



**В. А. Барілка¹, В. Л. Матлан², С. В. Примак¹,
О. Я. Виговська¹, О. О. Шалай¹**

¹ ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини
НАМН України», м. Львів

² Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького

Роль фактора некрозу пухлин і його розчинних рецепторів у виникненні мієлосупресії у хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію

Вступ. Мієлосупресія, з вираженою анемією та/або тромбоцитопенією, належить до несприятливих прогностичних чинників у клінічному перебігу хронічної лімфоцитарної лейкемії (ХЛЛ). Порушення гемопоезу у хворих на ХЛЛ може спонукати до замісних гемотрансфузій і коригування тактики лікування ХЛЛ з метою знизити мієлотоксичність цитостатичної хіміотерапії [1, 6]. Загально визнаним для з'ясування стадії цієї хвороби, за класифікацією К. Rai (1975) чи J. Binet (1981), є обов'язкове врахування зниження рівня гемоглобіну та вмісту тромбоцитів у периферійній крові (ПК) хворих на ХЛЛ, адже з'являється щораз більше свідчень про те, що анемія та/або тромбоцитопенія метастатичного походження у хворих на ХЛЛ мають суттєво гірше прогностичне значення, ніж гемоцитопенія автоімунного генезу чи зумовлені спленомегалією [1].

Найчастіше мієлосупресія виникає внаслідок метастазів кісткового мозку (КМ) лейкемічними клітинами, які можуть витіснити паростки нормальних CD 34⁺ клітин-попередників гемопоезу (КПГ) із середовища або індукувати апоптоз КПГ під інтенсивним впливом декретованих цитокінів [4, 6]. Одним із ключових регуляторів гемопоезу, який часто нагромаджується в крові пацієнтів з ХЛЛ, є ліганд/рецепторна система фактора некрозу пухлин (TNF), що розглядається як можлива прогностична ознака перебігу ХЛЛ. TNF – плейотропний цитокін, який є важливим індуктором апоптозу, медіатором запалення, кахексії та анемії, а також росту неопластичних В-клітин [6, 14].

Водночас деякі повідомлення засвідчили позитивний протипухлинний ефект локального застосування малих доз TNF у комбінації з іншими лікарськими засобами, зокрема, у хворих на меланоми, тоді як парентеральне введення великих доз TNF дослідним тваринам не сумісне з життям і обмежує використання цитокіну в клінічній онкологічній практиці [2, 15, 17]. Труднощі

керування поведінкою TNF у організмі зумовлені різною експресією на клітинах-мішенях двох специфічних типів рецепторів – TNFR1 (p55) і TNFR2 (p75). Під час імунних реакцій поверхневі домени рецепторів, які містять центри зв'язування лігандів, зазнають протеолізу, переходять у розчинний стан із утворенням протеїнів, sTNFR1 і sTNFR2. У циркуляторному руслі sTNFR1 і sTNFR2 переважно виконують роль фізіологічних інгібіторів активності TNF [15, 17]. Доведено, що порушення співвідношення вмісту TNF та його розчинних рецепторів, sTNFR1 і sTNFR2, у крові пацієнтів з ХЛЛ корелює з особливостями перебігу захворювання, проте остаточно роль TNF, sTNFR1 і sTNFR2 у виникненні мієлосупресії вивчена недостатньо [3, 14, 15, 17].

Мета дослідження. З'ясувати роль TNF, sTNFR1 і sTNFR2 у виникненні мієлосупресії у хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію (В-ХЛЛ).

Матеріали та методи дослідження. Досліджували плазму ПК 74 хворих на В-ХЛЛ (дослідна група – 43 чоловіки і 31 жінка віком від 40 до 79 років, середній вік $62,6 \pm 9,8$ року), які не отримували спеціального лікування перед обстеженням. Пацієнти з попереднім діагнозом В-ХЛЛ потрапляли в клініку Інституту патології крові та трансфузійної медицини для надання високоспеціалізованої гематологічної допомоги. Під час ушпиталення пацієнта проводили ретельну оцінку анамнезу хвороби та диференціальну діагностику В-ХЛЛ відповідно до міжнародних критеріїв Національного інституту раку (NCI, США) [1, 9]. Після підтвердження діагнозу В-ХЛЛ брали ПК у пацієнтів для визначення концентрації TNF, sTNFR1 і sTNFR2.

