

Л.Я. Дубей
Р.С. Поліщук
О.І. Купчак
І.П. Цимбалюк
О.О. Трояновська
Л.Л. Скоропад
О.І. Козлова

Інститут патології крові
та трансфузійної медицини
АМН України

Обласна дитяча спеціалізована
клінічна лікарня, Львів, Україна

Ключові слова: діти, гостра
лімфобластна лейкемія,
програмна терапія, довготривала
ремісія, клітинний імунітет.

ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ У ДІТЕЙ З ГОСТРОЮ ЛІМФОБЛАСТНОЮ ЛЕЙКЕМІЄЮ ПІД ЧАС ПРОВЕДЕННЯ ХІМІОТЕРАПІЇ ТА У ПЕРІОД ДОВГОТРИВАЛОЇ РЕМІСІЇ

Резюме. У 87 дітей, хворих на гостру лімфобластну лейкемію (ГЛЛ), методом проточної цитофлюорометрії проведено під час програмної хіміотерапії та у різні терміни довготривалої ремісії дослідження окремих показників клітинного імунітету. Максимальне їх пригнічення виявлено під час реіндукційної хіміотерапії. Повне відновлення субпопуляції Т-лімфоцитів відзначають у пізні періоди довготривалої ремісії, у той же час кількість CD19⁺ і CD16/56⁺-клітин лімфоцитів залишається зменшеною.

ВСТУП

Гостра лімфобластна лейкемія (ГЛЛ) — це пухлинне захворювання, що характеризується неконтрольованою проліферацією клональних лімфоїдних попередників, які втратили властивість диференціюватися і дозрівати та неспроможні виконувати високоспеціалізовану імунну функцію. Сучасне програмне лікування ГЛЛ із застосуванням хіміотерапевтичних препаратів з направленістю на різні фази клітинного циклу характеризується високою агресивністю. Під час тривалої хіміотерапії можуть виникати загрозові для життя ускладнення, чільне місце серед яких належить інфекціям. Особливістю дітей, хворих на ГЛЛ, є те, що стан імунної супресії у них спричинений як витісненням нормального лімфопоезу злякисним клоном, так і застосуванням цитостатичної терапії, що спричиняє порушення дозрівання імунокомпетентних клітин та порушення їх функції. За таких умов суттєво знижується опірність дитячого організму, який стає вразливим до виникнення інфекційних ускладнень на всіх етапах терапії [1, 3].

Метою дослідження було вивчення стану окремих показників клітинного імунітету у дітей з ГЛЛ на різних етапах лікування та у період довготривалої ремісії.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі проаналізовано й узагальнено результати досліджень, проведених у 87 дітей, хворих на ГЛЛ, які лікувалися у гематологічному відділенні Львівської обласної дитячої спеціалізованої клінічної лікарні. Діагноз ГЛЛ ґрунтувався на результатах клінічного обстеження, цитологічного, цитохімічного досліджування та імунофенотип бластних клітин периферичної крові та кісткового мозку. Дослідження здійснювали на різних етапах лікування (консолідація, реіндукція, підтримувальна терапія), при його

завершенні та різних термінах довготривалої ремісії (до 3 років, 3–5 років.). Протоколи лікування та розподіл обстежених дітей за етапами лікування і терміном ремісії описані нами раніше [1]. Оцінку показників здійснювали у наступних вікових групах: 1–5 років (23 дитини), 6–10 (37) та 11–14 (27).

Всього виконано 163 імунофенотипових досліджень. Серед обстежених дітей 85 хлопчиків (52,1%), 78 дівчаток (47,8%).

