

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА НА ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И БЛАСТНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ У ДЕТЕЙ

М.Г. БУЛЕГЕНОВА¹, С.С. САЛИЕВА¹, А.А. ШЕРЕЗДАНОВА¹, А. ДУНАЕВА¹

¹АО "Научный центр педиатрии и детской хирургии", Алматы, Республика Казахстан

АННОТАЦИЯ

Актуальность: Актуальным вопросом онкогематологии является поиск эффективных подходов терапии и методов прогнозирования течения острых лейкозов. Перспективным направлением в этой области является изучение изменений экспрессии молекулярных маркеров на поверхности клеток в динамике химиотерапии.

Цель исследования – определить уровень экспрессии белков *apoptin V*, *Bcl-2*, *CD95*, *p53* на лимфоцитах периферической крови и лейкоэмических клетках костного мозга у детей с диагнозом «острый лейкоз».

Методы: Дизайн исследования – поперечный. Метод исследования: иммунофенотипирование. Материалами исследования послужили периферическая кровь и костный мозг 106 пациентов с впервые установленным диагнозом «острый лейкоз» в возрасте от 1 мес. до 16 лет (исследуемая группа) и периферическая кровь 23 условно здоровых детей в возрасте от 2 до 17 лет (контрольная группа). Полученные данные были подвергнуты статистической обработке.

Результаты: Исследование экспрессии *Bcl-2* при В-клеточных вариантах достоверных различий не выявило, при Т-клеточном варианте на лимфоцитах периферической крови данный маркер экспрессировался в достоверно большем количестве, нежели на бластах. При остром миелоидном лейкозе экспрессия *Bcl-2* была достоверно выше на бластной популяции клеток, по сравнению с лимфоцитами. При анализе экспрессии *CD95* при острых лимфобластных вариантах экспрессия была достоверно выше на лимфоцитах периферической крови, чем на мембране лейкоэмических клеток. Результаты анализа экспрессии *apoptin V* показали, что лимфоциты экспрессировали маркер раннего апоптоза достоверно больше, чем бласты костного мозга. Данное явление является опасным признаком, указывающим на снижение противоопухолевого иммунитета. Сравнительный анализ экспрессии белка *p53* на поверхности лимфоцитов и бластных клеток достоверных различий при различных вариантах лейкозов не выявил.

Заключение: Результаты проведенных исследований указывают на наличие прогностической значимости *Bcl-2* и *CD95* при остром лейкозе. *Apoptin V* и *p53* не выявили достоверной чувствительности и специфичности, что позволяет не включать данные маркеры в панель иммунофенотипирования лейкозов.

Ключевые слова: острый лейкоз, бластные клетки, маркеры апоптоза, *Bcl-2*, *CD95*.

Введение: За последнее десятилетие достигнут заметный прогресс в области диагностики и лечения острых лейкозов (ОЛ). Основной проблемой клиницистов остается наличие резистентных форм заболевания и частота развития рецидивов. Соответственно, поиск эффективных методов лечения, диагностики и прогнозирования течения ОЛ является одним из актуальных вопросов отечественной и зарубежной онкогематологии. В данной области многообещающим направлением представляется изучение биологических особенностей лейкоэмических клеток, в частности изменения экспрессии молекулярных маркеров на поверхности клеток в динамике химиотерапии [1, 2].

Известно, что в развитии большинства злокачественных опухолей важную роль играет нарушение баланса между пролиферацией и способностью клеток к естественной гибели (апоптозу). Основной функцией апоптоза является элиминация трансформированных клеток, включая вирус-инфицированные, опухолевые клетки или необратимо поврежденные. Индукция апоптоза служит основным механизмом действия большинства химиопрепаратов, применяемых при интенсивном лечении ОЛ [2-11]. В настоящее время активно исследуются два основных взаимос-

вязанных механизма апоптоза: митохондриальный и рецепторный, функционирующих при сбалансированном взаимодействии про- и антиапоптотических факторов, таких как белки семейства *Bcl-2*, белков *p53* и *CD95* [2].

Так, Н.Ф. Еbian и соавт. выявили, что у пациентов с ОМЛ повышенная регуляция *Bcl-2* была парадоксальным образом связана с повышенным апоптозом и низкими показателями ранней смертности [12]. Низкие показатели экспрессии *Bcl-2* указывали на ингибирование антиапоптоза и химиочувствительность злокачественных клеток [2].

Как известно, белок *CD95* непосредственно участвует в инициации и регуляции апоптоза. Представлены результаты исследований, в которых отмечается значительное увеличение экспрессии *CD95* на поверхности клеток, полученных от больных острым лейкозом, раком молочной железы и глиобластомой после проведения химиотерапии или лучевого лечения [13-16]. Высокий уровень экспрессии *CD95* предсказывал благоприятный ответ на химиотерапию при ОЛЛ [2]. В то же время, М. Tiribelli и соавт. показали связь повышенной экспрессии *Bcl-2* с резистентностью к химиотерапии и низкой выживаемостью при ОМЛ [17].

Ключевым элементом в обеспечении геномной стабильности клетки является транскрипционный фактор p53, известный как «белок бессмертия» или «страж генома». Он участвует в регуляции: I генов рецепторов смерти (DR5, Fas); I генов, отвечающих за остановку клеточного деления (P21, GADD45 и др.); I генов, запускающих апоптоз (BAX, KILLER DR5, PIG и др.); I вызывает репрессию генов, ингибирующих апоптоз (Bcl-2, RELA). Нарушение функций p53 встречается среди множества злокачественных заболеваний, в числе которых и ОЛ. При ОЛЛ у взрослых мутации гена p53 обнаруживаются в 13% случаев, однако у детей этот показатель гораздо ниже и составляет 2% случаев. Это может обуславливать более благоприятный прогноз и высокую частоту достижения ремиссии у детей [2]. Исследуя экспрессию p53 у пациентов с различными вариантами ОМЛ, А. Ahmadzadeh и соавт. выявили плохой прогноз у пациентов с высокими показателями экспрессии данного белка [18]. Следовательно, изучение комплекса апоптотических (annexin V, CD95, p53) и антиапоптотических антигенов (Bcl-2) позволит выявить различия сигнальных путей апоптоза при различных вариантах острого лейкоза. Для определения методов прогнозирования чувствительности и/или резистентности лейкоэмических клеток может помочь поиск нарушений в механизмах запрограммированной гибели клеток. Анализ роли маркеров annexin V, CD95, p53 и Bcl-2, контролирующих апоптоз, позволит разработать рекомендации по совершенствованию панели поверхностных антигенов при иммунофенотипировании клеток на различных этапах терапии.

Цель исследования – определить уровень экспрессии белков annexin V, Bcl-2, CD95, p53 на лимфоцитах периферической крови и лейкоэмических клетках костного мозга у детей с диагнозом «острый лейкоз».

Материалы и методы:

Дизайн исследования – поперечный.

Материалами исследования послужили периферическая кровь и костный мозг 106 пациентов (исследуемая группа) с диагнозом «острый лейкоз» и периферическая кровь 23 условно здоровых детей (контрольная группа). Возраст пациентов исследуемой группы составил от 1 мес. до 16 лет, контрольной группы – от 2 до 17 лет.

Все пациенты с ОЛ получали соответствующую терапию в Научном центре педиатрии и детской хирургии (Алматы, Казахстан). Пребывание пациентов с диагнозом ОЛЛ в стационарном режиме составило 8 месяцев, для больных ОМЛ – 4-5 месяцев.

Из исследований были исключены образцы пациентов с выраженной лейкопенией, а также при отсутствии подписанного информированного согласия или информированного отказа законного представителя от участия в исследовании перед началом терапии.

