УДК 612.017.1:616-006.448

СОСТОЯНИЕ ИММУННОГО СТАТУСА И ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ У БОЛЬНЫХ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ МИЕЛОМНОЙ БОЛЕЗНИ

Смирнова О.В., Манчук В.Т., Агилова Ю.Н.

ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, Красноярск, e-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Авторами изучено состояние клеточного и гуморального иммунитета и особенности цитокиновой регуляции у больных на разных стадиях миеломной болезни. С помощью метода непрямой иммунофлуоресценции установлено, что у больных развивается вторичный, комбинированный Т, В-клеточный иммунодефицит. По мере прогрессирования заболевания усугубляется дисбаланс $CD4^+$-клеток к цитотоксическим лимфоцитам, нарастают признаки недостаточности В-лимфоцитарного звена. Уровень NK-клеток снижается на всех стадиях заболевания. С помощью иммуноферментного метода установлено, что при миеломной болезни наблюдается дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов с преобладанием на всех стадиях заболевания провоспалительных и резким снижением противовоспалительных, что, вероятно, не исключает их патогенетическую роль в стимуляции и росте самой опухоли и возникновении инфекционных осложнений на всех стадиях заболевания.

Ключевые слова: миеломная болезнь, клеточный иммунитет, гуморальный иммунитет, цитокины

IMMUNE STATUS AND FEATURES OF CYTOKINE REGULATION PATIENTS AT DIFFERENT STAGES OF MULTIPLE MYELOMA

Smirnova O.V., Manchuk V.T., Agilova Y.N.

FSBI «SRI Medical Problems of the North» RAMS, Krasnoyarsk, e-mail: ovsmirnova71@mail.ru

The authors studied the state of cellular and humoral immunity and features of cytokine regulation in patients at different stages of multiple myeloma. Using the method of indirect immunofluorescence revealed that patients develop secondary, combined T, B-cell immunodeficiency. As the disease progresses exacerbated imbalances $CD4^+$-cells to cytotoxic lymphocytes, growing signs of B- lymphocyte level failure. The level of NK-cells is reduced in all stages of disease. Using enzyme immunoassay method found that in multiple myeloma an imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines, with a predominance of the disease at all stages of pro-inflammatory and anti-inflammatory sharp decline that probably does not exclude their pathogenetic role in the stimulation and growth of the tumor and the occurrence of infectious complications all stages of disease.

Keywords: multiple myeloma, cellular immunity, humoral immunity, cytokines

Миеломная болезнь (МБ) – заболевание системы крови, относящееся к лимфоидным опухолям низкой степени злокачественности (по REAL классификации). Частота заболеваемости составляет 1:100000 населения в год. Болезнь поражает людей старше 40 лет, одинаково часто как мужчин, так и женщин. Болезнь характеризуется инфильтрацией костного мозга плазматическими клетками, избыточной продукцией ими патологического моноклонального иммуноглобулина (М-протеина), сопутствующего поражения костей и развитием почечной недостаточности [2].

Причины развития МБ остаются неизвестными. Однако на сегодняшний день доказана роль иммунной системы в возникновении и прогрессировании неопластического процесса. При острых и хронических гемобластозах выявлялись изменения в клеточном и гуморальном иммунитете [4, 5, 6, 7, 8, 9], что не исключает их патогенетического значения и при МБ. Важнейшим регуляторным механизмом межклеточных взаимодействий между иммунной системой и опухолью являются цитокины, которые, с одной стороны, обеспечивают адекватную пролиферацию с дальнейшим, нормальным функционированием клеток, а с другой стороны, особенности иммунного ответа на внедрение патогенов инфекционного и неинфекционного генеза. Роль цитокинов широко изучается. Опухолевые клетки, подобно нормальным, способны вырабатывать цитокины, которые вызывают иммуносупрессию в организме хозяина. Баланс про- и противовоспалительных цитокинов способствует адекватному иммунному ответу. Среди причин смертности у больных МБ инфекционные осложнения занимают 2 место.

Таким образом, можно предположить, что роль иммунной системы и баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов играет патогенетическое значение при возникновении и прогрессировании МБ. В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение особенностей иммунного статуса и цитокиновой регуляции у больных на разных стадиях МБ G- вариантом.

