

## РОЛЬ ІМУНОРЕГУЛЯТОРНИХ СУБПОПУЛЯЦІЙ Т-ЛІМФОЦИТІВ В ПРОГРЕСУВАННІ ХРОНІЧНОЇ МІЕЛОМОНОЦИТАРНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ

А.І. Гордієнко, В.О. Кубарова, Г.С. Стародуб,  
Н.М. Третяк, Н.В. Горяїнова

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

**Резюме.** Мета полягала у визначенні в периферичній крові (ПК) хворих на ХММЛ до проведення лікування кількості  $CD3^+CD4^+$ -,  $CD3^+CD8^+$ - імунорегуляторних субпопуляцій Т-лімфоцитів, а також особливостей секреції ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-10 та ФНП.

**Матеріали та методи.** Матеріалом для досліджень були клітини ПК хворих на ХММЛ до проведення лікування. Методом проточної лазерної цитофлюорометрії у цих хворих аналізували показники Т-системи імунітету.

**Результати.** Результати цитофлюориметричного аналізу свідчать про зниження в ПК хворих на ХММЛ до проведення специфічної терапії кількості  $CD3^+CD4^+$ - і  $CD3^+CD8^+$ - імунорегуляторних субпопуляцій Т-лімфоцитів. Поряд з цим у хворих на ХММЛ спостерігали зміни секреції цитокінів, які приймають участь в регуляції антигенспецифічної імунної відповіді. Окрім того, проведені дослідження показали, що в сироватці крові обстежених хворих на ХММЛ знижена концентрація ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-10, ФНП.

**Висновки.** У хворих на ХММЛ дефекти специфічної клітинно-опосередкованої відповіді виникають внаслідок зменшення в ПК кількості  $CD3^+CD4^+$ - і  $CD3^+CD8^+$ -імунорегуляторних субпопуляцій. Разом з тим, кількісний дисбаланс супроводжується порушенням функціональної активності Т-лімфоцитів, що підтверджується зниженням продукції ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-10 і ФНП.

**Ключові слова:** МДС, ХММЛ, імунофенотипування, імунорегуляторні субпопуляції Т-лімфоцитів, протипухлинний імунітет, інтерлейкіни.

## РОЛЬ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПРОГРЕССИИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОМОНОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА

А.И. Гордиенко, В.А. Кубарова, Г.С. Стародуб,  
Н.Н. Третяк, Н.В. Горяинова

ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины», Киев

**Резюме.** Цель исследования состояла в определении в периферической крови (ПК) больных ХММЛ до проведения лечения количества  $CD3^+CD4^+$ -,  $CD3^+CD8^+$ - иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов, а так же особенностей секреции ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 и фактора некроза опухолей (ФНО).

**Материалы и методы.** *Материалом для исследования были клетки ПК больных ХММЛ до проведения лечения. Методом проточной лазерной цитофлюорометрии у этих больных анализировали показатели Т-системы иммунитета.*

**Результаты.** *Результаты цитофлюориметрического анализа свидетельствуют о снижении в ПК больных ХММЛ до проведения специфической терапии количества  $CD3^+CD4^+$ - и  $CD3^+CD8^+$ - иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов. Вместе с тем, у больных ХММЛ наблюдали изменения секреции цитокинов, которые принимают участие в регуляции антигенспецифического ответа. Кроме того, проведенные исследования показали, что в сыворотке крови обследованных больных ХММЛ снижена концентрация ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ФНО.*

**Выводы.** *У больных ХММЛ дефекты специфического клеточно-опосредованного ответа возникают в следствии снижения в ПК количества  $CD3^+CD4^+$ - и  $CD3^+CD8^+$  иммунорегуляторных субпопуляций. Так же, количественный дисбаланс сопровождается нарушением функциональной активности Т-лимфоцитов, что подтверждается снижением продукции ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 и ФНО.*

**Ключевые слова:** *МДС, ХММЛ, иммунофенотипирование, иммунорегуляторные субпопуляции Т-лимфоцитов, противоопухолевый иммунитет, интерлейкины.*

## ROLE OF IMMUNOREGULATORY SUBPOPULATIONS OF T-LYMPHOCYTES IN THE PROGRESSION OF CHRONIC MYELOMONOCYTIC LEUKAEMIA

A.I. Gordienko, V.A. Kubarova, G.S. Starodub, N.M. Tretyak, N.V. Goryainova

SI «Institute of Hematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

**Summary. Aim** – *to determine the in peripheral blood (PB) patients CMML before treatment number of  $CD3 + CD4 + -$ ,  $CD3 + CD8 + -$  immunoregulatory subpopulations of T-lymphocytes, as well as the features of IL-2, IL-4, IL-10 and Factor Tumor necrosis (TNF).*

**Materials and methods.** *Material for the study were patients with CMML cells PB before treatment. By flow laser cytofluorometry in these patients were analyzed indicators of T-system of immunity.*

