

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕМОКОАГУЛЯЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ И ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ

Д.М.Зубаиров, И.А. Андрушко, Л.Д. Зубаирова, Г.Ю. Свинтенюк,
А.Р. Ахмадеев, В.Н. Григорьев, З.М. Нехорошкова

Кафедра биохимии (зав. — акад. АНТ, проф. Д.М.Зубаиров), кафедра патофизиологии (зав. — проф. М.М.Миннибаев) Казанского государственного медицинского университета, Республиканская клиническая больница (главрач — Р.Г.Фатихов) МЗ РТ

Коагулопатия у больных миелобластным лейкозом, в частности острым промиелоцитарным лейкозом, часто является комплексной и состоит из классического синдрома ДВС [2, 4], системного фибринолиза и гемостатических сосудистых нарушений, вызванных протеолитическими ферментами, например лейкоцитарной эластазой.

Злокачественные програнулоциты у больных острым промиелоцитарным лейкозом содержат тканевой фактор [5], который инициирует образование тромбина по внешнему пути. Кроме того, предположено, что злокачественные клетки могут продуцировать большое количество цитокинов, интерлейкина 1, который стимулирует синтез тканевого фактора эндотелием кровеносных сосудов и моноцитами. ДВС часто драматически усугубляется во время циторедуктивной химиотерапии. Процесс, наиболее вероятно, обусловлен активацией Fas-рецепторов (система CD95) с

последующей активацией протеаз, эндонуклеаз, деградацией ДНК, апоптозом [6, 7] и освобождением после этого преформированного тканевого фактора или других прокоагулянтов в циркуляцию (рис. 1).

Протеазы, кроме тромбина и пламина, продуцируются миелоидными клетками у пациентов с острым лейкозом. Один из протеолитических ферментов — эластаза — была идентифицирована в культуре лейкозных клеток. Эластаза обладает широким спектром протеолитической активности и деградирует фибриноген на большие и меньшие продукты деградации (рис. 1). Еще не выяснено, насколько протеазы ответственны за кровоточивость у больных острым лейкозом. Наконец, кроме тромбоцитопении, химиотерапевтические агенты, антибиотики или циркулирующие продукты деградации фибриногена вызывают дисфункцию тромбоцитов и нарушение образования гемостатической пробки.



Рис. 1. Механизм нарушения гемостаза у больных острым промиелоцитарным лейкозом.

Одной из причин, препятствующих успешному лечению больных миелобластными лейкозами, является развитие синдрома ДВС [1], поэтому мы поставили задачу оценить эффективность предложенного ранее одним из нас [3] метода определения тканевого тромбопластина в клетках для обнаружения экспрессии тканевого фактора лейкозными клетками в периферической крови и в клетках пунктата костного мозга, так как именно под его влиянием развивается внутрисосудистое свертывание крови.

Под нашим наблюдением находились 13 первичных больных, у 6 из них был острый миелобластный лейкоз и у 7 — хронический миелолейкоз. Диагноз устанавливали на основании данных клиники, гемограмм, миелограмм, цитохимии и иммунофенотипирования клеток костного мозга методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител к антигенам HLA-DR, CD10, CD34, CD38, CD71, CD95, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD24, CD72, sIgM, sIgG, κ -цепей, λ -цепей, CD11b и лазерного проточного цитофлуориметра «EPICS-XL-MCZ, Coulter». Для контроля была исследована периферическая кровь 3 здоровых добровольцев.

Клетки периферической крови (гранулоциты, мононуклеары) здоровых добровольцев, больных острым миелобластным лейкозом и хроническим миелолейкозом (бластные и созревающие формы), а также клетки костного мозга больных изолировали, используя градиенты раствора Перколла в забуференном 0,9% растворе NaCl (pH 7,4). Выделение бластных клеток происходило на плотности 1,047—1,05, миелоцитов и метамиелоцитов — 1,057, гранулоцитов — 1,07, мононуклеаров — 1,077. Клетки были ресуспендированы в растворе Хенкса (pH 7,4). Идентификация клеток производилась морфологически в мазках, окрашенных по Романовскому — Гимзе.

При определении коагуляционной активности лейкозных клеток использовали следующие реактивы:

1 Субстратную плазму, дефицитную по факторам XI и XII, получали из крови доноров [3], которую сохраняли при -20°C . Время ее свертывания при ре-

кальцификации составляло $119,05 \pm 5,22$ с, а при активации внутреннего пути гемокоагуляции каолином оно увеличивалось, а не уменьшалась, как в обычной плазме.

2 Суспензия фосфолипидов из бовьего сои — АПТВ-реактив (НИИГиПК С.-Петербург) с активностью $43,8 \pm 0,8$ с.

3 0,25 М раствор CaCl_2 .

4 Для исследования использовали суспензии лейкоцитов, содержащие от $0,5$ до $75 \times 10^9/\text{л}$ клеток, так как это количество находилось в пределах чувствительности метода.

В пробирке с внутренним диаметром 12 мм при температуре 37°C смешивали 0,1 мл суспензии фосфолипидов, 0,1 мл суспензии лейкоцитов, 0,2 мл 0,25 М CaCl_2 . Приготовленную смесь инкубировали в течение одной минуты. Затем из автоматической пипетки добавляли 0,1 мл свежеразмороженной субстратной плазмы и одновременно включали секундомер. Регистрировали время появления сгустка. Экспрессию тканевого фактора клетками выражали количественно в единицах активности, используя калибровочную кривую разведений мозгового тканевого тромбопластина Кировского НИИГиПК (рис. 2).

