

ПРОГНОЗ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПОСЛЕ ХИМИОТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

О.В. Смирнова, А.А. Савченко, В.Т. Манчук, В.И. Москов*

ГУ Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера СО

РАМН, директор - чл.-корр. РАМН, Манчук В.Т.;

* - Краевая клиническая больница №1, гл. врач - Заслуж. врач РФ Б.П.

Маштаков

Резюме. Предложен новый способ прогнозирования развития геморрагических осложнений после химиотерапии у больных острыми лейкозами, используя уровни активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови. О возможности возникновения геморрагических осложнений у больных прогнозировали по сочетанию величин активности двух дегидрогеназ. При сочетании активности Г6ФДГ в пределах от 10,02 до 66,51 мкЕ и НАДФГДГ - от 84,27 до 257,39 мкЕ прогнозировалось развитие геморрагических осложнений. Чувствительность теста составила 0,96.

Ключевые слова: острый лейкоз, геморрагические осложнения, дегидрогеназы, лимфоциты, химиотерапия, острый лимфобластный лейкоз, острый миелобластный лейкоз

Острые лейкозы занимают ведущее место по частоте встречаемости среди гемобластозов [1,2,5]. Неблагоприятность исходов больных острыми лейкозами во многом обусловлена возникновением геморрагических осложнений после проведения химиотерапии [3,4,8,9]. Данный вид осложнений возникает у больных острыми лейкозами вне зависимости от вида и стадии заболевания, значительно ухудшает качество их жизни, влияет на исход болезни, понижая выживаемость больных после проведенного лечения [10,11,12,13]. Все это и послужило поводом для проведения нашего исследования.

Эритроциты, лейкоциты и тромбоциты – равнозначные компоненты гемопоэза. Родоначальником всех форменных элементов крови является полипотентная кроветворная клетка (стволовая клетка), она – общая

предшественница всех ростков кроветворения. Из неё в результате последовательных дифференцировок образуются унипотентные клетки – предшественницы, которые могут дифференцироваться только в каком-то одном направлении. Клеточный состав крови и кроветворных органов представляет собой систему, находящуюся в здоровом организме в динамическом равновесии; непрерывное разрушение форменных элементов уравнивается соответствующей их продукцией. При острых лейкозах страдают все линии кроветворения, однако в большей степени при остром лимфобластном и остром миелобластном лейкозах повреждаются лейкоциты. В настоящее время не вызывает сомнений факт, что наиболее ранние признаки нарушений, следует искать на уровне клетки, где начинается формирование ответной реакции на онковоздействие, что в свою очередь позволяет составить представление о метаболической стратегии иммунного ответа, избранной организмом. Доказано, что наиболее информативные показатели внутриклеточного метаболизма в клетках иммунной системы в зависимости от уровня активности основных метаболических процессов являются дегидрогеназы. Это позволяет использовать их в качестве показателей, характеризующих метаболическое и функциональное состояние клеток у больных острыми лейкозами в прогнозе геморрагических осложнений после химиотерапии.

Воздействие опухоли на нормальные кроветворные клетки приводит к их количественному и качественному изменению, следовательно, метаболизм лейкоцитов при острых лейкозах отличается от метаболизма лейкоцитов здорового человека. Индивидуально подобранная больному с острым лейкозом программа химиотерапии также направлена на нормализацию количественного и качественного состава лейкоцитов, полное удаление патологических клонов клеток и часто вызывает у больных лейкопению. Таким образом, по принципу обратной связи при полном отсутствии лейкоцитов, возникает влияние на начальную полипотентную кроветворную клетку, которая в первую очередь начинает продуцировать лейкоциты, следовательно, вторично вызываются

нарушения других ростков кроветворения (нарушается эритроцитарный и тромбоцитарный гемопоэз). Стало быть, чем более нарушен метаболизм лейкоцитов до начала терапии, тем больше изменений будет вызвано самой патогенетической терапией и тем больше будет изменений в эритроцитарном и тромбоцитарном ростках кроветворения, и как следствие возникновение анемического и геморрагического синдромов. Среди общей фракции лейкоцитов большую роль в онкопроцессе при остром лимфобластном и остром миелобластном лейкозах играют лимфоциты. Таким образом, оценивая начальный метаболизм лимфоцитов у больных острым лейкозом до проведения терапии, мы прогнозируем развитие геморрагических осложнений у них после.

