05)

Установлено, что при миелопролиферативных заболеваниях и миелодиспластическом синдроме происходит повышение содержания этого белка в сыворотке в 1,7 и 1,6 раза, соответственно, до значений, сопоставимых с наблюдаемыми в дебюте ХМЛ (p<0,05).

При остром миелоидном лейкозе уровень суммарного sCD95 находился в пределах нормы, а при остром лимфобластном было отмечено многократное

его повышение (в 5,1 раза) ($p < 0,001$). Содержание олигомерной формы растворимого CD95 имело тенденцию к повышению при ОМЛ и лишь при ОЛЛ статистически достоверно возросло в 1,4 раза. Следовательно, можно предположить, что нарастание сывороточного уровня суммарной фракции sCD95 в сыворотке при неоплазиях системы гемопоэза происходит преимущественно за счет мономерной формы данного протеина.

Молекулярные механизмы, которые управляют альтернативным сплайсингом ключевых регуляторов апоптоза, в настоящее время мало изучены. В связи с этим проведено исследование особенностей спектра альтернативных форм матричной РНК CD95 (Fas) белка в крови пациентов с хроническим миелолейкозом в дебюте заболевания и на фоне терапии гливеком (рис. 2).

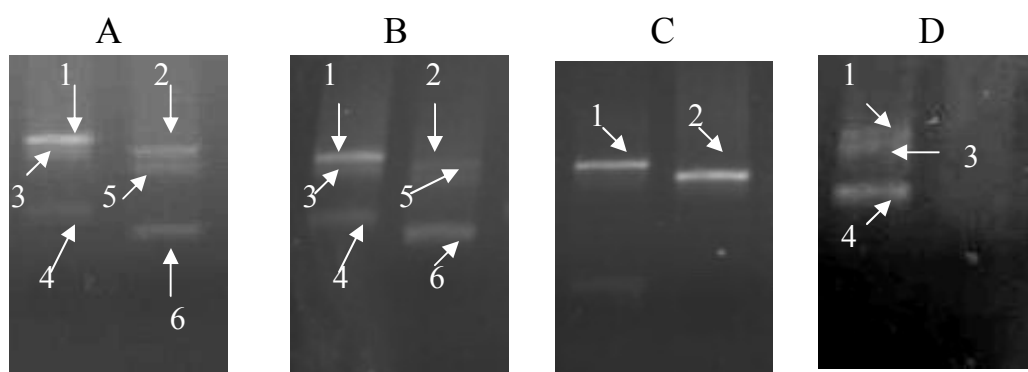


Рис. 2. Электрофореграммы альтернативных форм мРНК белка CD95 в мононуклеарных клетках крови при хроническом миелолейкозе

А – в дебюте заболевания; В – при полном цитогенетическом ответе; С – при отсутствии цитогенетического ответа; D – при клональной эволюции на фоне терапии гливеком; 1 – mFas, 2 – FasTMDel; 3 – FasExo4Del; 4 – FasExo3,4Del; 5 – FasExo4,6Del; 6 – FasExo3,4,6Del

В мононуклеарных клетках здоровых доноров присутствует мРНК, кодирующая мембранную (mFas), доминирующую растворимую (FasExoTMDel) и 4 минорных растворимых формы CD95 протеина. В дебюте заболевания спектр форм мРНК отличался гетерогенностью: от полного спектра до отсутствия альтернативных форм. У всех пациентов, получающих гливек, обнаружены мРНК mFas, FasExoTMDel и FasExo3,4Del.

Выявлены особенности спектра в зависимости от эффективности терапии: при полном цитогенетическом ответе спектр форм мРНК Fas белка совпадал с донорским, в то время как при частичном ответе и отсутствии ответа отмечены изменения в спектре мРНК минорных альтернативных форм, а именно, в 50% образцов крови у больных обнаруживалась единственная минорная форма (FasExo3,4Del или FasExo3,4,6Del). В случае клональной эволюции на фоне

терапии гливеком обнаружено отсутствие доминирующей формы FasTMDel, а также FasExo4,6Del и FasExo3,4,6Del. Выявленные особенности в спектрах мРНК Fas протеина открывают перспективы для их использования в мониторинговых целях.

При исследовании среднего уровня растворимого рецептора интерлейкина-2 (CD25 протеина) в сыворотке пациентов с ХМЛ было обнаружено его возрастание по сравнению с нормой в 1,6 и 1,4 раза соответственно при отсутствии или минимальном ЦО ($p < 0,05$). (табл. 5).

