

реплення здоров'я детского населения.

Summary

PERSONALIZED REGIONAL AND POPULATION ANALYSIS OF BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA AND DYSPLASTIC-RELATED PATHOLOGY OF BRONCHOPULMONARY SYSTEM: INNOVATIVE APPROACHES AND THEIR PRACTICAL IMPLEMENTATION
Shipka A.F.

Key words: social medicine, child health, regional features, bronchopulmonary system, forecasting.

The representative groups of children (with dysplastic-related pathologies of bronchopulmonary system and control group) were subjected to personalized assessment of the impact of regional and population factors on the risk of developing this disease. This article describes substantiation of a new suggested and tested method of assessing the quality of the environment, the use of which allows you to decide on the differentiation of regional prevention programs. It has been proved that taking into account pathology and sanitary parameters on different levels of environmental factors can be significant to justify the structure of target community health care and regional environmental programs to promote children health.

УДК 612.017:616.155.392-006-053.8

**Шляхтиченко Т.Ю., Дягіль І.С., Мінченко Ж.М.,
Дмитренко І.В., Федоренко В.Г., Дмитренко О.О.**

ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ЦИТОКІНІВ У ФОРМУВАННІ ВІДПОВІДІ НА ТЕРАПІЮ ІНГІБІТОРОМ BCR-ABL ТИРОЗИНКІНАЗИ ІМАТИНІБОМ МЕЗИЛАТОМ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ

ДУ «Національний Науковий центр радіаційної медицини НАМН України», м. Київ

Різноманітні клінічні прояви пухлинного росту, в тому числі гемабластозів, пов'язані з порушенням цитокінового статусу, які проявляються дисбалансом продукції цитокінів імунотропними клітинами та зміною експресії відповідних рецепторів. Оцінка ефективності лікування із застосуванням інгібіторів BCR-ABL тирозинкінази у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ) ґрунтується на інформації щодо редукції пухлинного клону на хромосомному і молекулярному рівнях. За даними нашого дослідження, встановлено, що секреція цитокінів залежить від вмісту Ph⁺ клітин в кістковому мозку та терміну лікування Іматинібом Мезилатом ІМ, що свідчить про взаємозв'язок концентрацій цитокінів з масою пухлинної тканини. Комплексна оцінка широкого спектру секреції про- і протизапальних цитокінів та їх балансу в динаміці таргетної терапії хронічної фази ХФ ХМЛ надасть можливість визначити деякі закономірності формування імунологічної реактивності у патогенезі ХМЛ, дозволить розширити уявлення щодо внеску імунологічної компоненти у формування резистентності до терапії інгібіторами тирозинкіназ ІТК, удосконалити спектр діагностичних і прогностичних критеріїв перебігу захворювання та ефективності лікування.

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

Дана робота є фрагментом НДР «Комплексна оцінка ефективності таргетної терапії хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію з урахуванням імунотропних, цитогенетичних та молекулярно-генетичних характеристик патологічного клону клітин», № держ. реєстрації 0110U000179.

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) – клональне мієлопроліферативне захворювання, розвиток якого пов'язаний із реципрокною хромосомною транслокацією t(9;22)(q34,q11) у стовбуровій гемопоетичній клітині та утворенням Філадельфійської хромосоми (Ph⁺) [Ohyashiki, Twama, 2000; Jahagirgar, Miller, 2001].

Встановлено, що цитокіни здійснюють ряд важливих міжсистемних взаємодій, а на тканинному рівні вони відповідають за розвиток запалення, імунної відповіді та регенерації тканин. Цитокіни можуть бути ростовим фактором для деяких пухлин, а іноді пухлинні клітини самі продукують цитокіни, які є аутокринним фактором їх росту [1, 2]. Поряд з цим, цитокіни мають протипухлинні властивості, що активно використовуються при лікуванні злоякісних новоутворень. Так, інтерферон γ (ІФН-γ) та фактор некрозу пухлин α (ФНП-α) мають цитотоксичну дію власне індукуючи апоптоз пухлинних клітин. ІФН-γ підсилює протипухлинну активність макрофагів; Ін-

терлейкін (ІЛ) -2 активує природні кілери і стимулює функцію цитотоксичних Т - лімфоцитів та ін. В сучасній літературі, важливу роль у патогенезі онкогематологічних захворювань, відводять не стільки зміні рівня цитокінів, скільки дисбалансу прозапальних (ФНП-α, ІЛ-1, ІЛ-3, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-12, ІФН-γ) та протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-11, ІЛ-13 та ін), який багато в чому визначає характер перебігу і результат лікування захворювання [1, 2].

Незважаючи на значний успіх у лікуванні ХМЛ препаратами-інгібіторами тирозинкінази, існує проблема первинної рефрактерності до них, що обумовлено, очевидно, як генетичними, так і імунологічними механізмами [5, 7].

З огляду на це, вивчення особливостей спонтанної секреції про- та протизапальних цитокінів та перебігу ХМЛ дозволить розширити уявлення щодо внеску імунологічної компоненти в формуванні резистентності до терапії іматинібом, удосконалити спектр діагностичних і прогностичних

критеріїв ефективності лікування.

Мета дослідження

Провести порівняльний аналіз секреції ІЛ-2, про- і протизапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8, ФНП- α , ІФН- γ , ІЛ-4, ІЛ-10) сироватки ПК і КМ у хворих в ХФ ХМЛ залежно від динаміки елімінації пухлинного Ph+ клону та згідно критеріїв European Leukemia Net ELNet. Визначити найбільш інформативні прогностичні критерії ефективності лікування та перебігу ХМЛ.

Об'єкт і методи дослідження

Концентрації інтерлейкінів (ІЛ) а саме ІЛ-2, основних інтерлейкінів запалення (ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8), протизапальних інтерлейкінів (ІЛ-4, ІЛ-10), а також інтерферону- γ (ІФН- γ) і фактору некрозу пухлин - α (ФНП- α) визначали у зразках сироватки периферійної крові (ПК) та кісткового мозку (КМ) у 52 осіб, з них 26 осіб чоловічої та 26 жіночої статі. Всі пацієнти знаходилися в хронічній фазі 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 периферійної 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, ФНП- α , ІФН- γ «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 аналізів.

Цитогенетичні дослідження проводили до призначення імаїнібу, а також через 6, 12, 18, та через 24 місяці після початку терапії імаїнібом. Аналізували метафазні пластинки з 24-годинних нестимульованих культур клітин кісткового мозку. Зразки кісткового мозку отримували шляхом пункції кісткового мозку. Культивування клітин кісткового мозку протягом 24-х годин здійснювали у поживному середовищі RPMI-1640 ("Sigma", США) з додаванням 20% телячої ембріональної сироватки. Після інкубації при 37°C культуру клітин обробляли 0,075 М гіпото-

нічним розчином KCl та проводили стандартну фіксацію сумішшю метанолу та льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1.

Для отримання диференційного G-зabarвлення препарати метафазних хромосом фарбували за стандартною методикою з використанням барвника Гімзи та 0,25% розчину трипсину [3, 6]. Ідентифікацію кожної пари хромосом та їх змін проводили згідно з критеріями "Міжнародної системи для номенклатури в цитогенетиці людини - 2009" (ISCN) [6]. У кожного пацієнта аналізували від 7 до 30 метафазних пластинок (в середньому 20 пластинок). В облік брали тільки клонові порушення. Клоном вважали порушення, яке повторювалося не менше ніж двічі на 10 проаналізованих пластинок. Клон з втратою чи придбанням хромосоми враховувався тільки при наявності мінімум трьох клітин з однаковою чисельною аномалією з 10 проаналізованих клітин [3].

