

ДИНАМІКА ЗМІН ЦИТОКІНОВОЇ ЛАНКИ ІМУНІТЕТУ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ ПРИ ТАРГЕТНІЙ ТЕРАПІЇ

**ДУ „Національний Науковий центр радіаційної медицини
НАМН України”**

Вступ. Визначення особливостей секреції імунокомпетентними клітинами прозапальних і протизапальних цитокінів в процесі таргетної терапії хворих на ХМЛ дозволяє розширити уявлення про внесок імунологічної компоненти в формування резистентності до терапії імаїнібом і удосконалити спектр діагностичних і прогностичних критеріїв перебігу захворювання і ефективності лікування.

Мета. Визначення змін цитокінового профілю (концентрації прозапальних та протизапальних інтерлейкінів, і інтерферону- γ) в сироватках ПК та КМ у хворих на ХФ ХМЛ на протязі таргетної терапії.

Методи. Концентрації ІЛ-2, основних інтерлейкінів запалення (ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8), протизапальних інтерлейкінів (ІЛ-4, ІЛ-10), а також ІНФ- γ визначали у зразках сироватки периферичної крові (ПК) та кісткового мозку (КМ) у 52 хворих на ХМЛ в хронічній фазі (ХФ) захворювання. Хворі були обстежені до призначення специфічної таргетної терапії, через 6, 12 та 24 місяців лікування ІМ. Кількісну оцінку концентрації в зразках сироватки зазначених цитокінів *in vitro* проводили методом твердофазного імуоферментного аналізу.

Результати. Доведено підвищений спонтанний рівень прозапальних – ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8 та протизапальних – ІЛ-4, ІЛ-10 в сироватці ПК і КМ і наступне виражене їх зниження в процесі таргетної терапії, а також нормалізація секреції ІЛ-2 та підвищення рівню ІНФ- γ , у хворих на ХМЛ. Дослідження змін цитокінової секреції є додатковим лабораторним критерієм оцінки ефективності лікування ХМЛ інгібіторами тирозинкіназ і прогнозу відповіді на терапію.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія, цитокіни, інтерлейкіни, імунна відповідь, таргетна терапія.

Вступ. Цитокіни розглядаються в якості учасників глобальної імунологічної системи, тісним чином пов'язаної з усіма фізіологічними системами організму. [1,2]. Вони визначають виживання клітин, стимуляцію або інгібіцію їх росту, диференціацію, функціональну активацію і апоптоз клітин. Здатність регулювати імунні реакції зумовлена тим, що після взаємодії цитокінів з комплементарними рецепторами на поверхні клітин, сигнал через елементи внутрішньоклітинної трансдукції передається в ядро, де активуються відповідні гени. Білки, продукти активованих цитокінами генів, продукуються клітинами і регулюють імунну відповідь [2,3,4]. Вважається, що низький процент периферичних Т-лімфоцитів –хелперів у хворих на ХМЛ в хронічній фазі (ХФ) захворювання та фазі акселерації (ФА) відбувається внаслідок пригнічення диференційованої експресії цитокінів, що секретуються Т-лімфоцитами-хелперами I типу (ТН 1), та активації секреції цитокінів, які секретуються Т-лімфоцитами-хелперами II типу (ТН 2) [5,6].

Участь в елімінації BCR-ABL позитивного клону у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ) цитокінів, демонструється на прикладі зокрема того, що імунний профіль Т-хелперів (ТН) II типу є характерним для хронічної фази, фази акселерації та бластної кризи ХМЛ. [4,6] Натомість цитокіни, які синтезуються Т-хелперами (ТН) I типу, до яких відноситься ІЛ-2, превалюють в період повної цитогенетичної ремісії ХМЛ [3,4,5]. Однак на даний час роль цитокінів на різних етапах перебігу ХМЛ в еру таргетної терапії інгібіторами тирозинкінази (ІТК) висвітлена недостатньо.