Известно, что растворимый CD25 протеин является фактором супрессии, поскольку связывает в межклеточном пространстве интерлейкин-2, продуцируемый клетками (В.В. Новиков и др., 2008). В связи с этим повышение сывороточного уровня sCD25 у больных с отсутствием ЦО является закономерным отражением угнетения противоопухолевого иммунного ответа.

Таблица 5

Сывороточное содержание растворимых форм белков CD38 и CD25 при хроническом миелолейкозе, U/ml ($M \pm m$)

Белок	Норма	Первич. пациенты, n=37	Полный ЦО, n=44	Частичный ЦО, n=19	Миним. ЦО, n=19	Отсутствие ЦО, n=19
CD25	407±27	539±97	487±39	420±31	554±97*	638±71*
CD38 димер	257±14	435±135*	379±83	369±107	346±82	449±94*
CD38 сумм.	200±17	231±18	238±13	197±7	201±10	239±21

* – статистически значимые отличия по сравнению с нормой ($p < 0,05$)

Мембранный белок CD38 полифункционален: он проявляет ферментативную активность, катализируя образование циклической АДФ-рибозы, выполняющей функцию вторичного мессенджера, а также участвует в передаче сигнала внутрь клетки и процессах межклеточной адгезии. Известно, что мономерный CD38 протеин в мембранной форме в большей степени выполняет функции сигнал-передающей структуры, участвуя в межклеточных адгезивных взаимодействиях, а в растворимой форме их блокирует. Димерный CD38 белок в большей степени проявляет ферментативную активность. При этом нерешенным остается вопрос о роли ферментативной активности во внеклеточном пространстве (S. Deaglio et al., 2001).

Содержание суммарной фракции sCD38 у пациентов с ХМЛ существенно не отличалось от нормы ни в дебюте заболевания, ни на фоне терапии гливекком. При этом у первичных больных ХМЛ, сывороточное содержание олигомерной формы данного белка было повышено в 1,7 раза в сравнении с нормой ($p < 0,05$). Последующая терапия гливекком сопровождалась снижением сывороточного содержания до уровня, характерного для здоровых волонтеров, однако в группе пациентов с отсутствием ЦО наблюдалось повышение концентрации олигомерного CD38 в 1,7 раза ($p < 0,05$). Таким образом, характер изменения сывороточного уровня суммарной и олигомерной фракций растворимого CD38 протеина был различен.

Мы провели сравнительный анализ уровня sCD25 и sCD38 при заболеваниях кроветворной системы различной этиологии (табл. 4). Значимое повышение содержания растворимой формы CD25 белка в 3,1 раза по сравнению с нормой отмечалось лишь при остром лимфобластном лейкозе ($p < 0,01$). Аналогичным образом уровень суммарной фракции растворимого CD38 протеина оставался в пределах нормы при миелопролиферативных заболеваниях, миелодиспластическом синдроме и остром миелоидном лейкозе, но был повышен в 2,0 раза при ОЛЛ ($p < 0,05$). Однако олигомерная форма sCD38 содержалась в повышенном в 2,1 раза количестве у пациентов с ОНЛЛ ($p < 0,05$), в 6,5 раза при ОЛЛ ($p < 0,001$). Таким образом, различная биологическая природа исследуемых патологий системы гемопоэза нашла свое отражение в содержании растворимых форм исследуемых белков.

Нарушения адгезионных взаимодействий лежат в основе аномального поведения опухолевых клеток при ХМЛ (J.M. Goldman, J.V. Melo, 2003). Модуляция процессов адгезии клеток иммунной системы осуществляется в том числе и растворимыми белками CD50 и CD54 семейства ICAM. Проведено исследование содержания молекул адгезии CD18, CD50 и CD54 в свободной форме, а также в составе растворимых комплексов CD18-CD54, CD18-CD50 (табл. 6).

Растворимые формы CD54 протеина могут существовать как в виде отдельных белковых молекул, так и в виде олигомерных форм и нести важную информацию о состоянии системы иммунитета (Н.И. Егорова и др., 2004). Содержание CD54 белка в сыворотке крови превышало норму при ХМЛ как в дебюте заболевания, так и на фоне проводимой терапии ингибитором тирозинкиназы. При этом повышение сывороточной концентрации sCD54 в сыворотке происходило главным образом за счет мономерной фракции данного протеина, поскольку уровень олигомерной фракции sCD54 возрастал лишь при частичном цитогенетическом ответе в 3,4 раза ($p < 0,05$).

