

А.В. ЙОВДИЙ,
В.И. ШАРДАКОВ,
Т.П. ЗАГОСКИНА,
Е.Л. НАЗАРОВА,
ФАН ТРОНГ ЛАН

Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови федерального агентства по высокотехнологической медицинской помощи,

Министерство здравоохранения
Вьетнама

Особенности клеточного звена иммунитета и цитокинового профиля у больных хроническим лимфолейкозом на фоне терапии Ферровиром

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) является опухолью кроветворной системы, которая характеризуется пролиферацией и аккумуляцией морфологически зрелых лимфоцитов, в большинстве случаев имеющих фенотип В-клеток. ХЛЛ – наиболее распространенный вид хронического лейкоза в странах Европы и Северной Америки, где на долю этого заболевания приходится до 30% от всех лейкозов (1). Достоверной информации о заболеваемости и распространенности ХЛЛ в России нет. Экстраполяция европейских данных позволяет считать, что ежегодно в России заболевают 3600 человек (18).

Течению ХЛЛ сопутствует угнетение иммунной системы, что приводит к повышенному риску развития инфекционных осложнений у этой категории больных. В структуре их смертности бактериальные, грибковые и вирусные инфекции составляют около 60%. Нередко инфекционные осложнения бывают первыми проявлениями болезни (2, 3). Причины иммунных нарушений у больных ХЛЛ многообразны. Во-первых, наблюдается вытеснение опухолевыми клетками нормальной лимфоидной популяции (4). Во-вторых, опухолевый клон представлен морфологически зрелыми, но функционально малоактивными лимфоидными клетками, неспособными в большинстве случаев к дифференцировке в плазматические клетки и, следовательно, к реализации полноценного иммунного ответа (5, 6). В-третьих, опухолевые клетки,

наряду с другими мононуклеарами, способны вырабатывать ряд иммуносупрессивных факторов, подавляющих нормальную функцию иммунной системы и способствующих прогрессированию опухолевого роста (7, 8, 9).

У больных ХЛЛ большинство авторов выявили понижение величины иммунорегуляторного индекса за счет увеличения числа CD8⁺-лимфоцитов (6, 10, 12). Ряд исследователей отмечают также снижение показателей CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺-лимфоцитов (13). Кроме того, в ряде научных работ показана функциональная неполноценность Т-лимфоцитов (11).

Приводятся данные, что проведение химиотерапии у больных ХЛЛ усугубляет иммунные нарушения (6, 14, 15, 16, 17). Подтверждением служит тот факт, что наиболее часто вирусные и грибковые инфекции наблюдаются по окончании курсов полихимиотерапии и сочетаются с наличием дефекта Т-клеточного иммунитета. Так, в ряде исследований, посвященных влиянию химиотерапии на иммунные показатели, обнаружено достоверное снижение числа CD 4⁺- и CD 8⁺-лимфоцитов (15, 17).

Учитывая высокую частоту инфекционных осложнений у больных ХЛЛ, актуальной является проблема проведения профилактических мероприятий, включающих применение противовирусных и иммуномодулирующих препаратов. Одной из последних разработок российской фармакологической отрасли стал противовирусный препарат Ферровир®. Доказано, что данный

препарат у людей, страдающих вирусной инфекцией, способен влиять на фагоцитарную активность макрофагов и Т-клеточное звено иммунитета. К сожалению, исследований, отражающих влияние Ферровира на противовирусный иммунитет у больных опухолями лимфатической системы (ОЛС), в литературе не представлено. Целью настоящей работы явилась оценка влияния препарата Ферровир® на состояние иммунитета у больных ХЛЛ, получающих базисную химиотерапию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 13 человек больных ХЛЛ в возрасте от 43 до 72 лет (медиана – 57 лет). Диагноз подтвержден на основании морфологических и иммуногистохимических исследований. Стадию заболевания определяли согласно классификации К. Rai (1975 г.), при этом у 8 больных была выявлена II стадия заболевания, у 3 – III стадия, у 2 – IV стадия. Все больные получали современные программы химиотерапии. Четверо из них проходили лечение по программе RFC, а девять человек – Campath-1H.

