

# ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Кадричева Т.Г., Манчук В.Т., Шагарова С.Г.

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера Сибирского отделения РАМН, г. Красноярск

**Резюме.** Проведено исследование функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов методом люминол-зависимой хемилюминесценции цельной крови детей с острым лимфобластным лейкозом. Выявлено, что вне миелотоксических осложнений генерация активных форм кислорода повышена при спонтанной хемилюминесцентной реакции и снижена при исследовании зимозан-индуцированной хемилюминесценции.

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

*Kadricheva T.G., Manchuk V.T., Shagarova S.G*

## FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

**Abstract.** Functional activity of neutrophilic granulocytes from whole blood of the children with acute lymphoblastic leukemia was tested by means of luminol-induced chemiluminescence detection. We have revealed increased production of reactive oxygen species under basal conditions, and a decreased chemiluminescent response after zymosan-induced stimulation. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 6, pp 631-634)

**Keywords:** acute lymphoblastic leukemia, children neutrophilic granulocytes, chemiluminescence.

## Введение

В структуре детской онкологической заболеваемости острый лейкоз занимает ведущее место, на его долю приходится более 30% всех опухолей у детей. Самым распространенным среди злокачественных заболеваний кроветворной ткани у детей является острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), составляя 80-90% случаев острого лейкоза. Введение в практику современных интенсивных программ химиотерапии привело к существенному улучшению прогноза у детей с ОЛЛ: 5-летняя безрецидивная выживаемость составляет от 70 до 84% [4, 9]. Несмотря на совершенствование цитостатической и сопроводительной

терапии, инфекционные осложнения на сегодняшний день являются ведущей причиной смертности, не связанной с прогрессированием основного заболевания [6, 7]. Факторами, определяющими высокий риск инфекционных заболеваний и связанной с ними смертности, являются особенности патофизиологии заболевания, следствие воздействия цитостатических препаратов в виде индуцированной аплазии кроветворения, повреждения эпителиальных барьеров, необходимость проведения инвазивных диагностических и лечебных процедур.

Способность организма защищаться от инфекций зависит не только от сохранности количественного состава, но и от качественных характеристик функционально компетентных фагоцитирующих клеток и лимфоцитов. Лейкоциты крови больных с гемобластомами имеют функциональные дефекты уже на начальном этапе лечения. Цитостатики, глюкокортикоиды, лучевая терапия приводят к резкому усугублению дисфункции фагоцитов [8].

### Адрес для переписки:

Кадричева Татьяна Геннадьевна  
660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, 3г.  
Тел.: (391) 256-81-23.  
Факс: (391) 228-06-83.  
E-mail: ktg\_1@mail.ru

Нейтрофилы, обладая уникальной функцией фагоцитоза, составляют первую линию неспецифической противомикробной защиты. Одной из наиболее важных особенностей нейтрофилов является «респираторный взрыв», результатом которого является продукция активных форм кислорода (АФК), от которых зависит эффективная внутриклеточная гибель микробов, поглощенных фагоцитами. Способность к генерации АФК характеризует функциональную активность нейтрофилов, а именно возможность осуществления завершеного фагоцитоза [2].

**Цель данного исследования** — выявить особенности функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов детей с ОЛЛ методом люминол-зависимой хемилюминесценции цельной крови.

## Материалы и методы

Под наблюдением находился 47 больных ОЛЛ в возрасте от 1 года до 17 лет 11 мес 29 дней. Возрастная структура больных была следующей: 1-3 года — 6, 3-7 лет — 20, 7-11 лет — 7, 11-15 лет — 8, 15-18 лет — 6, девочек — 21, мальчиков — 26. Все дети получали программную полихимиотерапию по протоколам ALL BFM95m и MB-2002 [5]. Сравнение проводилось с группой здоровых детей с аналогичными возрастными характеристиками, в каждую возрастную группу вошли 6 человек.

Функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов методом люминол-зависимой хемилюминесценции оценивали после купирования миелотоксических и инфекционных осложнений, количество нейтрофилов у наблюдаемых детей превышало  $1,5 \times 10^9/\text{л}$ . Учитывая, что хемилюминесцентный ответ крови определяется в основном фагоцитирующими клетками, способными продуцировать АФК, исследование проводилось в цельной крови.

