

*В.В. Афанасьева**А.К. Бутенко**И.Ю. Глуховская**К.П. Зак**Институт эндокринологии
и обмена веществ
им. В.П. Комиссаренко
АМН Украины, Киев, Украина**Украинский НИИ онкологии
и радиологии МЗ Украины,
Киев, Украина*

Ключевые слова: неходжкинская лимфома, миелосупрессия, рЧГМ-КСФ, ультраструктура моноцитов.

УЛЬТРАСТРУКТУРА МОНОЦИТОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ С НЕХОДЖКИНСКИМИ ЛИМФОМАМИ, ЛЕЧЕННЫХ МОЛГРАМОСТИМОМ

Резюме. Представлены данные электронно-микроскопического исследования моноцитов крови при лечении рЧГМ-КСФ (молграмостимом) детей с неходжкинскими лимфомами (НХЛ) и миелосупрессией, индуцированной химиотерапией. Молграмостим вводили подкожно в дозе 5 мкг/кг в сутки в течение 5–7 дней через 24 ч после полихимиотерапии. В результате наблюдали значительное увеличение абсолютного количества моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов в крови при хорошей переносимости препарата и улучшении общего состояния больных. При ультраструктурном анализе моноцитов непосредственно после химиотерапии (до введения рЧГМ-КСФ) выявляли отчетливые изменения ультраструктуры в виде маргинации гетерохроматина ядра, разрыхления матрикса цитоплазмы и уменьшения количества гранул. После применения молграмостима отмечали нормализацию субмикроскопического строения моноцитов и выраженное увеличение числа цитоплазматических гранул, значительно превышающее таковое у здоровых детей. Проведенные исследования дают основание считать, что рЧГМ-КСФ (молграмостим) у детей с НХЛ и миелосупрессией наряду со стимуляцией моноцитопоэза приводит к поступлению в кровь моноцитов, субмикроскопическое строение которых свидетельствует об их повышенной функциональной активности.

ВВЕДЕНИЕ

Получение с помощью генной инженерии высокоочищенных рекомбинантных препаратов гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (рЧГМ-КСФ) — молграмостима — расширило возможности изучения его биологических свойств и использования в клинической онкологии [1–3].

В многочисленных работах была детально исследована роль рЧГМ-КСФ в механизмах регуляции гранулоцитарно-макрофагального роста кроветворения и показана его высокая эффективность при лечении угрожающей жизни нейтрофилопении, индуцированной химиотерапией, и/или при трансплантации костного мозга и стволовых кроветворных клеток периферической крови (ПК) больным со злокачественными опухолями [4, 5].

Вместе с тем, в последние годы появились новые данные о том, что ГМ-КСФ обладает более широкими биологическими свойствами. Он способен не только восстанавливать миелопоэз, но и оказывать стимулирующее действие на эритро-, мегакариоцитопоэз и некоторые популяции лимфоцитов, в том числе естественные клетки-киллеры (ЕК-клетки) и Т-лимфоциты. Установлена жизненно важная роль ГМ-КСФ в регуляции различных функций иммунной системы, повышении защитных свойств организма против инвазии различных бактерий и грибов,

в механизмах воспаления, развитии инфекций, злокачественном росте и другой патологии. Препараты рЧГМ-КСФ стали использовать для профилактики особо опасных инфекций у больных с иммуносупрессией, как адъювант при приготовлении противовирусных и противоопухолевых вакцин и в генной терапии. Большое внимание привлекают сообщения о противоопухолевом эффекте рЧГМ-КСФ при солидных новообразованиях, отдельных формах лейкозов и лимфом [2, 6–9].

Было обнаружено, что в механизме лечебного действия рЧГМ-КСФ существенная роль принадлежит таким клеткам-мишеням, как моноциты/макрофаги, количество и функциональная активность которых под воздействием этого цитокина значительно повышается.

Проведенные рядом авторов [10–12] исследования, в основном на тканевых макрофагах экспериментальных животных или моноцитах крови человека *in vitro*, дают право считать, что ГМ-КСФ приводит к повышению цитолитической, фагоцитарной и секреторной активности моноцитов/макрофагов. После применения рЧГМ-КСФ повышается их реактивность к бактериальным липополисахаридам, активируется окислительный метаболизм, фагоцитоз, продукция цитолитических соединений и ангиостатина, тормозящего ангиогенез в опухоли, а также усиливается секреция ряда цитокинов.