Мета. Визначення змін цитокінового профілю (концентрації прозапальних та протизапальних інтерлейкінів, і інтерферону- γ) в сироватках ПК та КМ у хворих в ХФ ХМЛ на протязі таргетної терапії як додаткових патогенетичних та прогностичних критеріїв для оцінки ефективності таргетної терапії хворих на ХМЛ в хронічній фазі (ХФ) інгібітором BCR-ABL-тирозинкінази (ІТК) – Іматинібом Мезилатом (ІМ).

Матеріал та методи. Концентрації ІЛ-2, основних інтерлейкінів запалення (ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8), протизапальних інтерлейкінів (ІЛ-4, ІЛ-10), а також ІНФ- γ визначали у зразках сироватки периферичної крові (ПК) та кісткового мозку (КМ) у 52 осіб, з них 26 осіб чоловічої та 26 жіночої статі. Всі пацієнти знаходилися в хронічній фазі (ХФ) захворювання. Хворі були обстежені до призначення специфічної таргетної терапії, через 6, 12 та 24 місяців лікування ІМ. Контрольну групу склали 45 практично здорових осіб (донори крові). Обраний нами спектр інтерлейкінів, концентрації яких ми визначали в зразках сироватки крові хворих на ХМЛ *in vitro* на момент встановлення діагнозу захворювання і протягом таргетної терапії найбільш яскраво відображають прозапальну, протизапальну, протипухлинну та цитотоксичну дію імунної відповіді. Кількісну оцінку концентрації в сироватці периферичної крові зазначених цитокінів проводили методом твердофазного імуноферментного аналізу на аналізаторі „MULTISKAN ASCENT” виробництва „LABSYSTEMS” (Фінляндія). Використовували тест-системи та контрольні сироватки: ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10 „DIACLONE” виробництва Франція, згідно протоколів до тест-систем. Результати реакції визначали на багатоканальному спектрофотометрі при довжині хвилі 450 нм. За допомогою калібрувальної кривої розраховували концентрації зазначених цитокінів в пікограмах на 1 мл (пг/мл). Отримані дані оброблені за допомогою статистичного аналізу із використанням програми статистичної обробки даних STATISTICA 6.0 і методів кореляційного і дисперсного аналізу.

Результати та їх обговорення. Як показали результати дослідження, у хворих на ХМЛ в ХФ, до початку лікування мали місце виражені порушення цитокінового статусу, про що свідчило значне підвищення спонтанного рівня основних медіаторів запалення – ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8 в сироватці ПК і КМ. Застосування таргетної терапії у хворих на ХМЛ призвело до значних змін вмісту прозапальних інтерлейкінів порівняно з показниками на етапі діагностики захворювання. Через 6 місяців лікування ІМ встановлено зниження концентрації ІЛ-1 β як в сироватці ПК, так і в сироватці КМ (табл. 1). Суттєвим також було зниження рівню продукції ІЛ-6 та ІЛ-8 в сироватці ПК і КМ у відповідь на терапію. Результати мали високу ступінь достовірності $p < 0,0001$. Показники зміни основних прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8), визначені у сироватці КМ мали однонаправлений характер і були

МЕДИЧНА РАДІОЛОГІЯ

аналогічними у сироватці ПК. Концентрація ІЛ-2 в зразках сироватки ПК і КМ у хворих ХМЛ, які отримували ІМ у продовж 6 місяців, також підвищувалася і становила в ПК ($7,7 \pm 2,04$) проти ($4,42 \pm 0,76$) пг/мл та відповідно в КМ ($8,6 \pm 2,33$) проти ($4,42 \pm 0,89$) пг/мл в групі ХМЛ у порівнянні з ініціальним рівнем ($p < 0,001$). За даними частотного аналізу концентрація ІЛ-2 залишалась незмінною тільки у 4 (7,7 %) осіб, у 48 пацієнтів (92,3 %) відмічено її підвищення. Коливання вмісту ІЛ-2 у сироватці ПК і КМ у хворих в ХФ ХМЛ через 6 місяців лікування інгібітором тирозинкінази ІМ відображено на рис. 1. – 2. Рівні сироваткових протизапальних цитокінів, продуцентами яких є Т-хелпери II-го типу (ТН 2): ІЛ-4 і ІЛ-10 у хворих в ХФ ХМЛ до лікування, були достовірно підвищені ($p < 0,001$). Так концентрація ІЛ-4 у 1,6 рази, а ІЛ-10 у 3 рази перевищувала відповідні показники контрольної групи.