З огляду на це, та з метою встановлення прогностичного внеску цитокінів у формуванні цитогенетичної відповіді ЦВ на терапію ІМ, у хворих ХФ ХМЛ проведено додатковий детальний аналіз секреції цитокінів у ПК та КМ в залежності від динаміки елімінації пухлинного Ph+ клону. Обстежених пацієнтів класифікували згідно ЦВ та критеріїв ELNet через 6, 12 та 24 місяці терапії ІМ. Аналізували рівні продукції досліджуваних цитокінів у підгрупах пацієнтів з оптимальною, субоптимальною відповіддю, та з "невдачею лікування" тобто із відсутністю цитогенетичної відповіді (в клітинах культури кісткового мозку більше ніж 95% Ph+ метафаз, а також у пацієнтів, які досягли повної цитогенетичної відповіді (ПЦВ) при якій в препаратах культури клітин кісткового мозку Ph+ метафаз немає, часткової цитогенетичної відповіді (ЧЦВ) якій притаманні 1-35% Ph+ метафаз або мінімальної цитогенетичної відповіді (МЦВ) - при цьому спостерігається 35-95% Ph+ метафаз у продовж всього періоду лікування (24 місяці) та у хворих ХМЛ, які набули стабільної ПЦВ та втратили ПЦВ після її досягнення за той же час.

Згідно рекомендації European Leukemia Net ELNet, критерієм оптимальної відповіді ОВ вважається досягнення повної цитогенетичної відповіді ПЦВ (відсутність Ph+ метафазних пластинок в кістковому мозку) на 6 місяців лікування ІТК 1-ї лінії та рівень BCR-ABL < 1%. При ознаках відсутності адекватної та своєчасної відповіді (пересторога), а це недосягнення ПЦВ на 6 місяців терапії ІТК [4]. Кількість Ph+ метафазних пластинок у кістковому мозку становить 1-35% , а рівень BCR-ABL-1-10%). На 12-й місяць лікування при застереженні рівень BCR-ABL становить 0,1-1%. У разі невдачі терапії ІТК на 6-й місяць Ph+ метафазних пластинок у кістковому мозку >35%, а рівень BCR-ABL > 10%, на 12-й місяць лікування Ph+ метафазних пластинок в

кістковому мозку > 0% і рівень BCR-ABL >1% [4].

Результати досліджень та їх обговорення

Вивчення продукції цитокінів в групі хворих з вперше встановленим діагнозом залежно від ефективності терапії ІМ показало, що пацієнти з ХМЛ, які з Плином 6 місяців лікування, характеризувалися більш позитивною частковою цитогенетичною відповіддю (ЧЦВ), до початку терапії мали достовірно нижчі показники вмісту прозапального ІЛ-8 та вищі рівні ФНП-α і ІНФ-γ у КМ та ПК порівняно з пацієнтами, які досягли лише

МЦВ та відрізняються надалі резистентністю до лікування. Результати наведено у табл. 1. та рис. 1-3.

Так, вміст ІЛ-8 був нижчим у 1,1 рази, а ФНП-α і ІНФ-γ вищим у 1,2 та відповідно у 1,1 рази. Рівні інших досліджуваних цитокінів (ІЛ-1β, ІЛ-6, ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-10) достовірної різниці не мали. Поряд із цим, в дебюті захворювання ІЛ-10 мав дещо нижчі концентрації у групі пацієнтів з ЧЦВ порівняно із такими в групі з МЦВ.

Таблиця 1
Рівень цитокінів у сироватці ПК та КМ хворих ХФ ХМЛ до лікування та залежно від цитогенетичної відповіді (за масивом даних 6 місяці терапії ІМ)

Цитокіни		Концентрація, пг/мл	
		МЦВ (n=28) M±SD	ЧЦВ (n=24) M±SD
ІЛ-1β	КМ	35,2 ± 5,59	36,8 ± 5,48
	ПК	33,7 ± 4,91	35,1 ± 3,94
ІЛ-6	КМ	38,5 ± 3,35	38,8 ± 3,31
	ПК	37,5 ± 3,25	36,5 ± 3,74
ІЛ-8	КМ	41,9 ± 2,19	38,8 ± 6,26*
	ПК	41,2 ± 2,17	38,1 ± 5,84*
ФНП-α	КМ	1,2 ± 0,28	1,4 ± 0,18*
	ПК	1,2 ± 0,27	1,3 ± 0,14*
ІНФ-γ	КМ	24,6 ± 6,21	27,0 ± 4,70*
	ПК	26,5 ± 6,48	29,3 ± 4,08*
ІЛ-2	КМ	4,3 ± 0,89	4,6 ± 0,87
	ПК	4,3 ± 0,65	4,6 ± 0,86
ІЛ-4	КМ	6,0 ± 0,52	5,9 ± 0,61
	ПК	5,8 ± 0,55	5,8 ± 0,60
ІЛ-10	КМ	29,1 ± 4,88	28,8 ± 4,72
	ПК	27,9 ± 4,84	26,6 ± 4,15

Примітка: * — вірогідність розбіжностей з показниками групи хворих ХФ ХМЛ з МЦВ $p < 0,001$.

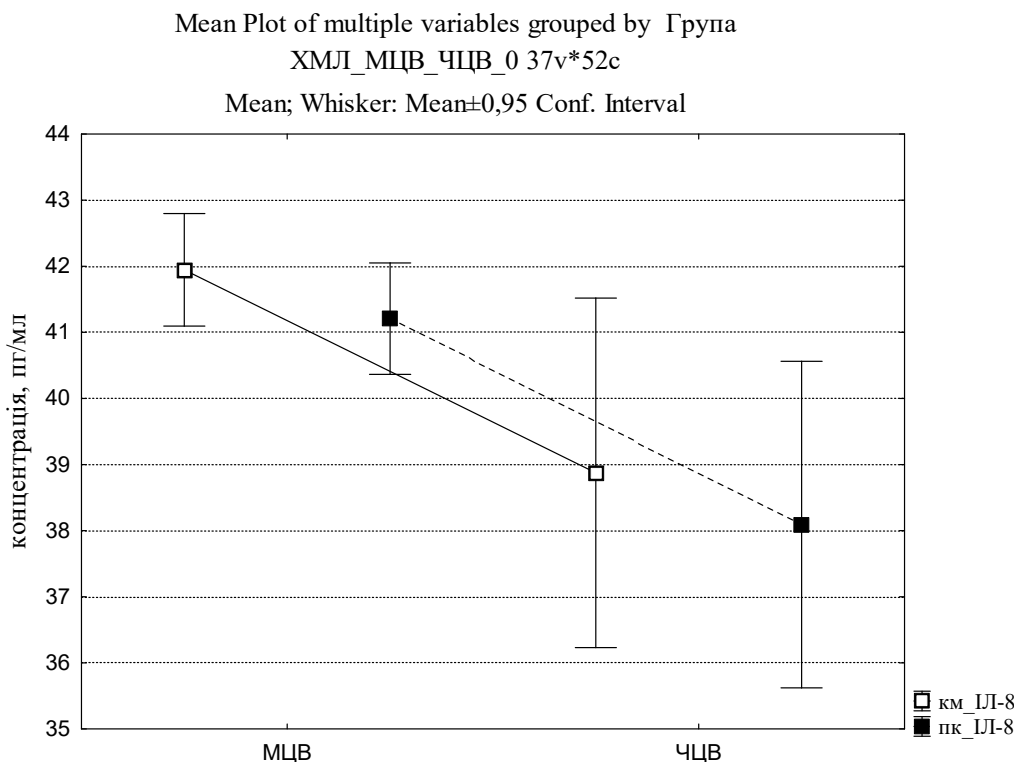


Рис. 1. Рівень ІЛ-8 у сироватці ПК та КМ хворих ХФ ХМЛ до початку терапії ІМ в залежності від цитогенетичної відповіді, за масивом даних 6 місяців лікування.

