

Состояние клеточного и гуморального звеньев иммунитета у пациентов, страдающих В-клеточными неходжкинскими лимфомами и влияние интерлейкина на иммунологический статус

О.А. Каленик

РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, г. Минск, Беларусь

The state of cellular and humoral immunity lines in patients with B-cell non-Hodgkin lymphomas and influence of interleukin on the immunological status

O.A. Kalenik

Ключевые слова: В-клеточные неходжкинские лимфомы, ритуксимаб, интерлейкин-2

В статье приведены результаты исследования по изучению состояния клеточного и гуморального звеньев иммунитета и влияние интерлейкина на иммунологический статус пациентов, страдающих В-клеточными неходжкинскими лимфомами.

Key words: B-cell non-Hodgkin's lymphomas, rituximab, interleukin-2

The article represents the results of a study on the state of the cellular and humoral units of immunity and the effect of interleukin on the immunological status of patients suffering from B-cell non-Hodgkin's lymphomas.

ВВЕДЕНИЕ

В-клеточные неходжкинские лимфомы (НХЛ) представляют из себя гетерогенную группу лимфопролиферативных заболеваний, источником возникновения которых являются В-лимфоциты в различных стадиях развития. К данному фенотипу относится примерно 90% всех НХЛ [1].

Характерной особенностью большинства В-клеточных НХЛ является наличие на поверхности лимфоидных клеток антигена CD20, который экспрессируется как злокачественными, так и нормальными клетками-предшественниками и зрелыми лимфоцитами. На клетках, отвечающих за кроветворение (стволовые клетки) и В-клеточный иммунитет (плазматические клетки, клетки памяти), антиген CD20 практически отсутствует [2].

Злокачественные лимфомы, по современным представлениям, рассматриваются как опухоли иммунной системы, возникающие чаще у лиц с врожденной или приобретенной иммунной патологией. Иммуносупрессия, наблюдающаяся при лимфопролиферативных заболеваниях, проявляется развитием частых бактериальных инфекций и высоким риском возникновения вирусных заболеваний, что осложняет течение болезни и не редко является причиной смерти пациентов. Од-

ним из звеньев патогенеза иммуносупрессии рассматривается нарушение продукции цитокинов, возникающее при опухолевом росте иммунокомпетентных клеток [1].

В настоящее время стандартом лечения CD20-позитивных НХЛ является включение в различные режимы химиотерапии ритуксимаба, моноклонального химерического антитела мыши/человека, иммуноглобулина класса IgG, которое специфически связывается с трансмембранным антигеном CD20 на поверхности нормальных и злокачественных В-клеток. Гибель опухолевых клеток при этом осуществляется как благодаря прямому антипролиферативному действию и индукции апоптоза, так и иммуноопосредованным механизмом — антитело- и комплементзависимой цитотоксичности. Известно также, что ритуксимаб сенситизирует линии В-клеточной лимфомы человека к цитостатическому действию некоторых химиотерапевтических препаратов [3-5].

Однако, несмотря на высокую эффективность в целом, определенное число пациентов демонстрируют резистентность к этому препарату, что обуславливает необходимость разработки новых подходов для усиления противоопухолевой активности ритуксимаба или преодоление резистентности к нему. Одним из таких подходов может быть

дополнительное использование цитокинов, в частности рекомбинантного интерлейкина-2 (гИЛ-2) [6].

Целью настоящего исследования явилось изучение состояния клеточного и гуморального звеньев иммунитета и влияние интерлейкина на иммунологический статус пациентов, страдающих В-клеточными НХЛ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили 50 пациентов, получавших лечение в РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова по поводу впервые выявленных НХЛ. Критериями включения пациентов в исследование являлись следующие: впервые выявленные, морфологически доказанные (с обязательным использованием иммуногистохимического метода) CD20 позитивные В-клеточные НХЛ в любой стадии; возраст старше 18 лет; общее состояние пациентов, оцениваемое по критериям восточной онкологической группы (ECOG), в пределах 0-2 баллов; ожидаемая продолжительность жизни более 3 месяцев; пациенты с индолентными вариантами болезни должны были иметь показания для начала лечения.

Путем рандомизации с использованием метода случайных чисел пациенты разделены на две группы. В первой группе лечение проводилось с применением стандартного режима R-CHOP. Во второй группе режим R-CHOP был дополнен введением гИЛ-2.