Метод исследования: иммунофенотипирование костного мозга и периферической крови. Панель диагностики острых лейкозов включала 51 иммунофенотипических маркер. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре FacsCantoll (Becton Dickenson, США) в программе DIVA. В программном обеспечении DIVA проточного цитофлуориметра FacsCantoll проводили сбор данных по нескольким параметрам: прямое светорассеяние (FSC), боковое све-

торассеяние (SSC), по 8-ми каналам флюоресценции. С помощью многоцветной панели моноклональных антител на первом этапе определяли линейность и подвариант острого лейкоза. Экспрессию белков annexin V, Bcl-2, CD95, p53 выявляли в этих же образцах на бластных клетках костного мозга и лимфоцитах периферической крови больных ОЛ до начала лечения.

Статистические методы: Для статистической обработки данных использовали статистическую программу SPSS. Для анализа различий между двумя независимыми переменными применяли U-критерий Манна-Уитни. Уровень значимости был установлен на уровне $p < 0,05$ для определения надежности.

Результаты: При использовании панели моноклональных антител мы определяли линейность и подвариант острого лейкоза у детей; для этого же образца выявляли экспрессию апоптотического (annexin-V, CD95, p53) и антиапоптотического антигена (Bcl-2) на бластных клетках костного мозга и лимфоцитах периферической крови.

Структура иммунологических вариантов ОЛ у исследуемых пациентов представлена на рисунке 1.

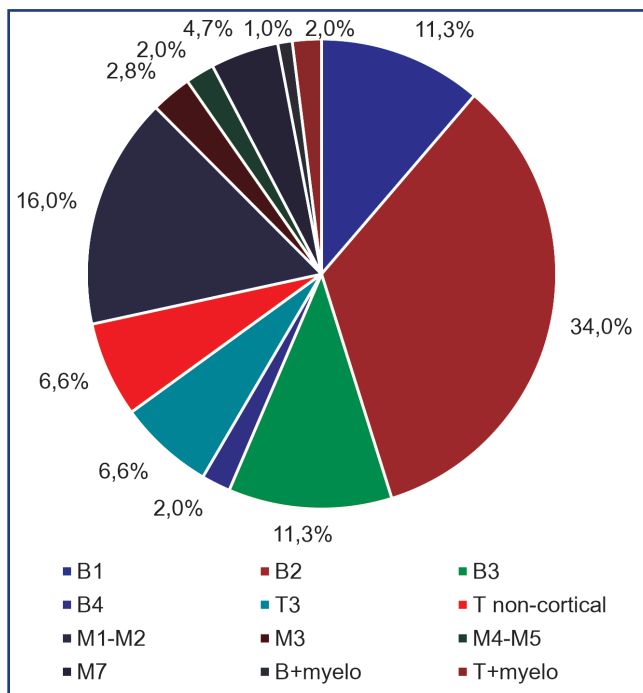


Рисунок 1 – Структура иммунологических вариантов ОЛ (106 пациентов)

Таким образом, большую часть ОЛ составили случаи В-ОЛЛ (46,1%), среди которых преобладал вариант В2 (34,0%). Следующими по частоте встречаемости были случаи ОМЛ, которые составили 38,7% от всех ОЛ. На долю Т-ОЛЛ пришлось 13,2% случаев, при этом Т-кортикальные (Т3) и некортикальные варианты (неТ3) встречались одинаково часто – по 6,6% от общего числа ОЛ. Наиболее редко встречался смешанно-клеточный фенотип ОЛ (бифенотипический ОЛ) – 2% от общего числа всех лейкозов. На рисунке 2 представлена скатерограмма CD45/SSC, демонстрирующая гейтирование бластной популяции (R2), которая имеет более бледное (CD45^{dim}) свечение по общелейкоцитарному антигену CD45 в сравнении с популяцией лимфоцитов (R1).

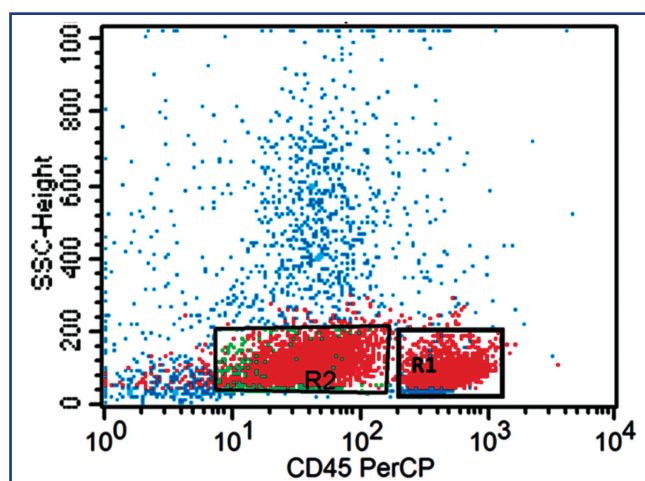


Рисунок 2 – Скатерограмма CD45/SSC

Сравнение уровня экспрессии апоптотических антигенов на лимфоцитах периферической крови больных ОЛ и условно здоровых детей. В таблице 1 представлены данные о результатах анализа уровня экспрессии белков annexin V, Bcl-2, CD95, p53 на лимфоцитах периферической крови у пациентов с ОЛЛ и условно здоровых детей.

При сопоставлении экспрессии маркера раннего апоптоза – annexin V – на лимфоцитах периферической крови выявлено следующее. Средний показатель экспрессии данного маркера в группе контроля достоверно не отличался от соответствующего показателя пациентов практически со всеми подвариантами лейкозов. Исключение составили только зрелый В4 вариант и М7 вариант ОЛ, при которых экспрессия аннексина регистрировалась в достоверно низких значениях по сравнению с контрольной группой.

Таблица 1 – Сравнение уровней экспрессии маркеров апоптоза на лимфоцитах периферической крови у пациентов с ОЛЛ (n=106) и контрольной группы (n=23), M±m

Вариант ОЛ кол-во пациентов (n)	Маркеры апоптоза							
	annexin V		P53		Bcl-2		CD95	
	Ранний апоптоз, %	Среднее значение	%	Среднее значение	%	Среднее значение	%	Среднее значение
B2 (n=36)	60,8±3,4	42,5±6,1	2,9±1,3	7,1±1,9	17,8±5,8	6,0±3,3	33,3±4,3	11,6±2,5
B1 (n=12)	68,5±7,3	50,4±5,6	2,8±1,5	7,6±1,7	12,9±1,5	5,6±1,4	23,1±1,9	12,0±3,3
B3 (n=12)	57,2±3,2	48,3±6,8	4,7±2,2	8,8±2,9	8,9±2,9	6,0±0,5	25,9±3,2	11,1±3,6
B4 (n=2)	50,4±5,5	39,2±2,1	11,4±2,9	11,1±2,7	15,4±4,6	4,5±2,3	46,5±2,1	9,4±3,9
T3 (n=7)	70,9±1,6	40,5±3,9	1,7±1,7	9,6±1,7	10,1±3,6	4,3±0,8	43,1±3,9	12,1±3,8
T4 (n=7)	70,7±4,8	47,5±3,9	3,8±4,5	8,4±1,5	17,7±4,0	3,6±1,4	37,6±2,9	7,4±4,1
M1-M2 (n=17)	54,1±2,9	51,9±4,4	3,5±4,3	7,8±2,1	26,0±3,2	6,1±2,3	30,2±2,8	8,9±2,8
M3 (n=3)	57,6±3,4	32,1±3,4	3,6±3,3	7,6±1,6	6,0±5,1	4,2±1,6	27,2±1,3	7,9±1,1
M4-M5 (n=2)	53,7±11,7	28,7±7,8	5,9±1,9	6,4±1,2	2,8±2,8	6,6±2,9	8,3±12,7	12,2±8,8
M7 (n=5)	49,2±4,5	64,8±7,1	4,1±4,2	7,1±1,7	9,6±1,9	5,5±2,6	16,0±2,5	10,0±1,5
T+миело (n=2)	55,6±11,5	42,6±5,5	2,8±6,0	7,4±2,7	8,8±10,9	7,1±3,9	21,1±3,4	11,5±2,0
В+миело (n=1)	65,0	3025,2	2,9	15,8	11,6	11,7	39,1	12,1
Контрольная группа (n=23)	66,1±3,7	21,9±2,5	3,6±2,1	6,1±0,9	10,9±2,3	4,4±1,2	20,3±3,2	7,3±1,1

