

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Т.Г. Кадричева

*НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск
660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г, e-mail: ktg_1@mail.ru*

Проведено исследование функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов методом люминол-зависимой хемилюминесценции цельной крови детей с острым лимфобластным лейкозом. Выявлено, что при миелотоксических осложнениях повышена генерация активных форм кислорода при спонтанной хемилюминесцентной реакции, чего не наблюдалось при исследовании зимозан-индуцированной хемилюминесценции.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, дети, нейтрофильные гранулоциты, хемилюминесценция.

PECULIARITIES OF NEUTROPHILE'S FUNCTIONAL ACTIVITY IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

T.G. Kadricheva

*State Scientific Research Institute for Medical Northern Problems of Siberian Division of Russian Academy of Medical
Sciences, Krasnoyarsk*

3-g, Partizan Zheleznyak Street, 660022-Krasnoyarsk, e-mail: ktg_1@mail.ru

Studies of neutrophilic granulocytes functional activity in children with acute lymphoblastic leukemia have been carried out using luminol-induced chemiluminescence. We have revealed increased production of reactive oxygen species under basal conditions and low responds in zimosans-induced chemiluminescent reaction.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, children, neutrophilic granulocytes, chemiluminescence.

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) является самой распространенной опухолью кроветворной ткани в детском возрасте и составляет 25–30 % всех злокачественных опухолей у детей и 80–90 % случаев острого лейкоза. Современные возможности терапии позволили существенно изменить прогноз у детей с ОЛЛ, 5-летняя безрецидивная выживаемость составляет от 70 до 84 % [5, 11].

Несмотря на совершенствование цитостатической и сопроводительной терапии, инфекционные осложнения на сегодняшний день являются ведущей причиной смертности, не обусловленной прогрессирующим основным заболеванием [9]. Факторами, определяющими высокий риск инфекционных заболеваний и связанной с ними смертности, являются и особенности патофизиологии заболевания, и повреждения эпителиальных барьеров, и необходимость проведения инвазивных диагностических и лечебных процедур, и побочные действия, и осложнения химиотерапии. Помимо индукции апоптоза в

клетках-мишенях, цитостатики вызывают выраженный миелотоксический эффект. Кроме количественных изменений, обусловленных как проявлениями заболевания, так и осложнениями проводимой терапии, нейтрофилы крови больных с гемобластомами имеют и функциональные дефекты уже на начальном этапе лечения. Цитостатики, глюкокортикоиды, лучевая терапия приводят к резкому усилению дисфункции фагоцитов [10].

Количественные и качественные дефекты всех звеньев иммунитета, в том числе нейтрофильного звена, являются основой развития и тяжелого и нетипичного течения инфекционных процессов у больных с острым лимфобластным лейкозом. Нейтрофилы являются фактором поддержания гомеостаза и составляют первую линию неспецифической противомикробной защиты организма. Одной из основных функций нейтрофилов является элиминация чужеродных агентов, которая реализуется с развитием так называемого респираторного взрыва [4]. Резуль-

татом каскада биохимических реакций является продукция активных форм кислорода (АФК), обладающих бактерицидным действием. Именно на регистрации интенсивности респираторного взрыва основан хемилюминесцентный анализ [1]. Наибольший вклад в продукцию активных форм кислорода определяется, прежде всего, нейтрофилами. В качестве неспецифического индуктора в хемилюминесцентной реакции применяется зимозан – полисахарид, получаемый из культуры *Saccharomyces cerevisiae*. Учитывая зависимость между уровнем хемилюминесценции фагоцитов и киллингом, результаты, полученные при использовании данного метода, могут характеризовать способность гранулоцитов к завершённому фагоцитозу [2].

Таким образом, целью данного исследования явилась оценка функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов детей с острым лимфобластным лейкозом методом люминол-зависимой хемилюминесценции цельной крови.