При использовании режима R-CHOP пациенты получали в 1-й день каждого цикла ритуксимаб в дозе 375 мг/м². Перед каждой инфузией ритуксимаба проводилась премедикация, заключающаяся во введении антипиретика (парацетамол 500 мг внутрь), интигистаминного препарата (1% раствор димедрола 5 мл внутримышечно) и кортикостероидов (преднизолон 90 мг внутривенно).

Во 2-й день каждого цикла пациенты получали: циклофосфамид в дозе 750 мг/м² в 250 мл 0,9% раствора натрия хлорида в течение 30 минут, доксорубин 50 мг/м² в 100 мл 0,9% раствора натрия хлорида, внутривенная инфузия в течение 10 минут; винкристин в дозе 1,4 мг/м² (максимальная доза 2 мг), который вводили внутривенно струйно в течение 1-3 минут; преднизолон в дозе 60 мг/м² (максимальная доза 100 мг) внутрь в 1-5-й дни с постепенной отменой в течение 3 последующих дней. Во время лечения преднизолоном, пациенты получали ингибиторы протонной помпы (омепразол 20 мг внутрь).

Интервал между курсами составлял 3 недели (начало очередного курса на 21 день от начала предыдущего курса лечения).

При лечении пациентов второй группы к стандартной схеме полихимиотерапии был добавлен гИЛ-2 («Ронколейкин», «БИОТЕХ», Российская Федерация), который вводили подкожно в дозе 1000000 МЕ ежедневно с 1-го по 5-й день с интервалом 24 часа.

Исследование иммунологического статуса производилось методом фенотипирования лимфоцитов в тестах розеткообразования с частицами, покрытыми моноклональными антителами. Диагностикумы для определения Т-хелперов, Т-супрессоров, Т-лимфоцитов представляют собой фиксированные частицы, эритроциты или латекс, покрытые моноклональными антителами против антигенов, которые несут активно пролиферирующие Т-лимфоциты: CD3 (Т-лимфоциты), CD4 (Т-хелперы), CD8 (Т-супрессоры), CD25 (рецептор к интерлейкину-2).

Для определения В-лимфоцитов использовались эритроциты, покрытые антителами для CD22, CD19, которые специфичны для В-клеток.

Для определения натуральных киллеров использовались диагностикумы с моноклональными антителами к CD16. Определяли также количество иммуноглобулинов классов М, G и А в сыворотке крови методом радиальной иммунодиффузии в агаровом геле по Манчини.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение исходного состояния отдельных звеньев иммунной системы выполнено у всех 50 пациентов, включенных в исследование. Из них 28 получали лечение по схеме R-CHOP + гИЛ-2 и 22 по схеме R-CHOP. В процессе лечения параметры иммунного статуса изучали с интервалом три недели перед каждым последующим курсом химиотерапии.

Исходное состояние иммунного статуса (таблица 1) свидетельствует о значительной иммуносупрессии, затрагивающей в наибольшей степени Т-клеточное звено.

До начала специального противоопухолевого лечения у трети пациентов имелась как относительная, так и абсолютная лимфоцитопения. Среди популяции Т-лимфоцитов наиболее значимым было снижение содержания Т-хелперов (CD4+), которое наблюдалось у 80% случаев. Усредненный показатель данного параметра составил $0,40 \pm 0,05 \times 10^9/\text{л}$ при нормальном уровне в пределах $0,6 - 0,8 \times 10^9/\text{л}$. Поскольку CD4+ лимфоциты являются основными продуцентами эндогенного ИЛ-2, обеспечивающего цитокиновую регуляцию иммунитета, в том числе и противоопухолевого, полученные данные свидетельствуют о выраженном нарушении контроля над пролиферацией и дифференцировкой Т-зависимых иммунокомпетентных клеток у пациентов с НХЛ.

Отклонения в содержании CD8+ лимфоцитов, относимых к цитотоксическим лимфоцитам, были менее выраженными. Хотя относительное содержание их у 45% пациентов было сниженным, однако средний уровень абсолютного количества находился в пределах нормальных значений $(0,37 \pm 0,04) \times 10^9/\text{л}$.

Дисбаланс внутри системы Т-клеточного иммунитета проявлялся снижением иммунорегуляторного индекса. Со-

отношение Т-хелперы/Т-супрессоры (Тх/Тс) у 86% пациентов было ниже нормального значения и составило в среднем $1,3 \pm 0,07 \times 10^9/\text{л}$. Количественный дефицит Т-лимфоцитов, ответственных за противоопухолевый иммунитет, а также низкий иммунорегуляторный индекс являются признаками нарушения в системе адаптивного иммунитета.