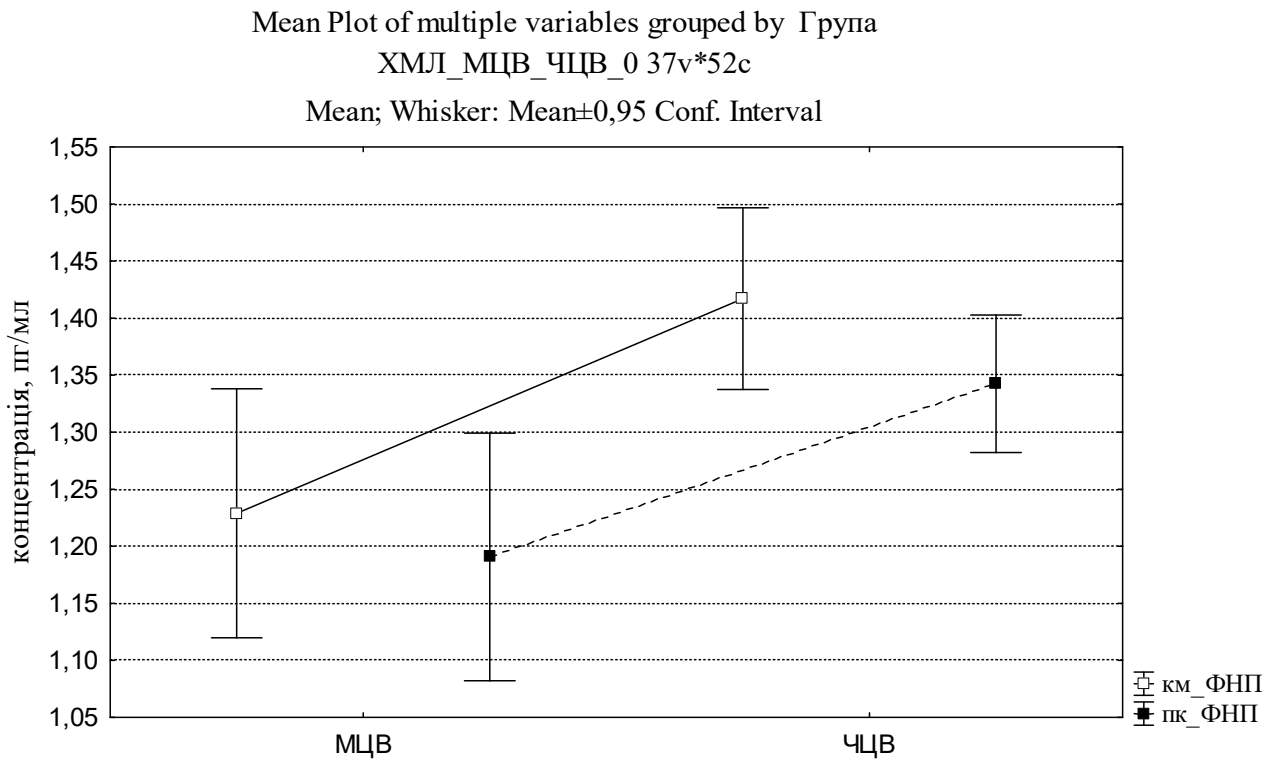


Рис. 2. Рівень ФНП-а у сироватці ПК та КМ хворих ХФ ХМЛ до початку терапії ІМ в залежності від цитогенетичної відповіді, за масивом даних 6 місяців лікування.

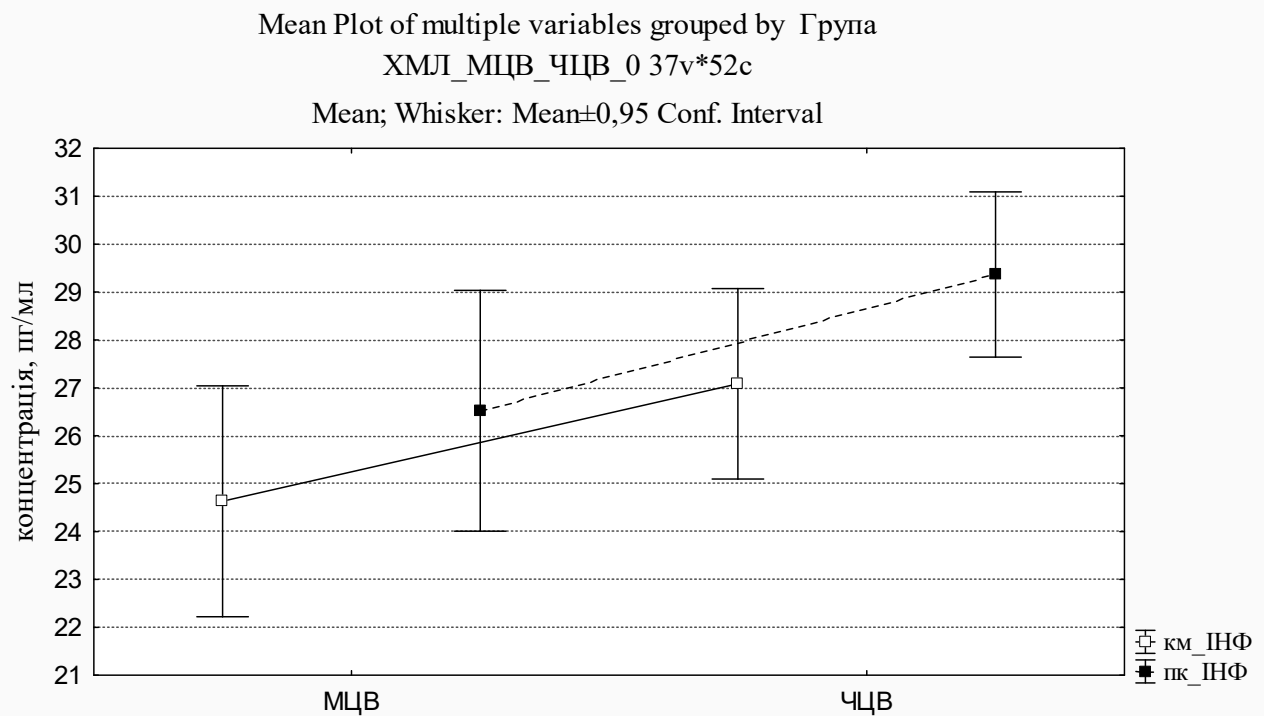


Рис. 3. Рівень ІФ-γ у сироватці ПК та КМ хворих ХФ ХМЛ до початку терапії ІМ в залежності від цитогенетичної відповіді, за масивом даних 6 місяців лікування.

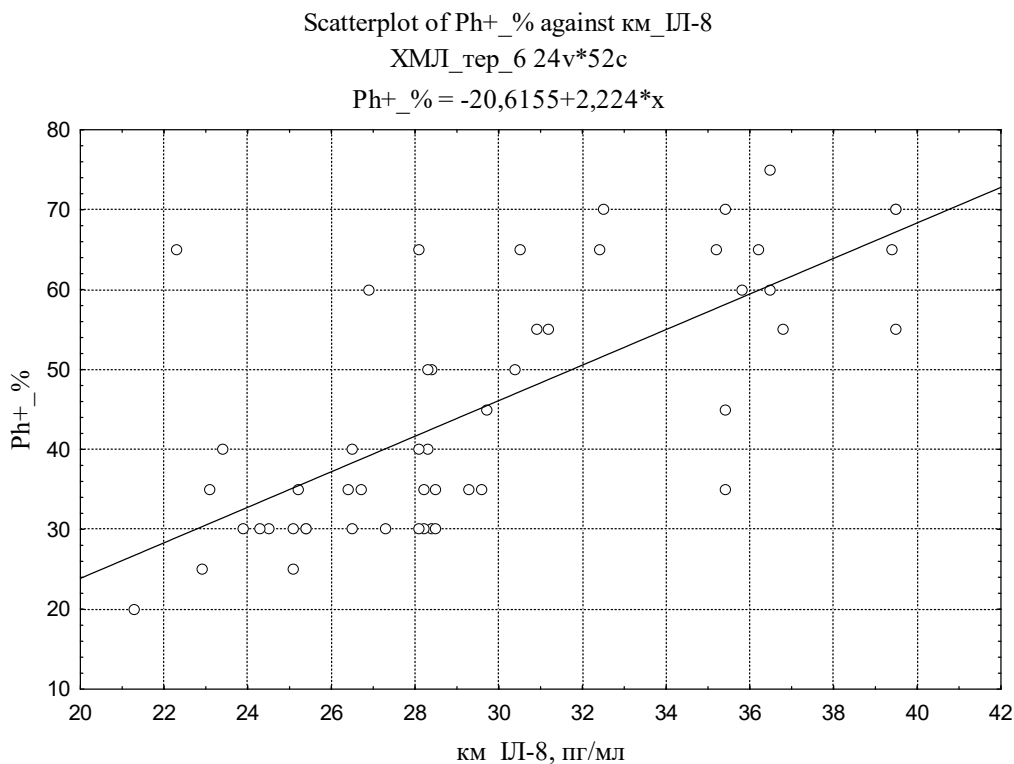


Рис. 4. Діаграма розсіяння: залежність вмісту ІІ-8 та відсотку Ph+ метафаз у сироватці КМ хворих ХФ ХМЛ через 6 місяців таргетної терапії ІМ.

