
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ

УДК 616.155.392–06:616.9]–053.2

СОДЕРЖАНИЕ Т И В–ЛИМФОЦИТОВ И ИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ У ДЕТЕЙ С ОПУХОЛЯМИ КРОВЕТВОРНОЙ И ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ИНФЕКЦИОННОГО ОСЛОЖНЕНИЯ И НЕЙТРОПЕНИИ

М.В. Пешикова, И.И. Долгушин, Н.Н. Русанова,
О.Л. Колесников, Е.В. Жуковская
e-mail: Peshikova @ mail.ru

Государственная медицинская академия, г. Челябинск, Россия

Статья поступила 4 мая 2004 г.

Введение

Существуют прямая связь выраженности и длительности снижения содержания полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови с числом развивающихся инфекционных эпизодов [Bodey G.P. et al., 1966]. Однако глубина нейтропении не всегда коррелирует с возникновением тяжелого инфекционного осложнения цитостатической терапии.

Целью работы явилось определение содержания Т и В–лимфоцитов и их предшественников в периферической крови детей с опухолями кроветворной и лимфоидной ткани в зависимости от наличия инфекционного осложнения цитостатической терапии и нейтропении.

1. Методика исследования

Проспективно находились под наблюдением дети с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и не–В–клеточными неходжкинскими лимфомами (не–В–НХЛ), получавшие лечение по протоколу ALL–BFMm–95 [Румянцев А.Г. и др., 1991] в онкогематологическом центре ОДКБ г. Челябинска с января 2000 по декабрь 2002 гг. В ходе исследования были сформированы 3 группы детей с ОЛЛ и не–В–НХЛ: 1 группа — без инфекционных осложнений или с инфекционными осложнениями легкой степени тяжести, развившимися на фоне нейтропении ($n = 25$); 2 группа — со среднетяжелыми и тяжелыми инфекционными осложнениями, развившимися на фоне нейтропении ($n = 25$); 3 группа — со среднетяжелыми и тяжелыми инфекционными осложнениями без нейтропении ($n = 12$). Все дети были в состоянии клинико–гематологической ремиссии [Дурнов Л.А., 2001], получали идентичную сопроводительную терапию [Масчан А.А. и др., 1992], в том числе гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г–КСФ) (граноцит, «Aventis» и нейпоген «Hoffman la Roche») в дозе от 5 до 10 мкг/кг/сутки, подкожно 1 раз в сутки, в течение $6,8 \pm 0,5$ (от 5 до 11) дней. Средняя суточная доза Г–КСФ достоверно не различалась во всех группах детей с ОЛЛ и не–В–НХЛ и составила $7,1 \pm 0,4$ мкг/кг. Количество популяций и субпопуляций лимфоцитов определяли в венозной крови в течение 72 часов с момента начала лихорадки. В качестве популяционного контроля обследовали группу условно–здоровых детей в количестве 25 человек — 4 группа. Исследование проводилось по методике иммунофенотипирования лимфоцитов в модификации Сибиряка С.В. и соавт. (1997) с использованием моноклональных антител серии ИКО (НПЦ «МедБиоСпектр», Москва): CD3, CD4, CD8, CD10, CD20, CD34. Наличие маркера CD3 характерно для Т–лимфоцитов; CD4 — для Т–

хелперно/индукторных лимфоцитов; CD8 — для цитотоксических лимфоцитов; CD20 — для В-лимфоцитов; CD10 экспрессируется на мембране клеток-предшественников Т- и В-лимфопоэза [Кетлинский С.А., Калинина Н.М., 1998]; CD34 экспрессируется на мембране стволовых клеток крови и коммитированных клеток-предшественниц гемопоэза [Kraus D. et al., 1996]. Исследования проводились на базе иммунологического отдела ЦНИЛ ЧелГМА и лаборатории диагностики иммунодефицитных состояний НИИ иммунологии ЧелГМА. О достоверности различий показателей между группами судили по критерию Уилкоксона с поправкой Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,0083$, т. к. критерий сравнения был использован 6 раз.