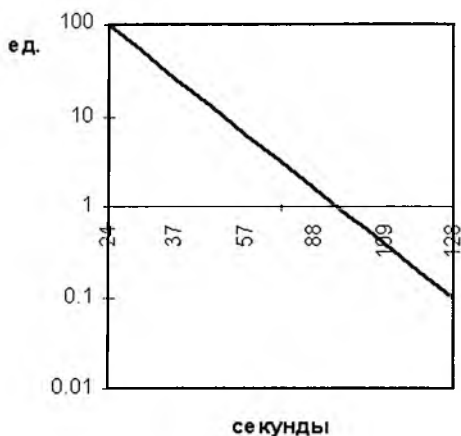


Рис. 2. Калибровочный график. По оси ординат — активность тканевого фактора в единицах в логарифмической шкале. По оси абсцисс — время свертывания в секундах.

Всем обследованным больным далее была назначена программная полихимическая терапия «7+3», «5+2» в сочетании цитостатиков — рубомицина, цитозара, вепезида.

У здоровых добровольцев активность тканевого фактора в клетках периферической крови практически не проявлялась ($0 - < 0,2$ ед). У больных же хроническим миелолейкозом бластные клетки периферической крови характеризовались отчетливо выраженной способностью активировать внешний путь свертывания крови, которая составляла в среднем $0,65 \pm 0,08$ ед. Значительно большей активностью обладали клетки периферической крови у больных острым миелобластным лейкозом: бластные клетки низкой плотности — $10,5$ ед/ 10^6 клеток, фракция высокоплотных бластов — $0,67 - 2,19$ ед/ 10^6 клеток, фракция лимфоцитов — $2,14$ ед/ 10^6 клеток. Высокой гемокоагуляционной активностью (от $7,93$ ед/ 10^6 до $233,33$ ед/ 10^6 клеток) отличались у них и клетки пунктатов костного мозга.

В лекции на XVII конгрессе по тромбозам и гемостазу, посвященной памяти Ш.Джонсон, Y.Nemerson (1999) на основании иммунохимической идентификации сообщил, что около 2% моноцитов и гранулоцитов периферической крови человека несут тканевой фактор на своей поверхности. С этих клеток тканевой фактор может передаваться на тромбоциты и в тромб. Таким образом, ставится под сомнение господствовавший долгие годы взгляд, что тканевой фактор не экспрессируется в клетках, которые находятся в прямом контакте с циркулирующей кровью.

Наши данные, во-первых, подтверждают ранее описанную экспрессию тканевого фактора миелобластами у больных острым миелолейкозом, причем как в периферической крови, так и в пунктатах костного мозга. Во-вторых, наши данные показывают, что у больных хроническим миелолейкозом экспрессия активности тканевого фактора в незашифрованном виде, хотя и в значительно меньшем количестве (в 4–30 раз), осуществляется миелобластами как в периферической крови, так и в пунктатах костного мозга. На основании проведенных исследований нельзя сделать заключение о характере экспрессии тканевого фактора отдельными клетками — равномерна она или избирательна. Изучая суспензии клеточных фракций, мы получили усредненные данные об их гемокоагуляционной активности. Для

решения этого вопроса необходимы иммуногистохимические исследования.

В целом, результаты свидетельствуют о несостоятельности концепции, утверждающей принципиальную невозможность образования тканевого фактора клетками крови. Таким образом, можно полагать, что развитие синдрома ДВС и кровоточивости под влиянием тканевого фактора, содержащегося в лейкоцитах, вероятно не только при остром миелобластном лейкозе, но и при хроническом миелолейкозе.

Поддержано грантами АНТ 03-5.5.1/99(ФП) и НИОКР 05-03/99(Ф)

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдулкадыров К.М., Бессмельцев С.С., Рукавицин О.А. Хронический миелолейкоз.—СПб, 1998.
2. Зубаиров Д.М.//Казанский мед. ж.—1988.— № 5.—С. 321—329.
3. Зубаиров Д.М., Байкеев Р.Ф.//Лабор. дело.—1991.—№12.—С.25—28.
4. Литвинов Р.И.//Казанский мед. ж.—2000.— № 1.—С. 48—52.
5. Bauer K.A., Conway E.M., Bach R. et al.//Thromb. Res.—1989.—Vol. 56.—P. 425—430.
6. Friesen C., Fulda S., Debatin K.M.//Leukemia.—1997.—Vol. 11.—P.1833—1841.
7. Iijima N., Miyamura K., Ito T., Tanimoto M., Sobue R., Saito H.//Blood.—1997.—Vol. 90.— P.4901—4909.

Поступила 17.07.98

REVEALING OF HEMOCOAGULATIVE ACTIVITY OF LEUKEMIA CELLS IN ACUTE MYELOBLASTIC LEUKEMIA AND CHRONIC MYELOLEUKEMIA

D. M. Zubairov, I.A. Andrushko, L.D. Zubairova, G.Yu. Svintenok, A.R. Akhmadeeva, V.N. Grigoriev, Z.M. Nekhoroshkova

Summary

Peripheral blood and punctates taken in 13 primary patients, 6 of which had acute myeloblastic leukemia and 7 — chronic myeloleukemia are studied. The peripheric blood in 3 healthy volunteers is studied for control. The method of revealing the tissue factor activity in blood cells of patients with leukemia is suggested. Previously described expression of the tissue factor by myeloblasts of patients with acute myeloblastic leukemia in peripheral blood as well as in bone marrow punctates is confirmed. It is shown that in patients with chronic myeloleukemia expression of the tissue factor activity is carried out by myeloblasts in peripheral blood as well as in bone marrow punctates. The results contradict the conception maintaining the principal impossibility of forming principal the tissue factor by blood cells. The development of disseminated intravascular blood coagulation syndrome and hemophilia under the influence of the tissue factor in leukocytes is possible not only in acute myeloblastic leukemia but in chronic myeloleukemia.