Препарат Ферровир® назначали по 5 мл (1 флакон) с 1 мл 0,25% новокаина внутримышечно 1 раз в сутки ежедневно на протяжении 10 дней. Курсовая доза составила 750 мг. Исследования иммунного статуса проводили до начала терапии, а также сразу после окончания курса лечения, через 1, 3, 6 месяцев. Анализировали показатели Т-звена иммунитета, уровень ряда цитокинов (интерлейкина

(ИЛ) – 1 β , -2, -4, -6, -8, -10, фактора некроза опухолей- α (ФНО- α), интерферона- α и интерферона- γ (ИФН- α и - γ) в супернатанте культуральной взвеси лимфоидных клеток. В группы сравнения вошли 54 больных ХЛЛ, не получавших иммуномодулирующую терапию, и 31 здоровый житель региона.

Лимфоидные клетки выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием на градиенте плотности фиколла-верографин (1,077 г/л). Лимфоциты для исследований использовали в рабочей концентрации 2×10^6 в 1 мл. Культивирование клеток проводили в 96 луночных планшетах для иммунологических исследований при 37°C в CO₂-инкубаторе в среде RPMI-1640 с добавлением 10%-ной телячьей эмбриональной сыворотки и 100 мкг/мл гентамицина. Для стимуляции клеток использовали фитогемагглютинин в концентрации 100 мкг/мл культуральной взвеси. Продолжительность инкубации составляла 72 часа для ИФН- α и ИФН- γ , а для остальных цитокинов – 24 часа.

Концентрацию цитокинов в супернатанте культуральной взвеси определяли в иммуоферментном анализе с использованием коммерческих наборов реагентов ООО «Вектор-Бест» (п. Кольцово Новосибирской области, Россия).

Определение поверхностных антигенных детерминант лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺) проводили в лимфоцитотоксическом тесте (P.I. Tarasaki et al., 1970 г.) с использованием специфических моноклональных антител (ООО «Сорбент» г. Москва).

Для статистической обработки полученных данных использовали пакет прикладных программ Microsoft Excel 2007. Достоверность различий полученных показателей подтверждали с помощью расчета непараметрического критерия U (Вилкоксона–Манна–Уитни).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведена оценка иммунокорригирующего влияния Ферровира у 13 больных ХЛЛ: изучена динамика уровней ряда цитокинов, а также

Таблица 1. Уровень спонтанной продукции цитокинов лимфоидными клетками больных ХЛЛ и здоровых лиц

(M \pm m)		
Исследуемые цитокины (пкг/мл)	Больные ХЛЛ (n = 52)	Здоровые лица (n = 31)
ФНО- α	270,2 \pm 37,66*	495,5 \pm 17,67
ИЛ-1 β	320,3 \pm 56,02*	575,4 \pm 15,34
ИЛ-2	15,4 \pm 1,44	8,6 \pm 0,89
ИЛ-4	11 \pm 1,04	14,9 \pm 0,20
ИЛ-6	916,6 \pm 88,81	899,4 \pm 7,41
ИЛ-8	581,3 \pm 29,28*	700,9 \pm 6,39
ИЛ-10	102,1 \pm 13,21**	826,7 \pm 122,84
ИФН- α	13,5 \pm 1,23	18,8 \pm 0,21
ИФН- γ	24,1 \pm 6,50**	948 \pm 319,03

Примечание. * p < 0,001 – достоверность отличий показателя между группами;
p < 0,05 – достоверность отличий показателя между группами.

Таблица 2. Уровень стимулированной продукции цитокинов лимфоидными клетками больных ХЛЛ и доноров крови

(M \pm m)		
Исследуемые цитокины (пкг/мл)	Больные ХЛЛ (n = 52)	Здоровые лица (n = 31)
ФНО- α	377,7 \pm 39,8*	531,3 \pm 4,40
ИЛ-1 β	354,1 \pm 58,16*	535,5 \pm 29,4
ИЛ-2	200,6 \pm 45,00**	1241,7 \pm 30,20
ИЛ-4	13,6 \pm 1,36	15,5 \pm 0,23
ИЛ-6	1011,1 \pm 90,53	902,1 \pm 8,60
ИЛ-8	599,1 \pm 29,51*	702,8 \pm 8,52
ИЛ-10	138,2 \pm 25,37**	1556,7 \pm 131,81
ИФН- α	14 \pm 1,22	18,9 \pm 0,19
ИФН- γ	2103,2 \pm 291,65*	3180,1 \pm 148,41

Примечание. * p < 0,05 – достоверность отличий показателей между группами;
** p < 0,001 – достоверность отличий показателей между группами

показателей Т-клеточного иммунитета. В ходе исследований нами получены следующие результаты (таблица 1).