Таблиця 1

Вміст основних прозапальних інтерлейкінів ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8 у сироватці ПК та КМ хворих в ХФ ХМЛ до терапії ІМ і на 6 місяць лікування

Цитокіни	n	Концентрація, пг/мл			
		До терапії ІМ*		Після 6 міс. терапії ІМ	
		ПК, M \pm SD	КМ, M \pm SD	ПК, M \pm SD	КМ, M \pm SD
ІЛ-1 β	52	34,3 \pm 4,50	35,9 \pm 5,54	18,8 \pm 4,74**	20,9 \pm 4,93**
ІЛ-6	52	37,0 \pm 3,49	38,8 \pm 3,30	28,7 \pm 4,64**	29,6 \pm 4,71**
ІЛ-8	52	40,7 \pm 2,18	41,5 \pm 2,33	28,6 \pm 4,42**	29,6 \pm 5,00**

Примітка: * — представлено результати концентрації цитокінів до початку лікування ІМ; ** — вірогідність розбіжностей з показниками основної групи (До початку терапії ІМ) $p < 0,0001$.

Вже через 6 місяців лікування ІМ, у всіх хворих у ХФ ХМЛ встановлено зниження рівню ІЛ-4, у більшості пацієнтів 46 (88,4 %) зниження секреції ІЛ-10. Підвищення даного показника виявлено у 5 (9,6 %) осіб, а у 1 (1,9 %) рівень ІЛ-10 не змінювався. Вміст сироваткового ІЛ-4 становило в ПК ($5,8 \pm 0,57$) пг/мл та в КМ ($6,0 \pm 0,56$), ІЛ-10 відповідно ($27,3 \pm 4,55$) пг/мл та ($29,0 \pm 4,77$) пг/мл. Результати середньогрупових значень концентрації ІЛ-4 та ІЛ-10 відображені у табл.2.

Як видно із табл. 2, середньогрупові значення концентрації протизапальних цитокінів ІЛ-4, ІЛ-10 у сироватці ПК та КМ достовірно знижені порівняно із відповідними показниками основної групи. Звертає увагу значне пригнічення продукції ІЛ-4 у 2,1 рази тоді, як рівень ІЛ-10 знижується лише в 1 раз. За даними частотного аналізу, у всіх хворих ХМЛ у ПК та КМ виявлено зниження рівню ІЛ-4, а у 20 (38,4 %) пацієнтів його концентрація не досягала рівню середньогрупового значення і була меншою ніж 2,5 пг/мл. Порівняльний аналіз динаміки секреції ІЛ-2 на фоні терапії ІМ показав, що концентрація ІЛ-2 в зразках сироватки ПК у хворих ХФ ХМЛ, впродовж всього терміну лікування, стрімко зростала (рис. 3.)

Вміст протизапальних цитокінів ІЛ-4, ІЛ-10 у сироватці ПК та КМ хворих ХФ ХМЛ до початку терапії і після 6 місяців лікування ІМ

Цитокіни	n	Концентрація, пг/мл			
		До терапії ІМ*		6 міс. терапії ІМ	
		ПК, M±SD	КМ, M±SD	ПК, M±SD	КМ, M±SD
ІЛ-4	52	5,8 ± 0,57	6,0 ± 0,56	2,7 ± 0,63**	2,9 ± 0,72**
ІЛ-10	52	27,3 ± 4,55	29,0 ± 4,77	23,6 ± 4,33**	24,1 ± 4,64**

Примітка: * — представлено результати концентрації інтерлейкінів до початку лікування ІМ; ** — вірогідність розбіжностей з показниками основної групи (до терапії ІМ) $p < 0,001$.