Однако механизм повышения противоопухолевой активности моноцитов крови у больных онкологического профиля после применения ГМ-КСФ мало изучен. Практически отсутствуют сведения о влиянии ГМ-КСФ на ультраструктуру моноцитов, то есть состояние их органоидов, что может дать дополнительную информацию о субклеточном механизме действия этого цитокина. В наших предварительных электронно-микроскопических исследованиях было показано [3, 13], что у детей с неходжкинскими лимфомами (НХЛ) и химиотерапевтической миелосупрессией, которых лечили молграмостимом, моноцитоз в ПК сопровождается восстановлением ультраструктуры моноцитов, нарушенной в результате применения цитостатиков.

В настоящем сообщении приводятся новые данные о субмикроскопической организации моноцитов ПК у детей с НХЛ и химиотерапевтической миелосупрессией, которым в качестве терапии назначали молграмостим.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследованы 15 детей обоего пола в возрасте 8–12 лет с различными формами НХЛ, у которых после высокодозовой химиотерапии, включающей метотрексат, циклофосфамид, винкристин, доксорубин, цитарабин, этопозид и преднизолон, абсолютное число нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в крови резко снижалось до показателей менее 500 клеток в 1 мкл крови, что заставляло немедленно прекращать лечение цитостатиками. Контрольная группа состояла из 10 практически здоровых детей того же возраста и пола.

Молграмостим (лейкомакс фирмы «Novartis», Швейцария) вводили больным (основная группа) в дозе 5 мкг/кг в сутки ежедневно в течение 5–7 дней через 24 ч после прекращения миелосупрессивной терапии. Исследование крови проводили через день: дважды до применения молграмостима, затем во время его введения и дважды после. Общее количество лейкоцитов подсчитывали общепринятым методом. Лейкоцитарную формулу определяли в мазках крови, окрашенных по Паппенгейму, на 200 клеток. В отдельную группу выделяли большие гранулосодержащие лимфоциты (БГЛ).

Электронно-микроскопическое исследование лейкоцитов крови проводили непосредственно после прекращения химиотерапии, то есть во время нейтрофильного надиря, и второй раз — в период максимального увеличения количества НГ в крови, то есть на 3–5-й день после начала введения молграмостима. Тромбоцитарно-лейкоцитарную пленку фиксировали 2,5% раствором глутаральдегида на сбалансированном какодилатном буфере с добавлением 2% раствора сахарозы (рН 7,2), постфиксировали 1% раствором тетраоксида осмия на том же буфере, проводили через спирты восходящей концентрации, абсолютный ацетон и заключали в аралдит. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме

ЛКВ-8800 («ЛКВ», Швеция) и просматривали на электронных микроскопах JEM-100С и JEM-1200 EX («JEOL», Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общее количество лейкоцитов в крови больных основной группы до начала лечения, то есть в 1-й день введения молграмостима, в среднем составляло $(0,85 \pm 0,1) \cdot 10^9/\text{л}$, из них НГ — $34,4 \pm 8,4\%$ $(0,25 \pm 0,05) \cdot 10^9/\text{л}$, лимфоцитов — $59 \pm 5,6\%$ $(0,51 \pm 0,06) \cdot 10^9/\text{л}$ и моноцитов — $6,6 \pm 0,81\%$ $(0,05 \pm 0,001) \cdot 10^9/\text{л}$, то есть процентное содержание последних находилось в пределах нормы, хотя абсолютное их число было несколько сниженным. Эозинофильные гранулоциты и БГЛ обнаружить в мазках крови не удавалось. Динамика дальнейшего изменения абсолютного количества различных видов лейкоцитов в ПК после применения молграмостима представлена на рис. 1.

