

УДК 616.155.392

ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ ІМУНІТЕТУ ПРИ В-КЛІТИННІЙ ХРОНІЧНІЙ ЛІМФОЦИТАРНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ

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

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

Резюме. *Метою роботи було вивчення стану клітинного імунітету у хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію (В-ХЛЛ) з різним ступенем вираженості пухлинного процесу.*

Матеріали і методи. *Мононуклеари периферичної крові (МПК) фарбували в прямому двокольоровому імунофлюоресцентному тесті моноклональними антитілами (МКА) фірми Becton Dickinson. Антигенний профіль МПК вивчали на проточному лазерному цитофлюориметрі FACScan (Becton Dickinson, USA за допомогою програмного забезпечення LYSYS-II Ver. 1.1 (Becton Dickinson), WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA) і Microsoft Excel 2000 з пакета Microsoft Office 2000.*

Результати. *У 20 хворих на В-ХЛЛ був проаналізований стан клітинного імунітету. Показано, що ступінь вираженості Т-клітинного дефіциту залежить від кількості в периферичній крові пухлинних клітин з фенотиповими ознаками CD19⁺CD5⁺. Така ж закономірність відмічена і у відношенні зниження в крові кількості CD16⁺CD56⁺ та CD3⁺CD16⁺CD56⁺ клітин, що здійснюють протипухлинний імунний нагляд.*

Висновки. *Отримані дані можуть бути використані для розробки нових підходів до імунотерапії у хворих на В-ХЛЛ.*

Ключові слова: *В-клітинний хронічний лімфолейкоз, клітинний імунітет, CD антигени, проточна цитофлюориметрія.*

CHANGES IN INDICATORS OF IMMUNITY IN B-CELLULAR CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

A. Gordienko, N. Tretyak, V. Kubarova, G. Starodub, G. Bortnik

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

Summary. *The aim of the study was to study the state of cellular immunity in patients with B-cellular chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) with varying degrees of tumor process.*

Materials and methods *Peripheral blood mononuclear cells (PBM) were stained in a direct two-color immunofluorescence test with monoclonal antibodies (MCA) from*

Becton Dickinson. The antigenic profile of the PBM was studied on a FACScan flow-through laser cytofluorometer (Becton Dickinson, USA using the LYSYS-II Ver.1.1 software (Becton Dickinson), WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA) and Microsoft Excel 2000 from the Microsoft package Office 2000.

Results. *The 20 patients with B-CCL leukemia analyze cells immunity status. Showing, that degree expression T-cells deficiency dependent from quantity malignant cells CD19⁺CD5⁺ in peripheral blood. The same regularity observe as regards to fall number CD16⁺CD56⁺ and CD3⁺CD16⁺CD56⁺ cells, which realized antileukemia immunity supervision, in blood.*

Conclusions. *Facts, that was receive, it is possible use for work up new approachs to immunotherapy patients with B-cells chronic leukemia.*

Key words: *B-cells chronic leukemia, cells immunity, CD antigens, flow cytometry.*

Вступ. В-клітинна хронічна лімфоцитарна лейкемія (В-ХЛЛ) відноситься до лімфопроліферативних захворювань з повільною клональною експансією злякисних та імунологічно незрілих CD19⁺ В-лімфоцитів, що коекспресують антиген CD5⁺. Наявність цих клітин є важливим диференційно-діагностичним маркером даного захворювання [1, 2]. Пухлинний процес у хворих на В-ХЛЛ протікає на тлі значних змін з боку клітинно-опосередкованого і гуморального імунітету. Незважаючи на наявні дані про зміни в системі імунітету у хворих на В-ХЛЛ, механізми, що беруть участь в цьому, залишаються недостатньо вивченими. Тому актуальним є дослідження клітинно-молекулярних механізмів, що впливають на розвиток порушень імунітету у хворих на В-ХЛЛ. Це необхідно для оцінки ролі імунних дисфункцій у патогенезі В-ХЛЛ і розуміння біологічних особливостей захворювання. Крім того, інформація про механізми, що призводять до суттєвих зрушень в системі імунітету у хворих на В-ХЛЛ, може бути використана в якості теоретичної основи для розробки принципово нових підходів до імунотерапії хворих на В-ХЛЛ.