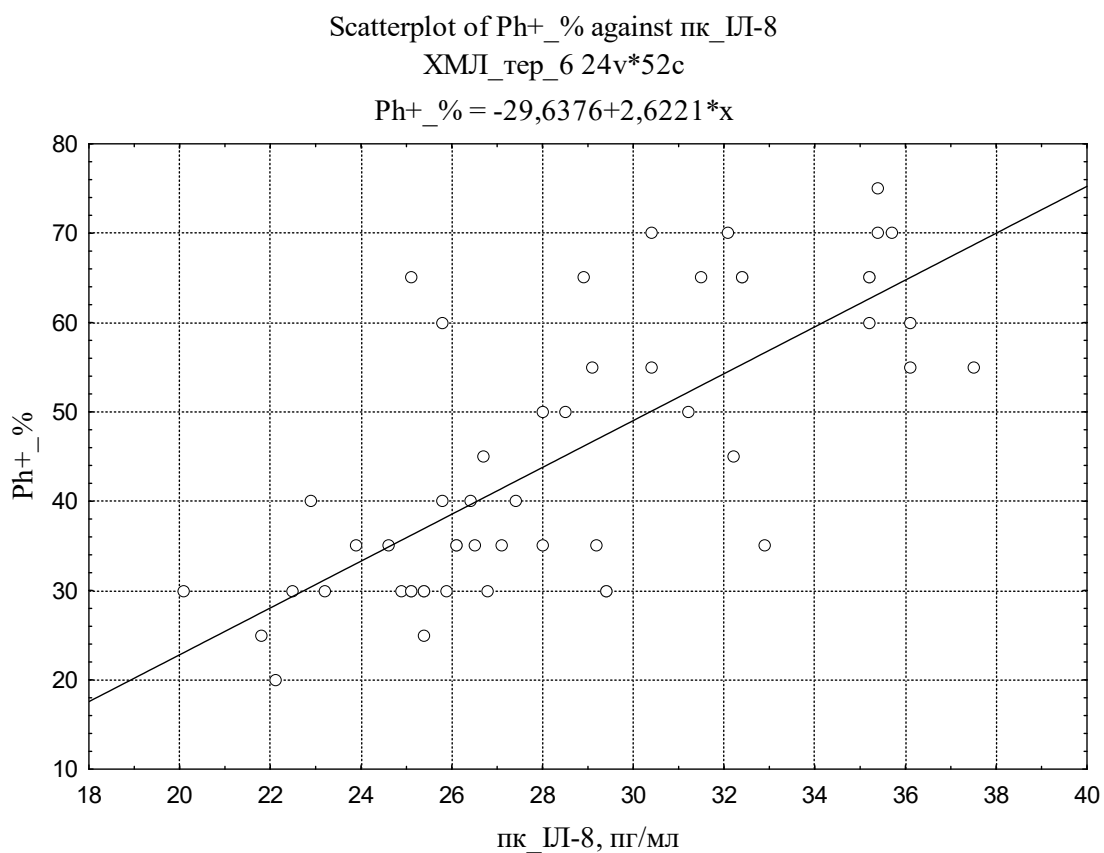


Рис. 5. Діаграма розсіяння: залежність вмісту ІІ-8 та відсотку Ph+ метафаз у сироватці ПК хворих ХФ ХМЛ через 6 місяців таргетної терапії ІМ.

У пацієнтів основної групи (до початку лікування) виявлено позитивну кореляційну залежність концентрації ІЛ-8 та відсотку Ph+ метафаз (rs = 0,364). Тобто, чим вищим був рівень Ph+ клітин, тим вищим був рівень продукції ІЛ-8 в сироватці КМ і ПК. Така залежність зберігається і після 6 місяців таргетної терапії ІМ: rs = 0,70 (КМ); rs = 0,72 (ПК), рис. 4, 5.

Можливо, на даному етапі лікування (6 місяців), затримка редукції пухлинного клону у пацієнтів з МЦВ сприяє надмірній продукції ІЛ-8, а зниження потенціалу регуляції балансу ІЛ-8 у пацієнтів ХФ ХМЛ, пояснюється значною активністю клітин нейтрофільного ряду, адже саме вони мають високу експресію рецепторів до ІЛ-8.

Для визначення прогностичного значення ци-

токінів проводили вивчення інформативності їх показників в динаміці лікування та залежно від цитогенетичної відповіді на терапію ІМ. Пацієнтів з ХФ ХМЛ класифікували згідно ЦВ через 24 місяці терапії ІМ, визначали групу пацієнтів із стабільною МЦВ, ЧЦВ, ПЦВ та простежували зміну рівнів досліджуваних цитокінів у продовж 6, 12 та 24 місяці лікування. Результати порівняльної характеристики зміни рівнів цитокінів у досліджуваних групах представлені у табл. 2-4.

На фоні терапії ІМ через 6 місяців лікування у сироватці ПК та КМ всіх пацієнтів з ХФ ХМЛ встановлено достовірне зменшення вмісту ІЛ-1β, ІЛ-6, ІЛ-8 та ІЛ-4 у порівнянні із такими в дебюті захворювання. Рівень ІЛ-2 значно підвищувався відносно вихідного рівню.

Таблиця 2

Рівень цитокінів у сироватці ПК та КМ у хворих ХФ ХМЛ із стабільною МЦВ залежно від терміну лікування ІМ

Цитокіни		Концентрація, пг/мл (МЦВ стабільна)				
		Контроль (n=45) M±SD	0 (n=6) M±SD	6 (n=6) M±SD	12 (n=6) M±SD	24 (n=6) M±SD
ІЛ-1β	КМ	—	36,7 ± 6,84	24,9 ± 4,38*	16,4 ± 2,90**	15,4 ± 2,18
	ПК	3,02 ± 0,66	34,6 ± 4,21	22,3 ± 3,51*	15,2 ± 2,31**	15,1 ± 2,73↑
ІЛ-6	КМ	—	40,6 ± 2,89	35,1 ± 3,13*	26,8 ± 5,04**	18,4 ± 4,38***
	ПК	13,0 ± 2,04	39,1 ± 2,27	34,2 ± 2,95*	26,2 ± 5,97**	17,6 ± 4,15***↑
ІЛ-8	КМ	—	42,4 ± 1,45	35,5 ± 5,02*	29,1 ± 2,59**	23,3 ± 2,55***
	ПК	9,0 ± 0,83	41,3 ± 1,32	33,7 ± 3,38*	27,2 ± 4,73**	22,3 ± 2,62***↑
ФНП-α	КМ	—	1,2 ± 0,14	1,3 ± 0,19	1,6 ± 0,20**	2,4 ± 0,44***
	ПК	4,1 ± 0,65	1,2 ± 0,19	1,3 ± 0,17	1,6 ± 0,16**	2,4 ± 0,46***↓
ІНФ-γ	КМ	—	21,0 ± 3,27	27,8 ± 5,41	43,9 ± 7,70**	46,8 ± 4,15
	ПК	78,4 ± 5,40	24,1 ± 7,15	26,9 ± 5,28	41,4 ± 5,60**	44,7 ± 4,48↓
ІЛ-2	КМ	—	4,3 ± 1,03	6,9 ± 1,58*	8,7 ± 1,55	11,6 ± 2,24***
	ПК	13,3 ± 2,41	4,6 ± 0,54	6,4 ± 1,54*	7,7 ± 1,32	11,4 ± 2,99***↓
ІЛ-4	КМ	—	6,3 ± 0,56	2,4 ± 0,32*	2,9 ± 1,35	3,3 ± 1,11
	ПК	3,5 ± 0,52	6,0 ± 0,52	2,1 ± 0,43*	2,8 ± 1,07	3,2 ± 0,87
ІЛ-10	КМ	—	30,2 ± 2,56	27,7 ± 2,68	21,7 ± 3,68**	17,5 ± 2,15***
	ПК	9,1 ± 0,61	28,6 ± 2,59	26,1 ± 2,92	21,0 ± 3,25**	16,9 ± 1,91***↑
Ph+	КМ	—	98,3 ± 2,58	59,2 ± 9,17*	41,6 ± 4,08**	27,5 ± 10,83***

