ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Результаты работы основаны на исследовании величины энергии таксиса лейкоцитов (ЭТЛ) периферической крови и костного мозга у 60 больных хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ). Контрольными группами были 110 здоровых людей (доноров станции переливания крови) и 16 больных острым миелобластным лейкозом (ОМЛ). В работе использована оригинальная методика оценки функционального состояния лейкоцитов по величине ЭТЛ, разработанная Т. Ф. Шевченко и А. Б. Песковым.

В физиологических условиях, а также при многих патологических состояниях основную массу клеток периферической крови составляют клетки миелоидного ряда, в частности нейтрофилы и их молодые формы.

Общеизвестно, что лейкоциты участвуют в различных воспалительных процессах, неспецифических и иммунных реакциях сопротивляемости организма. Нейтрофилы как основные клетки, эффекторы острой фазы воспаления, продуцируют биологически активные вещества, оказывающие на ткани преимущественно цитопатическое и деструктивное воздействие.

Изменяя свою численность в периферической крови, функциональные и морфологические качества, лейкоциты существенно влияют на течение патологического процесса. Количество лейкоцитов периферической крови, оценка степени их функциональной активности в клинической практике являются критериями течения патологического процесса. Лейкоциты являются «странствующими» клетками. Большой подвижностью обладают зрелые формы нейтрофилов, моноцитов и в меньшей степени их молодые формы. Двигательная активность лейкоцитов связана с их энергетическим потенциалом, обеспечиваемым сложными биохимическими превращениями в клетке, в основном за счет гликолиза и окислительного фосфорилирования углеводов [1].

Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) – опухоль, развивающаяся из ранних клеток миелоидного ряда. Клеточным субстратом лейкоза являются преимущественно гранулоциты, в основном нейтрофилы.

В связи с этим представлялось небезынтересным изучение функциональной активности лейкоцитов периферической крови (ПК) и костного мозга (КМ) у больных в различные фазы течения ХМЛ. Более того, в клинической практике до настоящего времени были и остаются актуальными вопросы прогнозирования течения и оценки эффективности лечения лейкозов [1–7].

Материал и методы

Функциональное состояние лейкоцитов ПК и КМ исследовалось методом, основанном на определении энергии таксиса лейкоцитов (ЭТЛ) [1, 5, 6].

Сущность методики определения ЭТЛ заключалась в следующем.

Кровь пациента, взятая из локтевой вены утром натощак, набиралась в пробирку с гепарином в количестве 2 мл. В последующем эта кровь из

пробирки набиралась в капилляры, которые помещались в ячейки специального аппарата, совмещающего в себе одновременно термостат и центрифугу. Капилляры с кровью инкубировались в аппарате в течение суток. К концу срока инкубирования на открытом конце капилляра формировалось лейкоцитарное «облако», представляющее собой скопление лейкоцитов. Размер данного «облака» находится в прямой зависимости от двигательной активности клеток, которая, в свою очередь, определяется их энергетической способностью. В норме лейкоциты двигаются хаотично, в нашем же исследовании лейкоцитам придавалось прямолинейное движение за счет вращения в центрифуге со скоростью 1500 оборотов в минуту. Величина ЭТЛ рассчитывалась по специальной формуле и выражалась в джоулях (Дж). Наряду с определением величины показателя ЭТЛ, определялся градиент «ЭТЛ костного мозга – ЭТЛ периферической крови», формула расчета которого представлена ниже:

$$\xrightarrow{Grad} \text{ЭТЛ} \frac{\text{ЭТЛ}_{\text{КМ}} - \text{ЭТЛ}_{\text{ПК}}}{\text{ЭТЛ}_{\text{КМ}}} \cdot 100\%,$$

где $\text{ЭТЛ}_{\text{КМ}}$ – энергия таксиса лейкоцитов костного мозга; $\text{ЭТЛ}_{\text{ПК}}$ – энергия таксиса лейкоцитов периферической крови.

Абсолютное значение показателя, выражающегося в единицах измерения, отражает направленность вектора. При значении показателя меньше 0 вектор градиента направлен из ПК в КМ, при положительном значении показателя – из КМ в ПК.