Кров (10,0 мл) брали з ліктьової вени пацієнтів натще в окрему стерильну пробірку з гепарином (5,0 од/мл крові). Після центрифугування плазму по 0,3–0,5 мл відбирали у стерильні пластикові пробірки та

зберігали при мінус 30 °С до визначення концентрації TNF, sTNFR1 і sTNFR2.

Хворих із діагнозом В-ХЛЛ розподіляли на групи за поширеністю лейкемічного процесу відповідно до загальноприйнятих класифікацій стадій В-ХЛЛ за К. Rai (1975) та J. Binet (1981) [1, 9]. Визначаючи стадії за класифікацією J. Binet, обраною для аналізу отриманих результатів, у 10 пацієнтів діагностували стадію хвороби «А». На цій стадії рівень гемоглобіну (Hb) має становити $\geq 100,0$ г/л, а кількість тромбоцитів $\geq 100,0 \times 10^9$ /л, зон ураження лейкемічним процесом $< 3,0$. У 22 пацієнтів діагностовано стадію «В», на якій, крім зазначених вище показників, зони ураження поширювалися до $\geq 3,0$. У 42 осіб діагностовано розгорнуту стадію «С», на якій рівень Hb $< 100,0$ г/л та/або тромбоцитів $< 100,0 \times 10^9$ /л. Зони ураження – лімфатичні вузли в ділянці голови/ший (включно з кільцем Вальдесера), підщелепні, пахвові, пахвинні групи лімфатичних вузлів, ураження селезінки, ураження печінки [1, 9].

Концентрацію TNF визначали біологічним методом із використанням чутливої культури клітин фібробластів миші лінії L929, як описано раніше [13].

Концентрацію sTNFR1 та sTNFR2 визначали імуноферментним методом із використанням наборів (BioSource Europe S. A., Бельгія). Дослідження проводили у повторах, згідно з робочими протоколами. Побудову стандартної калібрувальної кривої та обчислення концентрації sTNFR1 і sTNFR2 виконували в програмі Ridawin.

Отримані результати порівнювали з показниками гемограми ПК пацієнтів на різних стадіях В-ХЛЛ. До контрольної групи увійшли 15 здорових осіб – донорів крові аналогічних статі та віку.

Для статистичного опрацювання фактичного матеріалу використані методи варіаційної статистики, їх вірогідність оцінювали за допомогою критерію Стюдента (t); вірогідність різниці між середніми значеннями двох сукупностей $p < 0,05$. Взаємозв'язок між концентрацією TNF, sTNFR1, sTNFR2 та показниками гемограми ПК пацієнтів на різних стадіях В-ХЛЛ визначали за коефіцієнтом кореляції (r), який обчислювали в програмі Excel.

Дослідження проведено відповідно до етичних принципів Гельсінкської декларації 1975 р. та її перегляду 1983 р.

Результати дослідження та їх обговорення. Визначали концентрацію TNF, sTNFR1 і sTNFR2 в плазмі ПК хворих на В-ХЛЛ у взаємозв'язку з показниками гемограми ПК, керуючись гіпотезою, що TNF, sTNFR1 і sTNFR2 секретуються неопластичними В-лімфоцитами, які інфільтрують КМ і можуть локально індукувати мієлосупресію таких хворих [1, 2, 4–6, 10, 14, 17].

Визначали загальний вміст TNF (суміш ізоформ TNF α і TNF β), оскільки за результатами, отриманими методом проточної цитофлюорометрії, на поверхні клітин хворих на В-ХЛЛ є обидва типи специфічних рецепторів TNF – TNFR1 і TNFR2, що мали високу

чутливість до обох ізоформ TNF (TNF α і TNF β) [3, 10]. Крім цього, в контрольних дослідженнях використовували рекомбінантний людський TNF (rhTNF; США, Sigma), який містив TNF α і TNF β з подібним цитотоксичним впливом на тестову культуру L929 [13].

Результати дослідження наведені в таблиці. Показники кореляції (r), які відображали взаємозв'язок між концентраціями TNF, TNFR1 та TNFR2 у плазмі ПК пацієнтів і показниками гемограми, наведені нижче.