Целью настоящего исследования явилась разработка нового метода прогнозирования возникновения геморрагических осложнений у больных острыми лейкозами после проведенной химиотерапии.

Материалы и методы

Данный метод разработан на 70 больных острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) и 65 больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) в возрасте от 17-87 лет, поступивших в гематологическое отделение краевой клинической больницы №1 г. Красноярск. Средний возраст больных составил $42,7 \pm 1,5$ лет. Обе группы были сопоставимы по полу и возрасту. Объектом исследования являлась венозная кровь. Кровь больных забиралась на исследование при поступлении до начала патогенетического лечения больных. Количественное определение активности дегидрогеназ глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ) (мкЕ) проводилось по приведенной ниже методике с помощью биолюминометра «БЛМ-8803». Динамическое наблюдение за больными осуществлялось на протяжении всего периода пребывания их в стационаре. Наличие или отсутствие геморрагических осложнений после терапии диагностировались клинически (возникновение кровотечений, геморрагий и т.д.), по анализам крови и показателям свертываемости.

Сущность способа заключается в исследовании активности ферментов лимфоцитов периферической крови больных острым лейкозом до проведения химиотерапии. Для этого из венозной крови больных выделяют лимфоциты, а затем с помощью биolumинесцентного метода определяют активность дегидрогеназ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ).

Г6ФДГ осуществляет дегидрирование глюкозо-6-фосфата с помощью кофермента НАДФ. Г6ФДГ катализирует инициализирующую и ключевую реакцию пентозофосфатного цикла. Пентозофосфатный цикл имеет огромное значение для системы внутриклеточного метаболизма. Он поставляет восстановленные НАДФН для реакций биосинтеза жирных кислот, холестерина и др. За счет пентозофосфатного цикла приблизительно на 50% покрывается потребность клеток в НАДФН. Кроме того, продуктами пентозофосфатного цикла являются также различные пентозофосфаты, которые необходимы для реакций синтеза нуклеиновых кислот и ряда коферментов.

НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназа (НАДФГДГ, КФ 1.4.1.4) осуществляет восстановительное аминирование 2-оксоглутаровой кислоты, в качестве кофермента используя НАДФН.

Способ выполняют следующим образом [6,7]. У больного с диагнозом острого лейкоза независимо от стадии и вида заболевания до проведения химиотерапии забирают венозную кровь из локтевой вены свободным током в пробирки с гепарином. Выделяют лимфоциты путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина по стандартной методике А. Воуит. Подсчитывают концентрацию лимфоцитов, например в камере Горяева. Чистота выхода лимфоцитов должна составлять не менее 97%. 1 млн. выделенных клеток используют для определения активности Г6ФДГ и НАДФГДГ одним из известных способов, например, биolumинесцентным. Для этого суспензию выделенных лимфоцитов, содержащую клетки в концентрации 1,0 млн/мл, разрушают путем осмотического лизиса с добавлением дистиллированной воды (1:5 по объему) и 1,0-2,0 мМ дитиотреитола. Затем

непосредственно определяют активность дегидрогеназ. Для этого в 150 мкл инкубационной смеси, содержащей соответствующий субстрат и кофактор, вносят 50 мкл суспензии разрушенных лимфоцитов. Значения концентраций субстратов и кофакторов, а также pH среды для определяемых ферментов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Концентрация субстратов, кофакторов и показатели pH среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах биолюминесцентным методом у здоровых лиц

Фермент	Субстрат	Кофактор	pH буфера
Г6ФДГ, мМ	Глюкозо-6-фосфат – 1,5	НАДФ – 0,025	9,8
НАДФГДГ, мМ	Глутамат – 0,5	НАДФ – 1,65	9,8

Для определения активности фермента Г6ФДГ использовали субстрат 1,5мМ глюкозо-6-фосфат и кофактор 0,025 мМ НАДФ, для определения активности НАДФГДГ применяли субстрат 0,5мМ глутамата и кофактор 1,65мМ НАДФ, в обоих случаях pH буфера составляла 9,8. После инкубации исследуемых проб при 37°C в течение 30 минут к 200 мкл инкубационной смеси добавляют 50 мкл флавиномононуклеотида (ФМН) в концентрации $1,5 \times 10^{-5} \text{М}$, 50 мкл 0,0005% миристинового альдегида и 10 мкл ферментативной системы НАДФН:ФМНоксидоредуктаза-люцифераза (все реактивы биолюминесцентной системы разводят в 0,1 М K^+, Na^+ -фосфатном буфере с pH 7,0). После смешивания биолюминесцентных реактивов и инкубационной пробы с помощью биолюминометра, например марки “БЛМ-8803” измеряют свечение. Учитывая, что в клетках имеется определенное количество субстратов для течения различных метаболических реакций, в том числе и катализируемых исследуемыми ферментами, определяют показатели, условно названные “субстратный фон ферментов”. Определение ведут в тех же условиях, что и для вышеперечисленных дегидрогеназ, но в инкубационную смесь вместо соответствующего субстрата вносят буфер. В результате