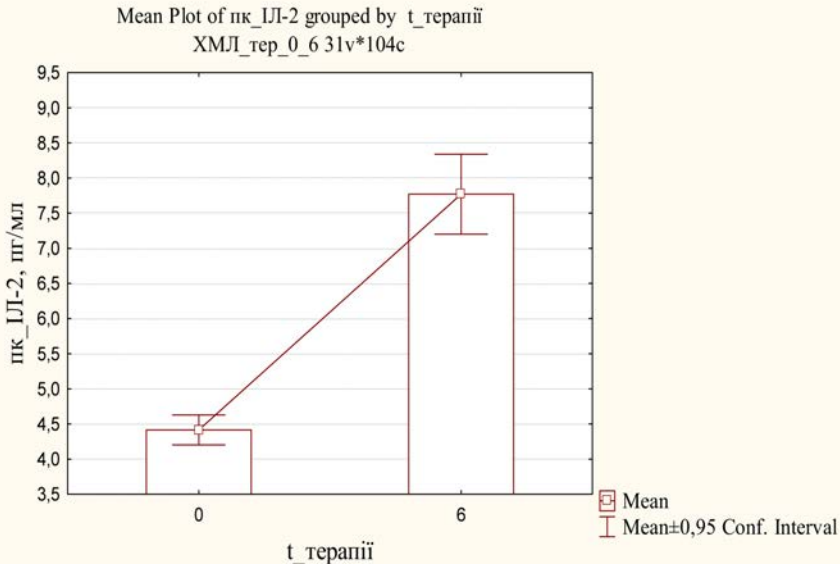


Рис. 1. Концентрація ІЛ-2 у сироватці ПК хворих в ХФ ХМЛ на 6 місяців таргетної терапії

Так, на 6 місяців лікування, вміст продукції ІЛ-2 у сироватці ПК достовірно збільшився у 1,75 рази порівняно із ініціальним, а вже через 24 місяці таргетної терапії концентрація ІЛ-2 перевищувала показники його спонтанного рівня у 3,11 рази та за середньогруповим значенням становила ($13,7 \pm 2,39$) пг/мл і досягла контрольного значення ($13,3 \pm 2,41$) пг/мл. Поряд із цим, на останньому етапі дослідження (24 місяці лікування) нормалізація секреції ІЛ-2 в межах (12 – 14) пг/мл визначена лише у 14 (26,9%) хворих вХФ ХМЛ, у 26 (49,9 %) осіб виявлено значно підвищений рівень ІЛ-2, а у решті пацієнтів 12 (23,0%) встановлено зниження даного показника ≤ 12 пг/мл.

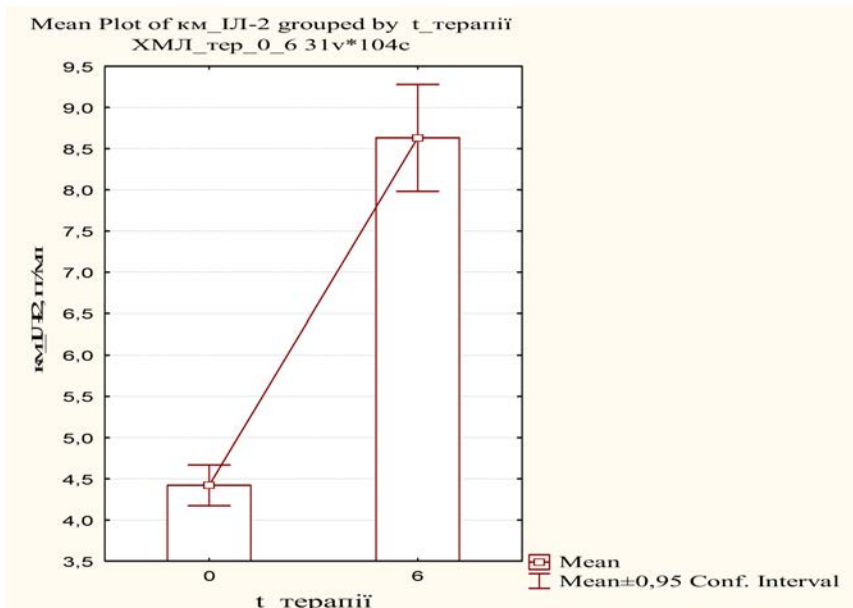


Рис. 2. Концентрація ІЛ-2 у сироватці КМ хворих в ХФ ХМЛ на 6 місяців таргетної терапії