Метою даної роботи було вивчення стану клітинного імунітету хворих на В-ХЛЛ з різним ступенем вираженості пухлинного процесу.

Матеріали та методи дослідження. Імунологічне обстеження проведено 20 хворим (серед них 4 жінки і 16 чоловіків) у віці від 49 до 75 років з вперше встановленим діагнозом В-ХЛЛ. Відповідно до класифікації по Rai обстежені пацієнти перебували на II-III стадіях захворювання.

Для імунофенотипового дослідження мононуклеари периферичної крові (МПК) фарбували в прямому двокольоровому імунофлюоресцентному тесті відповідними моноклональними антитілами (МКА) фірми Becton Dickinson, міченими флюоресцеїн ізотіоціанатом (FITC) і фікоеритрином (PE). Для контролю рівня неспецифічного зв'язування кон'югатів

МКА зразки крові фарбували мишачими МКА проти гемоцианіну фіссурелли (Keyhole limpet) субкласів IgG1 IgG2a, що мічені FITC і PE відповідно [3]. Антигенний профіль МПК вивчали на проточному лазерному цитофлюориметрії FACScan (Becton Dickinson, USA). Збір даних проводили за допомогою програмного забезпечення LYSYS-II Ver. 1.1 (Becton Dickinson), WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA) і Microsoft Excel 2000 з пакету Microsoft Office 2000. При статистичній обробці даних використовували пакет програм STATISTICA 6.0. Наявність кореляції між показниками, що досліджуються, оцінювали за допомогою непараметричного критерію Спірмена. Параметри імунітету у хворих на В-ХЛЛ порівнювали з аналогічними показниками для контрольної групи практично здорових осіб (20 чоловік).

Результати та їх обговорення. Отримані результати про стан адаптивного (набутого специфічного) імунітету, а також особливості розподілу в ПК природних кілерних клітин (ПКК, фенотип $CD16^+CD56^+$) і антигеннеспецифічних HLA-DR-нерестрикованих Т-кілерів (ТКК, фенотип $CD^+CD16^+CD56^+$) підсумовані в таблиці; там же наведені відомості про нормативні значення показників контрольної групи.

Абсолютне число лімфоцитів в ПК і показники Т-системи імунітету, що варіюють, у обстежених пацієнтів з В-ХЛЛ послужили підставою для виділення двох груп хворих, в рамках яких потім розглядалися досліджувані параметри. В першу групу ($n = 13$) увійшли хворі з більш високими показниками імунітету, а в другу групу ($n = 7$) – з більш низькими.

В основному популяція лімфоцитів ПК хворих першої групи представлена пухлинними клітинами з фенотиповими ознаками $CD19^+CD5^+$. За даними гемограм абсолютна кількість лімфоцитів у хворих цієї групи становила $70,9 \pm 49,9 \cdot 10^9/\text{л}$. Як впливає з даних таблиці, популяція Т-загальних лімфоцитів ($CD3^+$ -клітини) зменшена в 3,4 рази в порівнянні з нормативними значеннями ($p < 0,05$). Результати імунофенотипових досліджень свідчать про те, що у цих же хворих число $CD4^+$ - і $CD8^+$ -лімфоцитів нижче, ніж у донорів відповідно в 4,8 і 3,8 рази ($p < 0,05$). У хворих на В-ХЛЛ на відміну від осіб контрольної групи спостерігався кількісний перерозподіл субпопуляційного складу Т-лімфоцитів в бік збільшення числа $CD8^+$ -клітин. Співвідношення імунорегуляторних субпопуляцій ($CD4/CD8$) в середньому було в 1,3 рази ($p < 0,05$) менше контрольних значень. Кількість незрілих Т-лімфоцитів, що експресують одночасно антигени $CD4$ і $CD8$, вкладалася в діапазон коливань норми (не більше 1%). Аналіз імунограм обстежених хворих на В-ХЛЛ показав, що вміст в ПК активованих Т-лімфоцитів з фенотипом $CD3^+HLA-DR^+$ нижче норми в 4,4 рази. У всіх випадках спостерігалася низька щільність експресії