Визначення загальної кількості Т-клітин та їх субпопуляцій, NK-клітин та В-лімфоцитів у периферичній крові здійснювали за допомогою лазерної проточної цитофлюорометрії («Vecton Dickinson») з використанням панелі МКАТ до CD3 (anti-CD3), до CD4 (anti-CD4), до CD8 (anti-CD8), до CD19 (anti-CD19), до CD16/56 (anti-CD16/56) фірм «Becton Dickinson» (США) та «Dako» (Данія). Абсолютний рівень Т-клітин та їх субпопуляцій, NK-клітин та В-лімфоцитів у крові визначали за їх відсотком відповідно до абсолютної кількості лімфоцитів, яку отримували при диференційному підрахунку лейкоцитів.

Контрольну групу склали 52 практично здорові дитини відповідного віку.

Статистичну обробку результатів досліджень виконано за допомогою програми Excel-7 з пакету Microsoft Office-97 із використанням варіаційного та кореляційного аналізу.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На усіх етапах програмного лікування відзначали лейкопенію у межах 2,31–2,93 Г/л, спричинену впливом цитостатичних препаратів. Не виявлено різниці у кількості лейкоцитів у різних вікових групах. Після закінчення лікування відзначали значне збільшення кількості лейкоцитів у дітей всіх вікових груп, однак цей показник не досягав нормальних величин. У період ранньої ремісії (до 3 років) спостерігали незначне зростання рівня лейкоцитів, яке

було найбільш виражене у дітей другої вікової групи. У пізні періоди довготривалої ремісії встановлено більш помітне зростання кількості лейкоцитів, яке більш чітко виявляли у дітей третьої вікової групи. Заслуговує на увагу той факт, що на всіх етапах лікування та у період довготривалої ремісії у досліджуваних групах дітей рівень лейкоцитів не нормалізувався. Абсолютна кількість лімфоцитів під час лікування дітей окремих вікових груп була практично однаковою, проте вірогідно нижчою порівняно з контрольною групою.

Після протокольного лікування ГЛЛ виявлено зростання абсолютної кількості лімфоцитів із середнім значенням $2,19 \pm 0,11$ Г/л. Під час довготривалої ремісії у дітей різних вікових груп відбувалося подальше збільшення абсолютної кількості лімфоцитів.

На етапі консолідації незалежно від віку дітей кількість Т-клітин, які експресували $CD3^+$, була невеликою як у відносному, так і в абсолютному їх значенні. Перед початком II протоколу встановлено підвищення рівня $CD3^+$ -лімфоцитів до $1,37 \pm 0,14$ Г/л. Кількість $CD3^+$ -лімфоцитів у період підтримувальної терапії була досить незначною у порівнянні з попередніми етапами лікування і суттєво відрізнялася від показників контрольної групи ($0,49 \pm 0,17$ Г/л, $p < 0,05$). Після завершення підтримувальної терапії ГЛЛ відзначали збільшення загальної кількості $CD3^+$ -лімфоцитів до рівня $0,97 \pm 0,14$ Г/л. Під час довготривалої ремісії кількість $CD3^+$ -клітин досягла рівня контрольної групи (рис. 1).