**Results.** *Results cytofluorimetrycal analysis show a decrease in PB patients with CMML to specific therapy the number of  $CD3 + CD4 + -$  and  $CD3 + CD8 + -$  immunoregulatory subpopulations of T-lymphocytes. However, in patients with CMML observed changes in the secretion of cytokines, which are involved in the regulation of antigen-specific response. In addition, studies have shown that the serum of patients with CMML survey znizhena kontsentratsiya IL-2, IL-4, IL-10, TNF.*

**Conclusions.** *Thus, in patients with CMML defects specific cell-mediated response occur as a consequence of the decline in the number of PC  $CD3 + CD4 + -$  and  $CD3 + CD8 +$  immunoregulatory subpopulations. Similarly, quantitative imbalance accompanied by breach of the functional activity of T-lymphocytes, as evidenced by a decrease in production of IL-2, IL-4, IL-10 and TNF.*

**Key words:** *MDS, CMML, immunophenotyping, immunoregulatory subpopulations of T lymphocytes, tumor immunity, interleukins.*

Хронічна мієломоноцитарна лейкемія (ХММЛ) за Франко-Американо-Британською класифікацією входить до мієлодиспластичного синдрому (МДС), що об'єднує гетерогенну групу клональних захворювань з неефективним гемопоезом, особливостями якого є периферична цитопенія та гіперклітинний кістковий мозок (КМ). У хворих на ХММЛ у КМ, як правило, виявляють від 5 до 20% бластних клітин. При таких змінах гемопоєзу існує достатньо висока вірогідність еволюції ХММЛ в гостру лейкемію. [3, 4] Цьому також сприяє порушення протипухлинного імунітету, яке спостерігається при даному захворюванні [1].

Відомо, що в протипухлинному захисті організму активну участь беруть імунорегуляторні субпопуляції Т-лімфоцитів з імунотиповим профілем  $CD3^+CD4^+$  (хелпери/індуктори) та  $CD3^+CD8^+$  (супресори/цитотоксичні). Дані субпопуляції лімфоцитів здійснюють реакції антигенспецифічної Т-клітинно-опосередкованої імунної відповіді, інтенсивність якої, в тому числі на пухлинні пептиди, залежить від їх кількості і функціональної активності. Крім того, в регуляції антигенспецифічної імунної відповіді беруть участь цитокіни, зокрема інтерлейкін-2 (ІЛ-2) та інтерлейкін-4 (ІЛ-4), які продукують Th1 і Th2 лімфоцити. Також в реакціях протипухлинного імунітету важливе значення має інтерлейкін-10 (ІЛ-10), фактор некрозу пухлин (ФНП), що секретуються Т- і В-лімфоцитами та макрофагами. Порушення механізмів протипухлинного захисту призводить до формування толерантності імунної системи на пухлинний процес, що посилює прогресію захворювання. Враховуючи це, у хворих на ХММЛ представляє інтерес виявлення порушень у Т-системі імунітету. Так, у хворих на ХММЛ бажано визначати як кількість, так і функціональну активність  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$  імунорегуляторних субпопуляцій Т-лімфоцитів. Це дасть змогу індивідуально прогнозувати перебіг захворювання у цих пацієнтів на основі аналізу кількісних та функціональних змін показників Т-системи імунітету.

**Мета** дослідження полягала у визначенні в периферичній крові (ПК) хворих на ХММЛ до проведення лікування кількості  $CD3^+CD4^+$ -,  $CD3^+CD8^+$ - імунорегуляторних субпопуляцій Т-лімфоцитів, а також особливостей секреції ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-10 та ФНП.

**Матеріали і методи досліджень.** Матеріалом для досліджень були клітини ПК та сироватка хворих на ХММЛ до проведення лікування. Методом проточної лазерної цитофлюориметрії у цих хворих аналізували показники Т-системи імунітету. Для цього зразки крові фарбували моноклональними антитілами (МКА) із набору Simultest IMK Plus (Becton Dickinson, США), кон'югованих двома різними флюорохромами. Дослідження проводили на проточному лазерному цитофлюориметрі FACScan (Becton Dickinson, США) з використанням програми LYSYS-II

Ver.1.1. (Becton Dickinson, США); WinMDI 2,8 (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, США) та Microsoft Excel 2000 із пакета Microsoft Office 2000.

У сироватці крові хворих на ХММЛ методом твердофазного імуоферментного аналізу визначали рівень ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-10 та ФНП з урахуванням результатів на автоматичному фотометрі Е1х800 (Bio-Tec instruments, Inc., США).

**Результати та їх обговорення.** Результати цитофлюориметричного аналізу свідчать про зниження в ПК хворих на ХММЛ до проведення специфічної терапії кількості  $CD3^+CD4^-$  - і  $CD3^+CD8^+$  - імунорегуляторних субпопуляцій Т-лімфоцитів. Так, виявлено, що у цих хворих кількість у ПК  $CD3^+CD4^-$  та  $CD3^+CD8^+$ -лімфоцитів було статистично достовірно зменшено відповідно в 2,3 рази ( $p < 0,05$ ), 1,8 рази ( $p < 0,05$ ) відносно аналогічних показників умовно здорових осіб контрольної групи.