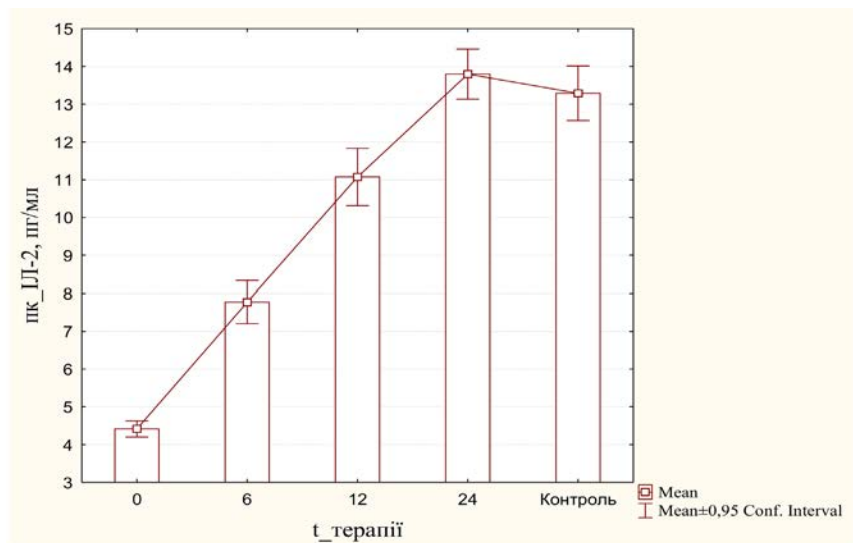


Рис. 3. Динаміка змін рівню ІЛ-2 в сироватці ПК залежно від терміну лікування інгібітором тирозинкінази ІМ

Аналогічні зміни рівня ІЛ-2 виявлені також у сироватці КМ. Зниження вмісту протизапальних цитокінів, властивих другому типу імунної відповіді (ТН 2), у більшій мірі ІЛ-10, ймовірно, сприяє підвищенню секреції ІЛ-2, стимуляції продукції ІНФ- γ і, як наслідок, активації механізмів протипухлинної цитотоксичності. Лікування ІМ у пацієнтів з ХМЛ, також супроводжувалось достовірним підвищенням сироваткових рівнів ІНФ- γ . Так, через 6 місяців терапії, його концентрація зростала до $(33,1 \pm 7,40)$ пг/мл, а через 12 місяців до $(46,3 \pm 8,45)$ пг/мл та на 24 місяці лікування становила $(53,9 \pm 7,86)$ пг/мл, що майже у 2 рази вище у порівнянні із відповідними показниками основної групи (до лікування), але у 1,5 рази нижче від контрольних значень. Тенденція до відновлення секреції сироваткових рівнів досліджених цитокінів, нормалізація вмісту ІЛ-2 та підвищення концентрацій ІНФ- γ в сироватці ПК і КМ у хворих на ХМЛ в ХФ на терапії ІМ свідчить про поступову нормалізацію імунної реактивності організму. А завдяки тому, що ІНФ- γ , має направлену цитотоксичну дію на клітини пухлинного клону, імунomodуючу та протизапальну властивість, що призводить до активації макрофагів, нейтрофілів та ендотеліальних клітин, підвищення їх концентрацій, ймовірно, свідчить про активацію механізмів апоптозу лейкемічних клітин на фоні терапії ІТК. Підвищений спонтанний рівень прозапальних – ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8 та протизапальних – ІЛ-4, ІЛ-10 в сироватці ПК і КМ і наступне виражене їх зниження в процесі лікування, а також нормалізація секреції ІЛ-2 та підвищення рівню ІНФ- γ , у хворих на ХМЛ в ХФ може свідчити зміну реактивності імунної відповіді в процесі лікування та сприяють переключенню домінуючого в дебюті захворювання гуморального – ТН-2 типу, на клітинний – ТН-1 тип. Такі процеси нормалізації рівня секреції прозапальних та протизапальних цитокінів корелюють із рівнем цитогенетичної та молекулярно-генетичної відповіді і слід вважати сприятливою ознакою, бо свідчать про значний ступінь пригнічення проліферації пухлинних клітин. Моніторинг рівнів про- та протизапальних цитокінів, на різних етапах лікування, може бути одним із методів спостереження направленості імунної відповіді, а також стати додатковим критерієм оцінки ефективності лікування ІТК.

