

ИММУННЫЙ И ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ, ПОЛУЧАЮЩИХ ТЕРАПИЮ АЛЕМТУЗУМАБОМ

Хоробрых М.Н., Загоскина Т.П., Шардаков В.И.,
Назарова Е.Л., Йовдий А.В.

ФГУ «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России»,
г. Киров

Резюме. Изучено содержание цитокинов и проанализирован ряд иммунологических показателей крови у больных хроническим лимфолейкозом до и после лечения моноклональным анти-CD52 антителом алемтузумаб. По сравнению с группой контроля у больных до начала лечения были достоверно снижены относительное содержание CD3⁺ и CD4⁺ лимфоцитов, значение CD4⁺/CD8⁺, а также уровень содержания в сыворотке крови IFN γ и IL-4, при незначительном повышении концентрации TNF α . После окончания терапии алемтузумабом у больных ХЛЛ достоверно снизилось абсолютное содержание зрелых Т-лимфоцитов, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺ клеток, а также относительное число CD16⁺ лимфоцитов. Наблюдалось достоверное снижение концентрации IL-2, прослеживалась тенденция к снижению уровней TNF α и IFN γ в сыворотке крови по сравнению с исходными данными. Выявленные изменения можно связать с иммунодепрессивным действием алемтузумаба. Динамика показателей цитокинов и иммунологических показателей крови на фоне терапии алемтузумабом свидетельствовала о дополнительном ослаблении клеточного звена иммунитета и, как следствие, повышении риска развития инфекционных осложнений.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, цитокины, алемтузумаб, CD52.

Khorobrykh M.N., Zagoskina T.P., Shardakov V.I., Nazarova E.L., Yovdiy A.V.

IMMUNE AND CYTOKINE STATUS IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA RECEIVING ALEMTUZUMAB

Abstract. In present work, we studied cytokine levels and performed analysis of some immunologic parameters in the patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) before and after treatment with monoclonal anti-CD52 antibody (alemtuzumab). In comparison with a control group, the CLL patients before alemtuzumab treatment showed a significant decrease in relative contents of CD3⁺ and CD4⁺ lymphocytes, CD4⁺/CD8⁺ T cells, diminished IFN γ and IL-4 levels, and a trend for TNF α increase. After ceasing the alemtuzumab treatment, the patients with CLL exhibited a significant decrease in absolute amounts of mature T-lymphocytes, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺ cells, as well as decreased relative contents of CD16⁺ lymphocytes. A sufficient post-treatment drop of serum IL-2 concentrations and a trend for serum TNF α and IFN γ decrease were also observed, as compared with pre-treatment values. The changes revealed may be connected with an additional immunosuppressive effect of alemtuzumab. The dynamics of cytokine levels and immunological parameters associated with alemtuzumab treatment is indicative for a weakening of cell-mediated immunity, thus resulting into a potential risk of infectious complications. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 4-5, pp 447-452)

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, cytokines, lymphocyte subsets, alemtuzumab, CD52.

Адрес для переписки:

Хоробрых Марина Николаевна
610027, Киров, ул. Красноармейская, д. 72.
Тел.: (8332) 67-55-00
Факс: (8332) 67-52-76
E-mail: marje81@mail.ru

Введение

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – опухоль иммунной системы, характеризующаяся клональной пролиферацией и накоплением преимущественно опухолевых В-лимфоцитов в костном мозге, периферической крови, лимфатических

узлах и селезенке [3]. Это заболевание составляет 25% всех лейкозов взрослых и 40% всех лейкозов у больных старше 65 лет [8]. В последние годы, с развитием генно-инженерных методов, появился новый класс противоопухолевых средств – моноклональные антитела (МКА). Терапия МКА направлена непосредственно на специфические антигены, расположенные на поверхности опухолевой клетки [15].

Достаточно хорошие результаты были показаны при применении гуманизованного МКА против антигена CD52 – алемтузумаба в терапии первичных больных и рефрактерных к флударабину форм ХЛЛ [12]. Антиген CD52 экспрессирован на мембране большинства зрелых нормальных и опухолевых Т- и В-лимфоцитов, эозинофилов, моноцитов и макрофагов, но не обнаружен на мембране стволовых клеток, эритроцитов и тромбоцитов.