Из представленных в таблице данных видно, что спонтанная продукция большинства цитокинов у больных ХЛЛ лимфоцитами крови снижена. Так, оказались низкими концентрации ФНО- α , ИЛ-1 β , -4, -8, -10, ИФН- α , ИФН- γ . При этом уровни ИЛ-2 и -6 имели тенденцию к повышению.

Для анализа способности лимфоцитов к синтезу цитокинов в ответ на антигенную стимуляцию было проведено их культивирование с фитогемагглютинином. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Из полученных результатов следует, что сохранность цитокинсекретирующей функции лимфоидных клеток больных ХЛЛ наблю-

далась только в отношении ИЛ-4 и -6. Остальные показатели в группе обследуемых больных имели достоверно более низкое значение по сравнению с данными здоровых лиц. Такие изменения в цитокиновом профиле больных ХЛЛ, вероятнее всего, связаны со снижением функциональной активности опухолевых клеток, составляющих основной пул мононуклеаров периферической крови.

Анализируя полученные данные, можно отметить, что при опухолях лимфатической системы, в частности, при ХЛЛ, имеется дисбаланс в синтезе цитокинов вследствие вовлечения в патологический процесс значительной часть цитокин-продуцирующих лимфоидных клеток.

Изменения в цитокиновом каскаде, наблюдаемые у больных ОЛС, оказывают влияние на все основ-

Таблица 3. Характеристика субпопуляционного состава лимфоидных клеток больных ХЛЛ и доноров крови

(M ± m)					
Обследованные группы	CD3 ⁺ -лимфоциты, %	CD4 ⁺ -лимфоциты, %	CD8 ⁺ -лимфоциты, %	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD16 ⁺ -лимфоциты, %
Больные ХЛЛ (n = 52)	43,8 ± 1,10*	24,5 ± 0,88*	16,9 ± 0,76*	1,57 ± 0,09	18,8 ± 1,16*
Здоровые лица (n = 50)	64,5 ± 1,77	38,2 ± 2,84	22 ± 2,71	1,9 ± 1,4	24,4 ± 3,26

Примечание. * p < 0,01 – достоверность отличий показателей между группами.

Таблица 4. Содержание цитокинов в супернатанте культуральной взвеси лимфоидных клеток больных ХЛЛ

(M ± m)		
Исследуемые цитокины (пкг/мл)	Больные ХЛЛ (n = 52)	Больные ХЛЛ, получавшие Ферровир® (n = 13)
1	2	3
ФНО-α	270,2 ± 37,66	452,2 ± 115,65*
ИЛ-1β	320,3 ± 56,02	120,9 ± 44,20**
ИЛ-2	15,4 ± 1,44	23,6 ± 5,24
ИЛ-4	11 ± 1,04	13,9 ± 4,49
ИЛ-6	916,6 ± 88,81	748,1 ± 73,09**
1	2	3
ИЛ-8	581,3 ± 29,28	694,3 ± 46,53
ИЛ-10	102,1 ± 13,21	138,4 ± 27,81
ИФН-α	13,5 ± 1,23	9,8 ± 4,35
ИФН-γ	24,1 ± 6,50	73,2 ± 46,88

Примечание: * p < 0,01 достоверность отличий показателей между группами;
** p < 0,05 достоверность отличий показателей между группами.