Таблиця – Фенотип клітин периферичної крові
хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкомію
і практично здорових осіб контрольної групи
(відсоток позитивних і пухлинних клітин/M \pm m)

CD-антигени	I група хворих на В-ХЛЛ (n=13)	II група хворих на В-ХЛЛ (n=7)	Контрольна група (n=20)
CD45 ⁺	97,8 \pm 0,5*	94,8 \pm 1,7*	95,0 \pm 1,2
CD3 ⁺	19,2 \pm 2,6*	2,1 \pm 0,4*	65,6 \pm 3,3
CD4 ⁺	9,3 \pm 1,5*	1,2 \pm 0,3*	44,6 \pm 2,7
CD8 ⁺	10,0 \pm 1,3*	1,6 \pm 0,2*	37,8 \pm 2,8
Співвідношення CD4/CD8	1,0 \pm 0,1*	0,9 \pm 0,4*	1,3 \pm 0,1
CD4 ⁺ CD8 ⁺	0,5 \pm 0,2*	0,3 \pm 0,1*	0,6 \pm 0,1
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	3,4 \pm 0,8*	0,3 \pm 0,1*	14,8 \pm 1,4
CD16 ⁺ CD56 ⁺	1,8 \pm 0,3*	0,6 \pm 0,1*	20,4 \pm 2,2
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	1,3 \pm 0,5*	0,3 \pm 0,1*	6,0 \pm 0,4
CD19 ⁺ CD5 ⁺	88,1 \pm 3,4*	96,9 \pm 0,7*	17,0 \pm 1,8

Примітки: * – вірогідно порівняно з показниками у здорових осіб (p<0,05).

молекули HLA-DR⁺ на CD3⁺-лімфоцитах. На підставі даних цитофлюориметричних досліджень встановлено, що в першій групі хворих відносний вміст CD16⁺CD56⁺-лімфоцитів і CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лімфоцитів знижено відповідно в 11,3 і 4,6 рази в порівнянні з такими ж показниками у осіб контрольної групи (p<0,05). У обстежених хворих вивчено вплив клону пухлинних клітин (імунофенотип CD19⁺CD5⁺) на імунокомпетентні лімфоцити. Виявлено зворотню кореляційну залежність між кількістю пухлинних клітин і числом CD3⁺ (r = -0,65; p <0,05), CD4⁺ (r = -0,70; p <0,05), CD3⁺HLA-DR⁺ (r = -0,84; p <0,05), CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (r = -0,71; p <0,05) лімфоцитів.

Отримані результати свідчать, що в другій групі пацієнтів кількість CD19⁺CD5⁺-пухлинних клітин в ПК незначно (в 1,1 рази) перевищувала аналогічний показник у хворих першої групи. У цих хворих абсолютне число лімфоцитів в крові становило 225,3 \pm 82,5 \cdot 10⁹/л. Оцінка імунофенотипу лімфоцитів ПК показала, що у хворих другої групи значно сильніше виражені зміни в Т-системі імунітету (табл.). Так, число CD3⁺-лімфоцитів виявилось істотно (в 31,2 рази) зниженим у порівнянні з

контрольними значеннями ($p < 0,05$). Зміни також стосувалися $CD4^+$ і $CD8^+$ -імунорегуляторних субпопуляцій; їх число було зменшено щодо норми відповідно в 37,2 і 23,6 рази ($p < 0,05$). Інверсія імунорегуляторного індексу, що спостерігалась в цих випадках, підтверджувала наявний дисбаланс в Т-системі імунітету хворих на В-ХЛЛ. До цього ж треба додати, що $CD3^+$ -лімфоцити слабо експресували активаційний маркер антиген HLA-DR. Крім того, відхилення в Т-системі імунітету у хворих другої групи супроводжувалися зниженням в ПК числа $CD16^+CD56^-$ і $CD3^+CD16^+CD56^+$ -лімфоцитів відповідно в 34,0 і 20,0 разів ($p < 0,05$). Результати кореляційного аналізу показали, що у хворих цієї групи існує зворотна залежність між числом пухлинних клітин ($CD19^+CD5^+$ -лімфоцити) і кількістю $CD3^+CD16^+CD56^+$ -клітин ($r = -0,81$; $p < 0,05$). У всіх обстежених пацієнтів першої та другої груп лімфоцити ПК були позитивні на антиген CD45, експресія якого нерідко перевищувала 95%, але відрізнялася низькою інтенсивністю флюоресценції.