Материал и методы

Под наблюдением находились 47 больных острым лимфобластным лейкозом в возрасте от 1 года до 17 лет 11 мес 29 дней. Возрастная структура наблюдаемых пациентов: от 1 до 3 лет – 7 больных; от 3 до 7 лет – 20; от 7 до 11 лет – 7; от 11 до 15 лет – 7; от 15 до 17 – 6 пациентов. Диагноз острого лимфобластного лейкоза устанавливался на основании клинических проявлений, морфологического, цитохимического исследования мазков костного мозга, иммунофенотипирования бластных клеток. Все дети получали интенсивную программную полихимиотерапию по протоколам ALL BFM95m и MB-2002 [6]. Группу контроля составили 30 детей в возрасте от 1 до 18 лет I–II группы здоровья, которые не имели острых заболеваний и проявлений аллергических реакций в момент исследования.

Функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов оценивали методом люминол-зависимой хемилюминесценции. Учитывая, что хемилюминесцентный ответ крови определяется в основном фагоцитирующими клетками, способными продуцировать АФК, и присутствие неадгезирующих клеток не оказывает существенного влияния на характер развития хемилюминесцентного ответа, нейтрофильные

гранулоциты из крови не выделяли, исследование проводили в цельной гепаринизированной крови [7].

Функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов методом хемилюминесцентного анализа исследовали при развитии инфекционных осложнений на фоне индуцированной химиотерапией гипоплазии кроветворения. Оценка спонтанной и индуцированной хемилюминесценции производилась в течение 90 мин на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL3604» (Россия). Регистрация результатов и управление анализатором осуществлялись через персональный компьютер. В качестве индуктора дыхательного «взрыва» использовался опсонизированный зимозан. Определялись следующие характеристики: время выхода кривой на максимум (T_{max}), максимальная интенсивность свечения (I_{max}), светоплощадь свечения (S) при спонтанной и индуцированной хемилюминесценции, а также индексы активации, демонстрирующие усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, относительно спонтанной – соотношения I_{max} инд. / I_{max} спон., S инд. / S спон.

Статистическая обработка проводилась с использованием методов непараметрического анализа пакета прикладных программ Statistica for Windows, Release 7.0 «StatSoft Inc». Проверку достоверности гипотез относительно изучаемых показателей проводили с помощью критерия Манна–Уитни для двух независимых выборок. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде значений медианы и 25-го и 75-го квартилей.

Результаты и обсуждение

В период миелотоксических осложнений у всех наблюдаемых больных количество гранулоцитов не превышало $0,5 \times 10^9/\text{л}$. Среди исследуемых пациентов наблюдались следующие инфекционные осложнения: мукозит ротовой полости – у 15 больных, фебрильная нейтропения – у 9, энтероколит – у 8, фарингиты – у 7, бронхиты – у 6, пневмония – у 1, инфильтрат мягких тканей – у 1 больного. Все больные получали антибактериальную терапию и препараты гранулоцитарного колониестимулирующего фактора.

При анализе полученных данных выявлено,

Таблица 1

Показатели хемилюминесценции цельной крови детей с ОЛЛ на фоне нейтропенических инфекционных осложнений (Ме (C₂₅; C₇₅))

Показатель	Контроль (n=30)	Больные ОЛЛ (n=47)	p
	1	2	
Tmax спон., сек	3340 (1605; 4296)	2921 (1475; 4168)	
I _{max} спон., о.е.	99 (86; 110)	147 (107; 227)	p _{1,2} <0,01
S спон., о.е. ×10 ⁴	0,47 (0,44; 0,55)	1,37 (0,85; 2,38)	p _{1,2} <0,01
Tmax инд., сек	1601 (1483; 1748)	1684 (1248; 1983)	
I _{max} инд., о.е.	748 (457; 1090)	246 (162; 516)	p _{1,2} <0,01
S инд., о.е. ×10 ⁴	2,78 (2,02; 3,56)	2,48 (1,22; 4,80)	
I _{max} инд./I _{max} спон.	8,28 (4,4; 11,32)	1,74 (1,24; 2,69)	p _{1,2} <0,01
Синд./S спон.	6,31 (3,39; 8,33)	1,49 (1,16; 2,22)	p _{1,2} <0,01

что время выхода хемилюминесцентной кривой на максимум статистически значимо не различалось при сравнении с группой контроля (табл. 1). Следовательно, наличие инфекционных осложнений у больных ОЛЛ не способствует более быстрой активации нейтрофилов.