Таблица 5. Уровень стимулированной продукции цитокинов лимфоидными клетками больных ХЛЛ

(M ± m)		
Исследуемые цитокины (пкг/мл)	Больные ХЛЛ (n = 52)	Больные ХЛЛ, получавшие Ферровир (n = 13)
ФНО-α	472,4 ± 40,27	649,7 ± 91,22*
ИЛ-1β	350 ± 59,61	250,8 ± 38,05
ИЛ-2	190,7 ± 44,80	39,4 ± 8,80*
ИЛ-4	13,5 ± 1,38	15,1 ± 4,27
ИЛ-6	991,6 ± 90,17	613,3 ± 35,50*
ИЛ-8	603,4 ± 29,76	711,1 ± 46,21
ИЛ-10	127,9 ± 23,66	167,4 ± 24,01
ИФН-α	14,0 ± 1,22	9 ± 4,28
ИФН-γ	2103,2 ± 291,6	1830,6 ± 695,02

Примечание. * p < 0,05 – достоверность отличий показателей между группами

ные функции лимфоцитов, включая реализацию противовирусного иммунного ответа. Из данных таблицы 1 видно, что в культуре лимфоцитов содержание ИЛ-4, -6, -10 у больных ХЛЛ значительно превышало уровень ИЛ-2 и ИФН-γ, в отличие от показателей группы здоровых лиц, что в основном связано с угнетением синтеза ИФН-γ. При этом показатели, отраженные в таблице 2, свидетельствуют о сохранности цитокинсекретирующей функции

лимфоидных клеток больных ХЛЛ, по сравнению с данными группы доноров крови, только в отношении ИЛ-4 и -6.

Происходящие в системе иммунорегуляторных пептидов изменения коррелировали с субпопуляционным составом лимфоидных клеток (таблица 3).

Из представленных в таблице 3 данных видно, что относительное содержание CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD16⁺-лимфоцитов у больных ХЛЛ

достоверно ниже аналогичных показателей группы сравнения.

Исходя из вышесказанного, особое значение приобретает состояние противовирусного иммунитета у больных ОЛС на фоне проведения полихимиотерапии (ПХТ). Для этих целей нами была отобрана группа больных ХЛЛ, получавшая в качестве сопроводительной терапии препарат Ферровир® (Р №000630/01 от 08.12.06, ЗАО ФП «Техномедсервис», Москва). Данный препарат относится к группе противовирусных средств с иммуномодулирующим эффектом. Ферровир® применялся внутримышечно 1 раз в сутки в курсовой дозе 750 мг. Для оценки иммуномодулирующего действия препарата проведен анализ динамики некоторых показателей цитокинового и иммунного статуса. В супернатанте культуры мононуклеаров крови после терапии Ферровиром определяли содержание исследуемых цитокинов (таблица 4).

Полученные результаты свидетельствовали об изменении синтеза цитокинов мононуклеарами крови больных ХЛЛ на фоне применения Ферровира, в частности, наблюдалось повышение секреции ФНО-α и снижение уровней ИЛ-1β и -6.

Некоторые авторы в своих исследованиях указывают на способность ФНО-α индуцировать синтез ИЛ-1β и -6 моноцитами крови. В нашем случае данная тенденция не прослеживается. Снижение уровня ИЛ-6 у больных ХЛЛ могло свидетельствовать об уменьшении активности Т-хелперов 2 типа, что явилось, скорее всего, позитивным фактором реализации противовирусного иммунитета и динамики опухолевого процесса.

Для изучения ответа мононуклеарных клеток крови на антигенную стимуляцию по окончании курса



ФЕРРОВИР

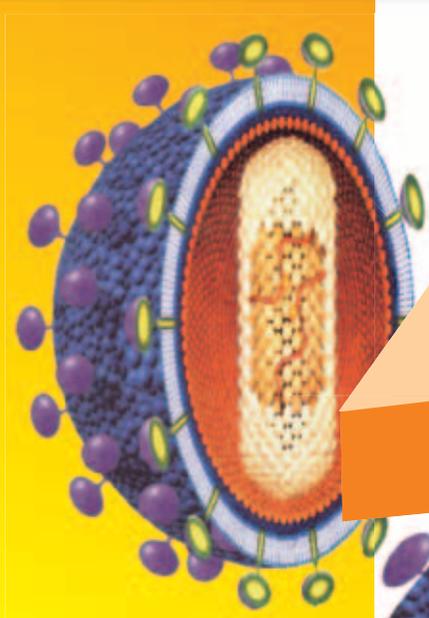
**ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ПРЕПАРАТ С ВЫСОКИМ
ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИМ ДЕЙСТВИЕМ**