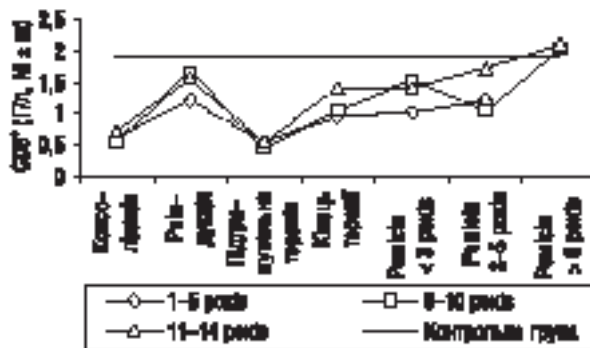


Рис. 1. Динаміка змін рівня $CD3^+$ -лімфоцитів у дітей з ГЛЛ

Відновлення $CD4^+$ - та $CD8^+$ -популяцій лімфоцитів впродовж усього періоду лікування ГЛЛ та на етапі довготривалої ремісії відзначалося нелінійним характером їх регенерації. Перед початком консолідації рівень $CD4^+$ -клітин був найнижчим і становив $0,27 \pm 0,13$ Г/л. Під час реіндукції відзначали підвищення середніх рівнів $CD4^+$ -лімфоцитів ($0,72 \pm 0,12$ Г/л), однак, вони були нижчими, ніж у дітей контрольної групи ($1,22 \pm 0,13$ Г/л). Після завершення II протоколу відзначено наступне зменшення кількості таких лімфоцитів до середнього рівня $0,24 \pm 0,15$ Г/л. Після завершення програмного лікування ГЛЛ відзначали відновлення їх кількості. Під час довготривалої ремісії ці показники досягнули через 5 років максимального значення і практично

не відрізнялися від рівня $CD4^+$ -лімфоцитів контрольної групи (рис. 2).

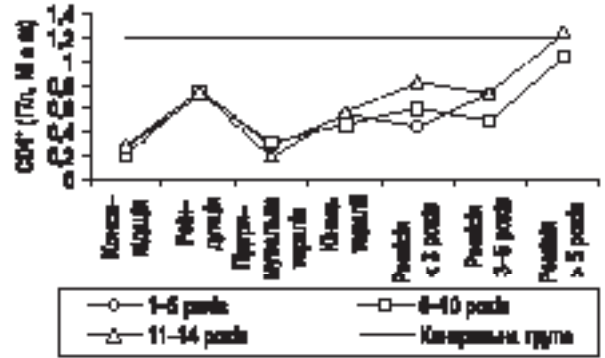


Рис. 2. Динаміка змін рівня $CD4^+$ -лімфоцитів у дітей з ГЛЛ

Після індукції у дітей усіх вікових груп показники $CD8^+$ -супресорних/цитотоксичних клітин були низькими і мало відрізнялися один від одного. Перед початком реіндукційного протоколу виявлено підвищення рівня $CD8^+$ -лімфоцитів. Проте після закінчення II протоколу їх кількість суттєво знижувалася, а у динаміці спостереження — поступово відновлювалася, досягаючи вікової норми під час довготривалої ремісії (рис. 3).

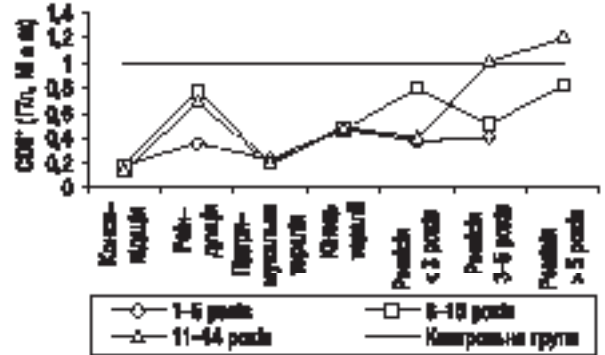


Рис. 3. Динаміка змін рівня $CD8^+$ -лімфоцитів у дітей з ГЛЛ

Після закінчення індукційного курсу поліхіміотерапії абсолютну кількість $CD19^+$ -лімфоцитів виявили зменшеною у всіх вікових групах із середнім значенням $0,17 \pm 0,09$ Г/л. На етапі реіндукційного протоколу спостерігали подальше зменшення кількості В-клітин ($0,06 \pm 0,01$ Г/л). Під час підтримувальної терапії простежували тенденцію до незначної регенерації кількості В-лімфоцитів у всіх вікових групах. У різні періоди довготривалої ремісії кількість В-лімфоцитів порівняно із контрольною групою залишалася невеликою із субнормальним значенням (рис. 4). Виключення становить підгрупа віком від 6–10 років з тривалістю ремісії 3–5 років, у якій рівень $CD19^+$ -лімфоцитів сягав такого у контролі.