Концентрація фактора некрозу пухлин і його розчинних рецепторів у плазмі крові хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію залежно від стадії хвороби та показників гемограми

Група/ показник	Величина і кількість обстежених хворих (n)	TNF, нг/мл	sTNFR1, нг/мл	sTNFR2, нг/мл
		$M \pm m, p$	$M \pm m, p$	$M \pm m, p$
Контрольна група	$n = 15$	$0,089 \pm 0,017$	$1,210 \pm 0,014$	$4,170 \pm 0,231$
Дослідна група хворих на В-ХЛЛ	$n = 74$	$0,938 \pm 0,124^*$	$2,740 \pm 0,277^*$	$32,180 \pm 4,350^*, **$
Стадія В-ХЛЛ за J. Binet	«А» ($n = 10$)	$0,482 \pm 0,184$	$2,200 \pm 0,660$	$17,080 \pm 1,294$
	«В» ($n = 22$)	$1,011 \pm 0,260^{***}$	$2,260 \pm 0,521$	$27,600 \pm 6,990^{***}$
	«С» ($n = 42$)	$0,980 \pm 0,160^{***}$	$2,800 \pm 0,340$	$33,330 \pm 5,690^{***}$
Hb, г/л	$\geq 100,0$ г/л; $n = 31$	$0,779 \pm 0,174$	$2,783 \pm 0,336$	$19,620 \pm 4,670$
	$< 100,0$ г/л; $n = 43$	$1,020 \pm 0,101$	$2,833 \pm 0,299$	$38,140 \pm 4,660 \Delta$
Тромбоцити ($\times 10^9$ /л)	$\geq 100,0 \times 10^9$ /л; $(n = 52)$	$0,971 \pm 0,164$	$2,907 \pm 0,301$	$34,079 \pm 5,235$
	$< 100,0 \times 10^9$ /л; $n = 22$	$0,892 \pm 0,126$	$2,967 \pm 0,469$	$35,417 \pm 7,222$
Абсолютна кількість лімфоцитів ($\times 10^9$ /л)	$5,0-30,0 \times 10^9$ /л; $n = 22$	$1,043 \pm 0,113$	$2,660 \pm 0,103$	$21,775 \pm 4,645$
	$31,0-100,0 \times 10^9$ /л; $n = 24$	$0,969 \pm 0,159$	$2,383 \pm 0,341$	$24,440 \pm 7,920$
	$> 100,0 \times 10^9$ /л; $n = 28$	$0,718 \pm 0,174 \Delta \Delta$ $p < 0,01$	$3,267 \pm 0,417$	$39,410 \pm 5,350 \Delta \Delta$ $p < 0,05$

Примітки: * – вірогідно відмінні показники порівняно з показниками контролю ($p < 0,001$); ** – вірогідно відмінна концентрація sTNFR2 порівняно з sTNFR1 ($p < 0,001$); *** – вірогідно відмінні показники порівняно з початковою (А) стадією ($p < 0,05$); Δ – вірогідно відмінні показники залежно від рівня Hb ($p < 0,01$); $\Delta \Delta$ – вірогідно відмінні показники порівняно з вихідним абсолютним лімфоцитозом $5-30 \times 10^9$ /л ($p < 0,01$ і $p < 0,05$ відповідно).

У дослідній групі хворих на В-ХЛЛ концентрація TNF у плазмі крові майже у 10 разів перевищувала показники у здорових осіб ($p < 0,001$). Вірогідне збільшення концентрації TNF у плазмі крові виявлено у

хворих на розгорнутих стадіях хвороби («В» і «С») порівняно зі стадією «А» ($p < 0,05$), що не суперечить іншим існуючим повідомленням [3, 10, 14]. Нагромадження TNF у ПК хворих на В-ХЛЛ вважається негативною прогностичною ознакою перебігу захворювання [4–6, 10, 14]. Усупереч назві з властивою протипухлинною дією, TNF може стимулювати ріст культури неопластичних лімфоцитів В-ХЛЛ *in vitro* [3, 10, 15].

Потужними джерелами секреції TNF можуть бути як непластичні В-лімфоцити, що внаслідок точкових мутацій у поліморфних генах *TNF* здатні конститутивно вивільняти фактор для автокринної регуляції росту [10, 13], так і різні клітини організму внаслідок реактивної відповіді на патологічний процес [18]. TNF та його мембраноасоційовані рецептори, TNFRI та TNFRII, у нормі є на КПП у КМ, регулюючи гемопоез разом із еритропоетинами та колоніестимулювальними чинниками [2, 10, 15, 18].

