

К.С. Казначеев

## ОТСРОЧЕННЫЕ МИЕЛОСУПРЕССИВНЫЕ И ПРОАПОПТОТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ В РЕМИССИИ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА

ГУ НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН, Новосибирск

Проведение программной антилейкемической химиотерапии сопровождается длительным цитотоксическим воздействием не только на клетки опухолевого клона, но и на здоровые клетки костного мозга и периферической крови. Уровень спонтанной гибели клеток наиболее высок непосредственно после окончания терапии; постоянно уменьшается с увеличением времени, прошедшего после отмены терапии, но не достигает контрольных значений, полученных у здоровых лиц, и не зависит от вида проведенной терапии. Доля спонтанно погибших клеток периферической крови находится в прямой корреляции с долей погибших клеток костного мозга. Процессы клеточной гибели в периферической крови и костном мозге протекают синхронно и однонаправленно.

**Ключевые слова:** острый лимфобластный лейкоз, гранулоциты, лимфоциты, апоптоз, проточная цитометрия

Современный прорыв в лечении различных форм онкологических заболеваний связан прежде всего со значительным прогрессом в развитии так называемой программной полихимиотерапии. Большая часть успеха заключается в правильно подобранной комбинации режима интенсивной химиотерапии, адекватных дозировок и сопроводительной терапии. Широкое введение интенсивной программной химиотерапии при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) у детей привело в последнее десятилетие к изменению прогноза этого заболевания: 70–80% детей, больных ОЛЛ, дают полные длительные ремиссии, равносильные выздоровлению [2].

У большинства современных химиотерапевтических средств отмечается дозозависимый эффект: более высокие дозировки используемых препаратов влекут за собой повышение вероятности адекватного ответа на терапию и, как следствие, увеличение частоты наступления ремиссии. В то же время интенсивная химиотерапия, столь эффективная в лечении ОЛЛ, не действует избирательно на опухолевые клетки, а оказывает цитотоксический эффект на быстро обновляющиеся ткани больного и, прежде всего, на кроветворную систему [3]. Одним из основных барьеров на пути увеличения дозировок является угнетение костномозгового кроветворения, как вызванное непосредственным влиянием одного препарата, так и возникающее в результате длительного применения нескольких лекарств.

Изучение отсроченных миелотоксических эффектов химиотерапии находится в настоящий момент в начальной стадии. Именно они представляют особый интерес для экспертной оценки состоя-

ния детей, перенесших ОЛЛ, после прекращения лечения. В работах Е.Б. Владимирской [2, 3] показано, что у так называемых “долгожителей”, перенесших ОЛЛ, нормальный лейкоцитарный состав крови сочетается с серьезными нарушениями миелопоэза, в основе которых лежит подавление активности гранулоцитарно-макрофагальных предшественников.

Исследования последних лет позволяют утверждать, что основным цитотоксическим механизмом противоопухолевой терапии является индукция апоптоза в клетках-мишенях [1, 2, 4, 5]. Апоптоз – это активная форма гибели клеток, которая развивается как ответ на действие различных экзогенных и эндогенных сигналов и проявляется в глубоком нарушении энергетики клетки в результате дисфункции митохондрий, в деградации ДНК и, как следствие, в потере клеткой части генетического материала [1, 4]. Апоптоз является энергозатратным процессом; требует перестройки клеточных мембран, синтеза и активации целого ряда макромолекул. Он играет важную роль в поддержании постоянства численности клеток в органах и целом организме, регуляции состава клеточных популяций, удаления “старых” клеток и т. п. [1–6].

Отсроченный эффект химиотерапевтических воздействий, их влияние на функциональное состояние миелопоэза в различные периоды после отмены терапии пока не исследованы. Изучение этих вопросов представляется весьма актуальным как для оценки состояния гемопоэза у детей, перенесших ОЛЛ, так и для дальнейшей оптимизации программной антилейкемической терапии.

**Методика.** Материалом исследования служили периферическая кровь (ПК) и костный мозг (КМ)

36 детей, находящихся в ремиссии ОЛЛ, получавших лечение по протоколам ALL BFM-90 (n=22) и ALL MB-91 (n=14). Все дети были разделены на три группы: 1-я группа – 8 детей с длительностью периода, прошедшего после отмены терапии до года; 2-я группа – 11 детей (после отмены терапии прошло от года до двух лет); 3-я группа – 17 детей (после отмены терапии прошло более двух лет).

Исследования морфологического состава ПК проводились на анализаторе ARGOS COBOS 5 DIFF; исследования морфологического состава КМ – при помощи световой микроскопии с окрашиванием мазков гематоксилином и эозином.