Применяется при хронических гепатитах,
герпетической инфекции, комбинированной
терапии ВИЧ, в онкогематологии

Отсутствие токсического эффекта
при длительном применении
восстановление клеток печени



ДНК-Na-Fe



Экономически доступное
лечение

Удобная готовая форма
для внутримышечных
инъекций

**ЗАО "ФП
"ТЕХНОМЕДСЕРВИС"**

105318, г.Москва,
ул. Мироновская, д.33, стр. 28
тел.: 739-50-52,
факс.: 234-99-46
Internet: www.derinat.ru
e-mail: info@derinat.ru



Таблица 6. Динамика субпопуляционного состава лимфоидных клеток больных ХЛЛ

(M ± m)					
Сроки наблюдения	CD3 ⁺ -лимфоциты, %	CD4 ⁺ -лимфоциты, %	CD8 ⁺ -лимфоциты, %	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD16 ⁺ -лимфоциты, %
До начала терапии	37,5 ± 2,13	21,7 ± 1,31	14,6 ± 1,48	1,68 ± 0,23	16,4 ± 2,31
После лечения	40,1 ± 2,69	22,3 ± 1,84	12,3 ± 1,43	2,08 ± 0,26	18,6 ± 3,36
Через 1 мес.	50,3 ± 2,31*	30,3 ± 2,42*	14,8 ± 1,59	2,22 ± 0,38	17,9 ± 1,71
Через 3 мес.	41,4 ± 2,88	23,7 ± 2,04	12,8 ± 2,17	2,01 ± 0,32	15,1 ± 2,64
Через 6 мес.	50,7 ± 3,42*	27,4 ± 2,37**	18,2 ± 2,16	1,46 ± 0,20	17,2 ± 1,19

Примечание: *p < 0,01 достоверность отличий показателей между группами;

**p < 0,05 достоверность отличий показателей между группами.

терапии Ферровиром была проведена оценка синтеза цитокинов после культивирования лимфоидных элементов с фитогемагглютинином (таблица 5).

В отличие от спонтанной продукции цитокинов, наблюдалось снижение уровня ИЛ-2.

Следовательно, полученные в ходе исследования данные позволили предположить наличие у Ферровира цитокинмодулирующей активности, направленной на активацию противовирусного звена иммунитета даже в случаях лимфоидных опухолей.

Для выявления возможной взаимосвязи между изменениями показателей цитокинового профиля и количеством иммунокомпетентных клеток проведен анализ субпопуляционного состава лимфоцитов после курса терапии Ферровиром (таблица 6).

Из представленных в таблице 6 данных видно, что количество лимфоцитов, несущих определенный маркер у пациентов до лечения и после окончания терапии не имели значимых отличий. При этом наблюдалась тенденция к росту числа CD3⁺-лимфоцитов и естественных киллерных клеток. При обследовании пациентов через месяц отмечено достоверное увеличение относительного числа CD3⁺-и CD4⁺-лимфоцитов. К третьему месяцу содержание данных клеток снижалось и приближалось к значениям, выявленным сразу после окончания терапии. Следующий пик роста количества CD3⁺- и CD4⁺-лимфоцитов наблюдался через 6 месяцев и, возможно, был связан тропностью Ферровира к лимфоидной ткани и последующей элиминацией эндолимфатическим путем к органам-мишеням.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что у больных ХЛЛ имеются изменения цитокинового профиля со смещением баланса иммунорегуляторных пептидов, соответствующих активности Т-хелперов 2 типа. У пациентов отмечено уменьшение относительного содержания CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺- и CD16⁺-лимфоцитов. В комплексе подобные изменения свидетельствовали о снижении противовирусной защитной реакции организма. Результаты, полученные при применении препарата Ферровир у иммунокомпрометированных лиц, подтвердили приведенные в литературе данные о том, что препарат оказывает влияние на реализацию противовирусного ответа. У больных ХЛЛ данный противовирусный эффект заключался в виде модуляции цитокинового профиля и Т-звена иммунитета. 

