

DOI: 10.21802/artm.2019.1.9.62

УДК 612.017+616.155.392

ОЦІНКА ІМУНОЛОГІЧНИХ ПОРУШЕНЬ У ХВОРИХ НА В-КЛІТИННУ ХРОНІЧНУ ЛІМФОЦИТАРНУ ЛЕЙКЕМІЮ

Г.М. Курилів¹, О.І. Дрогомецька¹, І.О.Якубовська²¹Івано-Франківський національний медичний університет,¹кафедра внутрішньої медицини №1, клінічної імунології та алергології,²кафедра внутрішньої медицини №2 та медсестринства, м. Івано-Франківськ, Україна,

ORCID ID: 0000-0003-1426-1343, ORCID ID: 0000-0001-9393-1434,

ORCID ID: 0000-0001-5181-2939,

e-mail: kuryliv@ukr.net

Резюме. Встановлено, що у хворих на В-ХЛЛ до початку лікування за протоколом FC (флударабін, циклофосфамід) спостерігали достовірні нижчі рівні CD3⁺, CD4⁺, CD16⁺, CD22⁺ клітин, імуноглобулінів, циркулюючих імунних комплексів та показників фагоцитозу в порівнянні із особами контрольної групи. На основі результатів проведеного дослідження встановлено позитивний імуномодулюючий вплив етіопатогенетичного лікування на рівні сироваткових імуноглобулінів, субпопуляцій лімфоцитів та показників фагоцитарної функції. Проте, наявність у хворих частого інфекційного синдрому свідчить про те, що кількісні позитивні зміни показників імунограми не є достатніми для забезпечення належного імунного захисту організму від інфекцій, що може бути пов'язано із морфологічними змінами будови імуноглобулінів та структури імунних клітин. Тому вивчення структури імуноглобулінів і функціональної активності імунокомпетентних клітин є перспективним для подальших досліджень.

Ключові слова: хронічна лімфоїдна лейкемія, імуноглобуліни, субпопуляції лімфоцитів, імунний захист.

Вступ. В-клітинна хронічна лімфоцитарна лейкемія (В-ХЛЛ) – це лімфопроліферативне пухлинне захворювання кровотворної тканини, в основі якого лежить поліклональна проліферація В-лімфоцитів характерним імунофенотипом. Внаслідок цього в периферичній крові та лімфоїдних органах накопичуються морфологічно зрілі малі В-лімфоцити, які є функціонально малоактивними і не можуть забезпечити повноцінну імунну відповідь [3,5,7]. На щастя, хвороба є більш поширеною серед старших груп населення і, за різними даними, складає у осіб до 60 років – 2,5-4,5 випадки на 100 тис. осіб на рік, а у осіб понад 60 років – до 20 випадків на 100 тис. осіб на рік. Чоловіки хворіють частіше, ніж жінки у співвідношенні 2:1. На цей час в Україні на диспансерному обліку з приводу В-ХЛЛ перебуває близько 9 тисяч осіб. [3,5]

Обґрунтування дослідження. Використання сучасних схем хіміотерапевтичного (ХТ), імунобіологічного лікування дозволяє подовжити тривалість життя таких хворих і покращити якість їх життя [7, 8, 9]. У той же час, частіше розвиваються ускладнення після проведеного лікування. Одним із найбільш частих ускладнень, що супроводжує В-ХЛЛ, є розвиток набутого імунодефіцитного порушення, що проявляється інфекційним синдромом. У практичній діяльності дуже важко боротися з часто рецидивуючим інфекційним синдромом, який нерідко стає і причиною летального завершення хвороби. Такі хворі по-особливому реагують на лікування, нерідко зустрічається резистентність до терапії, тому дослідження показників імунологічного захисту залишається високо актуальним завданням.

Метою роботи було визначення імунологічних особливостей у хворих на В-ХЛЛ до початку

курсів хіміотерапевтичного лікування та після блоків хіміотерапії.