Исследования проведены у 60 больных хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ), из них 28 женщин, 32 мужчины, возраст варьировался от 20 до 60 лет. Средняя продолжительность течения ХМЛ с момента постановки диагноза $12,6 \pm 4,5$ месяца.

У всех больных, взятых под наблюдение, клиническое течение заболевания было типичным – с гепатоспленомегалией различной степени выраженности, гиперлейкоцитозом, умеренной бластемией, эозинофильно-базофильной ассоциацией, тромбоцитозом или тромбоцитопенией.

Первая (хроническая) фаза отмечалась у 30 больных, вторая стадия (фаза акселерации) ХМЛ – у 14 пациентов, третья (терминальная) стадия – у 16 больных. Все пациенты получали химиотерапию, адекватную диагнозу, фазе, стадии болезни, в частности в фазу акселерации – монокимиотерапию гидреа, в фазу бластного криза – курсы полихимиотерапии (ПХТ).

Контрольные группы составили 110 здоровых лиц (доноров станции переливания крови) и 16 больных острым миелобластным лейкозом (ОМЛ). Длительность заболевания ОМЛ с момента постановки диагноза составила от 1 до 3 месяцев. Диагноз ХМЛ и ОМЛ подтверждался комплексом клинико-лабораторных, цитохимических и морфологических исследований. Больные ХМЛ и ОМЛ с инфекционными осложнениями исключались из исследований, т.к. последние могли повлиять на результаты определения величины ЭТЛ, а следовательно, и функциональной активности лейкоцитов.

Статистическая обработка цифрового материала выполнена с использованием персонального компьютера с помощью пакета Statistika 6.0.

Результаты и обсуждение

У практически здоровых людей показатель ЭТЛ_{ПК} составил $3,33 \pm 0,33 \times 10^{-14}$ Дж. Эта величина не зависит от пола исследуемых лиц, но зависит от возраста. Разделив исследуемых лиц на три возрастные подгруппы: до 30 лет, от 31 до 40 лет и от 41 до 60 лет и старше, оказалось, что в возрастной группе от 41 года и старше показатель ЭТЛ составил $4,62 \pm 1,01 \times 10^{-14}$ Дж ($p < 0,05$).

Были проанализированы результаты исследования ЭТЛ_{ПК} у больных ХМЛ в зависимости от фазы заболевания. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

Энергия таксиса лейкоцитов периферической крови у больных хроническим миелоидным лейкозом в различные фазы течения заболевания, у больных ОМЛ и здоровых лиц ($M \pm m$)

Фаза заболевания	M	n	m	p_1	p_2
Хроническая фаза	2,21	30	0,30	$>0,05$	$<0,05$
Фаза акселерации	2,90	14	0,82	$>0,05$	$>0,05$
Терминальная фаза	4,26	16	1,07	$<0,05$	$<0,05$
ОМЛ	6,28	16	0,99	$<0,05$	$<0,001$
Доноры	3,33	110	0,33		

Примечания: p_1 – статистическая достоверность между контрольной группой и группой больных; p_2 – статистическая достоверность между группами больных.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что в хроническую фазу показатель ЭТЛ оказался существенно меньше, чем у лиц контрольной группы. Напротив, у больных в фазу акселерации, в терминальную фазу и особенно у больных ОМЛ он был почти в два раза выше, чем у здоровых лиц.