Однак метаплазія КМ неопластичними В-клітинами здатна порушувати баланс цитокинів у середовищі та індукувати мієлосупресію [4, 5]. TNF разом із sTNFRI у КМ хворих із апластичною анемією вважаються головними посередниками апоптозу клітин еритроїдного ряду через рецептори TNFRI (p55) [8, 18]. Така властивість зумовлена активацією внутрішньоклітинних доменів смерті (DDs) у структурі TNFRI [2, 3, 8]. У метаплазованому КМ хворих на В-ХЛЛ згадані протеїни можуть нагромаджуватися внаслідок активної продукції пухлинними В-клітинами, макрофагами, фібробластами і діяти паракринно на еритроїдні паростки КПП, що експонують рецептори до TNF [5, 8, 10, 15].

Для виявлення залежності між рівнем TNF у плазмі крові та рівнем гемоглобіну пацієнтів розподілено на дві групи: з $Hb < 100,0$ г/л та $Hb \geq 100,0$ г/л. Рівень TNF у плазмі хворих із $Hb < 100,0$ г/л був вищим, ніж у групі пацієнтів з $Hb \geq 100,0$ г/л, однак показники статистично між собою не відрізнялися. У більшості інших досліджень важкість анемії позитивно корелювала з концентрацією TNF у сироватці крові, яку визначали імуноферментними методами, а не біологічними [4, 5, 13, 14]. Привернули увагу показники негативної оберненої кореляції між рівнем TNF у пацієнтів без анемії та показниками $Hb \geq 100$ г/л, які становили $r = -0,37$. У групі хворих на анемію при $Hb < 100,0$ г/л виявлена позитивна кореляція з рівнем TNF у плазмі крові ($r = +0,35$). Такі результати не виключають інгібіторного впливу TNF на еритропоез уже на ранніх етапах В-ХЛЛ, що спостерігається за наявності експонованих рецепторів TNFRI на паростках КПП [2, 5, 8, 15].

Водночас у інших працях описані механізми опосередкованого впливу TNF на виникнення мієлосупресії, зокрема, через індукцію секреції у фібробластах і макрофагах інших потужних проапоптичних лігандів, як ось Fas (FasL), споріднених до рецепторів Fas/Apo-1, CD 95+. Згадані протеїни також здатні експонуватися на клітинах КМ і руйнувати нормальні КПП, створюючи проліферативні переваги для по-

ширення неопластичних В-клітин [2–8, 14, 18]. Внутрішньоклітинними посередниками передавання сигналів TNF виявилися мітогенактивовані протеїнові кінази (МАПК), p38 МАПК і Ras, які в нормі не експресуються і розглядаються як можливі терапевтичні мішені для запобігання виникненню мієлосупресії у хворих на В-ХЛЛ [5, 7, 11]. Отже, можна припустити, що нагромадження TNF у ПК хворих на В-ХЛЛ, яке може призвести до виникнення анемії вже на ранніх етапах захворювання, зумовлене насамперед присутністю лейкомічного клону В-лімфоцитів. Надалі наявність анемії і тканинної гіпоксії в онкологічних пацієнтів може надавати метаболічні переваги неопластичним клітинам, підвищуючи агресивність поведінки пухлини в організмі [6].

Не виявлено залежності між рівнем TNF у плазмі крові та кількістю тромбоцитів. Так, у групі хворих із тромбоцитопенією ($< 100,0 \times 10^9$ /л) рівень TNF статистично не відрізнявся у групі хворих із нормальною кількістю тромбоцитів ($p > 0,05$). Між згаданими показниками не виявлено вірогідної корелятивної залежності на різних стадіях хвороби ($r = 0,03$).

Як відомо, популяція лімфоцитів у ПК хворих на В-ХЛЛ представлена значним відсотком неопластичних клітин, які можуть секретувати TNF [3–6, 10, 14]. З'ясовано, що у пацієнтів із абсолютним лімфоцитозом $< 30,0 \times 10^9$ /л рівень TNF у плазмі ПК статистично вірогідно перевищував показник у пацієнтів із вмістом лімфоцитів $> 100,0 \times 10^9$ /л ($p < 0,01$). У обох порівнюваних групах показники перебували в слабкому негативному кореляційному взаємозв'язку ($r = -0,1$ і $r = -0,16$ відповідно), що може свідчити про існування недостатнього протипухлинного контролю TNF над проліферацією лейкомічних клітин і наростанням важкості хвороби [10, 14].