Висновки. Іматиніб в якості патогенетично направленої терапії хворих у ХФ ХМЛ призводить до поступової нормалізації секреції як прозапальних – ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8, так і протизапальних – ІЛ-4, ІЛ-10 цитокінів, і сприяє зменшенню ступеню цитокінового дисбалансу, який супроводжує розвиток цього захворювання. На лікуванні ІМ в сироватці ПК і КМ простерігається зміна реактивності імунної відповіді, що ймовірно, проявляється переключенням домінуючого в дебюті захворювання гуморального – ТН-2 типу, на клітинний – ТН-1 тип, що слід вважати сприятливою ознакою так, як контроль за ростом і регресією пухлин здійснюють передусім Т – лімфоцити і стати додатковим критерієм оцінки ефективності лікування ХМЛ інгібіторами тирозинкінази.

Література

1. Бережная Н.М. Семейства интерлейкинов: биология и онкогенез / Н.М.Бережная.– К.: Наукова думка, 2013.– 575 с.
2. Бережная Н.М. Иммунология злокачественного роста / Н.М.Бережная, В.Ф. Чехун.- К.: Наукова думка, 2005.– 786 с.
3. Phenotypic and functional characterization of the host immune compartment of chronic myeloid leukemia patients in complete hematological remission / A.Guarini [et al.] // Brit. J. Haematol. – 2001.–Vol.113.–P.136–142.

4. Normal intrinsic Th1/Th2 balance in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia not treated with interferon-alpha or imatinib / A. Kiani [et al.] // Haematologica.— 2003.— Vol.88.— P.754 –761.

5. Pawelek G. Cellular immune responses in autologous chronic myelogenous leukemia cells in vitro / G. Pawelek [et al.] // Cancer Immunol.Immunother. — 2005. — Vol.42.— P. 433 – 435.

6. Restoration of Th1 cytokine synthesis by T- cells of patients with chronic myelogenous leukemia in cytogenetic and hematologic remission with interferon-a /G. Reuben [et al.] // Clin Cancer Res. — 2000. — Vol.6.— P.1671–1677.

**Т.Ю. Шляхтиченко, И.С. Дягиль, Ж.Н. Минченко,
И.В. Дмитренко, В.Г. Федоренко, Е.А. Дмитренко**

Динамика изменений цитокинового звена иммунитета у больных хронической миелоидной лейкемией при таргетной терапии

**ГУ «Национальный научный центр радиационной медицины
НАМН Украины»**

Вступление. Определение особенностей секреции иммунокомпетентными клетками провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в процессе таргетной терапии больных с ХМЛ позволяет расширить представления о значении иммунологической компоненты на формирование резистентности к терапии иматинибом и усовершенствовать спектр диагностических и прогностических критериев течения заболевания и эффективности лечения.

Цель. Определение изменений цитокинового профиля (концентрации провоспалительных, противовоспалительных интерлейкинов и интерферона- γ в сыворотках ПК и КМ у больных в ХФ ХМЛ на протяжении таргетной терапии.