В количественном отношении более значительными оказались результаты исследований ЭТЛ_{КМ} в различные фазы течения ХМЛ и ОМЛ. Так же, как и в ПК, показатель ЭТЛ_{КМ} в хроническую фазу был наиболее низким и, наоборот, наиболее высоким у больных ОМЛ. Показатель ЭТЛ_{КМ} в хроническую фазу составил $1,71 \pm 0,21 \times 10^{-14}$ Дж, в фазу акселерации – $4,81 \pm 0,82 \times 10^{-14}$ Дж, в терминальную фазу – $6,91 \pm 0,50 \times 10^{-14}$ Дж, и у больных ОМЛ – $7,29 \pm 0,41 \times 10^{-14}$ Дж. Заслуживающими внимания были результаты исследований ЭТЛ после химиотерапии. У больных ХМЛ в фазу акселерации показатель ЭТЛ_{ПК} с $2,90 \pm 0,82 \times 10^{-14}$ Дж уменьшился до $2,26 \pm 0,51 \times 10^{-14}$ Дж ($p > 0,05$). В терминальную фазу ХМЛ показатели ЭТЛ до и после химиотерапии были соответственно $4,26 \pm 1,27 \times 10^{-14}$ Дж и $3,47 \pm 0,78 \times 10^{-14}$ Дж ($p > 0,05$). У больных ОМЛ до лечения величина ЭТЛ была равна $6,28 \pm 0,99 \times 10^{-14}$ Дж, после лечения – $3,73 \pm 1,01 \times 10^{-14}$ Дж ($p < 0,001$). Как видно из приведенных выше данных, наиболее высокая эффективность лечения наблюдалась у больных ОМЛ и менее эффективной у больных ХМЛ в фазу акселерации и терминальную фазу, что, по-видимому, объясняется увеличением в клоне лейкозных клеток, рефрактерных к цитостатическим препаратам.

Несколько отличались от предыдущих результаты исследований величины ЭТЛ костного мозга после проведенного курса ПХТ. Так, у больных ХМЛ в

фазу акселерации показатель ЭТЛ до лечения был $4,18 \pm 0,82 \times 10^{-14}$ Дж, после лечения $2,26 \pm 0,34 \times 10^{-14}$ Дж ($p < 0,001$). В терминальную фазу ХМЛ показатели ЭТЛ были соответственно $6,91 \pm 0,50 \times 10^{-14}$ Дж и $4,47 \pm 0,48 \times 10^{-14}$ Дж ($p < 0,001$). У больных ОМЛ до лечения величина ЭТЛ была $7,29 \pm 0,41 \times 10^{-14}$ Дж, после лечения – $4,55 \pm 0,94 \times 10^{-14}$ Дж ($p < 0,001$).

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что величина ЭТЛ у больных ХМЛ и ОМЛ может находиться в прямой зависимости от количества бластных и малодифференцированных клеток миелоидного ряда в периферической крови и костном мозге. Процессу «наводнения» периферической крови лейкозными клетками, на наш взгляд, способствует положительный градиент ЭТЛ «костный мозг – периферическая кровь». В хроническую фазу заболевания вектор градиента направлен из периферической крови в костный мозг и составил $0,44 \pm 0,27$ ед. В фазу акселерации градиент инвертировался, становясь направленным из костного мозга в периферическую кровь, и составил $0,30 \pm 0,19$ ед., в терминальную фазу заболевания он был также положительным и даже незначительно увеличился по сравнению с фазой акселерации и составил $0,36 \pm 0,16$. Проводимая химиотерапия вне зависимости от стадии заболевания приводила к снижению разности значения ЭТЛ в костном мозге и периферической крови, не инвертируя направленности вектора градиента ЭТЛ. При проведении химиотерапии в фазу акселерации ХМЛ градиент ЭТЛ снизился с $0,30 \pm 0,19$ до $0,18 \pm 0,17$; в терминальную фазу – с $0,36 \pm 0,16$ до $0,21 \pm 0,15$. Другими словами, во все фазы течения ХМЛ и ОМЛ до и после лечения сохранялась тенденция выхода лейкоцитов из костного мозга в периферическую кровь.

Выше отмечалось, что увеличение показателя ЭТЛ у больных в различные стадии заболевания и при ОМЛ объяснялось повышением в периферической крови и костном мозге количества бластных и молодых клеток миелоидного ряда. Для подтверждения этой точки зрения были проанализированы результаты исследований ЭТЛ у больных ХМЛ и ОМЛ в зависимости от уровня бластемии периферической крови и бластоза костного мозга за период наблюдения с момента поступления больных и до выписки их из стационара. Нарастанием бластемии считалось повышение процента содержания бластных клеток периферической крови и костного мозга как минимум на 20% за период наблюдения. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы показатель ЭТЛ периферической крови и костного мозга был наиболее высоким при количестве бластных клеток $>20\%$. Эти данные также свидетельствуют об однонаправленности нарастания показателей ЭТЛ в периферической крови и костном мозге.