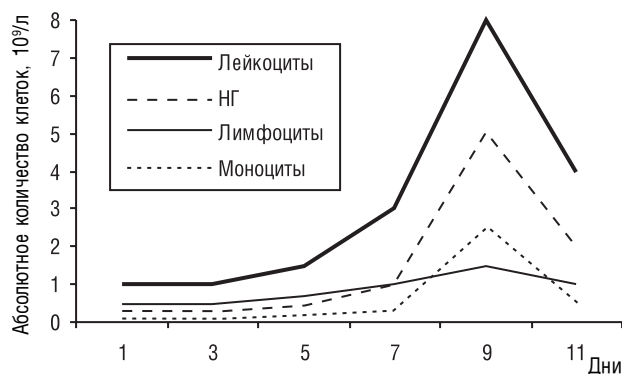


Рис. 1. Влияние молграмостима на абсолютное количество различных видов лейкоцитов крови у детей с НХЛ и химиотерапевтической миелосупрессией

При электронно-микроскопическом исследовании моноцитов крови у детей с НХЛ и миелосупрессией, индуцированной цитостатиками, было обнаружено, что эти клетки по своему строению несколько отличаются от таковых у здоровых детей (рис. 2, а, б). Наиболее типичными изменениями ультраструктуры моноцитов были более сглаженный контур плазматической мембраны, некоторая маргинация гетерохроматина ядра, в котором гораздо реже присутствовало небольшое компактное ядрышко, в более рыхлом матриксе цитоплазмы изредка определялся уменьшенный в размерах комплекс Гольджи. Многочисленные мелкие митохондрии конденсированного типа имели повышенную электронную плотность матрикса, что нередко затрудняло их дифференциацию от специфических гранул, количество которых, равно как пиноцитозных вакуолей и опущенных везикул, было значительно снижено (рис. 2, б).

Существует мнение [2], что моноциты крови и особенно тканевые макрофаги играют решающую роль в противомикробной клеточной иммунной защите организма при химиотерапевтической нейтрофилопении, так как они являются длительно живу-

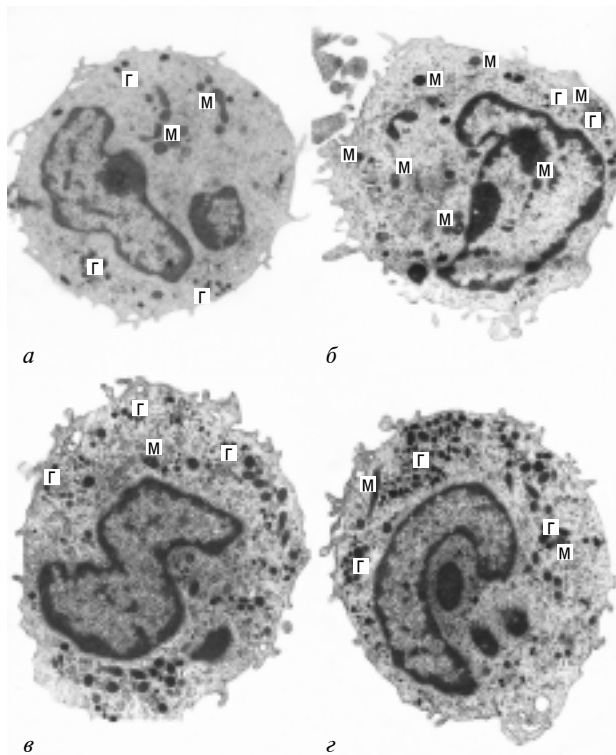


Рис. 2. Ультраструктура моноцитов крови здорового ребенка (а), больного с НХЛ и химиотерапевтической миелосупрессией (б) и больных с НХЛ после введения молграмостима (в, г): а — $\times 12\,000$; б — $\times 13\,000$; в — $\times 14\,000$; г — $\times 12\,000$ (м — митохондрии; г — специфические гранулы)

щими, устойчивыми к цитостатикам, в значительном количестве сохраняющимися после их действия, клетками. Полученные данные подтверждают высокую резистентность моноцитов к высокодозовой химиотерапии по сравнению с гранулоцитами, но вместе с тем показывают, что цитостатики все же оказывают определенное токсическое действие на их субмикроскопическую организацию, следовательно, и на их функцию. Степень такого воздействия, вероятно, значительно слабее, чем на НГ.

После 5–7-кратного ежедневного введения молграмостима, количество моноцитов в крови у больных основной группы, как видно из графика, представленного на рис. 1, достигает соответственно $(0,34 \pm 0,02 - 2,4 \pm 0,10) \cdot 10^9/\text{л}$ ($p < 0,0001$ по сравнению с исходными данными), то есть увеличивается спустя 7 дней по сравнению с исходными показателями в 7 раз, спустя 9 дней — почти в 50 раз.

