

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА Т-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ГЕМОБЛАСТОЗАМИ ПОСЛЕ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК

Н.В. Пронкина, В.С. Кожевников, И.А. Лисуков, А.Д. Кулагин, С.А. Сизикова, И.В. Крючкова, А.В. Гилевич

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

Проведен анализ изменений клеточного цикла и апоптоза в популяциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у пациентов с гемобластозами до и после аутологичной трансплантации периферических стволовых кроветворных клеток (ТПСКК). Показано, что апоптоз может играть решающую роль в ограничении скорости восстановления CD4⁺ Т-клеток, поскольку повышение пролиферативной активности сопровождается повышением апоптоза. Для CD8⁺ Т-клеток получена обратная зависимость: чем выше пролиферация, тем ниже апоптоз. Различное соотношение пролиферации и апоптоза, скорее всего, отражает различную скорость восстановления пула CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов после трансплантации. Через 3 мес после ТПСКК спонтанный апоптоз CD8⁺ Т-лимфоцитов в группе с неблагоприятным прогнозом был достоверно ниже, чем в группе пациентов с ремиссией. В группе с неблагоприятным течением в динамике наблюдения было выявлено снижение процента клеток в фазах SM как в популяции CD4⁺, так и в популяции CD8⁺ Т-лимфоцитов. На основании полученных данных можно предположить, что спонтанный апоптоз и SM-фазы клеточного цикла Т-лимфоцитов являются прогностически значимыми критериями эффективности ТПСКК.

CHANGES IN CELL CYCLE OF T-LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH HEMOBLASTOSIS AFTER AUTOLOGOUS GRAFTING OF PERIPHERAL STEM HEMOPOIETIC CELLS

N.V. Pronkina, V.S. Kozhevnikov, I.A. Lisukov, A.D. Kulagin, S.A. Sizikova, V.V. Kryuchkova, A.V. Gilevich

Research Institute of Clinical Immunology, SB RAMS, Novosibirsk

Changes in cell cycle and apoptosis in populations of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes for patients with hemoblastosis before and after autologous grafting of peripheral stem hemopoietic cells (GPSHC) were analyzed. Apoptosis was shown can play a critical role in the limitation of CD4⁺ T-cell recovery rate because the increase in proliferative activity was followed by the increase in apoptosis. The inverse correlation was observed for CD8⁺: the higher the proliferation the lower the apoptosis. The different correlation between proliferation and apoptosis most likely reflected the different rate of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes recovery after grafting. Spontaneous apoptosis of CD8⁺ T-lymphocytes 3 months after GPSHC was significantly lower in patients with unfavorable prognosis than in patients with remission. Patients with unfavorable prognosis demonstrated the reduction in the percentage of cells in SM phases for populations of both CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes. On the basis of data obtained it may be assumed that the spontaneous apoptosis and SM phases of cell cycle of T-lymphocytes are significant prognostic criteria for GPSHC efficiency.

Восстановление пула иммунокомпетентных клеток, в том числе Т-лимфоцитов, после воздействия химиотерапии или облучения происходит из стволовых кроветворных клеток путем их многократного деления и дифференцировки в зрелые клетки [1, 2, 5]. Другим важным механизмом, участвующим в регуляции численности клеток в физиологических процессах и при патологических состояниях, является программированная клеточная гибель — апоптоз [9]. В последние годы появились данные, продемон-

стрировавшие не только снижение показателей апоптоза Т-клеток у пациентов с гемобластозами после трансплантации костного мозга, но и взаимосвязь показателей апоптоза с течением заболевания [3, 10].

Исследование баланса пролиферации и апоптоза у больных гемобластозами в процессе восстановления Т-клеточного гомеостаза после аутологичной трансплантации периферических стволовых кроветворных клеток (ТПСКК) стало целью настоящей работы.