При оценке уровня максимальной интенсивности свечения (I_{max}) у больных ОЛЛ отмечено статистически значимое повышение I_{max} при спонтанной и индуцированной хемилюминесценции. Можно предположить, что данный факт связан с тем, что лейкоциты у детей с ОЛЛ были активированы вследствие имеющихся инфекционных осложнений, что и нашло отражение при определении показателей их функции. Подобные результаты получены А.Е. Кратновым и Е.В. Борисовой (2007) при определении активности миелопероксидазы, играющей ключевую роль в образовании ряда АФК в нейтрофилах детей с ОЛЛ: у детей, получающих программную интенсивную химиотерапию, активность миелопероксидазы в нейтрофилах была выше, чем в группе контроля [3].

При анализе показателей светоплощади хемилюминесценции отмечается статистически значимое повышение данного показателя при спонтанной хемилюминесценции (S_{спон.}) у больных с ОЛЛ по сравнению с контролем. После воздействия зимозана уровень светоплощади хемилюминесценции у больных с ОЛЛ значимо не отличался от уровня данного показателя, регистрируемого в группе контроля.

Соотношение I_{max} инд./I_{max} спон. демонстрирует усиление хемилюминесценции в от-

вет на воздействие индуктора «дыхательного взрыва» и отражает резерв функциональных возможностей лейкоцитов. Коэффициент I_{max} инд./I_{max} спон. у больных ОЛЛ оказался статистически значимо более низким, чем в группе контроля.

При оценке индекса активации, описываемого соотношением S инд./S спон., у больных ОЛЛ на фоне индуцированной цитопении данный коэффициент был статистически значимо меньше такового при сравнении с группой контроля. Таким образом, снижение индексов активации указывает на истощение резервных возможностей к генерации АФК в нейтрофильных гранулоцитах детей с ОЛЛ.

Учитывая, что некоторые исследователи при изучении смертности детей с ОЛЛ [8] указывают, что развитие лекарственного гепатита вследствие гепатотоксичного действия химиотерапии способствует изменению фармакокинетики цитостатиков и усилению их токсического действия на организм, мы попытались установить, как меняются в этих случаях показатели хемилюминесценции. Токсическое поражение печени у наблюдаемых больных диагностировалось по повышению уровня аминотрансфераз и/или прямой гипербилирубинемии при условии исключения гепатитов вирусной этиологии.

При сравнении изучаемых показателей в зависимости от наличия гепатотоксических осложнений (табл. 2) было выявлено, что у больных с указанными осложнениями были статистически значимо повышены показатели максимальной интенсивности свечения при

Таблица 2

Показатели хемилюминесценции цельной крови детей с ОЛЛ в зависимости от наличия токсического поражения печени (Ме (C₂₅; C₇₅))

Показатель	Без гепатита (n=39)	Токсический гепатит (n=8)	p
	1	2	
Tmax спон., сек	2921 (1295; 4245)	2990 (2576; 3772)	
Imax спон., о.е.	131 (105; 218)	223 (189; 258)	p _{1,2} <0,01
S спон., о.е. × 10 ⁴	1,23 (0,82; 2,24)	1,74 (1,32; 3,30)	
Tmax инд., сек	1534 (1248; 2264)	1836 (1484; 1919)	
Imax инд., о.е.	221 (162; 416)	739 (538; 1001)	p _{1,2} <0,01
Синд., о.е. × 10 ⁴	2,06 (1,15; 3,86)	5,42 (3,80; 10,99)	p _{1,2} <0,01
Imax инд./Imax спон.	1,55 (1,16; 2,40)	3,23 (2,58; 4,20)	p _{1,2} <0,01
Синд./S спон.	1,31 (1,12; 1,90)	2,8 (2,19; 3,60)	p _{1,2} <0,01

спонтанной (p<0,01) и индуцированной хемилюминесценции (p<0,01) и светоплощадь при индуцированной (p<0,01). Индексы активации Imax инд./Imax спон. и Синд./S спон. также оказались более высокими у больных ОЛЛ при наличии токсического поражения печени (p<0,01).