Примітка: *— вірогідність розбіжностей з показниками основної групи (0 — ХМЛ до терапії ІМ) p < 0,05; **— вірогідність розбіжностей з показниками групи (6 — ХМЛ через 6 місяців терапії ІМ) p < 0,05; ***— вірогідність розбіжностей з показниками групи (12 — ХМЛ через 12 місяців терапії ІМ) p < 0,05; †↓— вірогідність розбіжностей з показниками контрольної групи p < 0,001.

Таблиця 3

Рівень цитокінів у сироватці ПК та КМ у хворих ХФ ХМЛ із стабільною ЧЦВ залежно від терміну лікування ІМ

Цитокіни		Концентрація, пг/мл (ЧЦВ стабільна)				
		Контроль (n=45) M±SD	0 (n=14) M±SD	6 (n=14) M±SD	12 (n=14) M±SD	24 (n=14) M±SD
ІЛ-1β	КМ	—	35,5 ± 5,55	18,9 ± 3,70*	15,7 ± 4,08**	13,3 ± 3,26
	ПК	3,02 ± 0,66	33,9 ± 5,97	20,7 ± 4,38*	14,6 ± 3,05**	13,0 ± 3,05†
ІЛ-6	КМ	—	40,8 ± 2,61	34,3 ± 3,99*	25,9 ± 4,05**	18,5 ± 3,95***
	ПК	13,0 ± 2,04	38,8 ± 2,74	33,1 ± 3,95*	24,2 ± 4,97**	17,5 ± 3,60***↑
ІЛ-8	КМ	—	41,7 ± 2,50	32,4 ± 5,37*	27,5 ± 5,27**	21,7 ± 3,01***
	ПК	9,0 ± 0,83	40,8 ± 2,63	31,1 ± 4,03*	26,3 ± 5,05**	20,6 ± 3,35***↑
ФНП-α	КМ	—	1,3 ± 0,13	1,3 ± 0,21	1,7 ± 0,24**	2,4 ± 0,38***
	ПК	4,1 ± 0,65	1,2 ± 0,14	1,3 ± 0,22	1,8 ± 0,22**	2,4 ± 0,45***↓
ІНФ-γ	КМ	—	26,2 ± 5,44	32,0 ± 5,26	43,3 ± 6,27**	48,6 ± 6,71***
	ПК	78,4 ± 5,40	28,1 ± 5,38	30,9 ± 5,22	41,5 ± 6,26**	46,9 ± 6,71***↓
ІЛ-2	КМ	—	4,5 ± 0,76	7,3 ± 2,15*	9,5 ± 2,26**	12,2 ± 1,74***
	ПК	13,3 ± 2,41	4,5 ± 0,38	6,5 ± 1,81*	8,7 ± 2,13**	11,5 ± 2,16***↓
ІЛ-4	КМ	—	6,0 ± 0,41	2,4 ± 0,46*	2,5 ± 0,72	2,8 ± 0,90
	ПК	3,5 ± 0,52	5,9 ± 0,42	2,2 ± 0,48*	2,5 ± 0,74	2,8 ± 0,82↓
ІЛ-10	КМ	—	29,8 ± 4,03	26,5 ± 4,77	22,3 ± 5,38**	17,4 ± 1,98***
	ПК	9,1 ± 0,61	28,7 ± 4,05	25,6 ± 4,34	20,7 ± 4,86**	16,7 ± 1,96***↑
Ph+	КМ	—	95,0 ± 7,84	57,8 ± 10,50*	33,2 ± 8,22**	18,9 ± 7,33***

Примітка: *— вірогідність розбіжностей з показниками основної групи (0 — ХМЛ до терапії ІМ) p < 0,01; **— вірогідність розбіжностей з показниками групи (6 — ХМЛ через 6 місяців терапії ІМ) p < 0,05; ***— вірогідність розбіжностей з показниками групи (12 — ХМЛ через 12 місяців терапії ІМ) p < 0,05; †↓— вірогідність розбіжностей з показниками контрольної групи p < 0,001.

Таблиця 4

Рівень цитокінів у сироватці ПК та КМ у хворих ХФ ХМЛ із стабільною ПЦВ залежно від терміну лікування ІМ

Цитокіни		Концентрація, пг/мл (ПЦВ стабільна)				
		Контроль (n=45) M±SD	0 (n=21) M±SD	6 (n=21) M±SD	12 (n=21) M±SD	24 (n=21) M±SD
ІЛ-1β	КМ	—	36,0 ± 5,41	18,9 ± 3,70*	12,2 ± 3,59**	7,6 ± 1,44***
	ПК	3,02 ± 0,66	34,5 ± 4,23	17,6 ± 3,77*	11,7 ± 3,13**	7,2 ± 1,62***↑
ІЛ-6	КМ	—	38,5 ± 3,20	29,8 ± 2,83*	18,4 ± 5,87**	13,5 ± 1,31***
	ПК	13,0 ± 2,04	36,6 ± 3,72	25,9 ± 3,48*	17,4 ± 6,35**	12,9 ± 1,51***
ІЛ-8	КМ	—	41,2 ± 2,38	26,9 ± 3,71*	18,9 ± 3,22**	14,1 ± 2,67***
	ПК	9,0 ± 0,83	40,5 ± 1,99	26,2 ± 3,49*	17,4 ± 3,31**	13,6 ± 1,89***↑
ФНП-α	КМ	—	1,4 ± 0,27	1,7 ± 0,27*	1,9 ± 0,30**	3,3 ± 0,62***
	ПК	4,1 ± 0,65	1,3 ± 0,25	1,7 ± 0,28*	1,9 ± 0,26**	3,1 ± 0,53***↓
ІНФ-γ	КМ	—	25,6 ± 4,58	35,6 ± 7,51*	54,4 ± 6,30**	60,8 ± 5,36***
	ПК	78,4 ± 5,40	29,0 ± 4,79	34,5 ± 7,48*	51,9 ± 6,79**	58,9 ± 4,71***↓
ІЛ-2	КМ	—	4,3 ± 0,63	9,5 ± 1,75*	13,2 ± 2,58**	16,0 ± 1,17***
	ПК	13,3 ± 2,41	4,3 ± 0,56	8,6 ± 1,91*	12,2 ± 2,43**	15,0 ± 1,39***↑
ІЛ-4	КМ	—	5,8 ± 0,59	3,3 ± 0,57*	2,5 ± 0,56**	2,7 ± 0,86
	ПК	3,5 ± 0,52	5,6 ± 0,60	2,9 ± 0,50*	2,3 ± 0,47**	2,6 ± 0,75↓
ІЛ-10	КМ	—	28,7 ± 4,80	24,0 ± 3,91*	14,6 ± 5,83**	10,4 ± 2,03***
	ПК	9,1 ± 0,61	26,6 ± 4,29	24,1 ± 3,64*	14,3 ± 5,63**	9,9 ± 2,05***↑
Ph+	КМ	—	90,7 ± 9,65	34,5 ± 10,35*	0,0 ± 0,00**	0,0 ± 0,00

Примітка: *— вірогідність розбіжностей з показниками основної групи (0 — ХМЛ до терапії ІМ) $p \leq 0,05$; **— вірогідність розбіжностей з показниками групи (6 — ХМЛ через 6 місяців терапії ІМ) $p < 0,01$; ***— вірогідність розбіжностей з показниками групи (12 — ХМЛ через 12 місяців терапії ІМ) $p < 0,01$; ↑↓— вірогідність розбіжностей з показниками контрольної групи $p < 0,001$.