Примечание: среднее арифметическое значение (M), стандартное отклонение (±m)

Анализ экспрессии аннексина внутри варианта лейкоза выявил наличие достоверной разницы между группой с В1 ОЛЛ (68,5±7,3, p<0,05), и В4 ОЛЛ (50,4±5,5%) среди В-лимфобластных ОЛ. Внутри групп с Т-ОЛЛ достоверной разницы не обнаружено. Среди миелобластных вариантов и бифенотипических вариантах лейкоза достоверной разницы экспрессии аннексина на лимфоцитах периферической крови также выявлено не было.

Более значимые изменения наблюдались при исследовании интенсивности флуоресценции аннексина, которая оказалась достоверно ниже в группе контроля, по сравнению со соответствующим показателем во всех остальных подгруппах. Нельзя не отметить факт многократного увеличения именно интенсивности флуоресценции аннексина V при бифенотипическом варианте (В+миело) лейкоза, несмотря на то, что экспрессия его не отличается от показателя контрольной группы. Вероятно, интенсивность флуоресценции является более чувствительным показателем для определения течения и исхода заболевания.

Экспрессия апоптотического маркера p53 (t>2,2; p<0,05) была достоверно выше только в подварианте со зрелоклеточной В-формой ОЛЛ (В4) как по срав-

нению с показателями в контрольной группе, так и остальных подвариантов лейкозов. Однако, в отличие от аннексина убедительных изменений интенсивности флуоресценции (mean для антигена p53) определено не было при анализе между группой контроля и вариантами лейкозов, а также внутри групп. Из полученных результатов можно сделать вывод, что p53 не обладает специфичностью по экспрессии и интенсивности флуоресценции при онкогематологических заболеваниях. Однако также необходимо учитывать, что ограниченное количество пациентов в каждой группе является фактором, снижающим достоверность полученных данных. Необходимо значительно увеличить количество исследований каждого подварианта лейкоза с целью получения статистически значимых групп.

При сопоставлении экспрессии антиапоптотического маркера Bcl-2 на лимфоцитах условно здоровых детей и пациентов с лейкозом было показано следующее: экспрессия Bcl-2 на лимфоцитах периферической крови здоровых детей была достоверно выше при сравнении с данным показателем пациентов со всеми подвариантами острых лимфобластных лейкозов. При этом, достоверных различий в экспрессии белка Bcl-2 у кон-

трольной группы и пациентов с ОМЛ и бифенотипическим вариантом ОЛ не было обнаружено, также отсутствовали различия в интенсивности флюоресценции. Возникает предположение о возможном увеличении уровня экспрессии антиапоптотического маркера Bcl-2 на лимфоцитах больных вследствие активации клеточного звена [19]. Однако данная гипотеза подтвердилась только в группе пациентов с ОЛЛ. Это могло быть обусловлено статистически небольшим количеством проведенных исследований и указывает на необходимость дальнейшего изучения.

При анализе показателей маркера апоптоза CD95 среднее значение контрольной группы было достоверно ниже соответствующего показателя в группах пациентов с ОЛЛ и бифенотипической формой лейкоза, тогда как в группах с пациентами с ОМЛ высокая экспрессия CD95 определялась только при M1-M2 вариантах ОМЛ. По интенсивности флюоресценции между контрольной и исследуемыми группами достоверной разницы не определено. Наши предположения сводились к тому, что усиление экспрессии CD95 на лимфоцитах периферической крови у пациентов с лейкозом указывает на ингибирование активности иммунной системы супрессорными факторами, которые вырабатываются опухолевыми клетками, как путь избегания иммунологического надзора. Данное предположение получило подтверждение только в от-

ношении ОЛЛ. Сравнение экспрессии и интенсивности флюоресценции CD95 между подвариантами лейкозов показало, что максимальная интенсивность выявлялась при В4 и Т3-кортикальном варианте, минимальная – при М4-М5 вариантах. Однако интерпретировать полученные результаты не представляется возможным в связи с малочисленностью групп (n=1).

Анализ экспрессии апоптотических маркеров на лимфоцитах периферической крови и бластных клетках костного мозга у пациентов с лимфобластными ОЛ. При анализе экспрессии апоптотического маркера annexin V выявлено достоверное увеличение экспрессии белка на лимфоцитах периферической крови пациентов по сравнению с бластами костного мозга. Среди В-ОЛЛ достоверное увеличение было характерно для В1 и В2 подвариантов, Т-ОЛЛ для Т3-кортикального подварианта, ОМЛ для М1-М2 и М4-М5 подвариантов, а также при бифенотипических вариантах ОЛ (В+миело и Т+миело) (p<0,05, t>2.2). Интенсивность флюоресценции была достоверно выше на лимфоцитах пациентов с Т3, М7 и бифенотипическом вариантом лейкоза. Выраженная экспрессия маркера раннего апоптоза на лимфоцитах, на наш взгляд, является неблагоприятным прогностическим фактором, свидетельствующим о нацеленности иммунокомпетентных клеток на запрограммированную гибель и снижение противоопухолевого иммунологического надзора.

Таблица 2 – Экспрессия маркеров апоптоза в бластных клетках костного мозга у пациентов с острым лимфобластным лейкозом, M±m

Вариант ОЛ, кол-во пациентов (n)	Маркеры апоптоза							
	annexin V		P53		Bcl-2		CD95	
	Ранний апоптоз, %	Mean	%	Mean	%	Mean	%	Mean
В2 (n=36)	44,4±7,8	27,8±5,4	4,8±7,2	8,7±2,3	17,2±16,4	6,9±8,7	8,1±2,7	6,1±7,2
В1 (n=12)	29,0±13,0	33,5±26,5	4,3±4,5	7,6±1,0	10,8±13,2	5,7±1,6	2,8±2,2	4,8±1,4
В3 (n=12)	55,6±8,7	37,7±10,1	3,9±5,2	8,6±1,2	26,5±19,0	6,6±2,1	5,3±3,1	5,2±1,0
В4 (n=2)	37,8±18,2	15,6±2,5	29,2±20,7	16,8±7,8	9,6±1,3	3,4±1,8	3,0±0,4	4,8±0,1
Т3(n=7)	36,4±7,2	16,7±4,8	3,0±1,5	6,2±2,6	2,1±1,3	3,8±2,5	3,0±1,5	5,0±1,8
Т-некорт (n=7)	62,7±2,8	39,3±5,5	4,2±3,1	6,4±3,3	8,3±11,8	5,1±4,3	4,2±3,1	5,3±2,5
М1-М2 (n=17)	37,1±14,7	44,5±24,5	5,0±6,0	13,0±4,2	11,0±17,4	8,0±6,0	16,4±13,2	13,3±4,9
М3 (n=3)	56,5±11,2	36,9±7,5	1,9±2,4	14,6±1,6	57,5±2,0	12,9±0,7	10,5±6,8	16,8±1,7
М4-М5 (n=2)	35,0±11,7	37,4±7,8	3,5±1,9	11,3±1,2	2,9±2,8	7,3±2,9	30,6±12,7	17,5±8,8
М7 (n=5)	53±14,5	43±6,6	5,2±2,0	13,4±1,1	1,8±1,1	5,5±1,1	3,8±2,3	8,6±2,9
Т+миело (n=2)	23,9±11,5	27,5±5,5	6,8±6,0	11,0±2,7	15,9±10,9	7,8±3,9	3,5±3,4	8,1±2,0
бифенот В+миело (n=1)	40,1	33,1	84,7	31,1	0,21	17,9	24,2	8,7