При лечении алемтузумабом достигаются молекулярные ремиссии, что недостижимо при лечении другими препаратами [12,13]. Однако негативным действием алемтузумаба является то, что препарат направлен против антигенов всех иммунных клеток и вызывает лимфопению практически у каждого пациента. В связи со снижением активности клеточного иммунного ответа, обусловленным длительным и глубоким уменьшением числа CD4⁺ лимфоцитов, одним из осложнений лечения алемтузумабом является частое развитие вирусных инфекций [14]. Так, по данным ряда авторов, клиническая реактивация цитомегаловирусной инфекции может иметь место у 20%-50% пациентов с ХЛЛ, получающих лечение алемтузумабом в качестве первой линии терапии [12,13,14].

Больные ХЛЛ имеют нарушения в различных звеньях иммунной системы, обусловленные основным заболеванием. Проводимая иммунохимиотерапия, направленная на уничтожение злокачественного клона, может усугублять уже имеющиеся нарушения иммунной системы, вызванные самим опухолевым ростом, что снижает резистентность больных к инфекциям. Имеющиеся в литературе данные об изменениях иммунной системы у больных с ХЛЛ носят неоднозначный характер и часто противоречивы.

Субстратом опухоли при ХЛЛ являются В-лимфоциты, что приводит к продукции неполноценных иммуноглобулинов [6]. Следовательно, отмечается снижение активности гуморального иммунитета. Некоторые авторы отмечают, что при ХЛЛ страдает, прежде всего, клеточный иммунитет, что проявляется уменьшением количества CD3⁺ лимфоцитов [1]. Также отмечается ослабление функции NK-клеток, причем ее недостаточность, как отмечает ряд исследователей,

может наблюдаться и при сохранении количества этих клеток [9]. Поэтому дефект в системе клеточного иммунитета и функциональная неполноценность NK-клеток обуславливают развитие инфекционных осложнений у больных ХЛЛ.

Кроме того, многообразие клинических проявлений лимфопролиферативных заболеваний связывают с нарушениями цитокинового статуса [2, 4]. Однако данные литературы по этому вопросу часто противоречивы.

Несмотря на возможные осложнения, применение алемтузумаба становится все более распространенным. Те положительные результаты, которые достигаются при его применении, поставили препарат в ряд наиболее эффективных в терапии ХЛЛ. Тем не менее, работ, касающихся изучения влияния терапии моноклональными антителами на иммунитет больных ХЛЛ, немного, причем приведенные данные не позволяют в полной мере оценить характер воздействия препаратов на отдельные звенья иммунитета. Для проведения противовирусной терапии, профилактики вирусной инфекции также важно состояние иммунореактивности пациента, особенно противовирусного звена иммунитета.

Учитывая вышеизложенное, исследование содержания цитокинов, а также показателей гуморального и клеточного иммунитета у больных ХЛЛ при терапии моноклональными анти-CD52 антителами остаются актуальными.

Целью настоящего исследования явилась оценка состояния клеточного и гуморального звеньев иммунитета, цитокинового статуса у больных ХЛЛ в процессе терапии алемтузумабом.

Материалы и методы

В исследование включено 12 больных в возрасте от 42 до 65 лет, среди которых было 11 мужчин и 1 женщина. У 11 больных отмечалась стадия В и у 1 – стадия С хронического лимфолейкоза (по J. Binet). После стандартной эскалации алемтузумаб вводили подкожно по 30 мг трижды в неделю в течение 12 недель. Образцы сывороток от пациентов получали перед началом терапии и после ее завершения. Фенотипирование лимфоидных клеток производили в лимфоцитотоксическом тесте по методу P.I. Terasaki (1978) с использованием панели антител производства ООО «Сорбент» (Москва). Исследовали выраженность экспрессии таких маркеров, как CD3, CD4, CD8, CD16, CD20.

У больных проводили исследования уровня иммуноглобулинов (А, G, М) в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с помощью автоматического фотометра для микропланшетов при длине волны 450 нм с помощью на-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА БОЛЬНЫХ ХЛЛ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ АЛЕМТУЗУМАБОМ