Материалы и методы

Было обследовано 23 человека — 12 мужчин и 11 женщин — в возрасте от 18 до 55 лет (из них с лимфомой В - 4, с ЛГМ - 2, с ОМА - 8, с ОЛЛ - 3 и с ММ - 6 человек), находящихся на лечении в клинике НИИ клинической иммунологии СО РАМН. Диагноз гемобластоза устанавливался в соответствии с международными протоколами, принятыми к работе в отделении гематологии клиники НИИ КИ СО РАМН.

Кровь для исследования показателей иммунитета забирали пять раз: до начала курса высокодозной полихимиотерапии (режим кондиционирования), непосредственно перед операцией, на первых этапах восстановления кроветворения после операции (1 мес после ТПСКК), через 3 мес после ТПСКК, через 6 мес после ТПСКК. Ретроспективно пациентов разделили на 2 группы: группа А — пациенты с летальным исходом и/или с рецидивом (8 человек) и группа В - пациенты с ремиссией (15 человек). Также было обследовано 20 условно-здоровых доноров той же возрастной группы. Забор крови у здоровых лиц на исследование произведен однократно.

Во всех группах определяли относительное количество клеток CD4⁺ и CD8⁺, а также непосредственно в популяциях CD4⁺ и CD8⁺ спонтанный апоптоз и фазы клеточного цикла. Лейковзвесь получали методом седиментации эритроцитов в растворе желатина. Клетки метили

поверхностными моноклональными антителами (Becton Dickinson), затем фиксировали параформальдегидом, пермеабилizировали Tween-20, инкубировали в РНКазе и фиксировали формалином с внутриядерным красителем 7AAD (Sigma) [7]. Пробы анализировали методом проточной цитофлуориметрии с помощью цитометра FACSCalibur (Becton Dickinson). Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Величины выражали в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое, а m — стандартная ошибка. Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью непараметрического критерия Вилкоксона - Манна - Уитни (U). Корреляционный анализ проводился методом ранговой корреляции по Спирману.

Результаты и обсуждение

В группе здоровых лиц относительное количество CD4⁺ Т-лимфоцитов в S- и M-фазах (SM) клеточного цикла было достоверно ниже, чем в двух группах пациентов ($p < 0,05$). Не было достоверности только с группой А через 6 мес после АТПСКК. Спонтанный апоптоз CD4⁺ лимфоцитов у доноров также был достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в группах больных. Количество CD8⁺ лимфоцитов в SM-фазах клеточного цикла у доноров было достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в группах больных в 3 первых временных точках. Количество CD8⁺ лимфоцитов, подверженных спонтанному апоптозу, у доноров достоверно отличалось от групп пациентов в нескольких временных точках (табл. 1).

При сравнении данных между группами пациентов были получены достоверные различия фаз SM клеточного цикла в популяциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов до режима кондиционирования. Мы получили различия между относительным количеством CD8⁺ клеток, подверженных спонтанному апоптозу, в группе А и в группе В через 3 мес после ТПСКК. При этом спонтанный апоптоз в группе пациентов с рецидивом был ниже, чем спонтанный апоптоз в группе пациентов с ремиссией (табл. 2). Достоверные различия были выявлены в двух группах пациентов в относительном количестве CD4⁺ и

Таблица 1

Относительное количество Т-лимфоцитов в разных фазах клеточного цикла в группе здоровых лиц

Показатели, %	Данные
CD4	35±1,59
CD4SM	3,5±0,65
CD4apo	0,12±0,069
CD8	26±2,08
CD8SM	3,2±0,72
CD8apo	0,22±0,085