Примечание: mean – среднее арифметическое значение (M). Данные приведены в виде M±m, где m – стандартное отклонение

Сравнивая экспрессию annexin V на бластах костного мозга между различными подвариантами, следует указать, что минимальная экспрессия выявлена при В1-варианте и бифенотипическом виде (Т+миело), что свидетельствует о выраженной жизнеспособности бластов, тогда как максимальная экспрессия при В2, В3, Т4, М3 и М7 вариантах. Усиление интенсивности флюоресценции также была характерна именно при данных подвариантах лейкоза. Показано, что В3 и М3 линейные лейкозы имеют благоприятный прогноз, Т-некортикальный более благоприятен по сравнению с кортикальной формой. Вероятно, наличие на поверхности бластов большего количества апоптотических белков будет способствовать их ускоренной гибели. Следует

принимать во внимание не саму экспрессию аннексина, а показатель, проявивший большую чувствительность, каковым и является интенсивность флюоресценции. Увеличение числа выборки пациентов и последующие исследования могли бы повлиять на результаты исследований. Однако, даже опираясь на полученные данные, можно говорить о необходимости анализа данного маркера на бластах и лимфоцитах пациентов с целью прогнозирования течения заболевания.

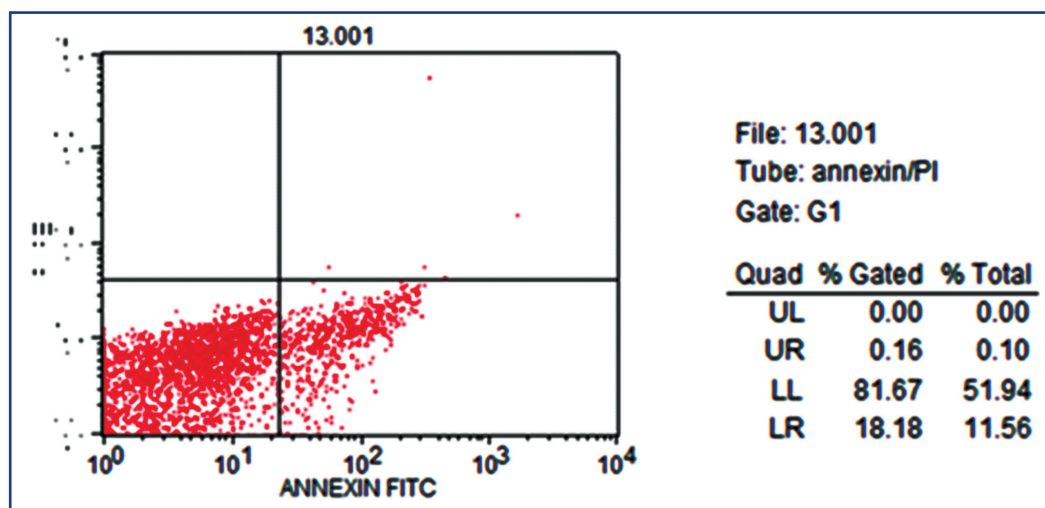
Среди Т-ОЛЛ экспрессия маркера раннего апоптоза на бластных клетках существенно снижена в группе с Т3-кортикальным вариантом (36,4±7,2%) по сравнению с группой некортикального Т-ОЛЛ (62,7±2,8%), (p<0,05, t=2.9) в то время, как на лимфоцитах перифе-

рической крови при данных вариантах лейкоза экспрессия аннексина максимальна. Значение средней интенсивности флуоресценции (mean) также ниже у пациентов с Т3-корт ОЛЛ ($16,7 \pm 4,8$ у.е.) по сравнению с соответствующим показателем некортикального Т-ОЛЛ ($39,3 \pm 5,5$ у.е.).

Среди ОМЛ экспрессия аннексин-V на лимфоцитах периферической крови была достоверно выше, чем на бластных клетках при М1-М2 и М4 подвариантах ОМЛ. Известно, что острый промиелоцитарный лейкоз (ОМЛ М3) и острый мегакариоцитарный лейкоз (ОМЛ

М7) отличаются агрессивным течением и неблагоприятным исходом в сравнении с другими видами ОМЛ. Тем самым подразумевалось, что экспрессия маркера аннексин-V на опухолевых клетках при данных подвариантах ОМЛ будет ниже, чем в группах с В-ОЛЛ, который характеризуется более благоприятным течением, однако достоверных различий выявлено не было.

Интересным, на наш взгляд является достоверно низкая экспрессия аннексина на бластах при бифенотипическом (Т+миело) варианте по сравнению с В+миело варианте.



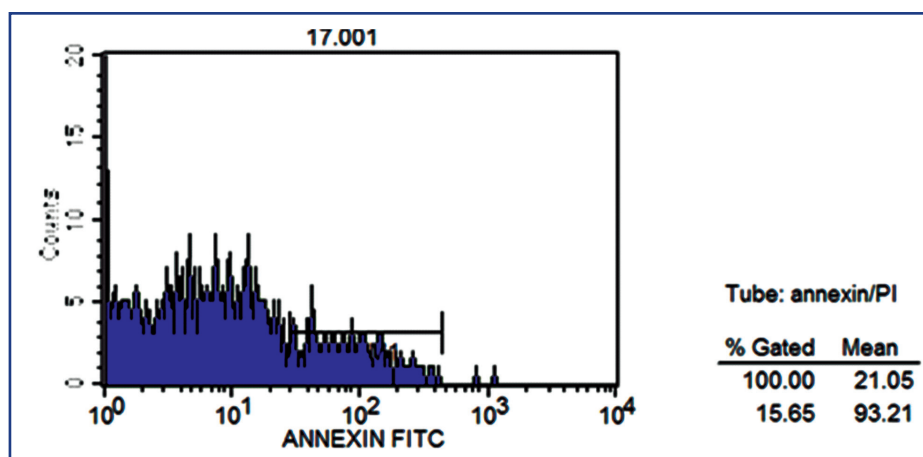
Легенда: UL (upper left) – верхний левый квадрант, UR (upper right) – верхний правый квадрант, LL (lower left) – нижний левый квадрант, LR (lower right) – нижний правый квадрант, Gated – область клеток, Quad – квадрант, Total – общий процент

Рисунок 3 – Экспрессия аннексин V, меченого флуоресцеином (FITC) на бластных клетках

В правом нижнем квадранте графика (LR) показаны бластные клетки, позитивные по аннексин-V, то есть находящиеся на этапе раннего апоптоза (18,18%). В левом нижнем квадранте (LL) расположены клетки, негативные по аннексин-V, следовательно живые (81,57%), в ле-

вом верхнем квадранте (UL) – мертвые клетки (0,00%), и в правом верхнем квадранте (UR) – клетки в стадии позднего апоптоза (0,16%) (рисунок 3).

Среднее значение FITC-положительных клеток, содержащих аннексин-V, составило 21,05 единиц (рисунок 4).