При электронно-микроскопическом исследовании моноцитов крови больных после 5–7-кратного введения молграмостима, то есть в период их резкого увеличения в циркуляции, было обнаружено, что ультраструктура этих клеток становится близкой к таковой у здоровых лиц, но по сравнению с нормой значительно возрастает количество опущенных везикул и специфических гранул (рис. 2, в, г), что дает повод предположить повышение цитолитической и секреторной функции клетки. Это подтверждается также менее выраженной маргинацией и более рыхлым распределением гетерохроматина в ядре моноцита.

Проведенный ультраструктурный анализ дает основание считать, что 5–7-кратное введение молграмостима в дозе 5 мкг/кг в сутки детям с НХЛ и миелосупрессией приводит не только к увеличению количества моноцитов в крови до показателей, превышающих таковые в норме, но и оказывает стимулирующее действие на структуры ядерного аппарата и гранулогенез.

Следует также отметить, что больные дети хорошо переносили курс лечения молграмостимом в используемых нами дозах. Выраженных побочных явлений не наблюдали. Только у двух детей отмечена слабовыраженная и у одного ребенка более сильная боль в костях и мышцах, которая купировалась парацетамолом. В одном случае отмечена также легкая тошнота 1-й степени по классификации ВОЗ. Назначение молграмостима давало возможность проведения повторных курсов химиотерапии.

В последние годы накопилось достаточное количество данных, дающих право утверждать, что моноциты/макрофаги играют важную роль в механизмах противоопухолевой иммунной защиты организма. С этим хорошо согласуются данные, представленные в недавно опубликованных работах [2, 9, 14], в которых показано, что выраженный лечебный эффект рчГМ-КСФ при некоторых формах новообразований, в том числе и при солидных опухолях, во многом обусловлен стимуляцией активности моноцитов/макрофагов. Благодаря свойству ГМ-КСФ усиливать функцию антигенпредставляющих клеток его успешно используют также в качестве адьюванта при получении антиопухолевых вакцин.

Основанием для утверждения того, что ГМ-КСФ оказывает выраженное действие на активность моноцитов, послужили также исследования [10–12, 15], в которых с помощью функциональных тестов, проведенных *in vitro*, было обнаружено усиление их прямой и опосредованной цитотоксичности по отношению к клеткам новообразований, а также повышение секреции некоторых противоопухолевых цитокинов (ФНО-альфа, ИФН-альфа и др.).

Прямые цитологические доказательства повышения функции моноцитов крови у больных, получающих рчГМ-КСФ, до последнего времени практически отсутствовали. В результате проведенных нами электронно-микроскопических исследований впервые обнаружено значительное увеличение числа специфических цитоплазматических гранул в моноцитах ПК детей с НХЛ, которым вводили рчГМ-КСФ. Причем количество гранул в цитоплазме было не только больше, чем до применения цитокина, но и превышало таковое в моноцитах здоровых детей. Так как гранулы в моноцитах являются основным источником цитотоксических веществ и, по-видимому, цитокинов, то полученные нами данные являются еще одним подтверждением того, что введение рчГМ-КСФ человеку вызывает значительное повышение их функциональной активности.