Таблица 6

Содержание растворимых форм молекул адгезии и их комплексов в сыворотке пациентов с хроническим миелолейкозом, U/ml ($M \pm m$)

Белок	Норма	Первичные пациенты	Полный ЦО	Частичный ЦО	Минимальный ЦО	Отсутствие ЦО
CD54 суммарный	65±10	145±25*	187±43*	182±33*	277±126*	228±36* **
CD54 олигомер	131±38	113±5	167±34	442±186*	119±8	185±57
CD50	353±65	292±47	286±46	197±35	266±35	240±36
CD18	212±32	356±218	816±425*	743±226*	123±6*	118±9*
CD18-CD54	146±17	65±8*	74±8*	141±54	96±18	99±29
CD18-CD50	193±27	151±14	195±59	122±22	148±51	146±31

* – статистически значимые отличия по сравнению с нормой ($p < 0,05$)

** – статистически значимые отличия по сравнению с группой первичных пациентов ($p < 0,05$)

Растворимые формы CD54 протеина могут существовать как в виде отдельных белковых молекул, так и в виде олигомерных форм и нести важную информацию о состоянии системы иммунитета (Н.И. Егорова и др., 2004). Содержание CD54 белка в сыворотке крови превышало норму при ХМЛ как в дебюте заболевания, так и на фоне проводимой терапии ингибитором тирозинкиназы. При этом повышение сывороточной концентрации sCD54 в сыворотке происходило главным образом за счет мономерной фракции данного протеина, поскольку уровень олигомерной фракции sCD54 возрастал лишь при частичном цитогенетическом ответе в 3,4 раза ($p < 0,05$).

Ранее было экспериментально продемонстрировано существование растворимых комплексов, состоящих из молекул CD18 и CD54 (А.А. Бабаев и др., 2006). У пациентов с ХМЛ в дебюте заболевания содержание растворимых ассоциатов CD18-CD54 было достоверно снижено в 2,2 раза, при полном ЦО отмечено снижение в 2,0 раза. Следовательно, повышение содержания sCD54 при ХМЛ происходит преимущественно за счет свободной, не связанной с лигандом формы, способной взаимодействовать с мембранными партнерами и оказывать иммуномодулирующий эффект.

Концентрация растворимого CD50 протеина у пациентов с ХМЛ имела небольшую тенденцию к снижению во всех группах больных ($p > 0,05$). Этот протеин также способен образовывать растворимые ассоциаты с CD18 белком. В дебюте заболевания и на фоне терапии гливексом, независимо от цитогенетического ответа, уровень sCD18-CD50 сохранялся на уровне нормальных значений.

Проведено исследование сывороточного содержания CD18 протеина, представляющего собой β_2 -цепь интегринов (В.В. Новиков и др., 2007). У пациентов ХМЛ при полном ЦО на фоне терапии гливекком происходило многократное увеличение содержания sCD18 (в 3,8 раза) ($p < 0,05$). При достижении частичного ЦО уровень растворимого CD18 также был существенно повышенным (в 3,5 раза). Однако при малом ЦО и его отсутствии, напротив, отмечалась тенденция к снижению содержания данного протеина ($p > 0,05$). Таким образом, одновременное определение растворимых форм молекул адгезии, являющихся партнерами друг друга (белков группы ICAM и CD18 белка) позволяет глубже оценить адгезивную составляющую иммунологического статуса при ХМЛ.

Анализ особенностей содержания растворимых форм молекул адгезии при различных нарушениях системы кроветворения показал достоверное повышение концентрации sCD54 при МПЗ и МДС в 2,5 и 3,9 раза соответственно ($p < 0,05$) (табл. 4). Как и при ХМЛ, это повышение происходило очевидно преимущественно за счет мономерной фракции растворимой формы белка CD54. Для пациентов с ОЛЛ также было характерно многократное (в 3,8 раза) возрастание содержания sCD54 и в 1,9 раза – содержания sCD50 ($p < 0,05$). Уровень в сыворотке растворимого ассоциата CD18-CD54 приближался к норме лишь при МПЗ и острых лейкозах, в то время как при МДС был сниженным. Содержание растворимого комплекса CD18-CD50 было повышенным лишь при острых лейкозах в 2,9 раза ($p < 0,05$). Таким образом, можно отметить черты сходства в спектре растворимых форм белков адгезии при ХМЛ и других, отличных по биологической природе опухолях кроветворной системы.