Матеріали і методи. Для виконання роботи проводилось клініко-лабораторне обстеження хворих на вперше діагностований В-ХЛЛ II(B) - III(C) стадій. Хворі перебували на лікуванні в гематологічному відділенні обласної клінічної лікарні м. Івано-Франківська. Діагноз В-ХЛЛ був виставлений на основі клініко-лабораторних даних згідно з уніфікованим клінічним протоколом первинної, вторинної, третинної медичної допомоги хворим на ХЛЛ МОЗ України (№ 439 від 12.05.16р). Під спостереженням було 26 хворих, серед яких 45% становили жінки і 55% – чоловіки. Середній вік хворих становив 64±2,5 роки. Хворі проходили шестицикловий курс ХТ лікування В-ХЛЛ за протоколом FC (флударабін, циклофосфамід). Імунологічні дослідження виконували двічі: до початку ХТ лікування та після завершення шести циклів ХТ. Групу контролю склали 17 практично здорових осіб аналогічного віку.

Проводилось комплексне імунологічне обстеження Т- та В-ланок імунітету та показників фагоцитарного захисту. Дослідження включало вивчення рівня зрілих Т-лімфоцитів (CD3⁺) та їх субпопуляцій: CD4⁺ (Т-лімфоцити-регуляторні, попередня назва – Т-лімфоцити-хелпери), CD8⁺ (Т-лімфоцити-цитотоксичні, попередня назва – Т-лімфоцити-супресори), CD16⁺ (натуральні кілери, НК-клітини), а також зрілих В-лімфоцитів (CD22⁺) за загальноприйнятою методикою з допомогою реакції розеткоутворення з еритроцитами, на яких адсорбовані моноклональні антитіла проти рецепторів з використанням наборів еритроцитарних діагностикумів (виробництво ТОВ НВЛ “Гранул”, м. Харків). Для оцінки гуморального імунітету вивчали функціональну активність В-

лімфоцитів за продукцією сироваткових IgG, IgA, IgM (метод Manchini et al., 1965). Концентрацію циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в сироватці крові визначали з використанням ПЕГ-6000 на мікроспектрофотометрі «Srescol-21» при довжині хвилі 450 нм. Неспецифічну резистентність організму вивчали шляхом визначення показників фагоцитозу. Визначали фагоцитарний індекс (ФІ) та фагоцитарний показник (ФП) в нейтрофільних гранулоцитах за методикою І. В. Петрова і співавт. (1984р.).

Результати дослідження опрацьовані із застосуванням статистичного пакету ліцензійної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» та «Microsoft Excel 2003». Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати дослідження. Проаналізовано показники гуморального та клітинного імунітету, а також показники фагоцитозу у хворих на В-ХЛЛ. У процесі проведення дослідження виявлено, що наявність у хворих встановленого діагнозу В-ХЛЛ супроводжується змінами в імунологічному статусі. Вира-

женість імунологічних змін у обстежених онкогематологічних хворих в значній мірі відрізнялася залежно від того, на якому етапі лікування захворювання перебували хворі. Зокрема, у хворих на В-ХЛЛ до початку ХТ лікування при аналізі клітинної ланки імунітету встановлено, що рівень загальної кількості Т-лімфоцитів ($CD3^+$ клітин) є вірогідно нижчим, ніж у хворих контрольної групи ($p < 0,05$) (табл.1). Очевидно, що таке зменшення пулу Т-лімфоцитів пов'язане із колонізацією кісткового мозку пухлинними малими лімфоцитами, які кількісно їх витіснили, тому і відповідні зміни виявлено у периферичній крові хворих [1,2,4]. Аналізуючи субпопуляції лімфоцитів, спостерігаємо аналогічну тенденцію, зокрема, рівні $CD4^+$ клітин достовірно нижчі у хворих із В-ХЛЛ до проведення лікування ($p < 0,05$) (табл.1). У той час, як представлено в табл. 1, рівень $CD8^+$ зменшений, проте не достовірно ($p > 0,05$), порівняно з показниками у контрольній групі.