Хемилюминесцентный анализ основан на регистрации интенсивности «респираторного взрыва» [1, 3]. 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 завершеному фагоцитозу [2].

Венозную кровь (1 мл) из периферической вены забирали в пробирки Eppendorf, перемешивая с 80 ЕД гепарина. Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 100 мкл люминола (AppliChem, Германия) в концентрации  $10^{-5}$  М, в случае определения индуцированной хемилюминесценции — 40 мкл зимозана

(Sigma, Германия), 840 мкл раствора Хенкса без красителя и 20 мкл цельной крови для определения индуцированной хемилюминесценции или 880 мкл раствора Хенкса — для спонтанной.

Регистрация светоизлучения спонтанной и индуцированной хемилюминесцентной реакции производилась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL3604» (СКТБ «Наука», г. Красноярск). Управление хемилюминесцентным анализатором и оценка результатов осуществлялись через персональный компьютер. Определялись следующие характеристики: время выхода кривой на максимум ( $T_{\text{max}}$ ), максимальная интенсивность свечения ( $I_{\text{max}}$ ), светоплощадь свечения ( $S$ ) при спонтанной и индуцированной хемилюминесценции, а также индексы активации, демонстрирующие усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, относительно спонтанной — соотношения  $I_{\text{max}}$  инд./ $I_{\text{max}}$  спон. и  $S_{\text{max}}$  инд./ $S_{\text{max}}$  спон. Максимальная интенсивность и светоплощадь свечения оценивались в относительных единицах (о.е.).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ «Statistica 8.0» (StatSoft, USA). Нормальность распределений проверялась методом Колмогорова—Смирнова. Данные представлены в виде медианы ( $Me$ ), нижнего и верхнего квартилей ( $C_{25}$ – $C_{75}$ ). Статистическая значимость различий независимых групп оценивали с помощью критерия Манна—Уитни ( $U$ ). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

Все исследуемые показатели оценивались в возрастном аспекте.

## Результаты и обсуждение

Анализ параметров хемилюминесценции у детей с острым лимфобластным лейкозом показал, что время выхода хемилюминесцентной кривой, отражающее скорость образования АФК, значительно не отличается от группы контроля (табл. 1).

При оценке интенсивности свечения отмечены следующие особенности: при спонтанной хемилюминесценции уровень исследуемого показателя превышал аналогичный при сравнении с группой контроля у больных в возрастных группах от 3 до 7, от 7 до 11, от 15 до 17 лет (табл. 2). Следовательно, изначально способность к генерации АФК в указанных группах была повышена. Можно предположить, что данный факт связан с тем, что лейкоциты у детей с ОЛЛ были активированы вследствие предшествовавших инфекционных осложнений. Индукция «дыхательного взрыва» в нейтрофилах приводила к значимому увеличению продукции АФК лишь у больных ОЛЛ в возрасте от 15 до 17 лет. Индекс активации

**ТАБЛИЦА 1. ВРЕМЕННЫЕ ПАРАМЕТРЫ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ У ДЕТЕЙ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

Возраст	Время выхода кривой на максимум при хемилюминесценции цельной крови у детей с ОЛЛ, сек [Me (C <sub>25</sub> ; C <sub>75</sub> )]			
	Показатель	Контрольная группа	Больные ОЛЛ	p
1-3 года	Tmax спон.	1570 (332; 1653)	3522 (1453; 4318)	0,36
	Tmax инд.	1573 (1241; 1592)	1797 (1345; 1824)	0,71
3-7 лет	Tmax спон.	4219 (433; 4228)	1580 (1279; 1453)	0,37
	Tmax инд.	1503 (1357; 1531)	1341 (1009; 1462)	0,16
7-11 лет	Tmax спон.	3340 (2757; 3900)	2761 (164; 2982)	0,15
	Tmax инд.	1723 (1359; 1730)	1480 (138; 1620)	0,37
11-15 лет	Tmax спон.	3776 (319; 4320)	3138 (1752; 3138)	0,46
	Tmax инд.	1712 (1483; 1712)	1582 (819; 1582)	0,91
15-18 лет	Tmax спон.	2970 (313; 4116)	2307 (430; 2655)	0,52
	Tmax инд.	1669 (1537; 1741)	1541 (637; 1660)	0,63

I<sub>max</sub> инд./I<sub>max</sub> спон. оказался ниже, чем в группе контроля, у больных в возрасте от 3 до 7 и от 11 до 15 лет, что указывает на истощение резервных возможностей нейтрофилов отвечать на стимуляцию повышением генерации АФК.