Материал и методы исследования

В исследовательскую группу были включены первичные 100 больных диффузно-очаговой МБ G-вариантом до 80 лет, поступившие в гематологиче-

ское отделение Краевой клинической больницы № 1 г. Красноярска с 2011 по 2012 г. Все больные были разделены по стадиям заболевания согласно классификации Durie, Salmon (1975). Данная классификация основана на линейной зависимости между содержанием М-протеина и клеточной опухолевой массы у больных. У больных МБ на I стадии наблюдался низкий уровень продукции М-протеина: IgG менее 50 г/л, IgA менее 30 г/л, IgU (протеинурия Бенс-Джонса) менее 4 г/сут, на II стадии – промежуточные показатели между стадиями I и III, на III стадии – уровень М-протеина: IgG – более 70 г/л, IgA – более 50 г/л, IgU – более 12 г/сут.

В качестве контроля было взято 100 практически здоровых людей, сопоставимых по полу и возрасту с группой больных лиц. Обследование больных и практически здоровых людей проводилось с разрешения этического комитета ФГБУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, при этом каждый участник подписывал форму информированного согласия на обследование. Оценка клеточного и гуморального иммунитета проводилась при поступлении больных до начала патогенетического лечения.

В группе изучения мужчин было 38 %, женщин 62 %. Средний возраст мужчин составлял – 60 ± 2,3 года, женщин – 61 ± 3,7 года. Более 50 % больных, включенных в исследование, независимо от стадии заболевания были в возрасте 61–70 лет.

При исследовании иммунного статуса применялся метод непрямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител к $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$, $CD19^+$, $HLA\text{-}DR^+$. (ТОО «Сорбент» г. Москва). Для дополнительной характеристики Т-клеточного звена иммунной системы вычисляли иммунорегуляторный ($CD4^+/CD8^+$), лейко-Т-клеточный (Лейкоциты /$CD3^+$), лейко-В-клеточный (Лейкоциты/$CD19^+$) индексы, а также индекс активации Т-лимфоцитов ($HLA\text{-}DR^+/CD19^+$). Концентрацию иммуноглобулинов классов A, M, E и G и уровни ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО, альфа-интерферона в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом. Состояние гуморального звена иммунитета характеризовали уровнем относительного синтеза IgA ($IgA/CD19^+$), IgE ($IgE/CD19^+$), IgG ($IgG/CD19^+$), IgM ($Ig\ M/CD19^+$).

По результатам исследования была сформирована база данных в виде электронных таблиц MS Excel 2010. Статистическая обработка полученных результатов проводилась в программе Statistica 8. Анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения проводился с использованием критерия Шапиро–Уилка. Признаки, имеющие нормальное распределение, анализировались при помощи параметрических методов: критерия Фишера и критерия Стьюдента для сравнения независимых выборок. Для признаков, распределение которых было отличным от нормального, использовались непараметрические методы: анализ Краскала–Уоллиса и критерий Манна–Уитни для сравнения независимых выборок. Количественные значения представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (C_{25}-C_{75}). Качественные переменные описаны абсолютными значениями и в виде процентных долей. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании особенностей клеточного иммунитета общее количество лейкоцитов, относительное и абсолютное значения лимфоцитов не отличались от показателей контрольной группы (табл. 1). Уровни относительного и абсолютного количества $CD3^+$-клеток при МБ достоверно снижены на всех стадиях заболевания, что свидетельствует о возникшем Т-иммунодефиците. Абсолютное количество $CD4^+$-клеток снижено только на II стадии заболевания а на III стадии регистрируется их увеличение по сравнению и с контролем, и со II стадией заболевания. У больных МБ регистрировалось увеличение относительного уровня $CD8^+$-клеток на всех стадиях заболевания, относительно контроля, что свидетельствует об активации цитотоксического клеточного звена. У больных МБ на II стадии заболевания отмечается увеличение относительного количества $CD19^+$-клеток. На всех стадиях заболевания МБ снижается абсолютное значение $CD16^+$-клеток относительно контроля, а учитывая решающую роль NK-клеток в противоопухолевом иммунитете, вероятно быстрое прогрессирование заболевания обусловлено в том числе дефицитом естественных киллеров из-за цитотоксического влияния опухоли. Нарушено соотношение между $CD4^+$-и цитотоксическими лимфоцитами на всех стадиях заболевания, что свидетельствует о дисбалансе различных звеньев клеточного иммунитета. Лейко-Т-клеточный показатель увеличивается, а индекс активации Т-лимфоцитов снижается на всех стадиях МБ относительно контроля. Лейко-В-клеточный показатель снижается на всех стадиях МБ относительно контроля, особенно значительно на III стадии заболевания, что свидетельствует о значительном увеличении В-клеток при прогрессировании процесса.