Поряд з цим у хворих на ХММЛ спостерігали зміни секреції цитокінів, які приймають участь в регуляції антигенспецифічної імунної відповіді. Так, встановлено, що в порівнянні з контрольними значеннями рівень ІЛ-2 був знижений в 2,4 рази ( $p < 0,05$ ) ( $4,9 \pm 0,3$  пг/мг при  $12,0 \pm 2,6$  пг/мг), ІЛ-4 – у 46,2 рази, ( $p < 0,001$ ) ( $0,61 \pm 0,02$  пг/мл при  $28,2 \pm 1,6$  пг/мг), ІЛ-10 – у 45,3 рази, ( $p < 0,001$ ) ( $0,73 \pm 0,06$  пг/мг при  $33,1 \pm 2,7$  пг/мг), ФНП-альфа – 6,7 рази, ( $p < 0,001$ ) ( $3,7 \pm 0,2$  пг/мг при  $24,7 \pm 1,9$  пг/мг).

Як видно із отриманих результатів, у хворих на ХММЛ у ПК зменшено кількість  $CD3^+CD4^-$  і  $CD3^+CD8^+$  імунорегуляторних субпопуляцій лімфоцитів. Окрім того, проведені дослідження показали, що в сироватці крові обстежених хворих на ХММЛ знижена концентрація ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-10, ФНП.

На теперішній час встановлена участь імунної системи в прогресії МДС. Однак, при цьому, механізми, що призводять до імунної дисфункції, залишаються недостатньо вивченими. Як відомо, імунна відповідь контролюється ефекторними та супресорними механізмами. Дисбаланс цих механізмів призводить до різних порушень імунітету. Підтримується точка зору, що важливу роль в контролі імунного гомеостазу відіграють Т-хелпери (Th1, Th2) і Т-супресори.

Однією з основних складових молекулярних механізмів вродженого і адаптивного імунітету, що асоційований з регуляцією імунної відповіді, є цитокіни, які являють собою поліпептидні медіатори міжклітинної взаємодії. Ці молекули беруть участь у формуванні і регуляції захисних реакцій організму, активно впливаючи на перебіг імунологічних реакцій при фізіологічних і патологічних процесах [2]. Зокрема, ІЛ-10, що продукується Th2 лімфоцитами і відноситься до

прозапальних цитокінів, інгібує продукцію інтерферона і, як наслідок, знижує відповідь Th1 [5].

Особливе значення при пухлинних захворюваннях належить ФНП, оскільки прояви його біологічної активності пов'язані з вибірковою цитотоксичністю малігнізованих клітин. Продукують ФНП (поліпептидний цитокін) моноцити, макрофаги, натуральні кіллерні клітини, а також гранулоцити і лімфоцити [6]. За даними літератури в якості індуктора синтезу ФНП, що здійснює регуляторні та ефекторні функції в імунній відповіді, розглядається ІЛ-2. Наводяться дані, що ФНП в синергізмі з ІЛ-2 посилює продукцію Т-клітинами ІНФ [7, 8].

Продемонстровано, що основна функція ІЛ-4 (протизапальний цитокін), який продукується переважно Th2 лімфоцитами, полягає в здійсненні контролю анти-тільної відповіді (проліферації, диференціювання В-лімфоцитів).

Таким чином, у хворих на ХММЛ дефекти специфічної клітинно-опосередкованої відповіді виникають внаслідок зменшення в ПК кількості  $CD3^+CD4^+$  і  $CD3^+CD8^+$ -імунорегуляторних субпопуляцій. Разом з тим, кількісний дисбаланс супроводжується порушенням функціональної активності Т-лімфоцитів, що підтверджується зниженням продукції ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-10 і ФНП.

### Література

1. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 16–23.
2. Скворцов В.В. Миелодиспластические синдромы / В.В. Скворцов, А.В. Тумаренко, Е.М. Скворцова // Терапевт.архив – 2009. – № 8. – С. 32–37.
3. Stauder R. The challenge of individualised risk assessment and trerary planning in elderly high-risk myelodysplastic syndromes (MDS) patients / Stauder R. // Ann Hematol. – 2012. – Vol. 91, № 9. – P. 1333-1343.
4. Standarts and impact of hemathology in myelodysplastic syndromes (MDS) / P. Valent, A. Orazi, G. Busche, A. Schmitt-Graff [et al.] // Oncotarget. – 2010. – Vol. 1, № 7. – P. 483-496.
5. IL-10 inversely correlates with the persentage of CD8 cells in MDS patients / M.R. Lores, F. Traina, Pde M. Campos, J.K. Pereira [et al.] // Leuk. Res. – 2013. – Vol. 37, № 5. – P. 541–546.
6. Wallach D. The TNF cytokine family: one track in a road paved by many / D. Wallach // Cytokine. – 2013. Vol. 63. – № 3. – P. 225–229.
7. Banchereau J. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. / J. Banchereau, V. Pascual, A. O'Garra // Nat. Immunol. – 2012. – Vol. 13, № 10. – P. 925–931.
8. Opposing functions of IL-2 and IL-7 in the regulation of immune responses / S.D. Katzman, K.K. Hoyer, H. Doods [et al.] // Cytokine. – 2011. – Vol. 56, № 1. – P. 116–121.