Вміст ІНФ-γ та ІЛ-10 у групах хворих з МЦВ та ЧЦВ з плином 6 місяців лікування достовірно не змінювався, а у групі пацієнтів із ПЦВ відмічено достовірне підвищення ІНФ-γ та зниження рівню ІЛ-10 ($p < 0,01$). З огляду на це, а також ґрунтуючись на результатах описаних вище, низький рівень ІНФ-γ та високі концентрації ІЛ-8 і ІЛ-10 в дебюті ХМЛ можуть бути поганою прогностичною ознакою захворювання, його перебігу та формування відповіді на лікування.

Через 12 місяців терапії ІМ у пацієнтів з ХФ ХМЛ виявлено достовірне зниження продукції ІЛ-1β, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10 та підвищення рівнів ФНП-α і ІНФ-γ відносно їх показників в дебюті захворювання та 6 місяців лікування. Концентрація ІЛ-4 у групах пацієнтів із МЦВ і ЧЦВ була зниженою лише у порівнянні з початковим рівнем ($p < 0,01$) і не змінювалась відносно показників попереднього етапу обстеження (6 міс), а у групі із стабільною ПЦВ зареєстровано його достовірне зниження. На даному фоні у групі з МЦВ зареєстровано лише несуттєве підвищення вмісту ІЛ-2 у сироватці ПК і КМ у порівнянні із такими через 6 місяців лікування, тоді як у пацієнтів з ЧЦВ і ПЦВ встановлено достовірне підвищення його рівнів відносно значень початку і 6 місяців терапії відповідно.

Після 24 місяців протипухлинної терапії ІМ у пацієнтів з ХМЛ всіх груп відбулися односпрямовані зміни, які мають тенденцію до нормалізації балансу досліджуваних цитокінів та характеризуються суттєвим зменшенням продукції ІЛ-1β, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, а також підвищенням концентрацій ІЛ-2 і ІНФ-γ відносно їх показників до лікування. Найбільш виражені зміни досліджуваних цитокінів відмічено у групі із стабільною ПЦВ. Поряд з цим, з плином 24 місяців лікування,

вміст пулу прозапальних (ІЛ-1β, ІЛ-6, ІЛ-8) цитокінів та протизапального ІЛ-10 залишався значимо високим, а концентрації ІЛ-2 і ІНФ-γ низькими у порівнянні із здоровими донорами. Звертає увагу затримка відновлення рівню ІЛ-1β у хворих з МЦВ і ЧЦВ. ІЛ-1β у пацієнтів даної групи хоча і мав тенденцію до зниження, але значимої різниці його концентрації у період 12 – 24 місяців лікування ІМ не встановлено. Цей факт пояснює затримку відновлення рівня ІНФ-γ, адже за даними кореляційного аналізу встановлено протилежну залежність рівня ІЛ-1β та ІНФ-γ ($r_s = -0,62$; $p < 0,05$). У пацієнтів з МЦВ відмічено лише несуттєве підвищення продукції ІНФ-γ відносно 12 місяців лікування. Показники ІЛ-4 мали різноспрямовані зміни та продемонстрували протилежну динаміку. Так, з плином 6 місяців лікування відмічено різке зниження продукції ІЛ-4, найбільш виражене в групі з МЦВ у 2,86 рази тоді, як у групі з ЧЦВ у 2,69 рази та з ПЦВ у 1,94 рази відповідно. Поряд з цим, у групі з МЦВ у період 6 – 12 місяців терапії рівень ІЛ-4 мав тенденцію до підвищення і з плином 24 місяців терапії досягав контрольних значень. Така тенденція відмічена і у групі з ЧЦВ тоді, як у пацієнтів із стабільною ПЦВ цей показник достовірно знижувався у продовж 6 – 12 місяців терапії, а з плином 24 місяців лікування мав тенденцію до зниження та не досягав нормальних значень.

Таке надмірне зниження вмісту протизапального ІЛ-4 на ранніх етапах лікування, що у більшій мірі виражене у групі з МЦВ, може бути поганою прогностичною ознакою, адже низькі рівні ІЛ-4 на ранніх етапах лікування асоційовані із високим рівнем відсотку Ph+ метафаз ($r_s = -0,83$) і корелюють із зниженням ІНФ-γ ($r_s = 0,57$), що зменшує імунологічну реактивність (Т-, НК-

цитотоксичність) та ймовірно негативно впливає на ефективність протипухлинної терапії (рис. 6).

Аналіз концентрацій цитокінів в динаміці протипухлинного лікування ХФ ХМЛ показав наявність стійкої тенденції, спрямованої на віднов-

лення продукції як прозапальних, так і протизапальних цитокінів, а також їх балансу, що у більшій мірі залежить від редукції Ph+ клону та терміну таргетної терапії.

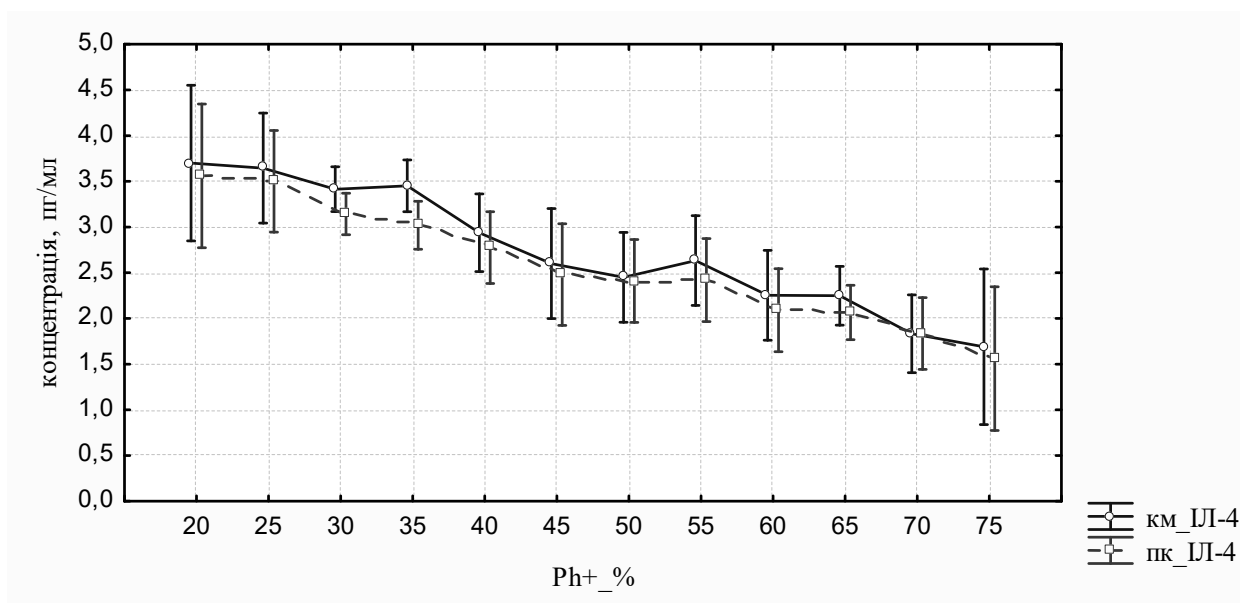


Рис. 6. Залежність вмісту ІЛ-4 та відсотку Ph+ метафаз у сироватці КМ і ПК хворих ХФ ХМЛ через 6 місяців таргетної терапії ІМ.