При исследовании состояния гуморального звена иммунитета установлено, что по мере прогрессирования заболевания у больных наблюдаются изменения в продуцировании иммуноглобулинов основных классов относительно контрольного диапазона (табл. 2). При этом увеличение сывороточной концентрации IgG и показателя относительного синтеза IgG на всех стадиях заболевания относительно контроля является диагностическим критерием МБ-G варианта. На II и III стадиях повышаются в крови концентрации иммуноглобулинов: IgA, IgM, IgG и величины уровней их относительного синтеза IgM, IgA и IgG.

При МБ наблюдается дисбаланс в цитокиновой регуляции клеток, нарушается соотношение противовоспалительных и провоспалительных цитокинов в сторону увеличения последних, вероятно, именно

поэтому инфекционные осложнения регистрируются у большинства больных и становятся причиной их гибели (табл. 3). Так уровни ФНО и альфа-интерферона при МБ достоверно повышены при III стадии заболевания относительно контроля. На II и III стадиях заболевания уровень цитокина – ИЛ-2 достоверно увеличивается, достигая максимального значения на III стадии заболевания. Аналогично изменяется уровень ИЛ-8, он значительно повышается на II и III стадиях МБ. Уровень ИЛ-4, являющегося противовоспалительным цитокином, резко снижается относительно контроля при прогрессировании МБ, минимальный уровень его регистрируется на III стадии заболевания.

Таблица 1

Состояние клеточного звена иммунитета у больных МБ в зависимости от стадии заболевания (Me, C_{25}-C_{75})

Показатели	Контроль, N = 100 (1)		Стадия II, N = 65 (2)		Стадия III, N = 35 (3)	
	Me	C_{25}–C_{75}	Me	C_{25}–C_{75}	Me	C_{25}–C_{75}
Лейкоциты, (10^9/л)	5,7	4,82–7,47	4,4	3,7–5,1	4,5	3,9–5,5
Лимфоциты, (%)	38,2	32,2–44,9	28	23–34	29	25–45
Лимфоциты, (10^9/л)	2,05	1,52–3,44	1,3	1–1,75	1,3	1,13–2,1
$CD3^+$, (%)	66	60,0–72,0	36	30–46	48	25–57
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
CD3+, (10^9/л)	1,19	0,94–2,46	0,43	0,31–0,68	0,51	0,60–0,33
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
$CD4^+$, (%)	45,0	34,0–48,75	41	33–50	40	25–60
$CD4^+$, (10^9/л)	0,70	0,50–1,76	0,51	0,31–0,78	1,12	0,77–0,24
			$p_1 < 0,001$		$p_{1,2} < 0,001$	
$CD8^+$, (%)	27,0	20,0–33,75	41	31–55	47	21–67
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
$CD8^+$, (10^9/л)	0,50	0,30–1,11	0,48	0,33–0,73	0,75	0,78–0,27
$CD16^+$, (%)	20,0	17,0–23,0	21	15,0– 37,0	20	11,0–31,0
$CD16^+$, (10^9/л)	0,38	0,26–0,85	0,27	0,17–0,49	0,25	0,13–0,58
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,017$	
$CD19^+$, (%)	13,5	9,0–15,75	24	14–31	30	20–41
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$; $p_2 < 0,001$	
$CD19^+$, (10^9/л)	0,25	0,15–0,57	0,24	0,16–0,55	0,40	0,27–0,88
					$p_1 < 0,023$; $p_2 < 0,004$	
HLA–DR^+, (%)	15,00	12,00–20,00	14,00	11–17	14,00	12–22
HLA–DR^+, (10^9/л)	0,26	0,17–0,68	0,19	0,1–0,28	0,23	0,15–0,4
Лейкоциты/$CD3^+$	4,06	3,06–5,46	10,4	7,5–14,24	8,65	5,19–13,59
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
Лейкоциты/$CD19^+$	19,23	14,58–32,43	18,31	9,03–27,78	12,41	6,42–18,38
			$p_1 < 0,046$		$p_1 < 0,001$; $p_2 < 0,003$	
HLA–DR^+/$CD19^+$	1,21	1,07–1,55	0,62	0,39–1	0,46	0,27–0,73
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
$CD4^+$/$CD8^+$	1,58	1,28–1,72	0,87	0,75–1,47	0,97	0,39–1,48
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	