измерения свечения на биолуминометре получают относительные значения активности исследуемых ферментов. Чтобы получить абсолютные значения активности, строят график зависимости интенсивности биолуминесценции от концентрации НАДФН (калибровочный график). Для этого 200 мкл стандартного раствора НАДФН в диапазоне $10^{-9} - 10^{-4}$ М вносят в кюветы биолуминометра, содержащие ФМН, миристиновый альдегид и НАДФН: ФМНоксидоредуктазу-люциферазу в концентрациях, указанных выше, после чего производят измерение интенсивности биолуминесценции. Активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ рассчитывают по математической формуле:

$$A = \frac{\Delta[C] \times V \times 10^6}{T}$$

где $\Delta[C]$ – разница концентраций НАД(Ф)Н в пробах “фермент” и “фон фермента”; V – объем пробы в миллилитрах; T – время инкубации.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью непараметрических методов вариационной статистики. Осуществляли подсчет медианы (Me) и полный размах выборки в виде минимального и максимального значения выборки.

Результаты и обсуждение

Учитывая полученные нами данные по активности ферментов лимфоцитов больных острыми лейкозами по стадиям, мы предлагаем новый способ прогнозирования геморрагических осложнений после химиотерапии у данных больных. Предлагаемый метод позволяет точно оценить функциональное состояние иммунной системы больных острыми лейкозами до начала химиотерапии и, положительно повлиять на исход заболевания, так как повышается вероятность прогнозирования возникновения осложнений у больных с возможной их более ранней коррекцией симптоматической терапией.

Сочетание активности Г6ФДГ в пределах от 4,46 до 10,01 мкЕ и НАДФГДГ в пределах от 52,87 до 84,26 мкЕ характерно только для здоровых людей.

В приведенных ниже таблицах представлены результаты исследования активности Г6ФДГ и НАДФГДГ (мкЕ) в лимфоцитах крови у больных острыми лейкозами (острым лимфобластным лейкозом и острым нелимфобластным лейкозом) без осложнений и с геморрагическими осложнениями.

У больных острым лимфобластным лейкозом без геморрагических осложнений (табл. 2) до начала патогенетического лечения активность Г6ФДГ была в пределах от 0,01 до 4,15(мкЕ/10⁴ клеток). При этом среднее её значение составило 3,12; медиана – 2,55(мкЕ/10⁴ клеток), а активность НАДФГДГ – от 0,01 до 52,86(мкЕ/10⁴ клеток), среднее – 2,82; медиана – 0,17(мкЕ/10⁴ клеток).

У больных острым миелобластным лейкозом без геморрагических осложнений (табл. 3) до начала терапии активность Г6ФДГ была в пределах от 0,01 до 4,45(мкЕ/10⁴ клеток). При этом среднее её значение составило 3,34; медиана – 2,49(мкЕ/10⁴ клеток), а активность НАДФГДГ – от 0,00 до 51,19(мкЕ/10⁴ клеток), среднее – 1,59; медиана – 0,43(мкЕ/10⁴ клеток).

Итак, у больных острым лимфобластным лейкозом и острым миелобластным лейкозом без геморрагических осложнений показатели активности ферментов Г6ФДГ и НАДФГДГ статистически не отличались друг от друга, но были достоверно ниже, чем показатели активности этих ферментов у контрольной группы (здоровых людей) ($p < 0,05$).