Молекулы главного комплекса гистосовместимости, как и многие другие мембранные белки клеток иммунной системы, имеют растворимые формы (W.F. Pickl et al., 1993). Исследовано сывороточное содержание растворимых молекул HLA I класса, HLA-DR, белка CD8 и растворимого комплекса HLA-I-CD8 при хроническом миелолейкозе (табл. 7). В дебюте заболевания содержание растворимых молекул HLA-I достоверно повышено в 2,2 раза по сравнению с нормой ($p < 0,05$).

При минимальном ответе на проводимое лечение наблюдалось достоверное повышение содержания данных молекул в 1,9 раза по сравнению с нормальными значениями ($p < 0,05$). Отсутствие ЦО сопровождалось многократным увеличением уровня растворимой формы HLA-I в 3,3 раза относительно нормы, и в 1,5 раза относительно пациентов с первичным ХМЛ. Таким образом, наиболее существенные отклонения в содержании растворимой формы HLA-I отмечены в дебюте заболевания и при отсутствии цитогенетического ответа на проводимое лечение гливекком. Снижение повышенного уровня sHLA-I до нормальных значений в случае успешной

терапии гливеком является, вероятно, звеном механизма нормализации апоптотических процессов, касающихся активированных Т-клеток. Это позволяет предположить возможность использования данного протеина для иммунологического мониторинга пациентов с ХМЛ.

Таблица 7

Сывороточное содержание растворимых форм молекул гистосовместимости и растворимого комплекса HLA-I-CD8 при хроническом миелолейкозе, U/ml (M±m)

Протеин	Норма	Первич. пациенты, n=37	Полный ЦО, n=44	Частичный ЦО, n=19	Миним. ЦО, n=19	Отсутствие ЦО, n=19
HLA-I	1012±36	2193±424*	1371±249	1294±151	1900±533*	3263±470 *, **
HLA-DR	99±11	151±45	98±8	93±9	133±34	167±28*
CD8	378±17	419±51	422±53	322±22	456±95	454±47
HLA-I-CD8	513±22	560±63	574±53	564±86	487±75	906±139*

* – статистически значимые отличия по сравнению с нормой (p<0,05)

** – статистически значимые отличия по сравнению с группой первичных пациентов (p<0,05)

Достоверных изменений в содержании растворимой формы белка CD8 у пациентов с ХМЛ как в дебюте заболевания, так и при лечении гливеком выявлено не было. Однако при минимальном и отсутствии ЦО была отмечена незначительная тенденция к повышению содержания sCD8 (p>0,05). Наряду с анализом сывороточного содержания растворимых молекул HLA I класса и растворимого белка CD8, был определен уровень растворимых комплексов, состоящих из данных молекул. Достоверное повышение содержания растворимого комплекса HLA-I-CD8 в 1,8 раза выявлено при отсутствии ЦО на получаемую терапию.

Корреляционный анализ позволил выявить наличие достоверной положительной связи между уровнем растворимой формы молекул HLA I класса и относительной концентрацией растворимого комплекса HLA-I-CD8 (r=0,53; p<0,05), а также между сывороточным содержанием sHLA-I и комплекса HLA-I-CD8 (r=0,46; p<0,05). Наличие такой корреляции указывает на определенную вероятность того, что sHLA-I и sCD8 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 белков, поскольку их центры связывания взаимно блокированы. Таким образом может происходить ограничение программированной клеточной смерти CD8-положительных цитотоксических Т-лимфоцитов и обеспечение более эффективной работы противолейкемического клеточного иммунного ответа.

У пациентов с Rh-негативными МПЗ также было отмечено статистически значимое возрастание уровня растворимых молекул HLA-I в 1,9 раза ($p < 0,05$) (табл. 4). Для острого миелоидного лейкоза было характерно повышение содержания этих молекул в 1,7 раза ($p < 0,05$), в то время как при ОЛЛ – в 4,0 раза ($p < 0,001$). Растворимая форма HLA-DR в повышенном количестве обнаруживалась лишь при ОЛЛ – в 3,6 раза ($p < 0,05$). Более высокие по сравнению с нормой (в 1,5 раза) значения уровня растворимого комплекса HLA-I-CD8 отмечены при МДС и ОМЛ ($p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о том, при данных неоплазиях, как и при ХМЛ, sHLA-I и sCD8 находятся в сыворотке в составе растворимых комплексов HLA-I-CD8.