Одним из гематологических признаков ХМЛ является также лейкоцитоз периферической крови, представленной различными по степени созревания клетками миелоидного ряда.

Были проанализированы результаты исследований величины ЭТЛ в зависимости от лейкоцитоза периферической крови.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что при увеличении лейкоцитоза на 20% и более у больных ХМЛ в хроническую фазу величина ЭТЛ возрастала с $1,71 \pm 0,21 \times 10^{-14}$ Дж до $2,88 \pm 0,19 \times 10^{-14}$ Дж ($p < 0,05$), в костном мозге соответственно $2,21 \pm 0,30 \times 10^{-14}$ Дж и $4,41 \pm 0,41 \times 10^{-14}$ Дж ($p < 0,05$). Наличие прямой зависимости между величиной ЭТЛ и лейкоцитозом указывает

на то, что в эту фазу ХМЛ периферическая кровь и костный мозг наряду с количественными изменениями претерпевают и определенные качественные сдвиги в лейкоцитарной формуле в сторону увеличения количества молодых клеток миелоидного ряда. Полученные результаты исследований согласуются в полной мере с градиентом ЭТЛ «костный мозг – периферическая кровь». Его величина $0,35 \pm 0,12$ ед. указывала на то, что направленность вектора была из костного мозга в периферическую кровь, т.е., другими словами, из костного мозга в периферическую кровь поступали клетки миелоидного ряда, среди которых определенную часть составляют бластные клетки. По сравнению с исходным уровнем у больных ХМЛ величина ЭТЛ периферической крови увеличилась на 80%, а в костном мозге почти в два раза. Следовательно, и увеличение лейкоцитоза в периферической крови, и увеличение показателя ЭТЛ у больных в хроническую фазу свидетельствуют о прогрессировании заболевания.

Таблица 2

Энергия таксиса лейкоцитов периферической крови и костного мозга у больных в зависимости от количества бластных клеток ($M \pm m$)

Количество бластных клеток	M	M_1	n	n_1	δ	δ_1	m	m_1	p	p_1
До 5%	2,21	1,71	30	28	0,85	0,57	0,30	0,21	<0,05	>0,05
От 6–20%	2,40	4,18	14	14	1,56	1,56	0,82	0,82	<0,05	<0,05
Больше 20%	3,56	6,06	7	7	2,64	1,91	1,95	1,41	<0,05	<0,05

Примечания: M – среднеарифметический показатель периферической крови; n – количество больных; m – среднее отклонение; p – статистическая достоверность, M_1 – среднеарифметический показатель костного мозга; n_1 – количество больных; m_1 – среднее отклонение; p_1 – статистическая достоверность.

Были сопоставлены показатели, характеризующие тяжесть состояния больных ХМЛ по Н. Д. Хорошко с величиной ЭТЛ периферической крови и костного мозга [8]. Результаты корреляционного анализа по Пирсону показали, что максимальная связь имеется между ЭТЛ_{ПК} и показателем тяжести состояния ($r = 0,67$), а также ЭТЛ_{КМ} и показателем тяжести состояния ($r = 0,64$), градиента ЭТЛ и показателя тяжести состояния ($r = 0,72$). Такой уровень корреляции можно расценить как высокий. Корреляция между величиной ЭТЛ и бластемией, величиной ЭТЛ и гепатомегалией, величиной ЭТЛ и спленомегалией была расценена как средняя. Установлен обратный низкий уровень корреляционной связи между величиной ЭТЛ и анемией, тромбоцитопенией и тромбоцитозом.

Приоритетность метода оценки степени тяжести течения ХМЛ и определения прогноза болезни с помощью исследования величины ЭТЛ зарегистрирована патентом РФ № 2241989 «Способ прогнозирования течения хронического миелоидного лейкоза» от 10 декабря 2004 г.