Таблиця 5
Рівень цитокінів у сироватці ПК та КМ хворих ХФ ХМЛ залежно від ефективності таргетної терапії згідно критеріїв ELN

Цитокіни		Концентрація, пг/мл				
		Контроль (n=45) M±SD	До терапії (n=52) M±SD	НЛ (n=32) M±SD	COB (n=57) M±SD	OB (n=63) M±SD
ІЛ-1β	КМ	—	35,9 ± 5,54	17,6 ± 6,64*	15,4 ± 6,19	12,8 ± 5,60***
	ПК	3,02 ± 0,66	34,3 ± 4,50	16,0 ± 5,65*	14,2 ± 5,49	12,0 ± 5,23***↑
ІЛ-6	КМ	—	38,8 ± 3,30	25,2 ± 7,72*	23,7 ± 7,45	19,5 ± 6,76***
	ПК	13,0 ± 2,04	37,0 ± 3,49	24,4 ± 7,57*	22,5 ± 7,13	18,8 ± 6,87***↑
ІЛ-8	КМ	—	41,5 ± 2,33	27,5 ± 6,90*	23,9 ± 6,77**	19,8 ± 6,32***
	ПК	9,0 ± 0,83	40,7 ± 2,18	26,1 ± 6,46*	23,1 ± 6,73**	18,9 ± 6,09***↑
ФНП-α	КМ	—	1,3 ± 0,26	1,7 ± 0,52*	2,0 ± 0,68**	2,3 ± 0,84***
	ПК	4,1 ± 0,65	1,3 ± 0,23	1,7 ± 0,51*	2,0 ± 0,67**	2,3 ± 0,75↓
ІНФ-γ	КМ	—	25,7 ± 5,65	41,4 ± 11,53*	44,2 ± 10,35**	50,1 ± 12,62***
	ПК	78,4 ± 5,40	27,8 ± 5,64	39,5 ± 10,38*	42,8 ± 10,23**	48,3 ± 12,23***↓
ІЛ-2	КМ	—	4,4 ± 0,88	9,5 ± 2,87*	11,5 ± 3,50**	12,8 ± 3,28
	ПК	13,3 ± 2,41	4,4 ± 0,76	8,9 ± 3,02*	10,8 ± 3,41**	11,9 ± 3,23↓
ІЛ-4	КМ	—	5,8 ± 0,57	2,9 ± 1,09*	2,7 ± 0,82	2,8 ± 0,75
	ПК	3,5 ± 0,52	5,8 ± 0,57	2,8 ± 1,01*	2,6 ± 0,78	2,6 ± 0,64↓
ІЛ-10	КМ	—	27,3 ± 4,54	20,2 ± 5,35*	19,0 ± 6,87	16,2 ± 6,99***
	ПК	9,1 ± 0,61	27,3 ± 4,54	19,5 ± 4,94*	18,2 ± 6,48	15,9 ± 7,09↑
Ph+	КМ	—	93,8 ± 8,55	38,1 ± 19,94*	27,6 ± 20,74**	11,7 ± 17,30***

Примітка: *— вірогідність розбіжностей з показниками основної групи (ХМЛ до терапії ІМ) $p < 0,001$; **— вірогідність розбіжностей з показниками групи НЛ $p < 0,05$; ***— вірогідність розбіжностей з показниками групи COB $p < 0,05$; ↑↓— вірогідність розбіжностей з показниками контрольної групи $p < 0,001$.

Рівень цитокінів у сироватці ПК та КМ хворих ХФ ХМЛ залежно від цитогенетичної відповіді на лікування ІМ

Цитокіни		Концентрація, пг/мл				
		Контроль (n=45) M±SD	До терапії (n=52) M±SD	МЦВ (n=39) M±SD	ЧЦВ (n=60) M±SD	ПЦВ (n=57) M±SD
ІЛ-1β	КМ	—	35,9 ± 5,54	22,1 ± 0,79*	15,1 ± 0,50**	9,4 ± 0,43***
	ПК	3,02 ± 0,66	34,3 ± 4,50	19,4 ± 4,67*	14,3 ± 3,93**	9,0 ± 3,14***↑
ІЛ-6	КМ	—	38,8 ± 3,30	29,8 ± 6,14*	23,7 ± 5,29**	15,5 ± 4,39***
	ПК	13,0 ± 2,04	37,0 ± 3,49	28,8 ± 6,09*	22,7 ± 4,97**	14,8 ± 4,53***↑
ІЛ-8	КМ	—	41,5 ± 2,33	30,8 ± 5,14*	24,5 ± 5,54**	16,0 ± 3,54***
	ПК	9,0 ± 0,83	40,7 ± 2,18	29,7 ± 4,67*	23,6 ± 4,52**	15,2 ± 3,14***↑
ФНП-α	КМ	—	1,3 ± 0,26	1,5 ± 0,35*	1,9 ± 0,45**	2,7 ± 0,77***
	ПК	4,1 ± 0,65	1,3 ± 0,23	1,5 ± 0,31*	1,9 ± 0,46**	2,6 ± 0,67***↓
ІНФ-γ	КМ	—	25,7 ± 5,65	34,2 ± 9,16*	43,4 ± 8,15**	57,3 ± 6,61***
	ПК	78,4 ± 5,40	27,8 ± 5,64	32,6 ± 7,99*	41,9 ± 7,95**	55,3 ± 6,49***↓
ІЛ-2	КМ	—	4,4 ± 0,88	7,9 ± 2,01*	11,1 ± 2,20**	14,8 ± 2,38***
	ПК	13,3 ± 2,41	4,4 ± 0,76	7,1 ± 1,87*	10,5 ± 2,31**	13,9 ± 2,27***
ІЛ-4	КМ	—	5,8 ± 0,57	2,6 ± 0,95*	2,9 ± 0,84	2,7 ± 0,77
	ПК	3,5 ± 0,52	5,8 ± 0,57	2,5 ± 0,87*	2,8 ± 0,72	2,6 ± 0,76↓
ІЛ-10	КМ	—	27,3 ± 4,54	23,6 ± 0,86*	20,3 ± 0,64**	12,0 ± 0,57***
	ПК	9,1 ± 0,61	27,3 ± 4,54	22,9 ± 4,94*	19,6 ± 5,01**	11,6 ± 4,26***↑
Ph+	КМ	—	93,8 ± 8,55	52,8 ± 11,85*	26,0 ± 4,13**	0,0 ± 0,0***

Примітка: *— вірогідність розбіжностей з показниками основної групи (ХМЛ до терапії ІМ) $p < 0,001$; **— вірогідність розбіжностей з показниками групи МЦВ $p < 0,01$; ***— вірогідність розбіжностей з показниками групи ЧЦВ $p < 0,001$; ↑↓— вірогідність розбіжностей з показниками контрольної групи $p < 0,01$.

Як видно із таблиць 5, 6, концентрації цитокінів у хворих ХФ ХМЛ в залежності від ефективності таргетної терапії ІМ мали статистично достовірні зміни рівнів майже всіх досліджуваних цитокінів. Встановлено, що пацієнти ХМЛ з МЦВ, які відносяться до групи з невдачею лікування згідно критеріїв ELN, характеризувалися достовірно більш високим вмістом в сироватці ПК і КМ ІЛ-1β, ІЛ-6, ІЛ-8 та ІЛ-10, а рівні продукції ФНП-α, ІНФ-γ та ІЛ-2, навпаки, мали достовірно більш низькі показники в порівнянні з пацієнтами, які відносяться до груп з СОВ і ОВ. Вміст концентрації ІЛ-4 через 6 місяців лікування значно знизився, його рівень не мав достовірної різниці між показниками всіх груп порівняння (НЛ – СОВ – ОВ). У хворих з НЛ перебіг захворювання характеризувався резистентністю до протипухлинної терапії ІМ і несприятливим прогнозом – відсутністю ПЦВ у 72% хворих (за масивом даних 24 місяців спостереження).