Рівень НК-клітин на різних етапах лікування та термінах довготривалої ремісії був низьким і суттєво ($p < 0,05$) відрізнявся від контрольної групи. Найбільш помітним ($p < 0,01$) було зниження рівня $CD16/56^+$ -лімфоцитів під час проведення підтримувальної терапії. Наприкінці завершення програмного лікування відзначали лише тенденцію зростання абсолютної кількості НК-клітин, яке продовжува-

лося у період повного їх одужання, досягаючи субнормального рівня у пізніх (5 років) термінах довготривалої ремісії (рис. 5).

У дітей з ГЛЛ виявляють схильність до інфекційних ускладнень як на час встановлення діагнозу, так і під час цитостатичної хіміотерапії. Деякі дослідження вказують на те, що інфекційні епізоди частіше трапляються і мають важчий перебіг у дітей з лейкемією, ніж із солідними пухлинами [2, 3]. Окремі автори описують тривалі і значні порушення імунної системи у дітей після закінчення програмного лікування ГЛЛ [2, 5, 12]. Припускають, що значний імунодефіцит у дітей з ГЛЛ є результатом не тільки цитотоксичної дії терапії, але й впливу лейкемічного процесу на імунну систему [4, 13]. У літературі висловлюють погляд, що лейкемічний клон клітин спроможний пригнічувати гемопоєз і лімфопоєз, внаслідок чого відновлення нормальної популяції NK та В-клітин утруднюється. Деякі дослідники спостерігали пригнічення лімфобластами ранніх клітин-попередників гемо- і лімфопоєзу *in vitro* [7, 8, 9], у той же час іншим авторам не вдалося продемонструвати такий ефект [11].

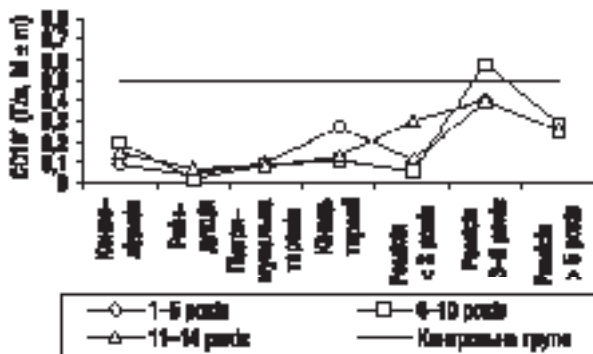


Рис. 4. Динаміка змін рівня CD19⁺-лімфоцитів у дітей з ГЛЛ

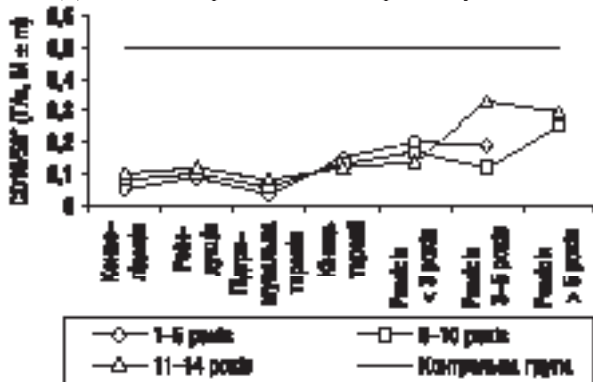


Рис. 5. Динаміка змін рівня NK (CD16/56⁺-клітин)

Ми провели дослідження, спрямовані на визначення здатності субпопуляцій Т-клітин, NK-клітин та В-лімфоцитів до відновлення як під час програмного лікування ГЛЛ у дітей, так і у різні терміни довготривалої ремісії. Ми очікували отримати дані про характер і тривалість імуносупресивної дії хіміотерапії ГЛЛ у дітей. Рівень окремих показників клітинного імунітету аналізували у хворих на фоні гематологічної стабільності після закінчення індукційної терапії, яка призвела до редукції кількості