CD8⁺ позитивных клеток через 1 мес после ТПСКК. Были получены и достоверные различия ряда показателей внутри обследованных групп. В группе В процент СГ54⁺-позитивных клеток был достоверно ниже через месяц после ТПСКК, в отличие от процента этих клеток до операции. В группе А таких изменений не было, но в этой группе наблюдалось достоверное повышение процента CD8⁺ позитивных клеток через 3 мес после ТПСКК в сравнении с показателем до операции. В группе А процент клеток в фазах SM в динамике наблюдения достоверно снижался как в популяции CD4⁺, так и в популяции CD8⁺ Т-лимфоцитов. В группе В такой зависимости не получено. В группе В показано достоверное повышение процента CD8⁺ Т-лимфоцитов в SM-фазах клеточного цикла в точке восстановления кроветворения после ТПСКК, в отличие от показателей до операции. Через 3 мес после ТПСКК в группе А спонтанный апоптоз CD4⁺ Т-лимфоцитов был достоверно выше, чем спонтанный апоптоз CD8⁺ Т-лимфоцитов в этой же группе пациентов ($p < 0,05$). В группе В по этим показателям достоверных различий не было выявлено. Процент SM-фаз клеточного цикла CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток достоверно различался в группе В через 3 и 6 мес после ТПСКК ($p < 0,05$) (табл. 2).

При проведении корреляционного анализа была получена зависимость между количеством клеток, подверженных спонтанному апоптозу, и количеством клеток, находящихся в SM-фазах клеточного цикла, причем в популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов эта зависимость была прямой, а в популяции CD8⁺ Т-лимфоцитов — обратной. Эти данные могут свидетельствовать о том, что апоптоз может играть решающую роль в ограничении скорости восстановления CD4⁺ Т-клеток, поскольку повышение пролиферативной активности сопровождается повышением апоптоза. Обратная ситуация характерна для CD8⁺ Т-клеток: чем выше пролиферация, тем ниже апоптоз. Различное соотношение пролиферации и апоптоза, скорее всего, отражает различную скорость восстановления пула CD4⁺ (медленное) и CD8⁺ Т-лимфоцитов (быстрое) после трансплантации, что показано во многих работах [2, 5]. Кроме того, более быстрое восстановление CD8⁺ Т-лимфоцитов у больных с благоприятным течением (группа В), отмечаемое в точке восстановления кроветворения, может отражать их более высокую функциональную, в том числе противоопухолевую, активность.

Обращает на себя внимание низкий уровень апоптоза (особенно CD8⁺ Т-клеток через 3 мес

Таблица 2

Относительное количество Т-лимфоцитов в разных фазах клеточного цикла у пациентов с гемобластозами

Показатели, %	Группа	До режима кондиционирования	Перед ТПСКК	Через 1 мес после ТПСКК	Через 3 мес после ТПСКК	Через 6 мес после ТПСКК
CD4 ⁺	А	26,6 ± 4,55	25,1 ± 2,00	25,1 ± 3,81*	19,5 ± 5,64	
	В	26,7 ± 2,76	25,5 ± 2,13**	13,6 ± 1,39**	17,2 ± 1,80	19,8 ± 2,72
CD4SM	А	24,2 ± 4,88 ***	15,9 ± 7,03	10,6 ± 5,88 **	11,3 ± 2,60**	4,6 ± 3,54
	В	13,2 ± 1,90	15,7 ± 3,53	18,8 ± 4,76	23,0 ± 5,52	10,6 ± 3,17
CD4apo	А	0,9 ± 0,58	1,6 ± 0,84	1,8 ± 0,94	1,3 ± 0,44	1,3 ± 1,11
	В	1,5 ± 0,74	1,9 ± 0,99	0,9 ± 0,49	2,4 ± 0,66	2,3 ± 1,42
CD8 ⁺	А	42,4 ± 4,01	36,0 ± 5,92**	35,4 ± 6,96*	49,2 ± 7,17**	26,0 ± 14,0
	В	41,6 ± 4,01	37,0 ± 3,76	53,3 ± 3,66	49,8 ± 4,81	50,5 ± 7,31
CD8SM	А	17,3 ± 3,82 ***	14,7 ± 5,05	9,1 ± 4,89**	4,7 ± 1,19**	2,1 ± 1,51
	В	9,2 ± 2,38	8,2 ± 2,83**	13,7 ± 3,43**	6,1 ± 1,65	3,7 ± 1,43
CD8apo	А	0,22 ± 0,139	2,66 ± 2,287	1,67 ± 1,037	0,17 ± 0,095*	0,15 ± 0,150
	В	1,12 ± 0,668	1,77 ± 1,139	1,00 ± 0,551	1,05 ± 0,842	1,04 ± 0,444

Примечания: * – различия достоверны между группами ($p < 0,05$); ** – различия достоверны внутри группы ($p < 0,05$).