При анализе светоплощади хемилюминесценции статистически значимое повышение данного показателя при спонтанной хемилюминесценции при сравнении с группой контроля регистрировалась у пациентов с ОЛЛ во всех возрастных группах (табл. 3). После воздействия

зимозана показатель светоплощади оставался статистически значимо более высоким в сравнении со здоровыми детьми в возрастных группах 1-3 года и 15-17 лет. При оценке соотношения S инд./S спон. у больных ОЛЛ указанный индекс активации оставалось сниженным у больных в возрасте 1-3 года, 3-7 лет, 11-15 лет. Таким образом, способность нейтрофилов реагировать на стимуляцию повышением продукции АФК остается сниженной в сравнении со здоровыми детьми.

**ТАБЛИЦА 2. ИНТЕНСИВНОСТЬ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ У ДЕТЕЙ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

Возраст	Максимальное значение интенсивности свечения при хемилюминесценции цельной крови у детей с ОЛЛ, о.е. [Me (C <sub>25</sub> ; C <sub>75</sub> )]			
	Показатель	Контрольная группа	Больные ОЛЛ	p
1-3 года	I <sub>max</sub> спон.	103 (99; 104)	217 (183; 355)	0,06
	I <sub>max</sub> инд.	11053 (353; 1120)	676 (303; 1147)	0,58
	I <sub>max</sub> инд./I <sub>max</sub> спон.	19,6 (3,02; 11,13)	1,48 (1,10; 5,53)	0,07
3-7 лет	I <sub>max</sub> спон.	89 (78; 89)	234 (105; 400)	< 0,05
	I <sub>max</sub> инд.	1027 (320; 1031)	677 (256; 802)	0,35
	I <sub>max</sub> инд./I <sub>max</sub> спон.	11,01 (2,41; 11,82)	1,79 (1,43; 3,12)	< 0,01
7-11 лет	I <sub>max</sub> спон.	99 (84; 104)	253 (89; 292)	< 0,05
	I <sub>max</sub> инд.	422 (260; 457)	290 (159; 480)	0,65
	I <sub>max</sub> инд./I <sub>max</sub> спон.	5,02 (2,02; 5,08)	1,81 (0,96; 2,52)	0,15
11-15 лет	I <sub>max</sub> спон.	105 (74; 112)	111 (62; 111)	0,81
	I <sub>max</sub> инд.	1090 (261; 1090)	231 (102; 111)	0,06
	I <sub>max</sub> инд./I <sub>max</sub> спон.	3,52 (1,2; 10,48)	1,81 (1,33; 1,84)	< 0,05
15-18 лет	I <sub>max</sub> спон.	86 (76; 86)	178 (117; 200)	< 0,01
	I <sub>max</sub> инд.	748 (503; 768)	873 (210; 1037)	< 0,01
	I <sub>max</sub> инд./I <sub>max</sub> спон.	8,62 (4,20; 8,88)	7,01 (1,83; 7,08)	0,20