лімфобластів (відсутність їх у периферичній крові та менше 5% у кістковому мозку) та тривалої лейкопенії. Дослідження продовжували протягом наступних етапів програмного лікування та у різні терміни довготривалої ремісії. Виявлено, що показники Т-клітинного імунітету на різних етапах лікування та термінах довготривалої ремісії характеризувалися нелінійним характером відновлення. Після завершення фази індукції протокольного лікування, тобто на початку етапу консолідації, спостерігається суттєве зниження показників Т-клітинного імунітету. Перед початком реіндукції виявлено різкий ріст загальної Т-клітинної популяції лімфоцитів. Проте після її завершення з'являється наступна хвиля зниження Т-клітин, яка триває впродовж всього періоду підтримувального лікування. Слід зазначити, що на етапі завершення програмного лікування ГЛЛ у дітей поступово підвищуються показники Т-клітин, що прослідковується впродовж всього періоду ранніх термінів довготривалої ремісії. Під час довготривалої ремісії (більше 5 років) рівень Т-лімфоцитів набуває свого максимального значення і досягає рівня верхньої межі вікової норми.

Згідно з даними літератури виявлено, що потенціал ефективного відновлення Т-хелперних клітин залежить від резидуальної тимічної активності [6, 9, 13]. Визначення експресії ізоформ CD4⁺CD45RA⁺ дає змогу оцінити ефективність відновлення Т-хелперів. Результати наших досліджень засвідчили, що CD8⁺-клітини мають властивість швидше відновлюватися, ніж CD4⁺-Т-лімфоцити, що співпадає з даними літератури [10, 13–15]. Вважається, що це пов'язано з тим, що супресорні/цитотоксичні лімфоцити не вимагають резидуальної тимічної активності.

За літературними даними на час встановлення діагнозу ГЛЛ у дітей рівень сироваткових імуноглобулінів та В-лімфоцитів знаходиться практично у межах вікової норми (відповідає найчастіше її нижній межі) [2, 3, 6]. Під час проведення програмної терапії відзначають глибоку В-клітинну лімфопенію, а на ранніх термінах довготривалої ремісії (від 1 до 48 міс) показник В-лімфоцитів знаходиться у межах вікової норми впродовж усього періоду спостереження [2, 4]. За нашими даними рівень CD19⁺-лімфоцитів на етапі встановлення діагнозу ГЛЛ у дітей також відповідав віковій нормі. На різних етапах лікування спостерігали значне зниження показників В-лімфоцитів, яке було найбільш помітним під час проведення реіндукційного протоколу. Під час підтримувальної терапії та завершення програмного лікування відзначали вкрай незначне підвищення показників CD19⁺-лімфоцитів. На ранніх термінах довготривалої ремісії (до 3 років) рівень CD19⁺-лімфоцитів також досить низький, особливо у дітей 6–10 років. У більш пізніх термінах ремісії показники В-лімфоцитів були субнормальними (за винятком вікової групи 6–10 років при ремісії 3–5 років), і так і не досягнули вікової норми. Не спостерігали відновлення вмісту і CD16/56⁺-клітин.

ВИСНОВКИ

1. У дітей з ГЛЛ виявлено зниження кількісних характеристик клітинної ланки імунітету, що зумовлено супресивною дією лейкемічного клону та цитотоксичним впливом програмної поліхіміотерапії.

2. Вміст лімфоцитів (як загальний, так і окремих популяцій) у периферичній крові на різних етапах лікування та довготривалої ремісії відзначаються нелінійним характером відновлення. Під час інтенсивного протокольного лікування спостерігається максимальне зниження показників, які поступово зростають і досягають рівня вікової норми в різні терміни.

3. Т-лімфоцити (CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-) регенерують швидше, ніж В-лімфоцити і НК-клітини і здатні відновлюватися впродовж періоду реіндукції.