Однією з причин втрати чутливості клітин ХЛЛ до TNF є розчинні рецептори до цитокіну – sTNFRI і sTNFRII [3, 12, 15]. У нормі ці протеїни потрібні для регуляції активності, росту й диференціації клітин у КМ та лімфоїдній тканині [2, 8, 12, 15]. У інших дослідженнях показано, що експресія мембранних рецепторів TNFRI і TNFRII виявилася значно вищою на КПП у КМ, ніж на мононуклеарах ПК хворих на В-ХЛЛ, що може вказувати на лейкомічні клітини як важливе джерело постачання цих протеїнів у крові [10, 12].

Результати дослідження концентрації sTNFRI і sTNFRII у плазмі крові хворих на В-ХЛЛ залежно від клініко-гематологічних ознак див. у таблиці.

У дослідній групі хворих на В-ХЛЛ концентрація sTNFRI удвічі перевищувала цей показник у здорових осіб ($p < 0,01$), тоді як рівень sTNFRII майже у 8 разів був вищим, ніж у осіб контрольної групи ($p < 0,001$). Вважається, що одночасне підвищення концентрації TNF разом із sTNFRI і sTNFRII у пацієнтів з В-ХЛЛ асоційоване з активністю протеолізу мембраноасоційованих попередників цих протеїнів у середовищі. Відомим посередником протеолітичного злучення поверхневих доменів розчинних чинників вважається

TNF-конвертуюча металопротеаза, TACE, яка активується в присутності лігандів TNF та інтерлейкіну-2 в середовищі [3, 12, 16].

У нашому дослідженні рівень sTNFR1 у плазмі ПК хворих на В-ХЛЛ не корелював з концентрацією TNF ($r = 0,006$), однак показники sTNFR2 у дослідній групі пацієнтів перебували у вірогідному позитивному взаємозв'язку з TNF ($r = 0,41$), вказуючи на причетність декретованого TNF до наростання концентрації sTNFR2 у ПК. Однак помітно нижчий рівень TNFR1, ніж TNFR2, може бути наслідком незначної експресії TNFR1 на В-клітинах ХЛЛ і їх нормальних попередниках або свідчити про порушення протеолізу цих протеїнів із поверхні клітин крові та/або кісткового мозку. Випадки зниженого протеолізу TNFR1 із мембран клітин описані за наявності набутих періодичних аутоімунних синдромів (TNFR1-associated periodic syndromes), коли рецептор TNFR1 конститутивно експонувався на мембранах, перебував у активній формі й опосередковував хронічне запалення та деструкцію тканин [6, 17, 18].

Експресія TNFR2, на відміну від TNFR1, характерна для нормальних В-клітин [8, 10]. Цей протеїн може функціонувати як рецептор у мембранозв'язаній формі або бути паракринним лігандом у розчинному стані, sTNFR2, для TNF на мембранах (mTNF) сусідніх клітин [16]. Експозиція TNF у мембранній формі, mTNF, до моменту звільнення в позаклітинний простір, виявлена лише нещодавно і може визначатись імунологічними методами [2, 15–17]. Отже, нагромадження sTNFR2 у ПК пацієнтів з В-ХЛЛ може свідчити про аутокринну продукцію цих протеїнів пухлинними лімфоцитами і не суперечить їх участі в нагромадженні клітин В-ХЛЛ [3, 14, 15]. Це підтверджено значущими показниками кореляції в нашому дослідженні.

У хворих із анемією ($Hb < 100,0$ г/л) виявлено вірогідну відмінність між вмістом sTNFR2 у плазмі ПК, порівняно з хворими без анемії ($Hb > 100,0$ г/л), ($p < 0,01$). Слід зазначити, що у хворих із анемією показники sTNFR2 незначною мірою залежали від рівня гемоглобіну ($r = 0,18$), тоді як у хворих без анемії корелятивна залежність зростала до вірогідних статистичних значень ($r = 0,47$). Концентрація sTNFR1 не відрізнялася в групах пацієнтів із різним вмістом гемоглобіну. Однак показник кореляції rsTNFR1 у хворих на анемію ($Hb < 100,0$ г/л) становив 0,19, а за відсутності анемії ($Hb > 100,0$ г/л) корелятивна залежність між концентрацією sTNFR1 та рівнем гемоглобіну сягала 0,44.