Литература

1. Гематология: руководство для врачей; под ред. Н.Н. Мамаева, С.И. Рябова. – СПб.: СпецЛит. 2008; с. 313-324.
2. Molica S. Infections in chronic lymphocytic leukemia: Risk factors and impact on survival, and treatment Molica S. // *Leuk. Lymphoma*. 1994; Vol. 13: 203-214.
3. Elias J. Anaissie., Dimitrios P. Kontoyiannis, Susan O'Brien. et al. Infections in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Treated with Fludarabine // *Annals of Internal Medicine*. 1998; Vol: 129; 559-566.
4. Клиническая онкогематология: руководство для врачей; под ред. М. А. Волковой // М.: Медицина. 2001; с. 376-394.
5. Виноградова Е.Ю., Варламова Е.Ю., Лекаш И.В. и др. Свободно циркулирующие и скрытые аутоантитела в сыворотке больных В-клеточными лимфатическими опухолями // *Иммунология*. 2008; №6, с. 370-372.
6. Короткова О.В., Ларионова В.Б., Заботина Т.Н. и др. Особенности нарушения иммунного статуса у больных лимфо-пролиферативными заболеваниями после высокодозной полихимиотерапии с последующей трансплантацией клеток предшественников // *Аллергология и иммунология*. 2002. Т.3; № 1, с. 105-110.
7. Антонов В.Г., Антонов В.Г., Козлов В.К. Патогенез онкологических заболеваний: иммунные и биохимические феномены и механизмы. Внеклеточные и клеточные механизмы общей иммунодепрессии и иммунной резистентности // *Цитокины и воспаление*. 2004. Т. 3, № 1, с. 8-19.
8. Schindler R., Mancilla J., Endres S. et al. Correlations and interactions of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppress IL-1 and TNF // *Blood*. 2006. Vol. 75: 40-47.
9. Mielcarek M., Graf L., Johnson G. et al. Production of interleukin – 10 by granulocyte colony – stimulating factor – mobilized blood products: a mechanism for monocyte – mediated suppression of T – cell proliferation // *Blood*. 1998. Vol. 2, № 1: 215-222.
10. Долгополова Е.В., Никитин И.Ю., Цыган И.Н. и др. Сравнительная характеристика показателей иммунного статуса больных неходжкинскими лимфомами // *Медицинская иммунология*. 2003. Т.3, № 2, 3, с. 197-198.
11. Görgün Güllü, Holderried Tobias A.W., Zahrieh David, Neuberg Donna, Gribben John G. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells // *The Journal of clinical investigation*. 2005. Vol. 115, № 7: 1797-1805.
12. Platsoucas C.D. et al. Abnormal T lymphocyte subpopulation in patients with B cell CLL // *J. Immunol*. 1982. Vol. 129: 2305-2312.
13. Dianzani U., Omede P., Marmont F. et al. Expansion of T cell expressing low CD4 or CD8 levels in B – cell chronic lymphocytic leukemia: Correlation with disease status and neoplastic phenotype // *Blood*. 1994. Vol. 83: 2198-2205.
14. Mackall C.M., Fleischer T., Brown M. et al. Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer // *Blood*. 1994. Vol. 84: 2221-2228.
15. Шевела Е.А., Сизикова С.А., Тихонова М.А. и др. Характеристика нарушений функциональной активности Т-клеток у больных лимфомами при проведении программной полихимиотерапии // *Гематол. и трансфузиол*. 2004. Т. 49, № 1, с. 15-19.
16. Бялик Т.Е., Волкова М.А., Андреева Л.Ю. и др. Флударабин в лечении хронического лимфолейкоза // *Гематол. и трансфузиол*. 2004. Т. 49, № 3, с. 6-11.
17. Волкова М.А. Моноклональные антитела к антигену CD53: оптимизация терапии хронического лимфолейкоза // *Гематол. и трансфузиол*. 2006. Т. 51, № 2, с. 27-32.
18. www.rg.ru/2007/08/14/onkologiya.html.