Таблиця 1

Показники клітинного імунітету та фагоцитозу в обстежених осіб ($M \pm m$)

Показник	Група контролю (n=17)	Показники у хворих на В-ХЛЛ до ХТ (n=26)	Показники у хворих на В-ХЛЛ після ХТ (n=26)
$CD3^+$, %	$76 \pm 1,3$	$38 \pm 1,2^*$	$48 \pm 0,94^*$
$CD4^+$, %	$43 \pm 1,9$	$29 \pm 0,8^*$	$38 \pm 0,94^*$
$CD8^+$, %	$29 \pm 0,9$	$20 \pm 1,0$	$26 \pm 1,1$
$CD4^+ / CD8^+$	$1,48 \pm 0,19$	$1,45 \pm 0,1$	$1,46 \pm 0,12$
$CD22^+$, %	$29 \pm 1,4$	$13 \pm 1,9^*$	$25 \pm 1,2^*$
$CD16^+$, %	$23 \pm 0,4$	$14 \pm 2^*$	$23 \pm 0,8^*$
ФІ	$68,4 \pm 4,2$	$32 \pm 1,2^*$	$61 \pm 3,52^*$
ФП	$7,4 \pm 1,16$	$2,5 \pm 0,23^*$	$6,1 \pm 0,82^*$

Примітка: * -різниця вірогідна порівняно з контролем ($p < 0,05$), * -достовірність різниці у хворих перед курсами хіміотерапії та після завершення курсів лікування ($p < 0,05$).

Дані зміни зниження рівнів $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ вказують на недостатню кількість факторів, що забезпечують клітинний імунітет. Такі закономірності, в свою чергу, можуть бути причиною розвитку у хворих інфекційних захворювань вірусної та грибкової етіології [2,7]. Проте, при аналізі кількісного складу субпопуляції лімфоцитів, важливою позитивною ознакою, яка спостерігається у хворих, є утримання нормального рівня показника імунорегуляторного індексу. Його визначаємо шляхом співвідношення клітин $CD4^+ / CD8^+$. Цей показник свідчить, що незважаючи на зменшення кількісного складу представників клітинного імунітету, пропорційне співвідношення між самими клітинами зберігається в нормі. Для активації і реалізації імунної відповіді це є дуже важливим фактом, щоб активізаційні імунні механізми захисту не були надмірно пригнічені супресорними факторами.

Кількість $CD16^+$ клітин у хворих на В-ХЛЛ до початку етіопатогенетичного лікування була достовірно нижчою, ніж у хворих контрольної групи ($p < 0,05$) (табл.1). Як відомо, однією із основних функцій цього пулу клітин є знищення онкогенних факторів. Якщо їхня кількість знижується, у людини зро-

стає ризик розвитку онкопатології. Проте, наше дослідження, на жаль, не дає нам можливість зрозуміти, чи рівень натуральних кілерів був знижений до розвитку В-ХЛЛ? Чи, можливо, наявність хвороби зумовила зниження пулу $CD16^+$?

Для аналізу гуморального імунітету, в першу чергу, проаналізовано рівні $CD22^+$ (зрілі В-лімфоцити). Так, у хворих до початку лікування рівень цих клітин був достовірно нижчим, порівняно із здоровими ($p < 0,05$) (табл.2). Низька кількість зрілих В-лімфоцитів відобразилася на недостатній секретії імуноглобулінів. Встановлено, що до початку ХТ лікування у хворих спостерігались достовірно нижчі рівні IgA, IgG, IgM порівняно із показниками у групі контролю ($p < 0,05$) (табл.2). Знижені рівні імуноглобулінів, як відомо, зумовлюють підвищений ризик розвитку інфекційного синдрому антигенами бактеріальної етіології [2,4,7]. Як наслідок зниженого антитілоутворення у хворих цієї групи виявлено достовірно нижчі рівні циркулюючих імунних комплексів (табл.2).