Методы. Концентрации ИЛ-2, основных интерлейкинов воспаления (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8), противовоспалительных интерлейкинов (ИЛ-4, ИЛ-10), а также ИНФ- γ определяли в образцах сыворотки периферической крови (ПК) и костного мозга (КМ) у 52 больных ХМЛ в хронической фазе (ХФ) заболевания. Больные были обследованы до назначения специфической таргетной терапии, через 6, 12 и 24 месяца лечения ИМ. Количественную оценку концентрации в образцах сыворотки указанных цитокинов *in vitro* проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Результаты. Доказан повышенный спонтанный уровень провоспалительных – ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и провоспалительных – ИЛ-4, ИЛ-10 в сыворотке ПК и КМ и дальнейшее выраженное снижение их концентраций в процессе таргетной терапии, а также нормализация секреции ИЛ-2 и повышение уровня сывороточного ИНФ- γ у пациентов с ХМЛ. Исследование изменений цитокиновой секреции является дополнительным лабораторным критерием оценки эффективности лечения ХМЛ ингибиторами тирозинкиназ и прогноза ответа на терапию.

Ключевые слова: хроническая миелоидная лейкемия, цитокины, интерлейкины, иммунный ответ, таргетная терапия.

*T. Shliakhtychenko, I. Diahil, Zh. Minchenko, I. Dmytrenko,
V. Fedorenko, O. Dmytrenko*

Dinamics of changes in the cytokine level of immunity chane in targeted therapy of chronic myeloid leukemia

**State Institution "National Research Centre for Radiation Medicine",
National Academy of Medical Sciences of Ukraine**

Introduction. Defining peculiarities of secretion by immunocompetent cells of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the effectiveness of targeted therapy for CML patients can extend the idea of the contribution of immune components to the formation of resistance to Imatinib therapy and improve range of diagnostic and prognostic criteria of the disease and treatment effectiveness.

The aim of the work was to determine the changes in cytokine profile (concentration of proinflammatory and anti-inflammatory interleukins and interferon - γ) in sera PB and BM in patients with CML during targeted therapy.

Methods. Concentrations of IL-2, major interleukin inflammation (IL - 1β , IL-6, IL-8), the anti-inflammatory interleukins (IL-4, IL-10), and IFN - γ were determined in serum samples of peripheral blood (PB) and bone cord in 52 patients with CML in the chronic phase disease. Patients were examined before the specific targeted therapy was prescribed in 6, 12 and 24 months of treatment with IM. A quantitative assessment of concentrations in serum samples of these cytokines in vitro was performed by solid immunoenzyme assay.

Results. An increased level of spontaneous proinflammatory - IL- 1β , IL-6, IL -8 and anti-inflammatory - IL-4 , IL-10 in serum PB and BM and their following decrease during the target therapy, as well as normalization of IL-2 secretion and increased IFN - γ level in patients with CML were proved. Research into cytokine secretion changes is an additional laboratory criterion for evaluating the effectiveness of CML treatment with tyrosine kinase inhibitor and prognosis of a response to therapy.

Key words: chronic myeloid leukemia, cytokines, interleukins, immune response, targeted therapy.

Відомості про авторів:

Дягіль Ірина Сергіївна - д.мед.наук, ст.н.с, зав. відділенням радіаційної гематології відділу гематології і трансплантології. Адреса: 03115, м. Київ, просп. Перемоги, 119/121, ДУ «ННЦРМ НАМН України.

Мінченко Жана Миколаївна - д. біол.наук, професор, зав.лаб. імуногенетики відділу гематології і трансплантології. Адреса: 03115, м. Київ, просп. Перемоги, 119/121, ДУ «ННЦРМ НАМН України.

Шляхтиченко Тетяна Юріївна - м.н.с. лаб. імуногенетики. Адреса: 03115, м. Київ, просп. Перемоги, 119/121, ДУ «ННЦРМ НАМН України.

Дмитренко Ірина Віталіївна - к. біол. н, ст.н.с. лаб. імуногенетики. Адреса: 03115, м. Київ, просп. Перемоги, 119/121, ДУ «ННЦРМ НАМН України.

Федоренко Віра Григоріївна - м.н.с. лаб. імуногенетики. Адреса: 03115, м. Київ, просп. Перемоги, 119/121, ДУ «ННЦРМ НАМН України.

Дмитренко Олена Олександрівна - к. біол.н., ст.н.с. лаб. імуногенетики. Адреса: 03115, м. Київ, просп. Перемоги, 119/121, ДУ «ННЦРМ НАМН України.