Легенда: Gated – область клеток, Mean – средняя интенсивность флуоресценции
 Рисунок 4 – Однопараметровая гистограмма интенсивности флуоресценции аннексин V (mean)

В группах миелобластных ОЛ экспрессия аннексин V на лимфоцитах периферической крови была достоверно выше по сравнению с бластными клетками в под-

группах М1-М2, М4-М5 подвариантами лейкоза ($p < 0,05$, $t = 11.2$), в то время как в группах с М3 и М7 подвариантами достоверных различий выявлено не было. Высокая

экспрессия annexin-V на лимфоцитах может сигнализировать о более неблагоприятном течении заболевания ввиду ускоренного выхода лимфоцитов из участия в противоопухолевом иммунитете. В дальнейшем, мы предполагаем проанализировать клиническое течение заболевания с экспрессией маркеров апоптоза. При анализе интенсивности флуоресценции (mean) аннексина достоверных различий определено не было.

Таким образом, анализ раннего маркера апоптоза у больных с ОЛЛ и ОМЛ показывает, что на лимфоцитах периферической крови данный антиген экспрессируется выше, чем на опухолевых клетках. Подобная картина наблюдалась и в отношении интенсивности флуоресценции.

Анализ экспрессии белка p53. При анализе экспрессии белка p53 на лимфоцитах периферической крови

и бластных клетках при различных подвариантах ОЛ выявлена достоверная усиление экспрессии данного маркера только лимфоцитах периферической крови пациентов с В4 подвариантом по сравнению с лимфоцитами других групп. Такая же закономерность наблюдалась и при сравнении экспрессии p53 на бластных клетках. ($p < 0,05$; $t > 2,2$) (рисунок 5, табл. 1).

Среди Т-ОЛЛ достоверной разницы в экспрессии белка p53 не выявлено ($3,0 \pm 1,5\%$ и $4,2 \pm 3,1\%$, соответственно), ($p < 0,05$; $t > 2,2$). В группах с ОМЛ достоверная разница также не выявлена (таблица 1). Оценка интенсивности флуоресценции не выявила существенных различий в исследуемых группах. Следовательно, можно предположить, что маркер p53 не является функционально значимым для данного исследования (рисунок 5).

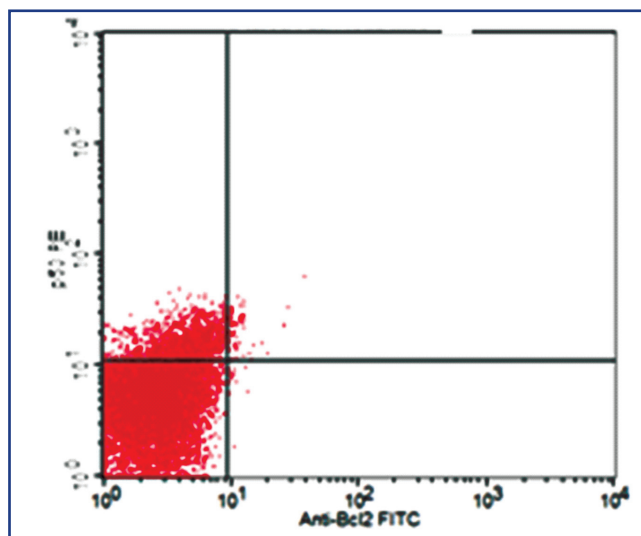


Рисунок 5 – Дот-плот экспрессии маркера Bcl-2 и белка p53

Анализ экспрессии антиапоптотического маркера Bcl-2. Полученные результаты свидетельствуют, что на лимфоцитах периферической крови больных до начала лечения экспрессия данного маркера была достоверно ниже, чем на лимфоцитах здоровых пациентов во всех группах, за исключением вариантов М1-М2 (в этой группе экспрессия Bcl-2 не отличалась от показателей контрольной группы).

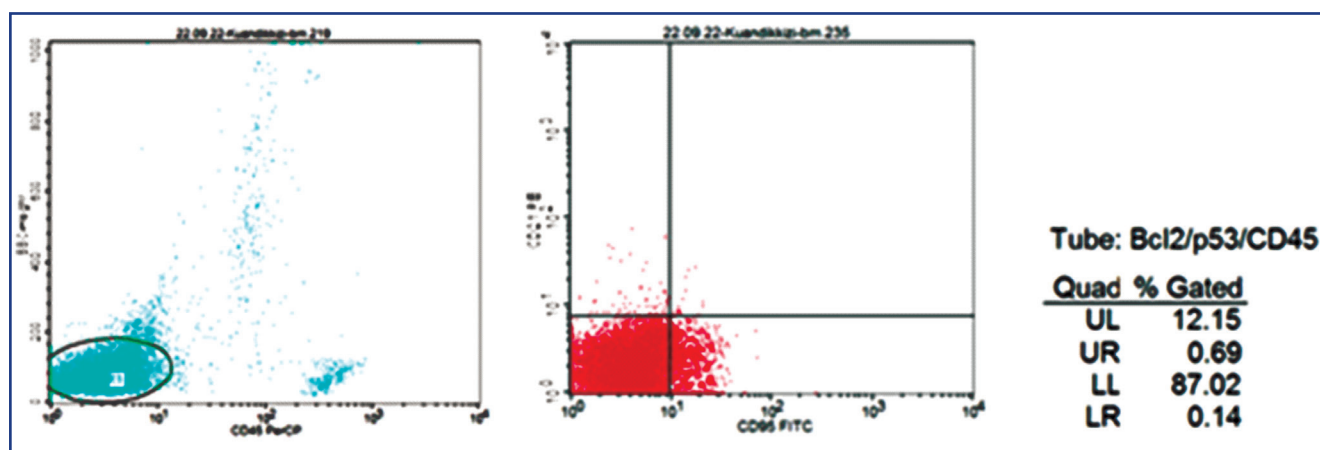
Сравнительный анализ этого маркера на лимфоцитах внутри групп показал, что наиболее высокая экспрессия наблюдалась у подтипов М1-М2, что, на наш взгляд, является прогностически благоприятным признаком, так как указывает на сохранение определенной функциональной активности лимфоцитов при ОМЛ. В различных вариантах В-ALL экспрессия Bcl-2 в популяции бластных клеток существенно не отличалась, но была значительно выше, чем у пациентов с Т-ОЛЛ.

В группе с ОМЛ на лимфоцитах периферической крови больных минимальная экспрессия bcl-2 была выявлена при М3 варианте, максимальная экспрессия bcl-2 - при М1-М2. На бластных клетках максимальная экспрессия Bcl-2 регистрировалась при М3. Широкий диапазон уровня экспрессии Bcl-2 в группе пациентов с ОМЛ по сравнению с ОЛЛ, вероятно, обусловливается происхождением бластов из разных ростков кроветворения (миелоцитарного и лимфоцитарного). При этом становится ясным, что Bcl-2 в большей сте-

пени может иметь прогностическое значение именно при ОМЛ. Сопоставление результатов экспрессии данного показателя между всеми исследуемыми группами продемонстрировало, что минимальная экспрессия антиапоптотического маркера на бластных клетках отмечалась при Т3 ОЛЛ и М4-М5 ОМЛ, в то время как максимум был выявлен при М3 ОМЛ (рисунок 6).

Анализ экспрессии Fas-лиганда CD 95. Анализ экспрессии CD95 на лимфоцитах периферической крови внутри групп достоверных различий не выявил. При этом, следует отметить, что экспрессия CD95 на бластах при всех вариантах лейкоза была достоверно ниже, чем на лимфоцитах периферической крови этих пациентов.