ТАБЛИЦА 3. ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА У ДЕТЕЙ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Возраст	Светоплощадь хемилюминесценции цельной крови у детей с ОЛЛ, × 10 <sup>4</sup> о.е. [Me (C <sub>25</sub> ;C <sub>75</sub> )]			
	Показатель	Контрольная группа	Больные ОЛЛ	p
1-3 года	S спон.	0,47 (0,45; 0,48)	2,94 (1,62; 3,06)	< 0,05
	S инд.	3,37 (1,55; 3,56)	5,40 (4,42; 9,30)	< 0,05
	S инд./S спон.	6,7 (3,21; 6,92)	1,33 (1,11; 5,73)	< 0,05
3-7 лет	S спон.	0,43 (0,30; 0,45)	1,7 (1,01; 2,77)	< 0,01
	S инд.	3,51 (2,02; 3,74)	6,33 (1,95; 9,01)	0,31
	S инд./S спон.	8,47 (1,89; 8,61)	1,47 (1,31; 2,78)	< 0,05
7-11 лет	S спон.	0,51 (0,44; 0,56)	3,12 (0,76; 0,46)	< 0,05
	S инд.	2,25 (1,14; 2,56)	5,13 (0,76; 4,58)	0,65
	S инд./S спон.	3,38 (1,65; 4,26)	1,47 (0,81; 2,08)	0,15
11-15 лет	S спон.	0,54 (0,40; 0,55)	1,35 (0,76; 4,58)	< 0,05
	S инд.	3,51 (1,08; 3,51)	2,40 (1,34; 10,3)	0,75
	S инд./S спон.	6,42 (2,67; 6,53)	1,57 (1,08; 1,63)	< 0,05
15-18 лет	S спон.	0,42 (0,37; 0,44)	1,68 (0,74; 1,68)	< 0,01
	S инд.	2,66 (2,04; 2,69)	5,22 (2,75; 6,62)	< 0,01
	S инд./S спон.	6,24 (3,37; 6,73)	5,11 (1,58; 5,11)	0,20

## Заключение

В результате проведенного исследования выявлены особенности функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов детей с ОЛЛ, получающих программную химиотерапию. Установлено, что скорость генерации АФК фагоцитами у большинства больных ОЛЛ значимо не отличается от группы контроля. При спонтанной хемилюминесцентной реакции выявлено повышение продукции АФК, что свидетельствует о повышении инициальной функциональной активности фагоцитирующих клеток, однако их резервные возможности отвечать на стимуляцию «респираторного взрыва» оказались сниженными.

## Список литературы

1. Афонина Г.Б., Майданник В.Г. Клинические аспекты применения хемилюминесцентного анализа // Врачебное дело. — 1990. — № 9. — С. 73-78.
2. Земсков В.М., Барсуков А.М., Безносенко А.А. Изучение функционального состояния фагоцитов человека (кислородный метаболизм и подвижность клеток): Методические рекомендации МЗ РФ. — М., 1988. — С. 12-15.
3. Маянский Д.Н. Хроническое воспаление. — М.: Медицина, 1991. — С. 49-51.
4. Румянцев А.Г., Самочатова Е.В. Результаты лечения острых лейкозов с использованием интенсивной терапии // Гематология и трансфузиология. — 1996. — № 2. — С. 3-7.
5. Стандарты оказания специализированной помощи детям и подросткам с гематологическими и онкологическими заболеваниями. — М.: МЕДПРАКТИКА-М, 2009. — С. 247-256.

скими и онкологическими заболеваниями. — М.: МЕДПРАКТИКА-М, 2009. — С. 247-256.

6. 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, N 1. — P. 58-64.
7. Nucci M., Spector N., Bueno A.P., Solza C., Perecmanis T., Bacha P.C., Pulcheri W. Risk factors and attributable mortality associated with superinfections in neutropenic patients with cancer // Clin. Infect. Dis. — 1997. — Vol. 24, N 4. — P. 575-579.
8. Pui C.H., Boyett J.M., Rivera G.K., Hancock M.L., Sandlund J.T., Ribeiro R.C., Rubnitz J.E., Behm F.G., Raimondi S.C., Gajjar A., Razzouk B., Campana D., Kun L.E., Relling M.V., Evans W.E. 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, N 14. — P. 2286-2294.
9. Pui C.H., Sandlund J.T., Pei D., Campana D., Rivera G.K., Ribeiro R.C., Rubnitz J.E., Razzouk B.I., Howard S.C., Hudson M.M., Cheng C., Kun L.E., Raimondi S.C., Behm F.G., Downing J.R., Relling M.V., Evans W.E. 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, N 9. — P. 2690-2696.

поступила в редакцию 11.04.2011  
отправлена на доработку 28.04.2011  
принята к печати 30.05.2011