Таблиця 2

Показники гуморального імунітету у обстежених осіб (M±m)

Показник	Група контролю (n=17)	Показники у хворих на В-ХЛЛ до ХТ (n=26)	Показники у хворих на В-ХЛЛ після ХТ (n=26)
CD22 ⁺ , %	29± 1,4	13± 1,9*	25±1,2•
IgG	15,4± 1,1	5,1± 0,2*	12,4± 0,3•
IgA	3,9± 0,2	0,7± 0,1*	2,0±0,2•
IgM	1,7± 0,3	0,48± 0,1*	1,0± 0,1•
ЦІК 3% од.	15,5±1,4	8,2±0,9*	14,±0,53•
ЦІК 4% од.	18,1±2,09	9,9±1,2*	15,8±0,61•

Примітка: * -різниця вірогідна порівняно з контролем (p<0,05), •-достовірність різниці у хворих перед курсами хіміотерапії та після завершення курсів лікування(p<0,05).

При аналізі неспецифічної резистентності організму спостерігаються статистично достовірно нижчі, ніж у осіб контрольної групи, показники фагоцитозу – знижені ФЧ і ФП. Такі тенденції призводять до того, що організм людини має ослаблений імунний захист при первинному контакті з антигеном. При цьому уражаються ініціальні етапи розвитку імунної відповіді, але за принципом «каскадного механізму» порушується її подальший розвиток [2].

Після проведення 6 циклів ХТ із використанням флударабіну та циклофосфаміду встановлено динамічні позитивні імунологічні зміни у обстежених хворих. Виявлено достовірне підвищення рівнів CD3⁺, CD4⁺ порівняно із хворими до лікування. У той час, як рівень CD8⁺ підвищився недостовірно (табл.1). У хворих цієї групи утримується нормальна пропорційність субпопуляцій Т-лімфоцитів, що підтверджується рівнем імунорегуляторного індексу. Встановлена достовірна позитивна динаміка підвищення рівня CD16⁺ клітин, що свідчить про відновлення протипухлинного і противірусного захисту, яким володіють натуральні кілери.

При аналізі показників гуморального імунітету кількісні порушення регуляторної частини гуморальної ланки, що впливають на синтез імуноглобулінів різних класів, були менш вираженими у хворих після ХТ лікування. Зокрема, спостерігали нормалізацію пулу зрілих В-лімфоцитів, що достовірно відрізнялася від таких показників у хворих до лікування (p<0,05) (табл.2). Цей процес позитивно вплинув і на секрецію імуноглобулінів різних класів, їхні рівні вірогідно підвищилися, порівнюючи із показниками хворих до лікування, що представлено у таблиці 2. Належна кількість імуноглобулінів зумовила формування достатньої кількості циркулюючих імунних комплексів, які, власне, і є відображенням активного знешкодження антигена бактеріальної, вірусної чи грибкової природи антитілами [2,6,9].

Беручи до уваги неспецифічний захист організму, який оцінено на прикладі фагоцитозу, встановлено, що рівні ФЧ та ФП у хворих після проведення лікування достовірно підвищуються і не значно відрізняються від показників у осіб із групи контролю.

Проаналізовано анамнез захворювання для встановлення наявності інфекційних захворювань у хворих під час проходження курсів ХТ лікування. У 72% хворих було зареєстровано двобічну негоспіта-

льну пневмонію, у 8 % – гострий тонзиліт, у 11 % – гострий пієлонефрит, у 5 % – гострий отит середнього вуха. У 19 % хворих інфекції виникали більш, ніж 1 раз упродовж лікування.