Аналогічні результати отримані при порівнянні продукції цитокінів згідно ефективності лікування за даними цитогенетичної відповіді, табл. 4.14, що свідчить про зв'язок сироваткової концентрації цитокінів з прогнозом захворювання і агресивністю злоякісного процесу.

Поряд із цим, незважаючи на явну позитивну динаміку, досягнуту після проведення протипухлинної терапії, показники рівню більшості досліджуваних цитокінів в усіх підгрупах не досягали нормативних величин, що свідчить про збереження імунологічної дисфункції.

Дослідження цитокінового спектру залежно від цитогенетичної відповіді в динаміці лікування інгібітором BCR-ABL тирозинкінази показало однонаправлені зміни продукції досліджених цитокінів із тенденцією до нормалізації їх балансу у всіх підгрупах хворих ХФ ХМЛ (МЦВ, ЧЦВ, ПЦВ),

що характеризувалися достовірним зниженням рівнів ІЛ-1β, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, а також підвищенням концентрацій ІЛ-2, ФНП-α і ІНФ-γ відносно їх показників до лікування. Найбільш виражені зміни вмісту цитокінів встановлено у підгрупі із стабільною ПЦВ. Поряд з цим, незважаючи на явну позитивну динаміку відновлення продукції досліджуваних цитокінів, з плином 24 місяців лікування, у всіх пацієнтів ХМЛ незалежно від цитогенетичної відповіді, вміст пулу прозапальних (ІЛ-1β, ІЛ-6, ІЛ-8), протизапального ІЛ-10, а також рівень ІЛ-2, ФНП-α і ІНФ-γ не досягав нормальних значень. Цей факт відображає наявність порушення функціональної активності імунітету та протипухлинного захисту, що має місце навіть у пацієнтів із стабільною ПЦВ, які досягли повної елімінації Ph+ клону вже на 12 місяці лікування і зберігається через 2 роки таргетної терапії ІМ.

Висновки

1. Високі рівні ІЛ-8 ($\geq 41,3 \pm 1,32$) пг/мл та низькі концентрації ІНФ-γ ($\leq 24,1 \pm 7,15$) пг/мл у сироватці ПК встановлені на етапі діагностики ХФ ХМЛ знижують ймовірність досягнення великої цитогенетичної відповіді на лікування (у продовж 6 – 24 місяців терапії), їх рівні асоційовані з вмістом Ph+ метафаз, ефектом від терапії, що вказує на можливість використовувати ІЛ-8 і ІНФ-γ в якості додаткових прогностичних імунологічних маркерів пухлинної прогресії та ефективності лікування при ХМЛ.

2. Визначено достовірне зниженням рівнів ІЛ-1β, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, а також підвищення концентрацій ІЛ-2 і ІНФ-γ, але не досягають контрольних значень у всіх підгрупах хворих ХФ ХМЛ (МЦВ, ЧЦВ, ПЦВ) відносно їх показників в динаміці таргетної терапії ІМ та порівняно з їх рівнем

в дебюті захворювання. Найбільш виражені зміни вмісту досліджених цитокінів із тенденцією до нормалізації встановлено у підгрупі із стабільною ПЦВ.

3. Встановлено кореляційні залежності вмісту Ph + клітин та зміни рівнів цитокінів, що свідчить про взаємозв'язок концентрацій досліджуваних цитокінів з масою пухлинної тканини, а поліпшення цитокінового балансу відбувається, ймовірно, за рахунок відновлення нормального гемопоезу в процесі лікування ІМ.

Перспективи подальших досліджень

Робота спрямована на поліпшення результатів лікування, профілактику та мінімізацію розвитку ускладнень патогенетичної терапії препаратами – інгібіторами тирозинкінази у хворих на ХМЛ, а також визначення нових прогностичних

показників щодо відповіді на таргетну терапію ХМЛ та прогнозування перебігу захворювання.

Література

1. Бережная Н.М. Иммунология злокачественного роста / Н.М. Бережная, В.Ф. Чехун. - К. : Наукова думка, 2005. –786 с.
2. Бережная Н.М. Семейства интерлейкинов: биология и онкогенез / Н.М. Бережная. –К. : Наукова думка, 2013. –575 с.
3. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: методичні рекомендації / КМАПО ім. П.Л. Шупіка МОЗ України. - Київ, 2003. - 23 с.
4. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European Leukemia Net // J. Clinical Oncology. – 2009. – Vol. 27. – P. 6041-6051.
5. Kantarjian H. M. Efficacy of imatinib dose escalation in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase / H. M. Kantarjian [et al.] // Cancer. – 2009. - Vol. 115. - P. 551-560.
6. Mitelman F. An international system for human cytogenetic nomenclature 2009 / F. Mitelman. - M. : Karger, 2009. - 140 p.
7. Reuben G. Restoration of Th1 cytokine synthesis by T- cells of patients with chronic myelogenous leukemia in cytogenetic and hematologic remission with interferon- α / G. Reuben [et al.] // Clin. Cancer Res. –2000. –Vol. 6. –P. 1671–1677.

Реферат

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЦИТОКИНОВ В ФОРМИРОВАНИИ ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ ИНГИБИТОРОМ BCR-ABL ТИРОЗИНКИНАЗЫ ИМАТИНИБОМ МЕЗИЛАТОМ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ МИЕЛОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИЕЙ

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

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

Различные клинические проявления опухолевого роста, включая гемобластозы, связаны с нарушением цитокінового статуса, которые проявляются дисбалансом продукции цитокінов иммунокомпетентными клетками и изменением экспрессии соответствующих рецепторов. Оценка эффективности лечения с применением ингибиторов *BCR-ABL* тирозинкіназы у больных с хронической миелоидной лейкемией (ХМЛ) основывается на информации, касающейся редукции опухолевого клона на хромосомном и молекулярном уровнях. Согласно нашим исследованиям, установлено, что секреция цитокінов зависит от содержания Ph + клеток в костном мозге и длительности лечения ИМАТИНИБОМ МЕЗИЛАТОМ ІМ, что указывает на взаимосвязь концентраций цитокінов с массой опухолевой ткани. Комплексная оценка широкого спектра секреции про- и противовоспалительных цитокінов и их баланса в динамике таргетной терапии хронической фазы ХФ ХМЛ предоставит возможность выявить некоторые закономерности формирования иммунологической реактивности в патогенезе ХМЛ, позволит расширить представление о роли иммунологической компоненты в формировании резистентности к терапии ингибиторами тирозинкіназ ИТК а также усовершенствовать спектр диагностических и прогностических критериев течения заболевания и эффективности лечения.

Summary

PROGNOSTIC VALUE OF CYTOKINES IN DEVELOPING RESPONSE TO BCR-ABL TYROSINEKINASE INHIBITOR THERAPY BY IMATINIB MESILATE IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Shlyakhtychenko T.Y., Dyagil I.S., Minchenko J.N., Dmytrenko I.V., Fedorenko V.G., Dmytrenko Ye. .A.

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

Diverse clinical symptoms of tumor growth, including hemoblastoses are related to cytokines status impairment, which are demonstrated by the imbalance of cytokines production by immunocompetent cells and by the changes in the expression of relevant receptors. Evaluation of the effectiveness of treatment with the use of BCR-ABL tyrosinekinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia (CML) is based on information as to the reduction of the tumor clone on the chromosome and molecular levels. According to our research, it has been revealed that the secretion of cytokines depends on the content of Ph+ cells in bone marrow and on the duration of treatment by Imatinib Mesilate IM, and it indicates a relationship between cytokines concentrations and extent of tumor tissue. A comprehensive assessment of a wide range of secretion of Pro - and anti-inflammatory cytokines and their balance in the dynamics of targeted therapy for chronic phase CML HF will provide an opportunity to identify some regularities of formation of immunological reactivity in the pathogenesis of CML, will allow us to broaden our understanding of the contribution of immunological components in the development of resistance to tyrosinekinase inhibitor therapy, will improve the range of diagnostic and prognostic criteria of the course of disease and the effectiveness of treatment.