

В.Н. Семелёв, В.В. Тыренко, В.Ю. Никитин,
А.К. Юркин, И.А. Сухина, Л.А. Тараканова

Исследование показателей клеточного и гуморального иммунитета у больных острым миелоидным лейкозом и сепсисом

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. Исследованы показатели клеточного и гуморального иммунитета у больного острым миелоидным лейкозом (*t (11;19) (q23; p13.1) (FAB M5b вариант)*) с диагностированным сепсисом после проведения курса высокодозной химиотерапии. Установлено, что в 1-е сутки у больного на фоне лейкопении, относительной и абсолютной лимфопении отмечалось выраженное снижение абсолютного числа основных субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток с умеренной их активацией, вторичный В-клеточный иммунодефицит, усиление фагоцитарной активности нейтрофилов до 97%. Средняя интенсивность флюоресценции CD 64 на мембране нейтрофилов составляла 47 у. е. На 7-е и 21-е сутки наблюдалось постепенное снижение обихих Т-клеток, относительное увеличение количества цитотоксических Т-клеток, снижение активированных Т-лимфоцитов и регуляторных Т-хелперных клеток при повышении относительного количества активированных Т-клеток и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, что свидетельствовало о достаточно выраженной избирательной активации цитотоксических Т-клеток. В то же время сохранялись признаки активации НК-клеток и вторичного В-клеточного иммунодефицита. На мембране активированных нейтрофилов на 7-е и 21-е сутки отмечалось постепенное снижение средней интенсивности флюоресценции CD 64 до 23,9 и 4,2 у. е. соответственно. Полученные данные свидетельствовали об умеренной положительной динамике и постепенном уменьшении активности воспалительного процесса. Положительная экспрессия антигена CD 64 также позволяет говорить о выходе больного из сепсиса.

Ключевые слова: сепсис, острый миелоидный лейкоз, иммунная система, показатели клеточного иммунитета, показатели гуморального иммунитета, проточная цитофлуориметрия, Т-клетки, НК-клетки, В-клетки, CD 64, средняя интенсивность флюоресценции.

Введение. За последние десятилетия благодаря использованию современных программ терапии удалось добиться значительного прогресса в лечении многих злокачественных гематологических заболеваний. В то же время долгосрочные результаты лечения острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) взрослых за последние годы, несмотря на совершенствование терапии выживания и использования ряда новых препаратов, принципиально не изменились. В среднем 5-летняя общая выживаемость больных в возрасте до 60 лет составляет 35–50%, в группе пожилых лиц не превышает 10–12%, а доля летальных исходов, связанных с лечением, составляет 7–18% [10]. Во многом такая высокая летальность обусловлена развитием инфекционных осложнений, которые обусловлены нейтропенией, нарушениями клеточного и гуморального иммунитета, повреждением слизистой желудочно-кишечного тракта и наличием центрального венозного катетера [6, 4, 9].

При генерализации инфекционного процесса у данной группы больных существует высокая вероятность развития сепсиса. По данным R.S. Hotchkiss, I.E. Karl [14], сепсис регистрируется у 30% онкогематологических больных после проведения курсов химиотерапии и является одной из наиболее частых причин

перевода их в отделения реанимации и интенсивной терапии [17, 1], а также смертности, не связанной с рецидивом заболевания [18, 16]. Особенно это актуально для больных ОМЛ. Так, по данным Е.Н. Паровичниковой [8], в процессе проведения первого курса индукционной терапии у 17,6% больных ОМЛ был диагностирован сепсис. Основными возбудителями сепсиса являются *Escherichia coli* (17,8%), коагулаза-негативные стафилококки (17,4%), *Enterococcus spp.* (10,3%), *Pseudomonas aeruginosa* (7,6%), *Klebsiella pneumoniae* (8,2%) [6].

Дисфункция иммунной системы при тяжелом сепсисе формируется и углубляется преимущественно в клеточном звене иммунной системы, а наблюдаемые у септических больных нарушения иммунореактивности можно классифицировать как комбинированный структурно-функциональный Т-лимфоцитарно-моноцитарный иммунодефицит [5]. При этом нарушения в Т-клеточном звене системы иммунитета полноценно не компенсируются активацией фагоцитарной составляющей и гуморального иммунитета [2], а выраженность вторичного иммунодефицита данного типа является тем прогностическим фактором, который определяет выживаемость пациентов [5, 2, 11].