Учитывая имеющиеся данные [2, 3] о том, что ГМ-КСФ одновременно с повышением содержания и активности моноцитов вызывает также мобилизацию ЕК-клеток, эозинофилов и особенно НГ в ПК, то есть всех основных клеток-эффекторов естественного иммунитета, а также отчасти Т-лимфоцитов, можно сделать вывод, что ГМ-КСФ участвует не только в поддержании постоянства лейкоцитарного состава крови, но и в регуляции многих звеньев иммунной системы, имеющих отношение к противоопухолевой защите. Многообразие действия на иммунную систему и незначительная токсичность рГМ-КСФ по сравнению с другими противоопухолевыми цитокинами открывает новые возможности для более широкого его использования в практической онкологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Nemunaitis J.** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a review from preclinical development to clinical application. *Transfusion* 1993; **33**: 70–83.
2. **Armitage JO.** Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998; **92**: 4491–508.
3. **Возианов АФ, Бутенко АК, Зак КП.** Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. Киев: Наук думка, 1998. 317с.
4. **Harmenberg J, Hoglund M, Hellstrom-Linberg E.** G-and GM-CSF in oncology and oncological haematology. *Haematol* 1994; **52**: 1–28.
5. **Summerhayes BM.** Myeloid haematopoietic growth factors in clinical practice. A comparative review. *Eur Hosp Pharm* 1995; **1**: 67–74.
6. **Leong SPL, Enders-Zohr P, Zhou JM, et al.** Active specific immunotherapy with GM-CSF as an adjuvant to autologous melanoma vaccine in metastatic melanoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1996; **15**: 437–8.
7. **Hall PD, Kreitman RJ, Willingham MC, Francel AF.** DT 388 GM-CSF, a fusion toxin targeting the granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor, bearing human acute myeloid leukemia blasts over ara-C. *Blood* 1998; **92**: 615–6.
8. **Wing EJ, Magee M, Whiteside TL, et al.** Recombinant human granulocyte/macrophage colony stimulating factor enhances monocyte cytotoxicity and secretion of tumor necrosis factor and interferon in cancer patients. *Blood* 1989; **73**: 643–9.
9. **Lawson D, Kirkwood JM.** Granulocyte — macrophage colony-stimulating factor: another cytokine with adjuvant therapeutic benefit in melanoma. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 1603–5.
10. **Williams MA, Kouroumoussis I, Syndercombe D, et al.** Administration of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after chemotherapy regulates the expression and secretion of monocyte TNF and TNF receptors p55 and p75. *Blood* 1995; **86**: 4234–42.
11. **Wiltshcke C, Krainer M, Wagner A, et al.** Influence of in vivo administration of GM-CSF and G-CSF on monocyte cytotoxicity. *Exp Hematol* 1995; **23**: 402–8.
12. **Lode NH, Dreier T, Xiang R, Reisfeld RA.** Targeted GM-CSF therapy suppress metastases of murine neuroblastoma mediated by macrophages. *Blood* 1998; **92**: 19.
13. **Butenko AK, Afanasyeva VV, Zak KP.** Monocyte-dendritic cells reaction after treatment by rhGM-CSF of malignant lymphoma patients with chemotherapeutic neutropenia. *Abstr 9th Intern Congr Anti-cancer Treatment. Paris 2-5. 02. 1999*; 247.
14. **Spitler LE, Grossbard ML, Ernstoff MS, et al.** Adjuvant therapy of stage III and IV malignant melanoma using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 1614–21.
15. **Chachona A, Oratz R, Hoogmoet R, et al.** Monocyte activation following systemic administration granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunother* 1994; **15**: 217–24.

ULTRASTRUCTURE OF BLOOD MONOCYTES IN CHILDREN WITH NON-HODGKIN LYMPHOMAS TREATED WITH MOLGRAMOSTIM

V.V. Afanasieva, A.K. Butenko, I.Y. Glukhovskaya, K.P. Zak

Summary. Findings are presented of electronic microscopy of blood monocytes from children with non-Hodgkin lymphomas with chemotherapy-induced myelosuppression after treatment with hrGM-CSF (molgramostim). Molgramostim was administered subcutaneously in a dose of 5 mg/kg per day during 5 to 7 days 24 hours after chemotherapy. The treatment resulted in a considerably increased level of monocytes and neutrophils in the blood. The patients tolerated the treatment well and their general condition improved. Ultrastructural analysis of monocytes immediately after chemotherapy and prior to hrGM-CSF administration revealed distinct ultrastructural changes in the form of margination of nucleic heterochromatin, loosen cytoplasmic matrix, and reduced number of granules. After hrGM-CSF administration, the submicroscopic constitution of monocytes normalized and the number of cytoplasmic granules was significantly increased relative to healthy children. Our findings suggest that in children with non-Hodgkin lymphomas with myelosuppression, hrGM-CSF (molgramostim) not only stimulates monocytopoiesis but also causes inflow of monocytes with an increased functionally activity (as evidenced by monocytes' submicroscopic structure).

Key Words: non-Hodgkin lymphoma, myelosuppression, hrGM-CSF, ultrastructure of monocytes.