2. Результаты

В группах детей, получающих цитостатическую терапию по поводу ОЛЛ и не-В-НХЛ, независимо от количества нейтрофилов, наличия инфекционного осложнения и его тяжести по сравнению с группой здоровых детей было достоверно снижено абсолютное и относительное количество Т-лимфоцитов (CD3-клеток) и их субпопуляций (CD4 и CD8-клеток) (табл.). Это связано с тем, что предусмотренные программами средства обладают общим цитостатическим действием и способствуют не только уничтожению опухолевых клеток, но и поражению нормальных пролиферирующих клеток различных органов. Однако, несмотря на снижение количества Т-лимфоцитов и их субпопуляций, иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8) был достоверно снижен только в группе детей со среднетяжелыми и тяжелыми инфекционными осложнениями, развившимися на фоне нейтропении по сравнению с группой здоровых детей. Абсолютное количество В-лимфоцитов (CD20-клеток) было достоверно снижено только в группах детей с нейтропенией, а относительное количество — только в группе детей со среднетяжелыми и тяжелыми инфекционными осложнениями, развившимися на фоне нейтропении по сравнению с группой здоровых детей. Также во всех группах детей с ОЛЛ и не-В-НХЛ по сравнению с группой здоровых детей было достоверно повышено абсолютное и относительное количество фенотипически незрелых клеток (CD10 и CD34-лимфоцитов).

Содержание субпопуляций лимфоцитов в периферической крови
у детей с острым лимфобластным лейкозом
и не-В-клеточными неходжкинскими лимфомами в зависимости
от наличия инфекционного осложнения цитостатической терапии и нейтропении

Показатели		Статистические показатели	Группы обследованных детей			
			1	2	3	4
			без осложнений или с осложнениями легкой степени тяжести на фоне нейтропении	с осложнениями тяжелой и средней степени тяжести		здоровые
				на фоне нейтропении	без нейтропении	
		<i>n</i>	25	25	12	25
Лейкоциты	•10 ⁹ /л	<i>M ± m</i>	1,51 ± 0,17	1,24 ± 0,14	3,23 ± 0,16	7,09 ± 0,33
		p1-4; 2-4; 3-4	0,0001	0,0001	0,0001	
		p1-2; 1-3		—	0,0001	
		p2-3			0,0001	
CD3	•10 ⁹ /л	<i>M ± m</i>	0,15 ± 0,04	0,10 ± 0,06	0,20 ± 0,04	1,51 ± 0,08
		p1-4; 2-4; 3-4	0,0001	0,0001	0,0001	
		p2-3			0,0039	
	%	<i>M ± m</i>	16,12 ± 1,41	16,32 ± 1,37	19,17 ± 1,37	59,28 ± 1,72
		p1-4; 2-4; 3-4	0,0001	0,0001	0,0001	

Окончание таблицы

Показатели		Статистические показатели	Группы обследованных детей			
			1	2	3	4
			без осложнений или с осложнениями легкой степени тяжести на фоне нейтропении	с осложнениями тяжелой и средней степени тяжести		здоровые
				на фоне нейтропении	без нейтропении	
		<i>n</i>	25	25	12	25
CD4	•10 ⁹ /л	$M \pm m$	0,12 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,21 ± 0,05	0,90 ± 0,04
		p1–4; 2–4; 3–4	0,0001	0,0001	0,0001	
		p2–3			0,0052	
	%	$M \pm m$	12,44 ± 0,85	12,96 ± 1,32	17,83 ± 1,58	35,28 ± 0,78
		p1–4; 2–4; 3–4	0,0001	0,0001	0,0001	
		p1–2; 1–3		—	0,0016	
CD8	•10 ⁹ /л	$M \pm m$	0,12 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,19 ± 0,04	0,63 ± 0,04
		p1–4; 2–4; 3–4	0,0001	0,0001	0,0001	
		p2–3			0,0061	
	%	$M \pm m$	11,64 ± 0,98	12,8 ± 1,02	16,67 ± 1,4	24,76 ± 0,95
		p1–4; 2–4; 3–4	0,0001	0,0001	0,0001	
		p1–2; 1–3		—	0,0017	
CD4\ CD8		$M \pm m$	1,21 ± 0,10	1,13 ± 0,17	1,22 ± 0,18	1,49 ± 0,07
		p1–4; 2–4; 3–4	—	0,0004	—	
CD10	•10 ⁹ /л	$M \pm m$	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,05 ± 0,01
		p1–4; 2–4; 3–4	0,0055	0,0023	0,0006	
	%	$M \pm m$	11,28 ± 0,79	16,88 ± 2,17	13,33 ± 1,88	1,84 ± 0,23
		p1–4; 2–4; 3–4	0,0001	0,0001	0,0001	
CD20	•10 ⁹ /л	$M \pm m$	0,12 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,2 ± 0,05	0,28 ± 0,01
		p1–4; 2–4; 3–4	0,0001	0,0001	—	
	%	$M \pm m$	11,48 ± 1,03	9,76 ± 1,01	15,17 ± 1,74	10,84 ± 0,19
		p1–4; 2–4; 3–4	—	0,0003	—	
		p2–3			0,0057	
CD34	•10 ⁹ /л	$M \pm m$	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,2 ± 0,07	0,02 ± 0,003
		p1–4; 2–4; 3–4	0,007	0,0001	0,0003	
	%	$M \pm m$	5,72 ± 0,55	12,04 ± 1,82	13,67 ± 3,06	0,72 ± 0,09
		p1–4; 2–4; 3–4	0,0001	0,0001	0,0001	
		p1–2; 1–3		0,0006	0,0021	