Исследуемый показатель	Больные ХЛЛ до лечения (n = 12)	Больные ХЛЛ после терапии (n = 12)	Контрольная группа (n = 50)
Лимфоциты, %	76,90±5,43*	20,50±5,33**	34,40±1,46
Лимфоциты, x 10 ⁹ /л	48,74±19,92*	0,61±0,21**	2,37±0,09
CD3 ⁺ , %	43,10±2,73*	44,21±3,31	63,90±0,61
CD3 ⁺ , x 10 ⁹ /л	22,54±9,85*	0,20±0,07**	1,20±0,32
CD4 ⁺ , %	24,94±1,99*	27,60±1,70	38,00±0,62
CD4 ⁺ , x 10 ⁹ /л	12,71±5,04*	0,04±0,01**	0,70±0,31
CD8 ⁺ , %	16,43±1,70	13,90±1,67	19,10±0,45
CD8 ⁺ , x 10 ⁹ /л	8,94±3,04*	0,05±0,01**	0,40±0,23
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,63±0,21*	2,42±0,46	1,83±0,06
CD16 ⁺ , %	23,12±2,39	15,69±1,89**	17,20±0,74
CD20 ⁺ , %	30,70±2,50*	25,11±2,71	17,80±0,62
CD20 ⁺ , x 10 ⁹ /л	14,92±4,51*	0,08±0,01**	0,30±0,10
IgG, г/л	12,04±1,61	8,98±1,00	13,00±0,54
IgA, г/л	1,85±0,69	2,28±0,75	2,00±0,18
IgM, г/л	1,19±0,50	0,97±0,20	1,90±0,14
ЦИК, ед.опт.пл.	0,497±0,11*	0,484±0,10	0,241±0,02

Примечание. * – различия достоверны по сравнению со здоровыми лицами (p < 0,05); ** – различия достоверны между показателями до и после лечения алемтузумабом (p < 0,05).

боров «Иммюноскрин – G, M, A – ИФА-БЕСТ», производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) определяли методом преципитации с раствором полиэтиленгликоля. Уровень цитокинов в сыворотке крови (IL-2, IL-4, IL-6, IFN γ , TNF α) определяли с помощью иммуноферментного анализа с использованием тест систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Динамика показателей иммунного статуса учитывалась до начала и после терапии алемтузумабом. К моменту проведения последнего исследования иммунитета все пациенты получали терапию алемтузумабом в течение 12 недель. В качестве контрольной группы служили данные аналогичных исследований, проведенные у 50 здоровых людей – первичных доноров крови.

Статистический анализ данных выполнен с использованием пакета прикладных программ

«Microsoft Office». Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При исследовании иммунного статуса больных ХЛЛ до лечения алемтузумабом получены следующие результаты (табл. 1). Общее содержание абсолютного и относительного числа лимфоцитов было достоверно повышено у всех больных (p < 0,05). Однако отмечалось выраженное снижение относительного количества CD3⁺ и CD4⁺ лимфоцитов (p < 0,05) у всех больных, а также снижение значения CD4⁺/CD8⁺ по сравнению с контрольной группой. Эти результаты согласуются с данными других авторов [1,8].

Для изучения В-клеточного звена иммунитета определяли число CD20⁺ клеток и содержание в сыворотке крови иммуноглобулинов классов IgG, IgM, IgA, а также ЦИК. Исследование по-

казало, что значение относительного содержания CD20⁺ клеток у больных В-ХЛЛ было достоверно выше по сравнению с таковым у здоровых лиц в подавляющем большинстве случаев ($p < 0,05$). Анализ содержания основных классов иммуноглобулинов выявил значительное снижение уровней IgG, IgA и IgM у половины больных в группе больных ХЛЛ. Содержание ЦИК в сыворотке крови до лечения было достоверно выше по сравнению с данными контрольной группы у всех больных ($p < 0,05$). Приведенные данные подтверждают наличие дефекта гуморального иммунитета, характерного для ХЛЛ.

При исследовании цитокинового статуса (табл. 2) было выявлено достоверное ($p < 0,05$) снижение продукции иммунорегуляторного цитокина – IFN γ у всех больных. Известно, что IFN γ вырабатывается Т-лимфоцитами и НК-клетками. Он обладает противоопухолевой активностью, ингибирует экспрессию проонкогенов, инактивирует действие ростовых факторов на опухолевые клетки, стимулирует иммунную цитотоксичность, а также является важнейшим противовирусным цитокином. Низкая концентрация IFN γ может свидетельствовать о недостаточной функции НК-клеток и угнетении противовирусного иммунитета [3].

Уровень IL-2 у больных до лечения оставался стабильным. Данный цитокин играет исключительно важную роль в регуляции механизмов иммунного ответа. IL-2 участвует в пролиферации и дифференцировке Т-клеток, реализуя эффекторные реакции клеточного иммунитета и механизмы противоопухолевой защиты, увеличивая количество митозов НК-клеток, активизируя клетки системы ЛАК (лимфокинактивированные киллеры), а также индуцируя пролиферацию цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) [5, 9].