Безусловно, патофизиологические и биохимические механизмы изменений величины ЭТЛ при лейкозах нуждаются в дальнейшем изучении. Факт значительного нарастания величины ЭТЛ костного мозга и появление градиента ЭТЛ, направленного из костного мозга в периферическую кровь, создают предпосылки для более ранней диагностики прогрессирования опухолевого процесса при ХМЛ. В перспективе это может означать более раннее и,

возможно, более эффективное назначение цитостатической терапии в целях блокирования прогрессирования опухоли. Появление обратно направленного градиента ЭТЛ, предшествующее опустошению периферической крови, может быть использовано для более ранней терапии цитостатического синдрома и агранулоцитоза. Необходимо еще раз подчеркнуть, что в ряде случаев наблюдавшиеся нами изменения величины ЭТЛ_{км} и ЭТЛ_{пк} предшествовали морфологическим. Учитывая простоту и легкую воспроизводимость использования способа определения величины энергии таксиса лейкоцитов, мы считаем вполне обоснованным применение этого теста для скрининга течения ХМЛ. Предложенный нами метод определения величины энергии таксиса лейкоцитов в совокупности с другими клинико-гематологическими признаками заболевания позволяет определить фазу течения ХМЛ, степень риска развития прогрессирования заболевания, а также дать оценку эффективности цитостатической терапии. Еще до появления клинических признаков по величине ЭТЛ можно судить о развитии той или иной фазы течения заболевания. Риск развития прогрессирования ХМЛ тем выше, чем выше величина ЭТЛ костного мозга и чем больше градиент ЭТЛ «костный мозг – периферическая кровь».

Выводы

1. Тест определения величины энергии таксиса лейкоцитов костного мозга и периферической крови является достаточно информативным для оценки функционального состояния лейкоцитов периферической крови и костного мозга у больных хроническим миелоидным лейкозом.

2. Показатель величины энергии таксиса лейкоцитов прямо коррелирует с большинством общепринятых в лейкологии критериями оценки тяжести течения хронического миелоидного лейкоза.

3. Риск прогрессирования ХМЛ тем больше, чем выше величина энергии таксиса лейкоцитов костного мозга и чем больше градиент ЭТЛ «костный мозг – периферическая кровь».

4. Эффективная цитостатическая терапия больных ХМЛ сопровождалась снижением величины энергии таксиса лейкоцитов периферической крови и костного мозга, а также уменьшением величины градиента «костный мозг – периферическая кровь».

Список литературы

1. **Песков, А. Б.** Прогнозирование риска хронизации острых бронхитов методом оценки функциональной активности лейкоцитов : дис. ... канд. мед. наук / А. Б. Песков. – Караганда, 1996.
2. **Абдулкадыров, К. М.** Хронический миелолейкоз / К. М. Абдулкадыров, С. С. Бессмельцев, О. А. Рукавицын. – СПб. : Специальная литература, 1998.
3. **Воробьев, А. И.** Хронический миелолейкоз. Руководство по гематологии / А. И. Воробьев, М. Д. Бриллиант ; под. ред. А. И. Воробьева. – 2002. – Т. 1. – С. 156–159.
4. **Исаков, С. В.** Прогнозирование течения хронического миелолейкоза / С. В. Исаков, Т. Н. Стренева, А. Ф. Томилов // Гематология и трансфузиология. – 1985. – № 12. – С. 11–14.
5. Пат. Российской Федерации № 2241989. Способ прогнозирования течения хронического миелоидного лейкоза / А. Б. Песков, Р. Х. Булиева. – М., 2004.

6. **Туркина, А. Г.** Клиническое значение молекулярно-генетических и иммуно-фенотипических характеристик хронического миелолейкоза : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / А. Г. Туркина. – М., 1998. – С. 15–19.
7. **Туркина, А. Г.** Оценка прогностической значимости структуры локуса хромосомной транслокации t (9; 22) при хроническом миелолейкозе / А. Г. Туркина, Д. А. Домнинский, Е. С. Покровская [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 1993. – № 3. – С. 8–10.
8. **Хорошко, Н. Д.** Факторы прогноза при хроническом миелолейкозе / Н. Д. Хорошко // Тер. архив. – 1993. – № 7. – С. 23–28.