В современной диагностике сепсиса основные усилия сосредоточены на поиске новых методик исследования, которые бы не только с высокой долей вероятности могли подтвердить или опровергнуть наличие септического процесса, но и полноценно отражали состояние иммунной системы больного. За последние десятилетия ведущие позиции в диагностике различных нарушений функционирования иммунной системы в клинико-лабораторной практике заняла методика проточной цитофлуориметрии, позволяющая проводить диагностику не только дисфункции иммунной системы, но и различных заболеваний, в том числе инфекционных.

В последнее время внимание исследователей направлено на поверхностные антигены нейтрофилов как диагностические маркеры сепсиса [15]. Наиболее информативным из них является CD 64, представляющий собой высокоаффинный Fc-рецептор, экспрессия которого повышается в течение инфекции и сепсиса, хотя у здоровых людей его плотность на поверхности нейтрофилов незначительна [12].

Цель исследования. Исследовать динамику показателей клеточного и гуморального иммунитета на фоне проведения терапии у больного ОМЛ с диагностированным сепсисом в период нейтропении после проведения курса высокодозной химиотерапии.

Материалы и методы. Проведено исследование показателей клеточного и гуморального иммунитета у 29-летнего больного ОМЛ с диагностированным сепсисом в период нейтропении после проведения курса высокодозной химиотерапии, находившегося на стационарном лечении в клинике факультетской терапии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова.

Исследование субпопуляций лимфоцитов выполнялось на проточном цитофлуориметре «Cytomics FC500» фирмы «Beckman Coulter» (Соединенные Штаты Америки) с использованием 4- и 5-цветных комбинаций прямых моноклональных антител и изотипических контролей той же фирмы. В качестве количественного критерия, характеризующего степень экспрессии поверхностных или внутриклеточных антигенов клетки, применяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) популяции клеток.

Оценку фагоцитарного звена иммунитета проводили с помощью определения фагоцитарной активности в пробе с латексом с подсчетом фагоцитарного индекса (процентное содержание нейтрофилов, вступивших в фагоцитоз от общего их числа), фагоцитарного числа (среднее содержание находящихся внутриклеточно частиц латекса в одном фагоцитирующем нейтрофиле) и определением функции нейтрофилов в пробе восстановления нитросинего тетразолия [7]. Гуморальное звено иммунитета оценивали количественным определением иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотке крови, используя иммуноферментный анализ (тест-системы закрытого акционерного общества «Вектор-Бест», Новосибирская область), и определением циркулирующих иммунных комплексов

(ЦИК) методом осаждения в 3,75% растворе полиэтиленгликоля (мол. м. 6000 Da) [3].

Исследование показателей общего анализ крови проводили на автоматическом гематологическом анализаторе «Sysmex KX-21» (Япония) с помощью коммерческого набора реактивов фирмы «Roch-Diagnostics» (Япония) (определялось количество лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, содержание гемоглобина и т. д.). Дополнительно проводился подсчет количества тромбоцитов в окрашенных мазках крови по методу Фолио и подсчет лейкоцитарной формулы в окрашенных препаратах крови. Скорость оседания эритроцитов определяли по унифицированной методике Панченкова.

C-реактивный белок крови определяли на автоматическом биохимическом анализаторе «Cobas Integra 400» фирмы «Roche» (Швейцария) с помощью коммерческого набора реактивов фирмы «Roch-Diagnostics» (Швейцария) количественным иммунотурбодиметрическим способом. Фибриноген определяли по методу Клауса на автоматическом анализаторе «STA-compact» с использованием прекалиброванного набора реактивов «STA-Fg» производства «Diagnostica Stago» (Франция). Концентрацию прокальцитонина (ПКТ) в сыворотке крови определяли, используя полуколичественную иммунохроматографическую методику с помощью наборов «PCT-Q» фирмы «Brahms» (Германия).

Забор материала осуществлялся в утренние часы. Отсчет времени проводился от дня верификации септического процесса – 1 сутки. Результаты показателей общего анализа крови и лабораторных маркеров системного воспаления представляли в 1-е, 5-е, 7-е и 21-е сутки, а исследований, характеризующих состояние системы иммунитета в 1-е, 7-е и 21-е сутки от момента диагностики сепсиса, т. е. в те временные сроки, когда наблюдались наиболее значимые их изменения.

Результаты и их обсуждение. На основании цитологического, цитогенетического и иммунофенотипического исследований костного мозга больному Г. установлен диагноз ОМЛ с t (11; 19) (q 23; p 13.1) (FAB M5b вариант). Риск высокий.

Лечение проводилось по унифицированному протоколу лечения больных ОМЛ в возрасте моложе 60 лет [2]. За период госпитализации больному проведено 2 курса индукционной терапии по схеме «7+3» (цитарабин 100 мг/м² 2 раза в сутки в течение 7 дней, даунорубин 60 мг/м² в сутки в течение 3 дней) и 2 курса консолидации по схеме «HiDAC» (цитарабин 3000 мг/м² 2 раза в сутки в течение 3 дней). Клинико-гематологическая ремиссия достигнута после первого курса индукции.