У половины больных ХЛЛ в сыворотке крови, по сравнению с донорами, наблюдалось незначительное повышение уровня TNF α . Для TNF α ,

как и для IFN γ , характерно выраженное противоопухолевое действие. Он способен тормозить клеточную пролиферацию, дифференцировку и функционирование клеток почти всех типов, служит медиатором цитотоксичности. Возможно, что увеличение уровня данного цитокина свидетельствует об активации механизмов противоопухолевого иммунитета у больных.

Снижение продукции общей фракции IL-4 отмечается рядом авторов у онкологических больных на фоне повышения уровня провоспалительных цитокинов [11]. Данный цитокин можно рассматривать как фактор аутокринной и паракринной регуляции функций опухолевых клеток [7,10]. В проведенном исследовании отмечалось значимое снижение его концентрации у всех больных на фоне повышения уровня IL-6 и TNF α .

Установлено, что повышение уровня провоспалительного цитокина IL-6 может иметь важное значение в опухолевой прогрессии, поскольку под его действием происходит увеличение антителообразования. По данным литературы, образующиеся противоопухолевые антитела защищают опухолевую клетку от разрушения [2]. Следовательно, у больных ХЛЛ отмечалась вторичная иммунная недостаточность, которая носила комбинированный характер и была сопряжена с дефектами клеточного и гуморального звеньев иммунитета, а также нарушением цитокинового профиля.

После проведенного лечения алемтузумабом у всех больных ХЛЛ отмечалось достоверное снижение абсолютного и относительного количества лимфоцитов в крови. В том числе наблюдалось снижение абсолютного содержания всех популяций лимфоцитов ($p < 0,05$) – CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, CD16⁺ клеток, что вероятнее всего связано со снижением общего числа лимфоцитов на фоне лечения. Относительное количество лимфоцитов, экспрессирующих CD20⁺, оста-

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХЛЛ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ АЛЕМТУЗУМАБОМ

Показатель, пг/мл	Больные ХЛЛ до терапии (n = 12)	Больные ХЛЛ после терапии (n = 12)	Контрольная группа (n = 50)
IFN γ	28,94 \pm 5,98*	24,57 \pm 4,67	104,10 \pm 18,19
IL-2	11,10 \pm 5,93	3,90 \pm 0,96**	13,60 \pm 1,08
IL-4	5,28 \pm 1,17*	7,58 \pm 0,43	21,30 \pm 2,36
IL-6	5,86 \pm 2,03	8,06 \pm 1,72	3,32 \pm 1,28
TNF α	53,17 \pm 8,45	32,41 \pm 8,46	41,30 \pm 2,57

Примечание. * – различия достоверны по сравнению со здоровыми лицами ($p < 0,05$); ** – различия достоверны между показателями до и после лечения алемтузумабом ($p < 0,05$).

ТАБЛИЦА 3. ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУНИТЕТА БОЛЬНЫХ ХЛЛ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ АЛЕМТУЗУМАБОМ

Пациент	CD4 ⁺ , x 10 ⁹ /л		CD8 ⁺ , x 10 ⁹ /л		CD20 ⁺ , x 10 ⁹ /л		CD16 ⁺ , x 10 ⁹ /л	
	до	после	до	после	до	после	до	после
1. Г-ва	1,64	0,01	4,89	0,03	16,8	0,12	8,82	0,09
2. Г-в	5,18	0,02	3,69	0,04	3,02	0,03	4,57	0,02
3. Е-н	3,96	0,02	0,95	0,02	4,83	0,01	1,53	0,01
4. З-н	5,72	0,09	0,15	0,01	0,63	0,01	0,27	0,01
5. К-в	2,22	0,02	17,1	0,08	1,28	0,01	8,9	0,02
6. К-н	1,28	0,01	6,78	0,04	8,48	0,08	3,81	0,01
7. К-х	42,68	0,13	2,8	0,07	4,5	0,09	1,6	0,01
8. Л-н	9,30	0,02	19,70	0,09	31,56	0,16	23,07	0,10
9. Л-в	54,42	0,09	34,38	0,1	44,51	0,14	52,57	0,12
10. Л-в	2,56	0,01	0,98	0,01	0,9	0,01	1,31	0,02
11. Л-в	6,34	0,01	15,01	0,08	28,31	0,14	22,86	0,04
12. М-в	17,2	0,10	0,9	0,02	34,2	0,19	12,3	0,01

валось незначительно повышенным по сравнению с контролем лишь у трети больных. Также определено достоверное снижение относительного числа CD16⁺ лимфоцитов у большинства обследуемых. Значимых изменений со стороны концентрации сывороточных иммуноглобулинов А, М, G и ЦИК после лечения не выявлено. В таблице 3 приведена индивидуальная динамика отдельных показателей иммунитета на фоне лечения алемтузумабом.