Таблица 2

Показатели активности Г6ФДГ и НАДФГДГ в лимфоцитах крови больных острым лимфобластным лейкозом без геморрагических осложнений

Ферменты	n	Показатели активности ферментов в группе ОЛЛ без осложнений			
		Среднее	Медиана	Минимум	Максимум
Г6ФДГ, мкЕ/10 ⁴ кл	40	3,12	2,55	0,01	4,15
НАДФГДГ, мкЕ/10 ⁴ кл	40	2,82	0,17	0,01	52,86

Таблица 3

Показатели активности Г6ФДГ и НАДФГДГ) в лимфоцитах крови больных острым миелобластным лейкозом без геморрагических осложнений

Ферменты	N	Показатели активности ферментов в группе ОМЛ без осложнений			
		Среднее	Медиана	Минимум	Максимум
Г6ФДГ, мкЕ/10 ⁴ кл	40	3,34	2,49	0,01	4,45
НАДФГДГ, мкЕ/10 ⁴ кл	40	1,59	0,43	0,00	51,19

У больных острым лимфобластным лейкозом, у которых после химиотерапии развились геморрагические осложнения (табл. 4), показатели активности ферментов до начала лечения были следующие: активность Г6ФДГ – от 10,02 до 58,97(мкЕ/10⁴ клеток), среднее – 27,39; медиана – 12,17(мкЕ/10⁴ клеток) и активность НАДФГДГ – от 84,27 до 257,39(мкЕ/10⁴ клеток), среднее – 114,2; медиана – 90,32(мкЕ/10⁴ клеток). У больных острым миелобластным лейкозом, у которых после лечения также возникли геморрагические осложнения (табл. 5), показатели активности ферментов до начала лечения были такие: активность Г6ФДГ – от 10,34 до 66,51(мкЕ/10⁴ клеток), среднее – 41,91; медиана – 19,14(мкЕ/10⁴ клеток) и активность НАДФГДГ – от 85,19 до 256,23(мкЕ/10⁴ клеток), среднее – 112,38; медиана – 0,06(мкЕ/10⁴ клеток).

Таким образом, показатели активности ферментов Г6ФДГ и НАДФГДГ у больных острым лимфобластным лейкозом и острым миелобластным лейкозом с геморрагическими осложнениями после терапии, статистически не различались между собой, но были достоверно выше показателей активности этих ферментов у лиц контрольной группы ($p < 0,05$).

Из таблиц 2-5 видно, что уровни активности Г6ФДГ и НАДФГДГ (мкЕ) в лимфоцитах крови у больных острыми лейкозами без осложнений и с геморрагическими осложнениями характеризуются значительными отличиями ($p < 0,05$).

Таблица 4

Показатели активности Г6ФДГ и НАДФГДГ в лимфоцитах крови больных острым лимфобластным лейкозом с геморрагическими осложнениями

Ферменты	n	Показатели активности ферментов в группе ОЛЛ с осложнениями			
		Среднее	Медиана	Минимум	Максимум
Г6ФДГ, мкЕ/10 ⁴ кл	25	27,39	12,17	10,02	58,97
НАДФГДГ, мкЕ/10 ⁴ кл	25	114,20	90,32	84,27	257,39

Таблица 5

Показатели активности Г6ФДГ и НАДФГДГ в лимфоцитах крови больных острым миелобластным лейкозом с геморрагическими осложнениями

Ферменты	n	Показатели активности ферментов в группе ОМЛ с осложнениями			
		Среднее	Медиана	Минимум	Максимум
Г6ФДГ, мкЕ/10 ⁴ кл	30	41,91	19,14	10,34	66,51
НАДФГДГ, мкЕ/10 ⁴ кл	30	112,38	0,06	85,19	256,23

У больных острыми лейкозами с геморрагическими осложнениями после терапии показатели активности Г6ФДГ и НАДФГДГ (мкЕ) достоверно выше, чем показатели активности этих же ферментов у больных без осложнений ($p < 0,05$) и достоверно выше показателей контрольной группы ($p < 0,05$), отсюда и полученные нами интервалы. Следовательно, о возможности возникновения геморрагических осложнений у больных можно прогнозировать по сочетанию величин активности двух дегидрогеназ (Г6ФДГ и НАДФГДГ) в лимфоцитах крови. При сочетании активности Г6ФДГ в пределах от 10,02 до 66,51 мкЕ и НАДФГДГ – от 84,27 до 257,39 мкЕ прогнозировалось развитие геморрагических осложнений, а при сочетании активности Г6ФДГ в пределах от 0,01 до 4,45 мкЕ и НАДФГДГ в пределах от 0,01 до 52,86 мкЕ прогнозировалось отсутствие геморрагических осложнений.

По результатам обследования у 129 из 135 больных острыми лейкозами обнаружено совпадение прогноза с развитием либо отсутствием геморрагических осложнений. У шести больных прогноз не совпал, следовательно, отмечено совпадение прогноза в 95,6%.