Увеличено процентное содержание антигена в группе с В2 ($8,1 \pm 2,7\%$) в сравнении с В1, В3, В4 подвариантами (таблица 1). Внутри групп пациентов с Т-ОЛЛ достоверной разницы в экспрессии поверхностного маркера CD95 на бластах не выявлено. Среди ОМЛ экспрессия лиганда CD95 была достоверно выше при М4-М5 вариантах в сравнении с другими, при М7 варианте экспрессия CD95 на бластах была минимальной, достоверно ниже по сравнению с другими вариантами ОМЛ. В сводной таблице 1 по вариантам (В, Т, миело) наибольший показатель экспрессии маркера CD95 выявлен в группе М4-М5 ОЛ ($t = 4,0$, $p < 0,001$) (рисунок 6). Средняя интенсивность флуоресценции также была выше в группе пациентов с ОМЛ ($16,4 \pm 13,2$ у.е.).



Легенда: Gated – область клеток, Quad – квадрант

Рисунок 6 – Стратегия гейтирования: 1) выделение гейта бластной популяции, 2) выявление экспрессии антигенов Bcl-2 и белка p53

Обсуждение: Как известно, апоптоз является основным механизмом, с помощью которого большинство химиотерапевтических средств вызывают гибель опухолевых клеток. С большей долей вероятности можно предположить, что баланс экспрессии (аннексин V, CD95, p53) и антиапоптотического белка (Bcl-2) может контролировать реакцию лейкозных клеток на химиотерапию и впоследствии влиять на прогноз пациента. Следовательно, задачей данного исследования было определить какой из указанных маркеров будет обладать прогностической значимостью для изучаемых вариантов лейкозов.

Данное исследовательское направление является относительно новым, поэтому в доступной литературе имеется лишь ряд работ, определяющих функциональную значимость маркеров апоптоза в прогнозировании течения и ответа на терапию пациентов с онкологическими и онкогематологическими заболеваниями. В представленной работе нами были получены данные, которые частично соответствовали уже имеющимся результатам.

Так, в ходе работы была выявлена высокая экспрессия маркера раннего апоптоза – аннексин V на лимфоцитах здоровых пациентов, что не соответствует данным литературы, где экспрессия аннексин V в популяции здоровых гораздо ниже. Данный результат указывает на необходимость проведения более масштабных исследований на большей популяционной выборке. При этом интенсивность флуоресценции аннексина на лимфоцитах в популяции здоровых достоверно ниже по сравнению с интенсивностью флуоресценции на лимфоцитах пациентов с лейкозом. Вероятно, для аннексин V более специфичным показателем будет в дальнейшем считаться интенсивность флуоресценции. В доступной литературе мы не встретили работ, освещающих изменения интенсивности флуоресценции. Кроме того, сравнительный анализ экспрессии аннексин V на лимфоцитах (объединенный показатель всех групп лимфобластных лейкозов – 63.8%) и бластах (44.3%) выявил, что на лимфоцитах данный маркер был экспрессирован достоверно больше, нежели, чем в бластной популяции, что являетсястораживающим признаком в отношении угнетения противоопухолевого иммунитета. При миелобластных лейкозах на

лимфоцитах экспрессия аннексин V составила (58%), тогда как на бластных клетках 45.4%, однако данные различия не были достоверными. При рассмотрении экспрессии аннексина внутри подвариантов лейкозов достоверных различий также выявлено не было, следовательно данный маркер не проявил выраженной специфичности и не может быть рекомендован в качестве прогностического с целью мониторинга и прогнозирования течения патологического процесса.

Сравнительный анализ экспрессии белка p53 на поверхности лимфоцитов и бластных клеток достоверных различий при различных вариантах лейкозов не выявил. В имеющихся публикациях представлены данные иммуногистохимических исследований солидных опухолей (рак яичников, легкого и т.д.), при которых данный маркер проявляет определенную диагностическую значимость [20]. В нашем исследовании достоверных различий экспрессии p53 выявлено не было, возможно данный маркер более специфичен для опухолевых клеток солидных опухолей. Тем не менее, не исключается вероятность отсутствия достоверных изменений по причине малого размера групп с редкими подвариантами лейкозов, в связи с чем существует необходимость дальнейшего исследования данного маркера.

Исследование экспрессии белка Bcl-2 на лимфоцитах и на бластных клетках при В-клеточных вариантах достоверных различий не выявило, тогда как при Т-клеточном варианте на лимфоцитах периферической крови данный маркер экспрессировался в достоверно большем количестве, нежели на бластах. При ОМЛ экспрессия Bcl-2 была достоверно выше на бластной популяции клеток, по сравнению с лимфоцитами, что может являться одним из механизмов «избегания опухоли иммунологического надзора». Являясь антиапоптотическим маркером, Bcl-2 способствует удлинению сроков жизнеспособности бластной популяции, обуславливая феномен «иммортализации». В то же время, А. Сахуаді и соавт. [21] не обнаружили корреляции между экспрессией Bcl-2 и как ответом на индукционную химиотерапию, так и частоту рецидивов при ОЛЛ что указывает на то, что уровни экспрессии Bcl-2 имеют довольно низкую прогностическую значимость. При этом, достаточно неожиданным оказал-

ся факт, что все образцы клеток, которые показали хороший ответ на начальную терапию преднизолоном, показали значительно более высокую экспрессию Bcl-2, чем те, которые плохо реагировали. Таким образом, высокие уровни экспрессии Bcl-2 в ALL могут указывать на зависимость выживания опухолевых клеток *in vivo* от цитокинов. Известно, что глюкокортикоиды оказывают мощное противовоспалительное действие из-за подавления экспрессии генов цитокинов [22], лечение преднизолоном *in vivo* может привести к общему снижению выработки цитокинов. Таким образом, интересно предположить, что индуцированное преднизолоном снижение экспрессии цитокинов может быть причиной благоприятной реакции для бластных клеток (снижение интенсивности апоптоза) на преднизолон во ВСЕХ образцах клеток с высоким уровнем экспрессии Bcl-2. Результаты исследования экспрессии Bcl-2 при ОЛЛ позволяют предположить, что уровни экспрессии Bcl-2 могут быть выше у пациентов с благоприятным ответом на лечение [23]. Ввиду отсутствия опубликованных результатов сравнительного анализа экспрессии апоптотических аннексин-V, p53, CD95 и антиапоптотического Bcl-2 маркеров на лейкоэмических клетках и лимфоцитах, для установления диагностической значимости каждого маркера, необходимо сопоставить уровень экспрессии с клиническим течением заболевания в каждом индивидуальном случае, что и определит направление дальнейших исследований.

Согласно результатам проведенных исследований установлено, что наиболее диагностически значимые изменения были показаны при сравнительном анализе экспрессии CD95 на лимфоцитах и бластной популяции. Для любой формы ОЛЛ, любого подварианта Т-ОЛ и В-ОЛ экспрессия CD95 на лимфоцитах периферической крови была достоверно выше, чем на популяции бластов. Полученные результаты согласуются с данными А.Ю. Вaryshnikov и соавт., которые показали, что экспрессия CD95 в бластных клетках является благоприятным прогностическим признаком, связанным с увеличением безрецидивной и общей выживаемости. Напротив, отсутствие антигена CD95 в бластах является неблагоприятным признаком для развития заболевания. Таким образом, мониторинг CD95 экспрессия и функция CD95 во время химиотерапии *in vivo* могут помочь в дальнейшем определить прогностическую значимость CD95 для индуцированно-го лекарственными препаратами апоптоза у всех пациентов. При ОМЛ достоверных различий выявлено не было, что свидетельствует о функциональной сохранности лимфоцитов, однако такой фактор, как малое количество пациентов, мог повлиять на полученные результаты.

Заключение: Результаты проведенных исследований указывают на наличие прогностической значимости Bcl-2 и CD95 при остром лейкозе. Необходимо проведение дальнейших исследований данных видов молекул с включением их в стандартную панель иммунофенотипирования при лейкозах с целью выявления благоприятного и/или неблагоприятного прогностического значения при ОЛЛ у детей. Annexin V и p53 не выявили достоверной чувствительности и специфичности, что позволяет не включать данные маркеры в панель иммунофенотипирования лейкозов.