При оценке цитокинового статуса отмечено достоверное уменьшение концентрации IL-2 в сыворотке крови всех пациентов ($p < 0,05$) и тенденция к дальнейшему снижению уровня TNF α в сыворотке крови у половины больных, что, вероятнее всего, объясняется подавлением пролиферации лейкозных клеток моноклональными антителами. Кроме того, терапия алемтузумабом приводила к дополнительному уменьшению продукции IFN γ , а также понижению синтеза IL-4, что может свидетельствовать об угнетении клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Нормализации вышеуказанных показателей у больных не происходило, это доказывает, что иммунохимиотерапия приводит к подавлению функций иммунной системы, и этим обуславливает высокую предрасположенность пациентов к различным инфекциям.

Таким образом, в результате проведенного комплексного иммунологического исследования больных ХЛЛ, установлено наличие у них вторичной иммунологической недостаточности, которая проявлялась изменениями гуморального и клеточного звеньев иммунитета. Терапия алемтузумабом оказывала дополнительное иммунодепрессивное действие, также характеризующееся сочетанным угнетением клеточного, гуморального звеньев, и дисбалансом регуляторных цитокинов (IFN γ , TNF α , IL-4, IL-6). Нарушения в иммунном статусе больных ХЛЛ, связанные как с основным заболеванием, так и с проводимым лечением, свидетельствовали о значительном снижении звеньев противовирусного иммунитета, что может приводить к увеличению риска развития инфекционных осложнений.

Список литературы

1. Баранчук Н.В. Сравнительная оценка показателей иммунитета и иммунофенотипа лимфоидных клеток у больных лимфопролиферативными заболеваниями: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Пермь, 2003. – 17 с.
2. Бережная Н.М. Система интерлейкинов и рак. – Киев, 2000. – 224 с.

3. Воробьев А.И. Руководство по гематологии: Учебник для вузов. – М.: Ньюдиамед, 2003. – Т. 2. – 256 с.
4. Грачева Л.А. Цитокины в онкогематологии. – М.: Алтус, 1996. – 58 с.
5. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунологическая недостаточность (выявление и лечение). – М.: Медицинская книга; Н. Новгород: Изд-во НГМА, 2003. – 443 с.
6. Ляликова Г.В., Виноградова Ю.Е. Содержание отдельных классов иммуноглобулинов в сыворотке и слюне больных с различными стадиями хронического лимфолейкоза // Тер. Арх. – 1986. – № 9. – С. 77-80.
7. Потапов М.П. В-лимфоциты. Цитокинообразующая функция // Иммунология. – 1994. – № 4. – С. 4
8. Рукавицын О.А., Поп В.П. Хронические лейкозы. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2004. – 240 с.
9. Серебряная Н.Б., Новик А.А., Волошин С.В. Клиническое значение некоторых цитокинов при злокачественных неходжкинских лимфомах // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 3. – С. 52
10. Симбирцев А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление. – 2003. – № 1. – С. 16
11. Тугуз А.Р. Динамика содержания TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-4 и IL-8 в раннем послеоперационном периоде у больных раком желудка // Иммунология. – 2002. – Т. 23, № 1. – С. 59
12. Dumont FJ. CAMPATH (alemtuzumab) for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and beyond // Expert Rev Anticancer Ther. – 2002. – P. 23-25.
13. Hale G., Waldmann H. From laboratory to clinic: the story of CAMPATH-1 // In: George AJT, Urch C, eds. Antibodies in the Clinic: Methods in Molecular Medicine. – 2000. – Vol. 40: Diagnostic and Therapeutic Antibodies. Humana Press, NJ. – P. 243-266.
14. Hale G. CD52 // J Biol Regul Homeost Agents. – 2002. – P. 386-391.
15. Seiler T., Dohner H., Stingelbauer S. Risk stratification in Chronic Lymphocytic Leukemia // Semin. Oncol. – 2006. – Vol. 33. – P. 186-194.

поступила в редакцию 05.05.2010

отправлена на доработку 13.05.2010

принята к печати 21.06.2010