Примечание: в таблице приведены только достоверные различия между исследуемыми группами.

3. Обсуждение

Обращает на себя внимание тот факт, что в группах детей со среднетяжелыми и тяжелыми инфекционными осложнениями независимо от количества нейтрофилов по сравнению с группой детей без инфекционных осложнений или с осложнениями легкой степени тяжести, раз-

вившимися на фоне нейтропении было достоверно повышено относительное количество CD34-лимфоцитов. Как же объяснить данное явление? По данным Lui F. и соавт. (2000), введение Г-КСФ приводит к значительному повышению количества CD34+ клеток в периферической крови, несмотря на низкую концентрацию рецептора к Г-КСФ на их поверхности. Механизм этого феномена Румянцев С.А. и соавт. (2002) объясняют следующим образом. Поскольку наибольшая плотность рецепторов к Г-КСФ отмечается на поверхности зрелых нейтрофилов [Demetri G.D., Griffin J.D., 1991], возникает предположение, что именно эти клетки служат мишенью для его действия и посредниками в реализации эффекта мобилизации стволовых клеток. В ответ на связывание Г-КСФ с рецептором, зрелые гранулоциты индуцируют секрецию ИЛ-8, который, в свою очередь, вызывает повышение в крови уровня фермента матриксометаллопротеиназы-9 (ММП-9) [Pruitt J.F. et al., 1999]. ММП-9 разрушает молекулы адгезии, фиксирующие CD34+ клетки к строме костного мозга, и приводит к выходу CD34+ клеток в периферическую кровь [Kronenwett R. et al., 2000]. Однако в наших исследованиях количество CD34-лимфоцитов в группах детей с инфекционными осложнениями, независимо от выраженности нейтропении достоверно не отличалось, а по данным Румянцева С.А. и соавт. (2002), уровень CD34+ клеток зависит от содержания нейтрофилов в крови. Мы полагаем, что данный биологический феномен связан с наличием у пациентов с ОЛЛ и не-В-НХЛ инфекционного осложнения. Томские ученые в эксперименте на животных показали, что развитие острого воспаления сопровождается рядом характерных сдвигов со стороны системы крови: имеет место значительная активация костномозгового грануломоноцитопозеза, усиление выработки костномозговыми мононуклеарами интерлейкина-1 (ИЛ-1) и колониестимулирующих активностей (КСА), увеличение в костном мозге гемопоэтических островков (ГО) [Дыгай А.М., Клименко Н.А., 1992]. Ими же была обнаружена ускоренная дифференцировка коммитированных прекурсоров в процессе регенерации кроветворения после применения некоторых цитостатиков [Дыгай А.М., Клименко Н.А., 1992]. По мнению Дыгай А.М. и Клименко Н.А. (1992) можно предположить, что активное созревание кроветворных прекурсоров оказывается возможным благодаря опережающему восстановлению способности костного мозга к формированию ГО. Можно утверждать, что важное место в восстановлении кроветворения занимают регуляторные влияния со стороны клеток гемопоэз-индуцирующего микроокружения (ГИМ) (как адгезирующихся, так и неадгезирующихся) посредством выделения ими ряда гуморальных активностей, например синтез макрофагами ИЛ-1 [Athlin L. et al., 1989; Bravo-Cuellar A. et al., 1989]. Таким образом, после цитостатического воздействия в костном мозге вырабатывается широкий спектр биологически активных веществ, влияющих на пролиферацию кроветворных прекурсоров, при этом происходит ускоренная дифференцировка оставшихся жизнеспособными полипотентных и коммитированных клеток-предшественниц. Следует отметить, что сигналом к их включению может служить, наряду с ИЛ-1, синтез синергично действующих на гемопоэз ИЛ-3 и ИЛ-6 [Leary A.G., Ikebuchi K., 1988].