Список использованных источников:

1. Ходунова Е.Е. Исследование маркеров программированной клеточной гибели (Bcl-2, Bax, p53 и CD95): дис. – Москва: ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, 2013. – 117 с. [Hodunova E.E. Issledovanie markerov programirovannoy kletочноy gibeli (Bcl-2, Bax, r53 i CD95): dis. – Moskva: FGBU NMIC gematologii Minzdrava Rossii, 2013. – 117 s. (in Russ.)]. <https://www.disscat.com/content/issledovanie-markerov-programmirovannoi-kletочноy-gibeli-bcl-2-bax-p53-i-cd95-v-period-indu>
2. Паровичникова Е.Н., Ходунова Е.Е., Гальцева И.В., Куликов С.М., Троицкая В.В., Кузьмина Л.А., Щепляков Д.В., Савченко В.Г. Маркеры апоптоза в CD34-позитивных клетках при острых лейкозах // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2013. – №4(6). – С. 373-378. [Parovichnikova E.N., Hodunova E.E., Gal'ceva I.V., Kulikov S.M., Troickaya V.V., Kuz'mina L.A., Shcheplyakov D.V., Savchenko V.G. Markery apoptoza v CD34-pozitivnyh kletkah pri ostryh lejkozah // Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika. – 2013. – Vol 4(6). – P. 373-378. (in Russ.)]. <https://old.bloodjournal.ru/markery-apoptoza-v-cd34-pozitivnyh-kletkah-pri-ostryh-lejkozah/>
3. Newton K., Strasser A., Kayagaki N., Dixit V.M. Cell death // Cell. – 2024. – Vol. 187(2). – P. 235-256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.11.044>
4. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals // Braz. J. Biol. – 2021. – Vol. 81(4). – P. 1133-1143. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437>
5. Nagata S., Tanaka M. Programmed cell death and the immune system // Nat. Rev. Immunol. – 2017. – Vol. 17(5). – P. 333-340. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.153>
6. McBride A., Houtmann S., Wilde L. The Role of Inhibition of Apoptosis in Acute Leukemias and Myelodysplastic Syndrome // Front Oncol. – 2019. – Vol. 9. – P. 192. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00192>
7. Ling V.Y., Straube J., Godfrey W., Haldar R., Janardhanan Y., Cooper L., Bruedigam C., Cooper E., Tavakoli S.P., Jacquelin S., Tey S.K., Baell J., Huang F., Jin J., Zhao Y., Bullinger L., Bywater M.J., Lane S.W. Targeting cell cycle and apoptosis to overcome chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia // Leukemia. – 2023. – Vol. 37(1). – P. 143-153. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01755-2>
8. Qian S., Wei Z., Yang W., Huang J., Yang Y., Wang J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy // Front. Oncol. – 2022. – Vol. 12. – P. 985363. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.985363>
9. Hussar P. Apoptosis Regulators Bcl-2 and Caspase-3 // Encyclopedia. – 2022. – Vol. 2(4). – P. 1624-1636. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2040111>
10. Wang H., Guo M., Wei H. Targeting P53 pathways: mechanisms, structures and advances in therapy // Sig. Transduct. Target Ther. – 2023. – Vol. 8. – P. 92. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01347-1>
11. Neophytou C.M., Trougakos I.P., Erin N., Papageorgis P. Apoptosis Deregulation and the Development of Cancer Multi-Drug Resistance // Cancers. – 2021. – Vol. 13(17). – P. 4363. <https://doi.org/10.3390/cancers13174363>
12. Ebian H.F., El-korashi L.A., Embaby A. Spontaneous apoptosis and BCL2 gene expression as predictors of early death and short overall survival in acute leukemia patients: a prospective, case cohort study // Egypt J. Med. Hum. Genet. – 2021. – Vol. 22. – P. 91. <https://doi.org/10.1186/s43042-021-00210-8>
13. Levoine N., Jean M., Legembre P. CD95 Structure, Aggregation, and Cell Signaling // Front Cell Dev Biol. – 2020. – Vol. 8. – P. 314. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00314>
14. Hanna J.R.A. Expression of CD95 in Acute Lymphocytic Leukemia (ALL) in Egyptian Children before and after Treatment // J. Blood Disorders Trans. – 2015. – Vol. 6. – P. 250. <https://doi.org/10.4172/2155-9864.1000250>
15. Qadir A.S., Ceppi P., Brockway S., Law C., Mu L., Khodarev N.N., Kim J., Zhao J.C., Putzbach W., Murmann A.E., Chen Z., Chen W., Liu X., Salomon A.R., Liu H., Weichselbaum R.R., Yu J., Peter M.E. CD95/Fas Increases Stemness in Cancer Cells by Inducing a STAT1-Dependent Type I Interferon Response // Cell Rep. – 2017. – Vol. 18(10). – P. 2373-2386. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.037>
16. Akin D.F., Ozkan Didem T., Nejatd K.E.A. Screening of single nucleotide polymorphism in CD95 (APO-1/FAS) promoter region (G-1377A) in children with acute leukemia // The Egyptian Journal of Haematology. – 2018. – Vol. 43(2). – P. 45-48. <https://doi.org/10.4236/oalib.1104385>

17. Tiribelli M., Michelutti A, Cavallin M, Di Giusto S, Simeone E, Fanin R, Damiani D. BCL-2 Expression in AML Patients over 65 Years: Impact on Outcomes across Different Therapeutic Strategies // J. Clin. Med. – 2021. – Vol. 10(21). – P. 5096. <https://doi.org/10.3390/jcm10215096>

18. Ahmadzadeh A., Hossein Mohammadi M., Mezginezhad F., Aghae N.H., Parkhideh S., Khosravi M., Khazaei Z., Adineh H.A., Allahbakhshian F.M. The expression of the TP53 gene in various classes of acute myeloid leukemia // WCRJ. – 2018. – Vol. 5(4). – P. e1178. https://doi.org/10.32113/wcrj_201812_1178

19. Saddam M., Paul S.K., Habib M.A., Fahim M.A., Mimi A., Islam S., Paul B., Helal M.M.U. Emerging biomarkers and potential therapeutics of the BCL-2 protein family: the apoptotic and anti-apoptotic context // Egypt J. Med. Hum. Genet. – 2024. – Vol. 25. – Art. no. 12. <https://doi.org/10.1186/s43042-024-00485-7>

20. Pundir D.S., Pundir C.S. Detection of tumor suppressor protein p53 with special emphasis on biosensors // Analyt. Biochem. – 2020. – Vol. 588. – Art. no. 113473. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113473>

21. Cahyadi A., Ugrasena I.D.G., Andarsini M.R., Larasati M.C.S., Aryati A., Arumsari D.K. Relationship between Bax and Bcl-2 Protein Expression and Outcome of Induction Phase Chemotherapy in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2022. – Vol. 23(5). – P. 1679-1685. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.5.1679>

22. Huang P., Sun R., Xu C. Glucocorticoid activates STAT3 and NF- κ B synergistically with inflammatory cytokines to enhance the anti-inflammatory factor TSG6 expression in mesenchymal stem/stromal cells // Cell Death Dis. – 2024. – Vol. 15. – P. 70. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.03.005>

23. Erkmén T., Serdar B.S., Ates H., Korkmaz M., Koçtürk S. Borax Pentahydrate and Disodium Pentaborate Decahydrate Are Candidates as Anti-leukemic Drug Components by Inducing Apoptosis and Changing Bax/Bcl-2 Ratio in HL-60 Cell Line // Biol. Trace Elem. Res. – 2022. – Vol. 4(200). – P. 1608-1616. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-021802-2>

АНДАТПА

БАЛАЛАРДАҒЫ ЖЕДЕЛ ЛЕЙКОЗДАРДАҒЫ ПЕРИФЕРИЯЛЫҚ ҚАН ЛИМФОЦИТТЕРІНДЕ ЖӘНЕ БЛАСТ ЖАСУШАЛАРЫНДА АПОПТОЗ МАРКЕРЛЕРІНІҢ ЭКСПРЕССИЯСЫН ТАЛДАУ

М.Г. Булегова¹, С. С. Салиева¹, А. Шерезданова¹, А. Дунаева¹

¹"Педиатрия және балалар хирургиясы ғылыми орталығы" АҚ, Алматы, Қазақстан Республикасы

Өзектілігі: оЖедел лейкоз емнің тиімді тәсілдерін және емнің барысын болжау әдістерін іздеу онкогематологияның өзекті мәселесі. Бұл саладағы перспективалық бағыт химиотерапия барысында жасуша бетіндегі молекулалық маркерлер экспрессиясының өзгеруін зерттеу болып табылады.