Через неделю после проведения 2-го курса консолидации на фоне развившихся постцитостатических осложнений (гемоглобин 68 г/л, тромбоциты 16×10⁹/л, нейтрофилы <0,5×10⁹/л) был зарегистрирован подъем температуры тела до 39,2°C. С учетом

отсутствия очагов инфекции по результатам осмотра и проведенных исследований, включающих микробиологическую лабораторную диагностику и компьютерную томографию органов грудной клетки и околоносовых пазух носа, пациенту был установлен предварительный диагноз фебрильная нейтропения и назначена эмпирическая антибактериальная терапия в варианте – цефтриаксон 6 г/сутки и амикацин 1,5 г/сутки. Через сутки на фоне сохраняющейся лихорадки появились жалобы на боли в паховой области слева, усиливающиеся при пальпации. Больной осмотрен хирургом без изменения проводимой тактики лечения. В последующие сутки на фоне сохраняющейся лихорадки выявлена инфильтрация в левой паховой области. Диагностирована флегмона паховой области в стадии инфильтрации. Произведена смена антибактериальной терапии на линезолид 1,2 г/сутки и дорипенем 1,5 г/сутки с положительным эффектом в виде снижения температуры до 36,9–37,2°C. В связи с распространением процесса на верхнюю треть бедра произведено хирургическое вмешательство – вскрытие и дренирование флегмоны.

С учетом клинической картины и лабораторных маркеров системного воспаления согласно диагностическим критериям сепсиса (SSC, 2012) [13] установлен диагноз сепсис.

По результатам исследований показателей иммунитета в 1-е сутки верификации септического процесса у больного на фоне лейкопении, относительной и абсолютной лимфопении было выявлено выраженное снижение абсолютного числа основных субпопуляций Т-лимфоцитов и NK-клеток. Процентное содержание Т-клеток свидетельствовало об умеренной активации как Т-хелперов, так и цитотоксических Т-лимфоцитов, что проявлялось ростом процента общих Т-клеток ($CD3^+=90,1\%$), Т-хелперов ($CD3^+ CD4^+=70,4\%$), активированных $CD25^+$ – ($CD3^+ CD25^+=16,6\%$) и HLA-DR⁺-Т-клеток ($CD3^+ HLA-DR^+=18,4\%$), активированных цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+ CD8^{bright} CD38^+=12,4\%$). Наряду с этим отмечалась активация натуральных киллерных клеток, что подтверждалось ростом процента активированных HLA-DR⁺-NK-лимфоцитов ($CD16^+ 56^+ HLA-DR^+=11,9\%$) и активированных $CD38^+$ – NK-клеток ($CD3^- CD8^{dim} CD38^+=23,5\%$). При оценке В-клеток был обнаружен вторичный В-клеточный иммунодефицит, характеризовавшийся снижением до нулевых значений количества всех субпопуляций В-лимфоцитов. В сыворотке крови был увеличен уровень ЦИК до 86 Ед. Наблюдалось усиление фагоцитарной активности нейтрофилов до 97%. На мембране активированных нейтрофилов отмечалась яркая экспрессия CD 64 антигена на 100% гранулоцитов. При этом средняя интенсивность флуоресценции CD 64 на мембране клеток составляла MFI = 47 у.е.

В дальнейшем на фоне проведения длительной комплексной терапии, включающей как хирургическое лечение, так и иммунокоррекцию (препарат человеческого нормального иммуноглобулина – пентаглобин

в дозировке 5 мл/кг массы тела в течение пяти дней), наблюдалась положительная динамика в клинической картине (санация очага инфекции, стабилизация состояния больного), нормализация показателей клинического анализа крови и лабораторных маркеров системного воспаления.