Обговорення результатів. Отримані нами дані дослідження свідчать про зміни імунного статусу хворих на В-ХЛЛ залежно від етапу лікування. Зокрема, до початку ХТ у пацієнтів спостерігається достовірне зниження загальної кількості Т-лімфоцитів, при цьому більш виражені зміни зниження рівня CD4⁺, в той час, як рівні CD8⁺ зменшуються недостовірно. Такі порушення корелюють із підвищеною частотою вірусних і грибкових інфекцій [2,7]. Цілковито зрозуміло, що у хворих на В-ХЛЛ виявлено низькі рівні CD16⁺ клітин, як одного із потужних протипухлинних факторів [7]. У хворих на В-ХЛЛ до лікування спостерігали порушення гуморальної ланки імунітету, а саме – низькі рівні імуноглобулінів різних класів (IgA, IgG, Ig M), що може бути причиною розвитку інфекцій, викликаних бактерійними антигенами [4,7].

Після проведення курсів ХТ рівні CD3⁺, CD4⁺, CD16⁺ клітин достовірно підвищуються. Покращується і секреція імуноглобулінів та показників фагоцитозу. Однак, у хворих персистують інфекційні захворювання, що свідчить про необхідність проведення імунокорекції [7].

Висновки: 1. Встановлені зміни при комплексному імунологічному обстеженні у хворих на В-ХЛЛ до проведення етіопатогенетичного лікування були більш виражені, ніж у хворих після завершення циклів хіміотерапії.

2. Комплексна хіміотерапія з використанням флударабіну та циклофосфаміду позитивно впливає на нормалізацію показників клітинного і гуморального імунітету та показників фагоцитозу. Проте наявність у хворих на В-ХЛЛ частого інфекційного синдрому вказує на необхідність подальших досліджень імунного захисту для створення алгоритму лікування.

References:

- Chebotkevych VN, Bessmeltcev SS, Kiseljova EE. Klinico-mikrobiologichna charakterystyka infekthij krovotoka u onkogematologicheskijh bolnyh. *Oncogematologiya*. 2016; 11(3):58-67. [in Russian]
- Chopyak VV, Potiomkina HO, Havrylyuk AM. *Lektsiyi z klinichnoyi imunolohiyi dlya praktychnykh likariv*. Lviv, 2010. P. 226. [in Ukrainian].
- Hluzman DF, Ivanivskaja TS, Kovalj SV, Rodionova NK, Ukrainskaja NI *Hronicheskoy limpholeikoz:*

- laboratornaja diagnostika I kriterii prognosa. *Onkologija*. 2014; 16(3):171-6. [in Russian]
4. Hordienko AI, Tretyak NM, Kubarova VO, Starodub HS, Bornik HA. Zminy pokaznykiv imunitetu pry hronichnij limfotsytarnij leykemii. *Hematolohiya i perelyvannja krovi*. 2017; 39:44-50. [in Ukrainian]
5. Kravchenko D, Svirnovskiy AI. Hronicheskij limfotsytarnyj lejkoz: klinika, diagnostika, lecheniye. *Homel, RNPTS RM I ECH*, 2017. P. 117. [in Russian]
6. Perehrestenko TP. Osobennosti techenija B-kletochnogo hronicheskogo lejkoza u boljnyh raznyh vozrastnyh grup. *Onkologija*. 2007; 9(2):154-158.
7. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016; 127(20):2375-90.
8. Valdes-Mas R, Gutierrez-Abril J, Puente XS, Lopez-Otin C. Chronic lymphocytic leukemia: looking into the dark side of the genome. *Cell death and differentiation*. 2016; 23(1):7-9.