после ТПСКК). В работах других исследователей наблюдаются сходные данные по различиям спонтанного апоптоза Т-лимфоцитов в группах больных гемобластозами с благоприятным и неблагоприятным течением заболевания. I. Malinowska et al. демонстрировали, что для больных с неблагоприятным течением (резистентность к лечению, рецидив, летальный исход) ОЛЛ и ОМЛ характерен низкий уровень апоптоза Т-лимфоцитов [6]. Работы, посвященные экспрессии белков Bax (апоптотическое действие) и Bcl-2 (антиапоптотическое действие), показывают, что в группе с полной ремиссией индекс Bax/Bcl-2 был высоким, а низкий индекс Bax/Bcl-2 ассоциировался с рецидивами [8]. В нашей работе показан также достоверно больший процент Т-клеток в SМ-фазах клеточного цикла в группе с неблагоприятным течением заболевания, по сравнению с группой пациентов в ремиссии. Эти данные, наряду с показателями апоптоза, могут служить прогностическим критерием при проведении аутологичных ТПСКК. Таким образом, различное соотношение процессов пролиферации и апоптоза лежит в основе разной скорости восстановления основных субклассов Т-лимфоцитов после трансплантации стволовых клеточных клеток, а результаты исследования апоптоза и фаз клеточного цикла субклассов Т-клеток могут использоваться для разработки прогностических критериев эффективности трансплантации стволовых клеточных клеток при гемобластозах.

Литература

1. Лисуков И.А. Трансплантация костного мозга // Клиническая онкология и гематология. 2000. № 2. С. 2-6.
2. Guillaume T., Rubinstein D.B., Symann M. Immune Reconstitution and Immynotherapy after Autologous Hemapoietic Stem Cell Transplantation // Blood. 1998. Vol. 92, №5. P. 1471-1490.
3. Hebib N.C., Deas O., Roulean M. Peripheral blood T-cells generated after allogeneic bone marrow transplantation: lower levels of Bcl-2 protein and enhanced sensitivity to spontaneous and CD95-mediated apoptosis in vitro. Abrogation of the apoptotic phenotype coincides with the recovery of normal naive/primed T-cell profiles // Blood. 1999. Vol. 94. P. 1803-1813.
4. Lin M-T., Tseng L-K, Frangoul K, Gooley T. Increased apoptosis of peripheral blood T-cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation // Blood. 2000. Vol. 95, № 12. P. 3832-3839.
5. Mackall C.L., Hakim ET, Gress R.E. Restoration of T-cell homeostasis after T-cell depletion // Semin. Immunol. 1997. Vol. 9. P. 339-346.
6. Malinowska I., Stelmaszczyk-Emmel A., Wasik M. Apoptosis and pH of blasts in acute childhood leukemia // Med. Sci. Monit. 2002. Vol. 8, № 6. P. 441-447.
7. Phipott N.J., Turner A.J., Scopes J. et al. The use of 7-aminoactinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques // Blood. 1996. Vol. 87, № 9. P. 2244-2251.
8. Poeta G.D., Venditti A., Maurillo L. et al. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML) // Blood. 2003. Vol. 101, №6. P. 2125-2131.
9. Raff M.C. Social controls on cell survival and cell death // Nature. 1992. Vol. 356. P. 397-400.
10. Smith B.D., Bambach B.J., Vala M.S. et al. Inhibited apoptosis and drug resistance in acute myeloid leukemia // Br. J. Haematol. 1998. Vol. 102. P. 1042-1049.

Поступила 17.12.04