Отже, імунологічний аналіз показав, що в обох групах у пацієнтів з В-ХЛЛ спостерігалися істотні порушення в Т-системі імунітету. Вони характеризувалися значним зниженням кількості $CD3^+$ -лімфоцитів, а також $CD4^+$, $CD8^+$ імунорегуляторних субпопуляцій. Отримані результати узгоджуються з даними інших дослідників, які показали, що у хворих на В-ХЛЛ поряд зі зменшенням числа Т-лімфоцитів в периферичній циркуляції, відбувається зниження їх функціональної активності. Можливо, що реальною причиною функціонального дисбалансу Т-клітин у хворих на В-ХЛЛ можуть бути порушення в Т-клітинному рецепторному комплексі (ТКРК) [4]. До складу ТКРК разом з α - і β -ланцюгами антигенрозпізнавального рецептора входить молекула CD3, що запускає процеси активації, а потім проліферації клітин [5]. У всіх обстежених хворих з В-ХЛЛ нижче норми кількість активованих Т-лімфоцитів з фенотиповими ознаками $CD3^+HLA-DR^+$. Експресія маркера HLA-DR на Т-клітинах є важливим показником, що характеризує їх здатність до активації – одного з ключових етапів формування повноцінної імунної відповіді [6, 7, 8, 9]. Це дає право стверджувати, що дисбаланс в Т-системі імунітету хворих на В-ХЛЛ, викликаний, з одного боку, недостатньою кількістю в ПК $CD3^+$ -лімфоцитів, а з іншого – зниженням рівня експресії ними активаційного антигену HLA-DR.

У результаті проведених досліджень встановлено, що більш виражені зрушення в Т-системі імунітету мали хворі на В-ХЛЛ з другої групи. У світлі сучасних уявлень про пухлинний процес очевидно, що малігнізовані клітини можуть активно впливати на розвиток імунологічних реакцій. Це здійснюється за рахунок експресії пухлинними клітинами численних антигенних структур, які опосередковують їх вплив на інші

клітини. Одним з маркерів на малігнізованих В-лімфоцитах, що часто виявляються, є Fas-ліганд (FasL), тоді як імунокомпетентні клітини цих же хворих експресують Fas-рецептор (FasR). У такій ситуації міжклітинні взаємовідносини пухлинних і імунокомпетентних лімфоцитів супроводжуються зменшенням клітин з маркерами CD3, CD4 і CD8 за рахунок реалізації в них апоптотичної програми, що опосередкована взаємодією FasR/FasL [10]. Отже, однією з можливих причин, що сприяють вираженому зниженню відсотка Т-лімфоцитів у хворих на В-ХЛЛ, може бути збільшення клону пухлинних клітин, що експресують FasL.