На седьмые сутки проведения комплексной терапии по результатам иммунограммы у больного на фоне сохраняющейся относительной и абсолютной лимфопении отмечалось постепенное снижение процента Т-хелперов ($CD3^+ CD4^+=64,9\%$) и увеличение относительного количества Т-ЦТЛ ($CD3^+ CD8^+=24,7\%$). Выявлено нарастание признаков активации основных субпопуляций Т-клеток, что проявлялось ростом процента активированных $CD25^+$ – ($CD3^+ CD25^+=38,5\%$) и HLA-DR⁺-Т-клеток ($CD3^+ HLA-DR^+=23,2\%$), активированных цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+ CD8^{bright} CD38^+=12,0\%$) и регуляторных Т-хелперных клеток ($CD4^+ CD25^{bright} CD45^+=6,8\%$). Также, сохранялись признаки активации натуральных киллерных клеток, что подтверждалось высоким процентом активированных HLA-DR⁺-NK-лимфоцитов ($CD16^+ 56^+ HLA-DR^+=11,0\%$) и активированных $CD38^+$ -NK-клеток ($CD3^- CD8^{dim} CD38^+=34,5\%$). Относительное содержание различных субпопуляций В-клеток, по-прежнему, было снижено до нулевых значений. В сыворотке крови наблюдалось снижение уровня ЦИК до 60 Ед. и увеличение концентрации иммуноглобулина G до 26,46 г/л. При анализе экспрессии антигена CD 64 отмечалось постепенное снижение средней интенсивности флуоресценции CD 64 на мембране активированных гранулоцитов (MFI = 23,9 у. е.). В целом, полученные данные свидетельствовали о сохранении достаточно высокой активности острого генерализованного воспалительного процесса.

На двадцать первые сутки от верификации септического процесса постепенно снизился процент общих Т-клеток ($CD3^+=88,5\%$) за счет уменьшения Т-хелперов ($CD3^+ CD4^+=49,5\%$). В то же время наблюдалось относительное увеличение количества цитотоксических Т-клеток ($CD3^+ CD8^+=36,9\%$). Снизился процент активированных $CD25^+$ – Т-лимфоцитов ($CD3^+ CD25^+=10,8\%$) и регуляторных Т-хелперных клеток ($CD4^+ CD25^{bright} CD45^+=3,3\%$), повысилось относительное количество активированных HLA-DR⁺-Т-клеток ($CD3^+ HLA-DR^+=34,6\%$) и активированных $CD38^+$ – цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+ CD8^{bright} CD38^+=27,5\%$), что свидетельствовало о достаточно выраженной избирательной активации цитотоксических Т-клеток. Наряду с этим сохранялись признаки активации натуральных киллерных клеток, что подтверждалось высоким процентом активированных HLA-DR⁺-NK-лимфоцитов ($CD16^+ 56^+ HLA-DR^+=6,0\%$) и активированных $CD38^+$ – NK-клеток ($CD3^- CD8^{dim} CD38^+=23,5\%$). Относительное содержание различных субпопуляций В-клеток, по-прежнему, было снижено до нулевых значений. В сыворотке крови сохранялся повышенный уровень ЦИК до 68 Ед. и высокая концентрация иммуноглобулина G до 23,8 г/л. На мембране

активированных гранулоцитов отмечалось значительное снижение средней интенсивности флуоресценции CD 64 до 4,2 у.е. В целом, полученные данные свидетельствовали об умеренной положительной динамике и постепенном уменьшении активности воспалительного процесса, а снижение экспрессии антигена CD 64 позволяет говорить о выходе больного из сепсиса.

Выводы

1. Больные ОМЛ в период нейтропении относятся к группе высокого риска развития инфекционных осложнений и нуждаются в проведении комплексного обследования и лечения с привлечением специалистов различного профиля.

2. У больных ОМЛ при развитии и течении септического процесса формируются комплексные нарушения показателей иммунитета, требующие наблюдения и коррекции. Следовательно, состояние иммунной системы больных ОМЛ в период нейтропении не только обуславливает развитие септического процесса, но и предопределяет его дальнейшее течение;

3. Проточная цитофлуориметрия является информативной методикой комплексной оценки всех звеньев показателей системы иммунитета, а экспрессия антигена CD 64 на нейтрофилах является высокочувствительным маркером, характеризующим активность септического процесса.