Анализ данных о состоянии пула растворимых форм мембранных белков гемопоэтических клеток в группе пациентов с дополнительными хромосомными аномалиями на фоне терапии ингибитором тирозинкиназы не выявил достоверных отличий по сравнению с группой больных ХМЛ без атипичных хромосомных перестроек. Однако можно отметить лишь тенденцию к снижению растворимых протеинов CD25 (в 1,6 раза) и CD8 (в 1,4 раза) ($p > 0,05$). Уровень растворимых молекул HLA I класса, напротив, имел тенденцию к повышению в 1,2 раза.

На основании проведенного исследования можно заключить, что при хроническом миелолейкозе и других нарушениях гемопоэза неопластического характера изменяется структурно-функциональное состояние пула растворимых форм мембранных белков гемопоэтических клеток, что играет важную роль в формировании механизмов ухода лейкоемического клона из-под контроля иммунной системы, взаимосвязано с цитогенетическим ответом на проводимую терапию ингибитором тирозинкиназы и может быть использовано в мониторинговых и прогностических целях.

ВЫВОДЫ

1. При первичном хроническом миелолейкозе на фоне вариабельности спектра альтернативных форм матричной РНК CD95 протеина клеток крови обнаружено снижение сывороточного уровня растворимого комплекса CD18-CD54 и повышение сывороточного содержания суммарной фракции растворимого CD95 протеина, олигомерной формы белка CD38, суммарной формы белка адгезии CD54, а также растворимых молекул HLA I класса.

2. Полный цитогенетический ответ на фоне терапии гливеком характеризуется спектром форм матричных РНК Fas белка клеток крови, соответствующим спектру здоровых доноров, нормализацией сывороточного содержания олигомерного белка CD38, суммарной фракции белка CD95, растворимых молекул HLA I класса, растворимого комплекса CD18-CD54, повышением уровня растворимого CD18, а также сохранением изначально повышенного содержания суммарной фракции растворимого белка CD54.

3. Чем менее выражен цитогенетический ответ, тем ниже сывороточное содержание растворимого протеина CD18 и выше уровень растворимых молекул HLA I класса, HLA-DR, растворимых комплексов HLA-I-CD8, растворимого рецептора интерлейкина-2, суммарного и олигомерного sCD95 протеина при сохранении у половины больных хроническим миелолейкозом с отсутствием цитогенетического ответа в клетках крови только одной из минорных форм матричной РНК CD95 протеина (FasExo3,4Del или FasExo3,4,6Del).

4. Независимо от цитогенетического ответа, сывороточное содержание суммарной фракции растворимого белка адгезии CD54 при терапии гливеком остается повышенным в сравнении с нормой, как и у первичных больных хроническим миелолейкозом.

5. Характер изменений сывороточного содержания тестированных представителей пула растворимых форм мембранных белков клеток иммунной системы для большинства из них сходен в дебюте хронического миелолейкоза с картиной изменений их содержания у первичных больных Ph-негативными миелопролиферативными заболеваниями, миелодиспластическим синдромом и острым миелолейкозом.

6. За исключением растворимых комплексов HLA-I-CD8, у больных острым лимфобластным лейкозом обнаружено более выраженное увеличение сывороточного уровня исследованных протеинов и их ассоциатов по сравнению с неоплазиями миелоидного происхождения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. **Гостюжова Е.А.** Сывороточное содержание растворимых дифференцировочных антигенов при разном цитогенетическом статусе больных хроническим миелолейкозом / Гостюжова Е.А., Преснякова Н.Б., Добротина Н.А., Волкова С.А., Новиков В.В. // Вестник ННГУ. – 2008. – № 5. – С. 89-95.

2. Новиков В.В. Состояние пула растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы при острых лейкозах / Новиков В.В., **Гостюжова Е.А.**, Караулов А.В., Самойлова О.С., Бабаев А.А., Волкова С.А.,

Гришунина М.Е., Новиков Д.В., Кокушков Д.В., Барышников А.Ю. // Российский иммунологический журнал. – 2009. – № 2. – С. 164-170.