Ще одним значущим порушенням в імунній системі хворих на В-ХЛЛ є низький вміст в ПК числа ПКК і ТКК. Зменшення кількості цих клітин характеризує несприятливий стан неспецифічного протипухлинного захисту у цих хворих [11]. Відомо, що ефективність протипухлинного захисту організму залежить від багатьох факторів. Серед них велике значення має імуногенність пухлинних клітин, що важливо для індукції протипухлинного імунітету. Тут не менше значення відводиться CD4+- і CD8+-клітинам, які повинні бути функціонально активними і здатними розпізнавати пухлинні пептиди в комплексі з молекулами МНС класу 1 і 2. Однак презентація пухлинних пептидів антигенрозпізнавальними клітинам може бути повноцінною тільки в тому випадку, коли малігнізовані клітини експресують коstimуляторні молекули (CD80, CD86), а імунокомпетентні клітини – їх ліганди (CD28, CD152 {CTLA-4}). Рівень експресії коstimуляторних молекул на лейкоцих В-клітинах і їх лігандів на Т-лімфоцитах визначає ступінь ефективності імунної відповіді, що виражається або в її індукції, або в анергії. Незважаючи на те, що пухлинні клітини хворих на В-ХЛЛ експресують пухлино-асоційовані пептиди і молекули МНС класу 1, вони є не надто активними антигенпрезентуючими клітинами. Виходячи з цього, можна припустити, що у обстежених хворих на В-ХЛЛ є порушення механізмів, які контролюють експресію коstimуляторних молекул та їх лігандів. Підтвердженням цьому може бути пухлинна прогресія у даних хворих.

Висновки

Згідно з отриманими результатами, у хворих на В-ХЛЛ спостерігалися виражені імунологічні зрушення. Вони супроводжувалися Т-лімфопенією, дисбалансом субпопуляційного складу Т-лімфоцитів з інверсією імунорегуляторного індексу, а також зниженням кількості ПКК і ТКК. Наявність в периферичній циркуляції хворих на В-ХЛЛ клону пухлинних клітин (більше 80%) корелює з низькими значеннями деяких показників клітинного імунітету.

Література

1. A systematic approach for peptide characterization of B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia cells / P. Díez, N Ibarrola, R.M. Dégano [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, no 26. – P. 42836–42846.
2. Finch S.C. Chronic leukemias. / S.C. Finch, M.S. Linet // *Baillere Hematol*. – 1992. – Vol. 5. – P. 27-56
3. Иммунологический мониторинг больных хроническим миелолейкозом в стадии клинико-гематологической компенсации на фоне иммуномодулирующей терапии / Ал. И. Гордиенко, Л.М. Исакова, Н.Н. Третьяк [и др.] // *Имунологія та алергологія*. – 1998. – Т. 3. – С. 44–47.
4. Early T cell receptor signals globally modulate ligand:receptor affinities during antigen discrimination / R.M. Pielak, G.P. O'Donoghue, J.J. Lin [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2017. – Vol. 114, no 46. – P. 12190–12195.
5. Identifying Individual T Cell Receptors of Optimal Avidity for Tumor Antigens. / M. Hebeisen, M. Allard, P.O. Gannon [et al.] // *Front Immunol*. – 2015. – Vol. 6. – P. 3389–3399.
6. Гордиенко А.И. Экспрессия антигена HLA-DR на Т-лимфоцитах периферической крови больных острой миелоидной лейкемией в стадии ремиссии / А.И. Гордиенко. – *Имунологія та алергологія*. – 2002. – Т. 1. – С. 37–39.
7. Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia / K. Giannopoulos, M. Schmitt, M. Kowal [et al.] // *Oncol Rep*. – 2008. – Vol. 20, no 3. – P. 677–682.
8. Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease / G. D'Arena, L. Laurenti, M.M. Minervini [et al.] // *Leuk Res*. – 2011. – Vol. 35, no 3. – P. 363–368.
9. Increased frequency of CD8⁺ and CD4⁺ regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: association with disease progression / F. Jadidi-Niaragh, M. Yousefi, A. Memarian [et al.] // *Cancer Invest*. – 2013. – Vol. 31, no 2. – P. 121–131.
10. Synergistic induction of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells after treatment with all-trans retinoic acid in combination with interleukin-21 and rituximab / K. Abbaszadeh-Goudarzi, F. Shokri, M. Hosseini [et al.] // *J Cancer Res Ther*. – 2016. – Vol. 1, no 4. – P. 1278–1283.
11. NK cell function is markedly impaired in patients with chronic lymphocytic leukaemia but is preserved in patients with small lymphocytic lymphoma / H.M. Parry, T. Stevens, C. Oldreive [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, no 42. – P. 68513–68526.

Надійшла 10.11.2017 року