Суттєву залежність констатовано між концентрацією sTNFR2 і абсолютною кількістю лімфоцитів на різних стадіях хвороби. Так, у групі хворих на В-ХЛЛ, у яких вміст лімфоцитів становив $5,0\text{--}30,0 \times 10^9$ /л, рівень sTNFR2 був статистично нижчим, ніж у хворих на В-ХЛЛ на розгорнутих стадіях ($p < 0,05$), і перебував у достовірному позитивному корелятивному зв'язку ($r = 0,44$). Отримані результати можуть свідчити про секрецію sTNFR2 у крові пухлинними В-лімфоцитами [10, 12, 14].

Не виявлено статистично вірогідної відмінності між показниками sTNFR1 у плазмі крові пацієнтів із різною абсолютною кількістю лімфоцитів. Однак у групі пацієнтів із рівнем абсолютних лімфоцитів від $5,0$ до $100,0 \times 10^9$ /л негативна кореляція з концентрацією sTNFR1 становила $-0,12$, а зі зростанням абсолютних лімфоцитів понад $100,0 \times 10^9$ /л ці показники досягали статистично вірогідного позитивного значення ($r = 0,90$).

Ще раніше показано, що неопластичні клітини, за наявності негоджкінських лімфом, експонують мембраноасоційований TNF, який функціонує як рецептор після приєднання sTNFR1 до мембрани *in vitro* [12, 18]. Отже, лейкомічні клітини В-ХЛЛ на розгорнутих стадіях хвороби можуть використовувати додаткові ростові стимули через sTNFR1 [2, 7, 8, 15, 17, 18].

У нашій роботі не виявлено вірогідної залежності між концентрацією sTNFR1, sTNFR2 та різним вмістом тромбоцитів, що може пояснюватись причетністю низки інших цитокінів до регуляції мегакаріопоезу в пацієнтів з В-ХЛЛ [4, 5].

Висновки. Отримано додаткові докази причетності клону лейкомічних В-лімфоцитів до активної продукції TNF та обох його розчинних рецепторів – sTNFR1 і, особливо, sTNFR2. На розгорнутих стадіях В-ХЛЛ декретований TNF разом із sTNFR2 можуть провокувати наростання важкості лейкемії, що підтверджено високим корелятивним зв'язком між цими показниками. Отримані свідчення взаємозв'язку між продукцією TNF і вмістом sTNFR2 у крові хворих на ХЛЛ та виникненням у них анемії вже на ранніх стадіях захворювання, на відміну від тромбоцитопенії. Таким чином, визначення концентрації TNF та його розчинних рецепторів, насамперед sTNFR2, може використовуватись для прогнозування виникнення анемії та ініціації лікування хворих на В-ХЛЛ.

Список літератури

1. Прогностичне значення характеру цитопенії у хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію / Я. І. Виговська, О. М. Цяпка, Ю. С. Кароль [та ін.] // Український журнал гематології та трансфузіології. – 2002. – Т. 6, № 2. – С. 14–17 (Prognostic Value of Cytopenia Nature in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia / Y. Vygovska, O. Tsyapka, Y. Carol [et al.] // Ukr. J. Hematol. Transfus. – 2002. – Vol. 6, N 2. – P. 14–17).
2. Bifunctional effects of tumor necrosis factor α (TNF α) on the growth of mature and primitive human hematopoietic progenitor cells: involvement of p55 and p75 TNF receptors / L. S. Rusten, F. W. Jacobsen, W. Lesslauer [et al.] // Blood. – 1994. – Vol. 83, N 1. – P. 3152–3159.
3. Circulating levels of TNF- α and TNF receptor superfamily members in lymphoid neoplasia / S. S. Metkar, K. N. Naresh, P. P. Manna [et al.] // Amer. J. Hematol. – 2000. – Vol. 65. – P. 105–110.