Таким образом, предложенный высокочувствительный метод позволяет повысить точность прогнозирования геморрагических осложнений после химиотерапии у больных острыми лейкозами, используя уровни активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ, что дает возможность своевременно, до проведения химиотерапии, откорректировать план и тактику лечения данной категории больных и улучшить результаты их реабилитации. Предложенный способ зарегистрирован патентом (№2324190, опубликован 10.05.2008, бюллетень №13, 6 страниц).

THE PROGNOSIS OF HEMORRHAGIC COMPLICATIONS DEVELOPMENT AFTER CHEMOTHERAPY IN PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIAS

O.V. Smirnova, A.A. Savchenko, V.T. Manchouk, V.I. Moskov

Institute of Medical Problems of the North, Siberian Division, Russian Academy of
Medical Sciences, Krasnoyarsk
Regional clinical hospital №1, Krasnoyarsk

We proposed the new method of prognosis of hemorrhagic complications development after chemotherapy in patients with acute leukemias, using the levels of NAD(P)-dependent dehydrogenises activities in blood lymphocytes. We prognosed the probability of hemorrhagic complications appearance in combination of two dehydrogenises activities. If the level of G6PDG activity was in limits from 10,02 till 66,51 mkE and NADPGDG activity was in limits from 84,27 till 257,39 mkE, we prognosed the development of hemorrhagic complications after chemotherapy in patients with acute leukemias. The test sensitivity was 0,96.

Key words: *acute leukemia, hemorrhage complications, dehydrogenases, lymphocytes, chemotherapy, acute lymphoblast leukemia, acute no lymphoblast leukemia*

Литература

1. Волкова М.А. Клиническая онкогематология. – М.: Медицина, 2001.– 576 с.
2. Воробьев А.И. Руководство по гематологии.– в 3-х томах.– Т.1.– М.: Ньюдиамед, 2002.– 280 с.
3. Земсков А.М., Караулов А.В., Земсков В.М. Комбинированная иммунокоррекция.– М.: изд-во Наука, 1994.– 260 с.
4. Зуева Е.Е., Афанасьев Б.В., Тотолян А.А. Иммунофенотипирование в диагностике острого лейкоза (лекция) //Клинич. лаб. диагностика.– 2004.– №7.– С. 25-32.
5. Ковалева Л.Г. Острые лейкозы.– М.: Медицина, 1990.– 212 с.
6. Савченко А.А., Сунцова Л.Н. Высококчувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биолюминесцентным методом//Лаб. дело.– 1989.– № 11.– С. 23-25.
7. Савченко А.А., Смирнова С.В. Особенности уровней активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных истинной аллергией и псевдоаллергией//Вест. новых мед. технологий.– 2001.– № 2.– С. 64-67.
8. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Исаев В.Г.. Программное лечение лейкозов.– М, 2002.– 331с.
9. Cunningham L., Aplenc R. Pharmacogenetics of acute lymphoblastic leukemia treatment response //Expert. Opin. Pharmacother.– 2007.– Vol.8, №15.– P. 2519-2531.
10. Efferth T., Volm M. Glutathione-related enzymes contribute to resistance of tumor cells and low toxicity in normal organs to artesunate //In Vivo.– 2005.– Vol.19, №1.– P. 225-232.
11. Fujii S. Application of natural killer T-cells to posttransplantation immunotherapy//Int. J. Hematol.– 2005.– Vol.81, №1.– P. 1-5.
12. Mitani K. Molecular physiopathology and molecular targeting therapy of leukemia//Nippon. Naika. Gakkai. Zasshi.– 2007.– Vol.96, №9.– P. 2013-2019.
13. Pabst T., Mueller B.U. Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML //Oncogene.– 2007.– Vol.26, №47.– P. 6829-6837.

Смирнова О.В. – ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, д.м.н., рабочий телефон/факс: (391) 2280-683, e-mail.: ovsmirnova71@mail.ru

Савченко А.А. – руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, д.м.н., профессор, рабочий телефон/факс: (391) 2280-683.

Манчук В.Т. – директор ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, член-кор. РАМН, д.м.н., профессор, рабочий телефон/факс: (391) 2280-683, e-mail.: manchyk41@rambler.ru

Москов В.И. – заведующий гематологическим отделением Краевой клинической больницы №1, к.м.н.