4. Під час інтенсивної фази лікування ГЛЛ спостерігається суттєве зниження рівня CD19⁺-лімфоцитів і CD16/56⁺-клітин. Їх кількість починає зростати після закінчення підтримувальної хіміотерапії і наближається до нижньої межі вікової норми лише у довготривалій ремісії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дубей ЛЯ, Купчак ОІ, Полішук РС та ін. Деякі показники гуморального імунітету у дітей з гострою лімфобластною лейкемією під час проведення хіміотерапії та їх відновлення у періоді довготривалої ремісії. Онкологія 2003; 7 (3): 230–4.
2. Вильчевская ЕВ, Тютюник ВВ, Курилко ЛВ. Динамика некоторых иммунологических показателей у детей с ОЛЛ. Гематология і переливання крові: Метер наук-практ школи семінару «Актуальні проблеми протокової цитометрії». Київ: 2004: 3–10.
3. Чернишов АВ. Субпопуляція лімфоцитів і дія на організм іонізуючого випромінювання. Укр мед часопис 2004; (5): вип. 43. 120–3.
4. Alonko S, Pelliniemi TT, Salmi TT. Recovery of blood B-lymphocytes and serum immunoglobulins after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer 1992; 69 (6): 1481–6.
5. Smith S, Schiffman G, Karayalcin G, et al. Immunodeficiency in long-term survivors of acute lymphoblastic leucemia treated with Berlin-Frankfurt-Münster therapy. J Pediatr 1995; 127 (1): 68–75.
6. De Vaan GA, van Munster PJ, Bakkeren JA. Recovery of immune function after cessation of maintenance therapy in acute lymphoblastic leukemia (ALL) of childhood. Eur J Pediatrics 1992; 39 (2): 113–7.
7. Dejbaksh-Jones S, Hitoaki O, Strober S. Similar Rates of production of T and B lymphocytes in the bone marrow. J Exp Med 1995; 181: 2201–11.
8. Lowdel MW, Craston R, Samuel O, Wood ME. Evidence that continued remission in patients treated fo acute leukemia is dependent upon autologous natural killer. Br J Hematol 2002; 117 (4): 821–7.

9. Hakim FT, Cepeda R, Kaimei S, et al. Constraints on CD4 recovery post chemotherapy in adults. Blood 1997; 90 (9): 3789–98.

10. Heitger A, Neu N, Kern H, et al. Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA+)T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. Blood 1997; 90 (2): 850–7.

11. Heitger A, Greinix H, Mannhalter C, et al. Requirement of residual thymus to restore normal T-cell subsets after human allogeneic bone marrow transplantation. Transplantation 2000; 69 (11): 2366–73.

12. Loken M, Shah V, Dattilio K, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. Blood 1987; 69 (1): 255–63.

13. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, et al. Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. Blood 1994; 84 (7): 2221–8.

14. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, et al. Age, thymopoiesis and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. N Engl J Med 1995; 332 (3): 143–9.

15. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, et al. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. Blood 1997; 89 (10): 3700–7.

SOME IMMUNITY INDICES IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LYMPHOMA DURING CHEMOTHERAPY AND LONG-TERM REMISSION

L.Y. Dubej, R.S. Polischuk, O.I. Kupchak,
I.P. Tsybalyuk, O.O. Trojanovska,
L.L. Skoropad, O.I. Kozlova

Summary. In 87 children with acute lymphoblastic lymphoma, some immunity indices were studied using flow cytofluorometry during program chemotherapy and at various times during a long-term remission. The maximum inhibition was observed during reinductive chemotherapy. Full restoration of T lymphocyte subpopulations was observed in late periods of a long-term remission. The number of CD19⁺ lymphocytes still remained to be reduced.

Key Words: children, acute lymphoblastic lymphoma, program therapy, long-term remission, cell-mediated immunity.

Адреса для листування:

Дубей Л.Я.
79044, Львів, вул. Генерала Чупринки, 45
Інститут патології крові та трансфузійної медицини
АМН України
E-mail: dubey@ukr.net.