Абсолютное число CD16+ лимфоцитов, большинство из которых (80%) являются естественными киллерными клетками и выполняют главную роль в противоопухолевой защите организма, в 39,4% случаев было ниже нормальных значений. Это свидетельствует о том, что у значительной части пациентов с НХЛ естественная иммунорезистентность против опухоли снижена.

Результаты исследования показателей гуморального иммунитета позволяют считать, что имеется определенная напряженность как в системе центрального, так и эффекторного звеньев. Абсолютное число антигенпродуцирующих CD22+ клеток у 48,9% пациентов было ниже нормальных значений, хотя средние значения абсолютного ($0,34 \pm 0,04 \times 10^9/\text{л}$) и относительного ($22,41 \pm 1,15\%$) содержания соответствовало норме. Вместе с тем у 35,4% пациентов имелся повышенный уровень IgG в сыворотке крови, что является свидетельством высокой функциональной активности CD22+ лимфоцитов.

Следует отметить также, что средний уровень циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови соответствовал верхнему пределу нормы и почти у половины превышал нормальные значения, что может быть обусловлено хронической антигенной опухолевой стимуляцией.

Одной из целей цитокинотерапии гИЛ-2 в практической онкологии является коррекция вторичного иммунодефицита, сопровождающего само заболевание и возникающего под действием противоопухолевого лечения. Кроме того, одним из механизмов реализации противоопухолевого действия ритуксимаба считается антителозависимая цитотоксичность, осуществляемая CD8+ цитотоксическими Т-лимфоцитами. Изменение иммунологических показателей у пациентов, получавших два вида химиотерапии, представлено в таблице 2.

Анализ этих данных показывает, что в ходе лечения, независимо от режима химиотерапии, наблюдается снижение количества лейкоцитов и абсолютного количества лимфоцитов.

Что касается субпопуляции Т-лимфоцитов CD4+ и CD8+, то характер изменений при использовании двух вариантов химиотерапии был однотипным. В ходе лечения во всех группах выявляется тенденция к снижению относительного их содержания и снижение абсолютного количества, что согласуется с уменьшением общего количества лимфоцитов.

Аналогичным образом изменялось и содержание Т-лимфоцитов (CD22+): незначительное уменьшение независимо от вида лечения относительного количества антигенпродуцирующих клеток и снижение абсолютного их уровня. Следует отметить, что в ходе лечения выявлялась явная тенденция к снижению уровня экспрессии иммуноглобулинов G, A и M, однако изменения эти происходили в пределах нормальных значений.

Таблица 1 — Параметры исходного иммунологического статуса пациентов с НХЛ

Параметры, группы лечения	Единица измерения	Исходные данные	После 3 курсов	После 5 курсов
Лейкоциты				
R-CHOP	$10^9/\text{л}$	$6,61 \pm 0,52$	$4,02 \pm 0,36$	$4,83 \pm 0,59$
R-CHOP + гИЛ-2		$7,85 \pm 1,06$	$4,03 \pm 0,66$	$4,09 \pm 0,83$
Лимфоциты				
R-CHOP	$10^9/\text{л}$	$1,46 \pm 0,12$	$1,07 \pm 0,13$	$1,22 \pm 0,20$
R-CHOP + гИЛ-2		$1,44 \pm 0,29$	$0,97 \pm 0,15$	$0,74 \pm 0,13$
CD4+				
R-CHOP	$10^9/\text{л}$	$0,43 \pm 0,09$	$0,25 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,05$
R-CHOP + гИЛ-2		$0,37 \pm 0,09$	$0,22 \pm 0,06$	$0,16 \pm 0,04$
CD8+				
R-CHOP	$10^9/\text{л}$	$0,43 \pm 0,07$	$0,21 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,04$
R-CHOP + гИЛ-2		$0,33 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,08$	$0,13 \pm 0,02$
Тх/Тс				
R-CHOP	—	$1,06 \pm 0,06$	$1,20 \pm 0,06$	$1,33 \pm 0,08$
R-CHOP + гИЛ-2		$1,10 \pm 0,08$	$0,92 \pm 0,10$	$1,19 \pm 0,18$
CD16+				
R-CHOP	$10^9/\text{л}$	$0,37 \pm 0,08$	$0,17 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,04$
R-CHOP + гИЛ-2		$0,26 \pm 0,06$	$0,18 \pm 0,06$	$0,13 \pm 0,03$
CD22+				
R-CHOP	$10^9/\text{л}$	$0,36 \pm 0,06$	$0,21 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,05$
R-CHOP + гИЛ-2		$0,32 \pm 0,06$	$0,17 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,04$

Изменение уровня NK-клеток в ходе лечения в группах лечения отличалось. При применении схемы R-CHOP уменьшение как относительного, так и абсолютного количества NK-клеток было более выраженное по сравнению со схемой, содержащей rIL-2, где выявлялась лишь тенденция к их уменьшению.