Таким образом, продукция АФК в нейтрофилах была более высокой у больных с гепатотоксическими осложнениями химиотерапии. Данный факт может быть связан с тем, что цитостатики индуцируют апоптоз, используя те же пути, что и физиологические индукторы. Кроме цитотоксического действия, АФК способствуют и развитию апоптоза, стимулируя свободнорадикальные процессы в клетках и истощая ферменты антиоксидантной защиты. Возможно, что следствием более активного воздействия цитостатиков у больных ОЛЛ с явлениями гепатотоксичности, обусловленной химиотерапией, является уменьшение потенциала антиоксидантной защиты в нейтрофилах, что находит выражение в изменении их функциональной активности.

Заключение

В результате проведенного исследования выявлены особенности функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов детей с ОЛЛ, получающих программную химиотерапию. Установлено, что скорость генерации АФК в период миелосупрессии у больных ОЛЛ значительно не отличается от группы контроля. В период миелотоксических осложнений имеет место по-

вышение функциональной активности нейтрофилов при оценке максимальной интенсивности свечения и светоплощади спонтанной хемилюминесценции, что, возможно, обусловлено имеющимися инфекционными осложнениями. В то же время отмечается низкий, по сравнению со здоровыми детьми, ответ на стимуляцию зимозаном, отражая сниженные функциональные резервы фагоцитов. Наличие гепатотоксических осложнений сопровождается более активным образованием АФК и, возможно, приводит к дефициту антиоксидантной защиты нейтрофилов, способствуя их апоптозу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грачева Т.А. Совершенствование хемилюминесцентного метода исследования функциональной активности фагоцитирующих клеток // Клиническая лабораторная диагностика. 2008. № 2. С. 54–55.
2. Земсков В.М., Барсуков А.М., Безносенко А.А. и др. Изучение функционального состояния фагоцитов человека (кислородный метаболизм и подвижность клеток): Методические рекомендации МЗ РФ. М., 1988. С. 12–15.
3. Кратнов А.Е., Борисова Е.В. Метаболическая активность нейтрофилов периферической крови в процессе лечения детей с острым лимфобластным лейкозом // Клиническая и лабораторная диагностика. 2007. № 12. С. 43–45.
4. Пинегин Б.В., Маянский А.Н. Нейтрофилы: структура и функции // Иммунология. 2007. № 6. С. 374–381.
5. Румянцева Ю.В., Карачунский А.И., Румянцев А.Г. Оптимизация терапии острого лимфобластного лейкоза у детей в России // Педиатрия. 2009. Т. 87, № 4. С. 19–27.
6. Стандарты оказания специализированной помощи детям и подросткам с гематологическими и онкологическими заболеваниями. М.: МЕДПРАКТИКА-М, 2009. С. 247–256.
7. Федоров Г.Н., Леонов С.Д. Особенности хемилюминесценции цельной разведенной крови // Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал. 2007. Т. 6, вып. 4. Доступ: <http://www.smolensk.ru/MMORPH/N-16html/cont.html>.

8. *Christersen M.S., Heyman M., Zeller B. et al.* Treatment-related death in childhood acute lymphoblastic leukemia in Nordic countries: 1992–2001 // *Br. J. Hematol.* 2005. Vol. 19 (3). P. 467–469.

9. *Kocak U., Rolston K.V., Mullen C.A.* Fever and neutropenia in children with solid tumors is similar in severity and outcome to that in children with leukemia // *Support Care Cancer.* 2002. Vol. 10 (1). P. 58–64.

10. *Pui C.H., Boyett J.M., Rivera G.K. et al.* Long-term results of Total Therapy studies 11, 12 and 13 A for childhood acute lymphoblastic leukemia at St. Jude Children's Research Hospital // *Leukemia.* 2000. Vol. 12 (14). P. 2286–2294.

11. *Pui C.H., Sandlund J.T., Pei D. et al.* Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII at St Jude Children's Research Hospital // *Blood.* 2004. Vol. 104 (9). P. 2690–2696.

Поступила 12.01.11