Таблица 2

Состояние гуморального звена иммунитета у больных МБ в зависимости от стадии заболевания

Показатели	Контроль, N = 100 (1)		Стадия II, N = 65 (2)		Стадия III, N = 35 (3)	
	Me	C_{25}–C_{75}	Me	C_{25}–C_{75}	Me	C_{25}–C_{75}
IgA, (г/л)	1,90	1,25–3,17	30,0	18,0–135,0	59,0	47,0–98,0
			$p_1 < 0,001$		$p_{1,2} < 0,001$	
IgM, (г/л)	1,20	0,50–1,80	0,5	0,2–1,0	1,5	1,0–10,0
			$p_1 < 0,001$		$p_{1,2} < 0,001$	
IgG, (г/л)	10,0	8,0–14,0	24,5	6,0–26,0	72,0	64,0–116,0
			$p_1 < 0,001$		$p_{1,2} < 0,001$	
IgE, (г/л)	50,0	10,0–70,0	12,0	6,0–40,0	10,0	4,0–30,0
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
IgA/CD19$^+$, (нг/клетку)	6,88	4,41–9,76	138,0	68,0–249,0	245,0	200,0–410,0
			$p_1 < 0,001$		$p_{1,2} < 0,001$	
IgM/CD19$^+$, (нг/клетку)	3,62	2,72–6,05	1,7	0,7–5,2	6,25	5,4–21,5
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$; $p_2 < 0,021$	
IgE/CD19$^+$, (нг/клетку)	135,68	91,18–181,22	54,86	21,74–137,89	33,3	7,88–85,11
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$; $p_2 < 0,016$	
IgG/CD19$^+$, (нг/клетку)	36,73	25,56–54,48	102,0	84,41–150,46	180,0	150,5–380,8
			$p_1 < 0,035$		$p_{1,2} < 0,001$	

Таблица 3

Уровни цитокинов у больных МБ в зависимости от стадии заболевания

Показатели	Контроль, N = 100 (1)		Стадия II, N = 65 (2)		Стадия III, N = 35 (3)	
	Me	C_{25}–C_{75}	Me	C_{25}–C_{75}	Me	C_{25}–C_{75}
ФНО, пг/мл	0,54	0,38–0,87	0,45	0,4–3	1	0,4–4
					$p_1 < 0,025$	
ИЛ–2, пг/мл	1,1	0,5–3,05	8	6–13	10	7–15
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
ИЛ –8, пг/мл	2,1	0,5–4	3	2–4	6	3–20
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,011$	
ИЛ –4, пг/мл	7	5,6–7,8	1	0,5–2	0,6	0,2–1
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,016$	
Альфа-интерферон, пг/мл	0,6	0,22–4	4	3–15	7	6–15
					$p_1 < 0,001$	

Примечание. p_1 – статистически достоверные различия с величиной контрольных показателей; p_2 – /– с показателями больных на II стадии.

Таким образом, у больных на II стадии МБ наблюдается уменьшение относительного и абсолютного количеств Т-лимфоцитов, абсолютных количеств CD4$^+$-, NK-клеток, увеличение относительного количества цитотоксических лимфоцитов. В гуморальном звене иммунитета на II стадии наблюдается увеличение концентраций IgA, IgG и уровней их относительного синтеза. Уровни цитокинов ИЛ-2, ИЛ-8, были достоверно выше, а уровень ИЛ-4 ниже по сравнению с контролем.

У больных на III стадии МБ наблюдается уменьшение относительного и абсолютного количеств зрелых Т-клеток, абсолютного числа NK-клеток, увеличение относительного количества цитотоксических лимфоцитов. На III стадии заболевания нарастает абсолютное число $CD4^+$клеток и В-лимфоцитов. В гуморальном звене иммунитета наблюдается увеличение в крови концентраций IgA, IgM, IgG и уровней их относительного синтеза. На III стадии МБ уровни ИЛ-2, ИЛ-8, ФНО, альфа-интерферон были достоверно выше, а ИЛ-4 ниже по сравнению с контролем.

Заключение

При МБ наблюдаются изменения в иммунном статусе и цитокиновой регуляции на разных стадиях заболевания. У больных развивается вторичный, комбинированный Т, В-клеточный иммунодефицит. По мере прогрессирования заболевания усугубляется дисбаланс $CD4^+$-клеток к цитотоксическим лимфоцитам, нарастают признаки недостаточности В-лимфоцитарного звена. Уровень NK-клеток снижается на всех стадиях заболевания. При МБ наблюдается дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов с преобладанием на всех стадиях заболевания провоспалительных и резким снижением противовоспалительных, что, вероятно, не исключает их патогенетическую роль в стимуляции и росте самой опухоли и возникновении инфекционных осложнений на всех стадиях заболевания.