4. Clinical relevance and treatment of non-autoimmune anemia in chronic lymphocytic leukemia / S. Molica, R. Mirabelli, M. Molica [et al.] // *Cancer Management Res.* – 2011. – Vol. 3. – P. 211–217. – Available from: www.dovepress.com.
5. Disease-related anemia in chronic lymphocytic leukemia is not due to intrinsic defects of erythroid precursors: a possible pathogenetic role for tumor necrosis factor- α / O. A. Tsopra, P. G. Ziros, E. D. Lagadinou [et al.] // *Acta Haematol.* – 2009. – Vol. 121. – P. 187–195.
6. Factors that predict chemotherapy-induced myelosuppression in lymphoma patients: role of the tumor necrosis factor ligand-receptor system / E. Voog, J. Bienvenu, K. Warzocha [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2000. – Vol. 18. – P. 325–331.
7. Feng Y. Mitogen-activated protein kinase p38 and hematologic malignancies / Y. Feng, J. Wen, C.-C. Chang // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2009. – Vol. 133. – P. 1850–1856.
8. Giannoulia S. Myelodysplasia and autoimmunity / S. Giannoulia, T. Kanellopoulou, M. Voulgarelis // *Curr. Opin. Rheumatol.* – 2012. – Vol. 24. – P. 97–102. – Available from: <http://www.co-rheumatology.com>.
9. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on chronic lymphocytic leukemia updating the National Cancer Institute – Working Group 1996 guidelines / M. Hallek, B. D. Cheson, D. Catovsky [et al.] // *Blood.* – 2008. – Vol. 111, N 12. – P. 5446–5456.
10. Intracellular tumor necrosis factor production by T- and B-cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia / A. Bojarska-Junak, J. Rolinski, E. Wasik-Szczepaneko [et al.] // *Haematologica.* – 2002. – Vol. 87. – P. 490–499.
11. Protein kinase Ras mediator of the effects of interferon (IFN) γ and tumor necrosis factor (TNF) α on normal and dysplastic hematopoiesis / B. Sharma, J. K. Altman, D. J. Goussetis [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, N 31. – P. 27506–27514.
12. Serum-soluble tumor necrosis factor receptor 2 (sTNFR2) level determines clinical outcome in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma / N. Goto, H. Tsurumi, M. Takemura [et al.] // *Europ. J. Haematol.* – 2006. – Vol. 77, N 3. – P. 217–225.
13. Sheehan K. C. Generation and characterization of hamster monoclonal antibodies that neutralize murine tumor necrosis factors / K. C. Sheehan, N. H. Ruddle, R. D. Schreiber // *J. Immunol.* – 1989. – Vol. 142, N 11. – P. 3884–3893.
14. The clinical significance of tumor necrosis factor- α plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia / A. Ferrajoli, M. J. Keating, T. Manshouri [et al.] // *Blood.* – 2002. – Vol. 100. – P. 1215–1219.
15. TNF- α , the great imitator: role of p55 and p75 TNF receptors in hematopoiesis / S. E. Jacobsen, F. W. Jacobsen, C. Fahlman [et al.] // *Stem Cells.* – 1994. – Vol. 12, suppl. 1. – P. 111–126.
16. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents / T. Horiuchi, H. Mitoma, S.-I. Harashima [et al.] // *Rheumatology.* – 2010. – Vol. 49. – P. 1215–1228.
17. Tumor necrosis factor antagonist therapy and lymphoma development / S. L. Brown, M. H. Greene, S. K. Gershon [et al.] // *Arthritis Rheumatism.* – 2002. – Vol. 46, N 12. – P. 3151–3158.
18. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) potently enhances in vitro macrophage production from primitive murine hematopoietic progenitor cells in combination with stem cell factor and interleukin-7: novel stimulatory role of p55 TNF receptors / C. Fahlman, F. W. Jacobsen, O. P. Veiby [et al.] // *Blood.* – 1994. – Vol. 84, N 5. – P. 1528–1533.

Стаття надійшла до редакції журналу 7 квітня 2015 р.

Роль фактора некрозу пухлин і його розчинних рецепторів у виникненні мієлосупресії у хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію

В. А. Барілка, В. Л. Матлан, С. В. Примак, О. Я. Виговська, О. О. Шалай

Визначена концентрація фактора некрозу пухлин (TNF) і його розчинних рецепторів (sTNFRII та sTNFRII) у плазмі периферійної крові (ПК) 74 пацієнтів з В-клітинною хронічною лімфоцитарною лейкемією (В-ХЛЛ), які проаналізовані у взаємозв'язку з показниками гемограми ПК на різних стадіях хвороби. Виявлено вірогідно вищий рівень TNF і sTNFRII у плазмі ПК хворих на всіх стадіях В-ХЛЛ порівняно зі здоровими особами. Водночас виявлено вірогідно нижчий рівень TNF та sTNFRII у плазмі ПК хворих на ранніх стадіях В-ХЛЛ порівняно з пізніми стадіями. Показники TNF і sTNFRII негативно корелювали з рівнем гемоглобіну, позитивно – з показниками абсолютного лімфоцитозу на ранніх стадіях хвороби. Водночас не виявлено вірогідних змін у концентраціях TNF та його розчинних рецепторів у хворих на В-ХЛЛ із тромбоцитопенією. Результати дослідження дають змогу стверджувати, що підвищення концентрації TNF і sTNFRII у плазмі ПК може виникати внаслідок секреції цих протеїнів клітинами В-ХЛЛ, негативно впливати на гемопоез та індукувати появу анемії на ранніх стадіях хвороби. Таким чином, визначення концентрації TNF та його розчинних рецепторів, насамперед – sTNFRII, може використовуватись для прогнозування виникнення анемії та ініціації лікування хворих на В-ХЛЛ.

Ключові слова: В-ХЛЛ, анемія, тромбоцитопенія, TNF, sTNFR1, sTNFRII.

The Role of Tumor Necrosis Factor and ITS Soluble Receptors in Myelosuppression Developing in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia

V. Barilka, V. Matlan, S. Prymak, O. Vygovska, O. Shalay

Introduction. Myelosuppression with severe anemia or thrombocytopenia refers to the adverse factors in clinical course of B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). According to the existing data, in B-CLL patients (pts) the production of TNF and its soluble receptors, such as sTNFRI and sTNFRII, is broken. However, the final role of these proteins in myelosuppression developing in B-CLL pts is studied poorly.

Purpose of the study. To determine the role of TNF, sTNFRI and sTNFRII in myelosuppression, developing in case of B-CLL.

Materials and research methods. Determination of tumor necrosis factor (TNF) and its soluble receptors, such as sTNFRI and sTNFRII, was performed using blood plasma of 74 pts with B-CLL at different stages of the disease before treatment. Determining the concentration of TNF was carried out by the biological methods, using mouse fibroblasts cell culture line L929. The level of sTNFRI and sTNFRII was performed by immunological methods using the kits of BioSource Europe S. A., Belgium. These parameters were analyzed in relation with complete blood counts of the pts with B-CLL. The control group consisted of 15 healthy blood donors. Probability statistics was evaluated using Student's t-test. The relationship between the concentration of TNF, sTNFRI, sTNFRII and haemograms of pts at different stages of B-CLL was established by the correlation coefficient (r), which was calculated by Excel program.

Results of the investigation and their discussion. The significantly higher levels of TNF (0.938 ± 0.124 ng/ml) and sTNFRII (32.180 ± 4.350 ng/ml) in plasma of B-CLL pts at all stages of the disease compared to healthy donors (0.089 ± 0.017 and 4.170 ± 0.231 ng/ml, accordingly) were established. On the other hand, appreciably lower levels of TNF and sTNFRII in plasma of B-CLL pts at early stage in comparison with more advanced stages were determined. The concentrations of TNF and sTNFRII correlated negatively with hemoglobin level and red blood cell count, but positively with absolute lymphocytic count at the early stage of the disease. In addition, any changes were detected in TNF, sTNFRI and sTNFRII concentrations in patients with thrombocytopenia.

Conclusions. These studies suggest that increasing of the concentration of TNF, sTNFRI and sTNFRII in case of B-CLL, as a result of their production by leukemic cell, may adversely affect hematopoiesis and induce development of anemia in pts with B-CLL. Thus there was installed a possible negative role of accumulated levels of TNF and sTNFRII in plasma of the pts with B-CLL in occurrence of bone marrow suppression at early stages of the disease. In advanced stages of B-CLL, the levels of the secreted TNF, sTNFRII may contribute to leukemic progression, which is confirmed by the high correlation between both indices. In addition, we didn't found significant changes in concentration of TNF, sTNFRI, sTNFRII in pts with varying content of platelets which pointed to the likely involvement of cytokines, other than TNF, sTNFRI, sTNFRII in the regulation of megakaryopoiesis in pts with B-CLL. So, determination of TNF and its soluble receptors may be used to predict the development of anemia as well as to initiate the treatment in B-CLL pts.

Keywords: B-CLL, anemia, thrombocytopenia, TNF, sTNFRI, sTNFRII.