Зерттеудің мақсаты – алғаш рет анықталған жедел лейкозы бар науқастарда перифериялық қан лимфоциттерінде және сүйек кемігінің бласт жасушаларында аннексин V, Bcl-2, CD95, p53 ақуыздарының экспрессиясын зерттеу.

Әдістері: Зерттеу дизайны – көлденең. Зерттеу әдісі: иммунофенотиптеу. Зерттеу материалдары 1 айдан 16 жасқа дейінгі "жедел лейкоз" диагнозы қойылған 106 пациенттің перифериялық қаны мен сүйек кемігі (зерттеу тобы) және 2 жасқа дейінгі шартты түрде сау 23 баланың перифериялық қаны (бақылау тобы) болды. Алынған мәліметтер статистикалық өңдеуден өтті.

Зерттеу нәтижелері: В-жасушалы жедел лейкоздарда BCL-2 экспрессиясын зерттеу сенімді айырмашылықтарды анықтаған жоқ, перифериялық қан лимфоциттеріндегі Т-жасушалы лейкоздарда бұл маркер бласттарға қарағанда сенімді түрде көбірек көрсетілді. Жедел миелобластты лейкозда BCL-2 экспрессиясы лимфоциттермен салыстырғанда бласттар популяциясында айтарлықтай жоғары болды. CD95 экспрессиясы лимфобластты лейкоздарда бласт жасушаларының мембранасына қарағанда перифериялық қан лимфоциттерінде айтарлықтай жоғары болды. Аннексин V экспрессиясын талдау ерте апоптоз маркерінің экспрессиясы лимфоциттерде жоғары екенін анықтады. Бұл ісікке қарсы иммунитеттің төмен екенін көрсететін белгі. Лимфоциттер мен бласт жасушаларының бетіндегі p53 ақуызының экспрессиясын салыстырмалы талдау лейкоздың әртүрлі варианттарында сенімді айырмашылықтарды анықтаған жоқ.

Қорытынды: Жүргізілген зерттеудің нәтижесі жедел лейкоз кезінде BCL-2 және CD95 болжамдық маңыздылығының болуын көрсетті. Аннексин V және p53 сенімді сезімталдық пен ерекшелікті анықтаған жоқ, бұл лейкоздың иммунофенотиптік панеліне осы маркерлерді қоспауға мүмкіндік береді.

Түйінді сөздер: жедел лейкоз, бласт жасушалар, апоптоз маркерлері, Bcl-2, CD95.

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF APOPTOSIS MARKERS ON PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AND BLAST CELLS IN ACUTE LEUKEMIA IN CHILDREN

M. Bulegenova¹, S. Saliyeva¹, A. Sherezdanova¹, A. Dunayeva¹

¹Scientific Center of Pediatrics and Pediatric Surgery, Almaty, the Republic of Kazakhstan

Relevance: A topical issue of oncohematology is the search for effective approaches to therapy and methods of predicting the course of acute leukemia. A promising direction in this field is the study of changes in the expression of molecular markers on the cell surface in the dynamics of chemotherapy.

The study aimed to determine the expression level of proteins annexin V, Bcl-2, CD95, and p53 on peripheral blood lymphocytes and leukemic bone marrow cells in children diagnosed with acute leukemia.

Methods: the study design was cross-sectional. Research method: immunophenotyping. Peripheral blood and bone marrow of 106 patients with acute leukemia diagnosed for the first time at 1 month to 16 years (study group) and peripheral blood of 23 conditionally healthy children aged 2 to 17 years (control group) served as the study materials. The obtained data were subjected to statistical processing.

Results: The study of Bcl-2 expression in B-ALL did not reveal reliable differences; in T-ALL, Bcl-2 expression was significantly higher on peripheral blood lymphocytes than on blasts. In OML, Bcl-2 expression was significantly higher in the blast cell population than in lymphocytes. When CD95 expression was analyzed in ALL, expression was significantly higher on peripheral blood lymphocytes than on the membrane of leukemic cells. The results of the analysis of the expression of annexin V showed that lymphocytes expressed a marker of early

apoptosis significantly more than bone marrow blasts. This phenomenon is a dangerous sign indicating a decrease in antitumor immunity. Comparative analysis of p53 protein expression on the surface of lymphocytes and blast cells showed no significant differences in leukemia variants.

Conclusion: The study indicated the prognostic significance of Bcl-2 and CD95 in acute leukemia. Annexin V and p53 did not show reliable sensitivity and specificity, which allows not to include these markers in the leukemia immunophenotyping panel.

Keywords: acute leucosis, blast cells, markers of apoptosis, Bcl-2, CD95.

Прозрачность исследования: Авторы несут полную ответственность за содержание данной статьи.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Данная работа финансировалась в рамках научно-технической программы №BR11065390 “Разработка инновационных технологий ранней диагностики и лечения злокачественных заболеваний с учетом современных подходов геномики”.

Вклад авторов: вклад в концепцию, интерпретация заявленного научного исследования – Булегенова М.Г., Дунаева А., Шерезданова А.А.; научный дизайн – Булегенова М.Г., Салиева С.С.; исполнение заявленного научного исследования – Дунаева А., Шерезданова А.А.; создание научной статьи – Булегенова М.Г., Салиева С.С., Дунаева А.

Сведения об авторах:

Булегенова М.Г. – д.м.н., профессор, заведующий клинико-диагностической лабораторией АО «Научный центр педиатрии и детской хирургии», Алматы, Республика Казахстан, тел. +77017220183, e-mail: mbulegenova@yandex.kz, ORCID ID: 0000-0002-7195-5926;

Салиева С.С. (корреспондирующий автор) – PhD, врач отделения онкологии/гематологии №2 АО «Научный центр педиатрии и детской хирургии», Алматы, Республика Казахстан, тел. +77072890102, e-mail: symbatsaliyeva@gmail.com, ORCID ID: 0000-0003-0262-8515;

Дунаева А. – врач-лаборант клинико-диагностической лаборатории АО «Научный центр педиатрии и детской хирургии», Алматы, Республика Казахстан, тел. 87475938655, e-mail: dunaeva-angelina2001@mail.ru, ORCID ID: 0009-0006-5204-4605;

Шерезданова А.А. – врач-лаборант клинико-диагностической лаборатории АО «Научный центр педиатрии и детской хирургии», Алматы, Республика Казахстан, тел. 87014964790, e-mail: sherezdanova.a@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-5430-7636

Адрес для корреспонденции: Салиева С.С., АО «Научный центр педиатрии и детской хирургии», ул. Аль-Фараби 146, Алматы 050000, Республика Казахстан.