Литература

1. Галстян, Г.М. Полиорганная патология при септическом шоке у больных с гемобластомами / Г.М. Галстян [и др.] // Анестезиол. и реаниматол. – 2000. – № 2. – С. 36–40.
2. Гринев, М.В. Хирургический сепсис / М.В. Гринев [и др.]. – СПб. – М., 2001. – 315 с.
3. Гудина, Р.В. Использование ФЭК нефелометра при определении циркулирующих иммунных комплексов / Р.В. Гудина // Лабораторное дело. – 1988. – № 7. – С. 67–68.
4. Давыдов, М.И. Инфекции в онкологии / М.И. Давыдов. – М.: Практическая медицина, 2009. – 472 с.
5. Козлов, В.К. Дисфункция иммунной системы в патогенезе сепсиса / В.К. Козлов // Общая реаниматология. – 2005. – Т. 1, № 4. – С. 65–76.
6. Клясова, Г.А. Антимикробная терапия / Г.А. Клясова // Программное лечение заболеваний системы крови. Сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови: в 2 т. – М.: Практика, 2012. – Т. 2. – С. 829–857.
7. Нагаев, Б.С. Модификация цитохимического метода восстановления нитросинового тетразолия / Б.С. Нагаев // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 7–11.
8. Паровичникова, Е.Н. Лечение больных острыми миелоидными лейкозами по протоколу российского многоцентрового рандомизированного исследования ОМЛ-01.10: результаты координационного центра / Е.Н. Паровичникова [и др.] // Терапевтический архив. – 2014. – Т. 86, № 7. – С. 14–23.
9. Птушкин, В.В. Инфекционные осложнения у больных с онкогематологическими заболеваниями / В.В. Птушкин, Н.С. Багирова // Клиническая онкогематология: руководство для врачей – М.: Медицина, 2001. – С. 507–528.
10. Савченко, В.Г. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов / В.Г. Савченко [и др.] // Гематол. и трансфузиол. – Прилож. 2. – 2014. – Т. 59, № 1. – С. 2–29.
11. Толстой, А.Д. Острый панкреатит как иммунологическая проблема / А.Д. Толстой [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1, № 2. – С. 51–52.
12. Хайдуков, С.В. Возможности проточной цитофлуориметрии в диагностике инфекционных заболеваний. Ч. 1 / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка // Инфекция и иммунитет – 2011. – Т. 1, № 1. – С. 59 – 66.
13. Dellinger, R.P. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012 / R.P. Dellinger [et al.] // Crit Care Med. – 2013. – Vol. 41, Suppl. 2. – P. 580–637.
14. Hotchkiss, R.S. The pathophysiology and treatment of sepsis / R.S. Hotchkiss, I.E. Karl // N. Engl. J. Med. 2003 – Vol. 348, Suppl. 2. – P. 138–150.
15. Ng, P.C. Quantitative measurement of monocyte HLA-DR expression in the identification of early-onset neonatal infection / P.C. Ng [et al.] // Biol. Neonate. – 2006. – Vol. 89, №2. – P. 75–81.
16. Penack, O. Management of sepsis in neutropenic patients: 2014 updated guidelines from the Infectious Diseases Working Party of the German Society of Hematology and Medical Oncology (AGIHO) / O. Penack [et al.] // Ann Hematol – 2014 – Vol. 93, Suppl. 7. – P. 1083–1095.
17. Remick, D.G. Pathophysiology of sepsis / D.G. Remick // Am. J. Pathol. – 2007. – Vol. 170, Suppl. 5. – P. 1435–1444.
18. Wisplinghoff, H. Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States / H. Wisplinghoff [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2003 – Vol. 36, Suppl. 9. – P. 1103–1110.

V.N. Semelev, V.V. Tyrenko, V.Yu. Nikitin, A.K. Yurkin, I.A. Sukhina, L.A. Tarakanova

Examination of cellular and humoral immunity in patient with acute myeloid leukemia and sepsis

Abstract. We have examined indicators of cellular and humoral immunity in patient with acute myeloid leukemia (t (11; 19) (q23; p13.1) (FAB M5b option)) and diagnosed with sepsis after course of high-dose chemotherapy. It is found that first day of the patient against the background of leukopenia, relative and absolute lymphopenia noted marked reduction in the absolute number of major subpopulations of T-lymphocytes and NK-cell with moderate their activation, the secondary B-cell immunodeficiency, increasing phagocytic activity of neutrophils to 97%. The mean fluorescence intensity CD 64 on the neutrophils membrane amounted to 47 c. u. At 7 and 21 days was observed a gradual reduction in the percentage total T-cells relative increase in cytotoxic T-cells, reduction in the percentage of activated T-lymphocytes and T-helper cells by increasing the relative number of activated T-cells and activated cytotoxic T-lymphocytes, indicating a fairly pronounced selective activation of cytotoxic T-cells. At the same time kept signs of activation of NK-cells and secondary B-cell immunodeficiency. On the membrane of activated neutrophils on the 7-th and 21-th day there was a gradual decrease in mean fluorescence intensity of CD 64 to 23,9 and 4,2 c. u. respectively. The data showed a moderate positive trend and the gradual reduction of inflammatory activity. Positive expression of antigen CD 64 allows us to speak about the withdrawal of the patient from sepsis.

Key words: sepsis, acute myeloid leukemia, immune system, parameters of cellular immunity, humoral immunity, flow cytometry, T-cells, NK-cells, B-cells, CD 64, mean fluorescence intensity.

Контактный телефон: +7-911-132-23-18; e-mail: vsemelev@yandex.ru