3. **Гостюжова Е.А.** Особенности содержания растворимых молекул HLA I класса, CD8 антигена и их комплексов при хроническом миелолейкозе / Гостюжова Е.А., Ликов В.Ф., Караулов А.В., Новиков В.В. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2008. – № 3. – С. 33-38.

4. Новиков В.В. Особенности структурного состояния пула растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы / Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю., Кравченко Г.А., Бабаев А.А., **Гостюжова Е.А.** // Молекулярная медицина. – 2009. – № 4. – С. 34-38.

II. Статьи, тезисы докладов региональных и международных конференций:

1. Волкова С.А. Гливек в терапии больных хроническим миелолейкозом в Нижегородской области / Волкова С.А., Самойлова О.С., Миронова Н.В., Гришунина М.Е., Пятковская О.В., **Гостюжова Е.А.**, Сиднев Г.В., Самоделкина Л.А., Сорокина И.В., Расторгуев Г.Г., Васильев Д.М. // Вестник гематологии. Тез. докл. Росс. научно-практич. конфер. "Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии". – 2007. – Т. 3, №2. – С. 17.

2. Волкова С.А. Дополнительные хромосомные аномалии в Ph⁺ кариотипе при лечении гливексом: описание 2-х случаев / Волкова С.А., Самойлова О.С., Миронова Н.В., Гришунина М.Е., Пятковская О.В., **Гостюжова Е.А.** // Вестник гематологии. Тез. докл. Росс. научно-практич. конфер. "Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии". – 2007. – Т. 3, №2. – С. 17-18.

3. Волкова С.А. Ответ на терапию препаратом гливек у пациентов с хроническим миелолейкозом на период 18 мес. от начала лечения / Волкова С.А., **Гостюжова Е.А.** // Артериальная гипертензия. Тез. докл. Всеросс. научно-практич. конфер. "Высокотехнологичные методы диагностики и лечения заболеваний сердца, крови и эндокринных органов". – 2008. – Т. 14, №1. – С. 95-96.

4. **Гостюжова Е.А.** Спектры альтернативных вариантов мРНК Fas(CD95) антигена в клетках крови больных хроническим миелолейкозом / Гостюжова Е.А., Уткин О.В., Новиков Д.В., Волкова С.А., Новиков В.В. // Российский биотерапевтический журнал. Материалы конференции "Нанотехнологии в диагностике опухолей". – 2009. – №1. – С. 13-14.

5. **Гостюжова Е.А.** Изучение мониторинговой роли сывороточного пула растворимых дифференцировочных антигенов и молекул гистосовместимости при хроническом миелолейкозе / Гостюжова Е.А., Преснякова Н.Б., Волкова С.А., Новиков В.В. // Российский биотерапевтический журнал. Материалы VII Всеросс. научно-практич. конфер. "Отечественные противоопухолевые препараты". – 2009. № 2. – С. 60.

6. **Гостюжова Е.А.** Взаимосвязь особенностей кариотипа гемопозитических клеток и структурно-функционального состояния пула растворимых форм мембранных белков при хроническом миелолейкозе / Гостюжова Е.А., Добротина Н.А., Преснякова Н.Б., Бабаев А.А., Самойлова О.С., Волкова С.А., Новиков В.В. // Матер. III междунар. научн. конфер. "Актуальные проблемы спортивной морфологии и генетики человека", Москва. – 2009. – С.60-62.

Список сокращений

ABL – протоонкоген, клеточный гомолог гена вируса мышинного лейкоза Абельсона
BCR – breakpoint cluster region – область множественных разрывов
BCR-ABL – химерный ген, образующийся в результате реципрокной транслокации между длинными плечами 9 и 22 хромосом
CD – кластеры дифференцировки
Fas протеин – белок, опосредующий апоптоз
HLA – человеческий лейкоцитарный антиген
ICAM – молекула межклеточной адгезии
GTG – дифференциальная G-окраска
MYC – онкоген, клеточный гомолог вирусного гена миелоцитоматоза птиц
Ph-хромосома – "филадельфийская" хромосома
sCD – растворимая форма дифференцировочных молекул
МДС – миелодиспластический синдром
МПЗ – миелопролиферативное заболевание
ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз
ОМЛ – острый миелоидный лейкоз
ХМЛ – хронический миелолейкоз
ЦО – цитогенетический ответ