Оценку уровня спонтанного апоптоза клеток КМ и ПК проводили с использованием реактивов набора – “PermoCyte-FP™, WBL 1010” (“BioErgonomics”, USA) [7, 8]. Сто микролитров цельной крови или мононуклеарной фракции костного мозга, выделенной на градиенте фикола с плотностью 1,077 г/мл, центрифугировали в 1 мл фосфатно-солевого буфера в течение 5 мин при 1000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 2 мл 1% пермеабилизирующего раствора с немедленным фиксированием в 10% фиксирующем растворе. Далее клетки инкубировали 30 мин при комнатной температуре для завершения лизиса эритроцитов. По завершении инкубации клетки двукратно отмывали, окрашивали пропидия йодидом в концентрации 4 мкг/мл клеточной суспензии в течение 40 мин при 37 °С. После окрашивания производили анализ интенсивности флюоресценции на проточном цитофлуориметре FACSCAN BD в диапазоне II у 10000 клеток. Анализировали распределение ДНК и определяли долю гиподиплоидных клеток во всей клеточной популяции (для ПК и КМ), лимфоцитарном и гранулоцитарном кластерах (для ПК), выделенных по светооптическим характеристикам.

**Результаты.** Проведенные исследования состава ПК показали, что количество гранулоцитов и лимфоцитов у исследуемых больных во всех выделенных группах не отличается от нормальных значений (рис. 1). Не выявлены какие-либо изменения в зависимости от вида терапии (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о полном восстановлении клеточного состава периферической крови по завершении терапии вне зависимости от ее вида и длительности.

Таблица 1

**Количество гранулоцитов и лимфоцитов в зависимости от вида терапии (M±m)**

Вид терапии	n	Лейкоциты, $\times 10^3/\text{мм}^3$	Гранулоциты, $\times 10^3/\text{мм}^3$	Лимфоциты, $\times 10^3/\text{мм}^3$
MB-91	14	7,4±0,64	3,97±0,51	2,09±0,12
BFM-90	22	7,3±0,32	4,12±0,24	2,07±0,11
Контроль	20	7,6±0,56	4,32±0,24	2,75±0,29

Тем не менее при изучении способности к спонтанному апоптозу клеток ПК было выявлено значительное увеличение доли апоптотических клеток как среди гранулоцитов, так и среди лимфоцитов ПК детей, перенесших химиотерапию (рис. 1). Доля апоптотических клеток снижалась с увеличением времени, прошедшего после отмены терапии, но не достигала контрольных значений. Наличие глубоких функциональных изменений в клетках ПК при сохранном клеточном составе в течение длительного времени свидетельствует о возможных перестройках, произошедших под влиянием химиотерапии в костномозговых клетках.



	1-я группа	2-я группа	3-я группа	Контроль
– гранулоциты, 1000/мм	4,26	4,28	4,11	4,32
– уровень апоптоза, %	6,63	3,99	2,90	0,64
– лимфоциты, 1000/мм	2,15	2,07	2,63	2,75
– уровень апоптоза, %	9,71	5,66	4,83	2,1

Рис. 1. Количество гранулоцитов, лимфоцитов и апоптотических клеток в зависимости от длительности периода после отмены терапии

Для выявления данных изменений в пункте КМ были изучены содержание клеток-предшественников – основного звена репродукции гемопоэза, доля пролиферирующих и непролиферирующих гранулоцитов и уровень спонтанного апоптоза костномозговых клеток. При исследовании числа клеток-предшественников было отмечено, что во всех группах доля непролиферирующих гранулоцитов не отличалась от нормальных значений и доля пролиферирующих клеток была снижена во всех группах пациентов (табл. 2). По-видимому, поддержание нормального числа и состава клеток ПК у обследованных больных связано с повышением пролиферативной активности клеток-предшественников.

Таблица 2

**Показатели миелограмм после отмены терапии (M±m)**

Группы наблюдения	Пролиферирующие гранулоциты, %	Непролиферирующие гранулоциты, %	Отношение пролиф./непролиф.
1-я	14,3±2,1	38,1±7,2	0,48±0,16
2-я	14,6±1,9	38,8±3,8	0,51±0,11
3-я	13,2±1,8	38,1±5,4	0,35±0,03
Контроль	18,9±0,7	38,3±0,9	0,49±0,07

Спонтанный апоптоз КМ определяли для всей совокупности ядродержащих костномозговых клеток, исключая зрелые нейтрофилы (мононуклеарная фракция КМ). Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень спонтанного апоптоза достоверно снижается у пациентов с длительностью периода после отмены терапии более двух лет: 1-я группа –  $7,55 \pm 1,49\%$ ; 2-я группа –  $8,55 \pm 0,9\%$  и 3-я группа –  $5,79 \pm 0,95\%$ . Различия достоверны при  $p < 0,05$  между 2-й и 3-й группами.

При этом отмечена положительная корреляционная связь между уровнем апоптоза клеток КМ и ПК (рис. 2). Это подтверждает гипотезу, что усиление апоптоза является универсальным феноменом отсроченного действия химиотерапии, выражаю-

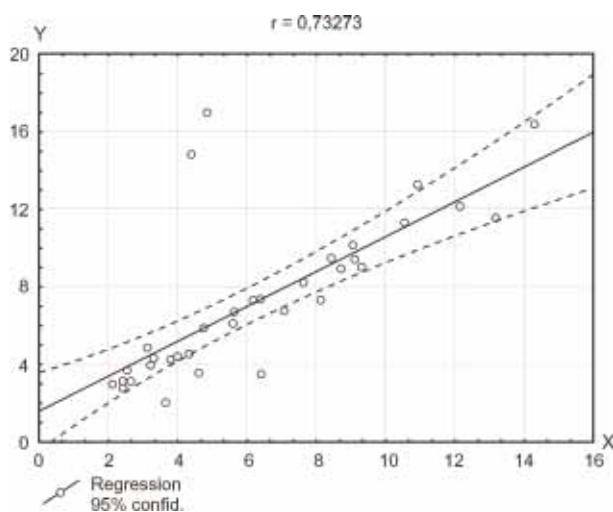


Рис. 2. Корреляционная связь между уровнем спонтанного апоптоза клеток костного мозга и лейкоцитов периферической крови.