УДК 612.017+616.155.392

**ОЦЕНКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ
НАРУШЕНИЙ У БОЛЬНЫХ
В-КЛЕТОЧНЫМ ХРОНИЧЕСКИМ
ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

Г.М. Курьлив¹, О.И. Дрогомерецкая¹,
И.О. Якубовская²

Ивано-Франковский национальный медицинский университет,

¹*кафедра внутренней медицины №1, клинической иммунологии и аллергологии,*

²*кафедра внутренней медицины № 2 и сестринского дела, г. Ивано-Франковск, Украина,*

ORCID ID: 0000-0003-1426-1343,

ORCID ID: 0000-0001-9393-1434,

ORCID ID: 0000-0001-5181-2939,

e-mail: kuryliv@ukr.net

Установлено, что у больных В-ХЛЛ до начала лечения по протоколу FC наблюдали достоверные низкие уровни CD3+, CD4+, CD16+, CD22+ – клеток, иммуноглобулинов, циркулирующих иммунных комплексов и показателей фагоцитоза – по сравнению с лицами контрольной группы. На основе результатов проведенного исследования установлено положительное иммуномодулирующее влияние этиопатогенетического лечения на уровень сывороточных иммуноглобулинов, субпопуляций лимфоцитов и показателей фагоцитарной функции. Однако наличие у больных частого инфекционного синдрома свидетельствует о том, что количественные положительные изменения показателей иммунограммы не являются достаточными для обеспечения надлежащей иммунной защиты организма от инфекций, что может быть связано с морфологическими изменениями строения иммуноглобулинов и структуры иммунных клеток.

Ключевые слова: хроническая лимфоидная лейкемия, иммуноглобулины, субпопуляции лимфоцитов, иммунная защита.

UDC 612.017+616.155.392

EVALUATION OF IMMUNOLOGICAL

**DISORDERS IN B-CELL CHRONIC
LYMPHOCYTIC LEUKEMIA PATIENTS**

G.M. Kuryliv¹, O.I. Drogomeretska¹, I.O. Jakubovska²

Ivano-Frankivsk National Medical University,

¹*Department of Internal Medicine №1, Clinical Immunology and Allergology,*

²*Department of Internal Medicine №2 and Nursing, Ivano-Frankivsk, Ukraine,*

ORCID ID: 0000-0003-1426-1343,

ORCID ID: 0000-0001-9393-1434,

ORCID ID: 0000-0001-5181-2939,

e-mail: kuryliv@ukr.net

Abstract. B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is a lymphoproliferative tumor disease of the hematopoietic tissue, which is based on the polyclonal proliferation of B-lymphocytes with a specific immunophenotype. Due to the frequent infectious diseases, which take place in such patients the investigation of immunity is very important.

Aim of research. The purpose of the work was to determine the immunological characteristics of patients with B-CLL before the start of chemotherapeutic treatment and after blocks of chemotherapy.

Materials and methods. To perform the work, a clinical and laboratory examination of patients for the first time diagnosed B-CLL II (B) - III (C) stages was conducted.

Results of the research. It was found that in patients with B-CLL before treatment by protocol with using of fludarabin and cyclophosphamide significantly lower levels of CD3+, CD4+, SD16+, CD22+ cells, immunoglobulins, circulating immune complexes and phagocytosis were observed compared to individuals in the control group. This immune dysfunction is the reason of the development of infectious diseases in B-CLL patients. Based on the results of the study, positive immunomodulatory effect of etiopathogenetical treatment on serum immunoglobulins, subpopulations of lymphocytes and phagocytic function parameters was found. However, the presence of frequent infectious syndrome in patients shows that quantitative indicators immunogram improvements are not sufficient to ensure adequate immune defense against infections, which may be associated with morphological changes in the structure of antibodies and immune cells structure.

Conclusions. The established changes in the complex immunological examination in patients with B-CLL before etiopathogenetic treatment were significantly more pronounced than in patients after the completion of chemotherapy cycles. Comprehensive chemotherapy with the use of fludarabine and cyclophosphamide positively affects the normalization of cellular, humoral immunity, and phagocytosis. However, the presence of frequent infectious syndrome in patients with B-CLL indicates the need for further research on immune protection to create a treatment algorithm.

Keywords: chronic lymphoid leukemia, immunoglobulins, subpopulations of lymphocytes, immune defense.

Стаття надійшла в редакцію 11.02.2019 р.