Таким образом, на основании анализа изменения количественных показателей иммунного статуса можно сделать заключение, что в ходе лечения, независимо от примененного режима химиотерапии, происходит усугубление иммунного дисбаланса.

Таблица 2 — Изменение параметров клеточного иммунитета в ходе лечения

Параметры, группы лечения	Единица измерения	Исходные данные	После 3 курсов	После 5 курсов
Лейкоциты				
R-CHOP	$10^9/\text{л}$	$6,61 \pm 0,52$	$4,02 \pm 0,36$	$4,83 \pm 0,59$
R-CHOP + rIL-2		$7,85 \pm 1,06$	$4,03 \pm 0,66$	$4,09 \pm 0,83$
Лимфоциты				
R-CHOP	$10^9/\text{л}$	$1,46 \pm 0,12$	$1,07 \pm 0,13$	$1,22 \pm 0,20$
R-CHOP + rIL-2		$1,44 \pm 0,29$	$0,97 \pm 0,15$	$0,74 \pm 0,13$
CD4+				
R-CHOP	$10^9/\text{л}$	$0,43 \pm 0,09$	$0,25 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,05$
R-CHOP + rIL-2		$0,37 \pm 0,09$	$0,22 \pm 0,06$	$0,16 \pm 0,04$
CD8+				
R-CHOP	$10^9/\text{л}$	$0,43 \pm 0,07$	$0,21 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,04$
R-CHOP + rIL-2		$0,33 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,08$	$0,13 \pm 0,02$
Тх/Тс				
R-CHOP		$1,06 \pm 0,06$	$1,20 \pm 0,06$	$1,33 \pm 0,08$
R-CHOP + rIL-2		$1,10 \pm 0,08$	$0,92 \pm 0,10$	$1,19 \pm 0,18$
CD16+				
R-CHOP	$10^9/\text{л}$	$0,37 \pm 0,08$	$0,17 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,04$
R-CHOP + rIL-2		$0,26 \pm 0,06$	$0,18 \pm 0,06$	$0,13 \pm 0,03$
CD22+				
R-CHOP	$10^9/\text{л}$	$0,36 \pm 0,06$	$0,21 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,05$
R-CHOP + rIL-2		$0,32 \pm 0,06$	$0,17 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,04$

ВЫВОДЫ

1. У пациентов, страдающих НХЛ, наблюдается дисбаланс внутри системы Т-клеточного иммунитета, проявляющийся снижением иммунорегуляторного индекса в 86% случаев, который в среднем составил $1,3 \pm 0,07 \times 10^9/\text{л}$, а также снижение естественной иммунорезистентности против опухоли за счет уменьшения количества натуральных киллеров.

2. Проведение химиотерапии ассоциировано с усугублением иммунного дисбаланса у пациентов (снижение количества лейкоцитов и абсолютного количества лимфоцитов) вне зависимости от примененной схемы лечения, затрагивающего в основном клеточное звено иммунитета.

Список использованных источников

1. Shankland, K. R. Non-Hodgkin lymphoma / K.

R.Shankland, J. O.Armitage, B. W.Hancock // Lancet. — 2012. — Vol. 380. — P. 848-857.

2. Solimando, A. G. Targeting B-cell non Hodgkin lymphoma: New and old tricks / A.G. Solimando [et al.] // Leuk. Res. — 2016. — Vol. 42. — P. 93-104.

3. Cemy, T. Mechanismus of action of rituximab / T. Cemy [et al.] // — Anticancer Drugs. — 2002 — Vol. 13— P.3–10.

4. Eisenbeis, C.F. Rituximab: Converging mechanisms of action in non-Hodgkin's Lymphoma / C.F.Eisenbeis., M.A.Colegiuri, J.S.Byrd // Clin. Cancer Res. — 2003 — Vol.9 — P.5810-5812.

5. Cragg, M.S. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents / M.S.Cragg, M.J.Glennie// — Blood — 2004— Vol.103. — P.2728-2743.

6. Khan, K.D. A phase 2 study of rituximab in combination with recombinant interleukin-2 for rituximab-refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma / K.D. Khan [et al.] // Clin. Cancer. Res. — 2006. — Vol. 12(23). — P. 7046-7053.