Мы предполагаем, что инфекционные осложнения у детей, получающих цитостатическую терапию, вызывают активное созревание кроветворных прекурсоров, происходит увеличение количества клеток в костном мозге, а это в свою очередь увеличивает количество CD34+ клеток, которые потенциально способны мигрировать в периферический кровоток. Данный биологический феномен говорит о возможном компенсаторном механизме иммунной системы во время инфекционного осложнения — гиперпродукции лимфопоэтических клеток-предшественниц на фоне их гипофункции, своеобразная биологическая реакция в ответ на деструкцию клеток.

Заключение

Тот факт, что в группах детей со среднетяжелыми и тяжелыми инфекционными осложнениями независимо от количества нейтрофилов, по сравнению с группой детей без инфекционных осложнений или с осложнениями легкой степени тяжести, развившимися на фоне нейтропении, возрастает число стволовых лимфопоэтических клеток-предшественниц, требует дальнейшего изучения, а относительное количество CD34+ клеток может служить прогностическим маркером исхода инфекционных осложнений цитостатической терапии.

Список литературы

1. Дыгай А.М., Клименко Н.А. Воспаление и гемопоэз. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1992. 276 с.

2. Злокачественные образования кроветворной и лимфоидной ткани у детей / Л.А. Дурнов, Л.А. Махонина, В.И. Курмашов и др.; Под ред. Л.А. Дурнова. М.: Медицина, 2001. 272 с.
3. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Иммунология для врача. СПб.: Гиппократ, 1998. 156 с.
4. Масчан А.А., Самочатова Е.В., Крыжановский О.И. Тактика сопроводительной терапии при лечении острого лимфобластного лейкоза по программе БФМ // Педиатрия. 1992. № 2. С. 68—78.
5. Румянцев А.Г., Самочатова Е.В., Табет Хамдан. Лечение острого лимфобластного лейкоза у детей по программе БФМ // Педиатрия. 1991. № 11. С. 58—63.
6. Румянцев С.А., Осипова Е.Ю., Астрелина Т.А. и др. Влияние гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на клеточный состав периферической крови // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2002. Т. 1. № 1. С. 66—69.
7. Сибиряк С.В., Юсупова Р.Ш., Курчатова Н.И. Иммунофенотипирование лимфоцитов в клинической практике. Уфа, 1997. 24 с.
8. Athlin L., Domellof L., Norberg B. Effect of therapeutic concentrations of anthracyclines on monocyte phagocytosis of yeast cells // Eur. J. Clin. Pharmacol. 1989. Vol. 36. P. 155—159.
9. Bodey G.P., Buckley M., Sathe Y.S. et al. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia // Ann. Intern. Med. 1966. Vol. 64. P. 328—40.
10. Bravo-Cuellar A., Mathe G., Arbouys O.S. A'injection intraperitoneale de 40-tetragidropyranie adriamycine provoque l'activation des macrophages peritoneaux chez la souris // Bull. Cancer. 1989. Vol. 76. P. 501.
11. Demetri G.D., Griffin J.D. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor // Blood. 1991. Vol. 78. P. 2791—2802.
12. Kraus D., Fackler M., Civin C. et al. CD 34: structure, biology and clinical utility // Blood. 1996. Vol. 87. P. 1—15.
13. Kronenwett R., Martin S., Haas R. The role cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells // Stem. Cells. 2000. Vol. 18. P. 320—330.
14. Leary A.G., Ikebuchi K. Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hemopoietic stem cells // Blood. 1988. Vol. 71. № 6. P. 1759—1763.
15. Lui F., Poursine-Laurent J., Link D.C. Expression of the G-CSF receptor on hematopoietic progenitor cells is not required for their mobilization by G-CSF // Blood. 2000. Vol. 95. № 10. P. 3025—3031.
16. Pruijt J.F., Fibbe W.E., Opdenakker G. et al. Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the Metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 10863—10868.