Список литературы

1. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. – Киев: Наукова думка, 1998. – С. 38–67.

2. Волкова М.А. Клиническая онкогематология. – М.: Медицина, 2001. – 576 с.

3. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. – М.: Фолиант, 2008, – 552 с.

4. Смирнова О.В. Хронический миелолейкоз – клинические и иммунологические особенности у взрослых больных // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2012. – № 3–2. – С. 185–189.

5. Манчук В.Т., Смирнова О.В. Особенности прогнозирования возникновения инфекционных осложнений после проведения химиотерапии у больных острыми лейкозами // Медицинская иммунология. – 2012. – Т.14, № 4–5. – С. 403–408.

6. Манчук В.Т., Смирнова О.В. Использование методов нейросетевого моделирования и дискриминантного анализа для оценки состояния иммунного статуса у больных острым нелимфобластным лейкозом // Якутский медицинский журнал. – 2010. – № 2. – С. 77–79.

7. Савченко А.А., Смирнова О.В., Манчук В.Т., Москов В.И. Способ прогнозирования инфекционных осложнений после химиотерапии у больных острыми лейкозами. Патент на изобретение RUS 2315305, 08.11.2005.

8. Савченко А.А., Смирнова О.В., Манчук В.Т., Москов В.И. Способ прогнозирования геморрагических осложнений после химиотерапии у больных острыми лейкозами. Патент на изобретение RUS 2324190, 15.02.2006.

9. Smirnova O.V., Manchouk V.T., Savchenko A.A. Immune status & enzymes activity in blood lymphocytes in adult patients at different stages of acute lymphoblastic leukaemia // Indian Journal of Medical Research. – 2011. – T.133, № 3. – P. 280–286.

References

1. Vozianov A.F., Butenko A.K., Zak K.P. Citokiny. Biologicheskie i protivoopuholevye svojstva. Kiev: Naukova dumka, 1998. pp. 38–67.

2. Volkova, M.A. Klinicheskaja onkogematologija. M.: Medicina, 2001. 576 p.

3. Ketlinskij S.A., Simbircev A.S. Citokiny. M.: Foliant, 2008, 552 p.

4. Smirnova O.V. Hronicheskij mielolejkoz – klinicheskie i immunologicheskie osobennosti u vzroslyh bol'nyh // Bjulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra SO RAMN. 2012. no. 3–2. pp. 185–189.

5. Manchuk V.T., Smirnova O.V. Osobennosti prognozirovanija vozniknovenija infekcionnyh oslozhnenij posle provedenija himioterapii u bol'nyh ostrymi lejkozami // Medicinskaja immunologija. 2012. T.14, no. 4–5. pp. 403–408.

6. Manchuk V.T., Smirnova O.V. Ispol'zovanie metodov nejrosetevogo modelirovanija i diskriminantnogo analiza dlja ocenki sostojanija immunnogo statusa u bol'nyh ostrym nelimfoblastnym lejkozom // Jakutskij medicinskij zhurnal. 2010. no. 2. pp. 77–79.

7. Savchenko A.A., Smirnova O.V., Manchuk V.T., Moskov V.I. Sposob prognozirovanija infekcionnyh oslozhnenij posle himioterapii u bol'nyh ostrymi lejkozami. Patent na izobretenie RUS 2315305, 08.11.2005.

8. Savchenko A.A., Smirnova O.V., Manchuk V.T., Moskov V.I. Sposob prognozirovanija gemorragicheskih oslozhnenij posle himioterapii u bol'nyh ostrymi lejkozami. Patent na izobretenie RUS 2324190, 15.02.2006.

9. Smirnova O.V., Manchouk V.T., Savchenko A.A. Immune status & enzymes activity in blood lymphocytes in adult patients at different stages of acute lymphoblastic leukaemia // Indian Journal of Medical Research. 2011. T.133, no. 3. pp. 280–286.

Рецензенты:

Зайцева О.И., д.м.н., руководитель лаборатории клинической мембранологии и иммунохимических исследований, НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск;

Игнатова И.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии и аллергологии, НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск.

Работа поступила в редакцию 04.04.2014.