По оси X – уровень спонтанного апоптоза клеток КМ, %; по оси Y – уровень спонтанного апоптоза лейкоцитов ПК, %

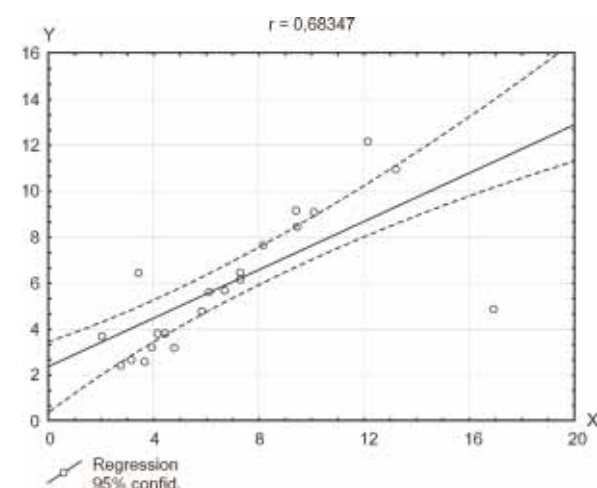


Рис. 3. Корреляционная связь между долей пролиферирующих клеток и уровнем спонтанного апоптоза клеток костного мозга.

По оси X – доля пролиферирующих клеток КМ, %; по оси Y – уровень спонтанного апоптоза клеток КМ, %

щимся в одинаковой степени во всех звеньях гемопоэза. Однако наличие положительной корреляционной связи между долей пролиферирующих клеток и уровнем спонтанного апоптоза клеток КМ для 1-й и 2-й групп, а также относительное увеличение доли пролиферирующих клеток КМ для этих же групп (табл. 2) свидетельствуют о том, что в первые два года после отмены химиотерапии повышение спонтанного апоптоза миелоидных клеток компенсируется увеличением доли пролиферирующего пула КМ (рис. 3).

**Заключение.** Таким образом, проведенные исследования демонстрируют наличие длительного отсроченного проапоптотического воздействия антилейкемической полихимиотерапии на все звенья гемопоэза. Способность к спонтанному апоптозу уменьшается по мере удлинения периода, прошедшего после отмены терапии. Несмотря на повышенный уровень спонтанного апоптоза, количество лейкоцитов ПК у больных всех сроков наблюдения поддерживается на нормальном уровне, что, вероятно, компенсируется увеличением доли пролиферирующих клеток КМ. Различий в степени выраженности процессов клеточной гибели между терапией по протоколам BFM-90 и MB-91 выявить не удалось.

#### LONG-TERM MIELOSUPPRESSIVE AND PROAPOPTOTIC CHANGES OF BONE MARROW AND PERIPHERAL BLOOD CELLS IN CHILDREN WITH REMISSION OF ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

K. S. Kaznacheev

The program of antileukemic chemotherapy treatment is followed with long-term cytotoxic effects not only for tumor cells but also for healthy cells of bone marrow and peripheral blood. The highest level of cell death could be seen immediately after the end of the therapy; it is constantly reduced, but it can not reach the control level and it does not depend on chemotherapy variant. Percent of dead peripheral blood cells is in positive correlation with the level of dead cells in bone marrow. Cell death processes in peripheral blood and bone marrow have the same vector and are synchronous.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аллен Р.Т. // Фарм. и токс. 1997. Т. 37. № 5. С. 215–228.
2. Владимирская Е.Б., Кисляк Н.С., Румянцев А.Г. // Гематол. и трансфузиол. 1998. Т. 6. № 6. С. 3–8.
3. Владимирская Е.Б., Казначеев К.С., Осипова Е.Ю., Астрелина Т.А. // Рос. Журн. иммунол. 2000. Т. 5. № 3. С. 302–306.
4. Казначеев К.С. // Гематол. и трансфузиол. 1999. Т. 44. № 1. С. 40–43.
5. Blank K.R., Rudolfs M.S., Kao G.D. et al. // Int. J. Radiat. Biol. 1997. Vol. 71. № 5. P. 455–466.
6. Golstein P. // Nature. 1997. Vol. 275. № 5303. P. 1081–1082.
7. Jackson A., Warner N. // Manual of Clinical Laboratory Immunology. Washington, 1986. P. 226–235.
8. Long R., Goldberg A. // Laboratory Examination of Blood Cells. Boston, 1998. P. 14–18.