

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

© Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ЛИКВОРА ПРИ НЕЙРОТОКСИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЯХ ХИМИОТЕРАПИИ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ

В.В. Базарный^{1}, О.П. Ковтун¹, О.В. Корякина^{1,2}, Л.Г. Полушина¹, А.Ю. Максимова¹*

¹Уральский государственный медицинский университет,

620028, Екатеринбург, ул. Репина, 3; *эл. почта: vlad-bazarny@yandex.ru

²Областная детская клиническая больница, 620149, Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, 32

Стандартная химиотерапия острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) приводит в ряде случаев к нейротоксическим осложнениям, механизмы которых, способы прогнозирования и профилактики активно изучаются. Цель данной работы — оценить цитокиновый спектр ликвора при нейротоксических осложнениях химиотерапии у детей с ОЛЛ. В проспективное исследование включено 24 ребёнка с диагнозом ОЛЛ в возрасте от 3 до 17 лет, которые были подразделены на две группы — с неврологическими осложнениями (основная группа) и без неврологических осложнений (группа сравнения). Уровень цитокинов в ликворе определяли методом мультипараметрического флуоресцентного анализа с применением магнитных микросфер (Xmap-технология, Luminex) с использованием тест-систем Invitrogen (eBioscience) и мультиплексного анализатора Luminex 200. При сравнительном анализе цитокинового профиля в группе детей с химио-индуцированными нейротоксическими осложнениями было выявлено повышение уровня хемокина CXCL12 (SDF-1 α) и фактора стволовых клеток (SCF). Увеличение концентрации этих цитокинов в ликворе свидетельствовало об относительно высоком риске развития токсической периферической полиневропатии.

Ключевые слова: цитокины; острый лимфобластный лейкоз; нейротоксичность

DOI: 10.18097/PBMC20216704374

ВВЕДЕНИЕ

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) у детей остаётся актуальной проблемой современной онкогематологии. Активная разработка новых иммуно- и клеточно-терапевтических подходов вместе с точной стратификацией риска пока не позволяет отказаться от стандартной химиотерапии, для которой характерны медикаментозные осложнения. Одним из них является нейротоксичность [1, 2]. Убедительные доказательства механизмов нейротоксических осложнений химиотерапии довольно немногочисленны. Они связаны с прямой токсичностью цитостатиков, повреждением ДНК и иммуноопосредованным повреждением нервной ткани. Определённый вклад вносит действие самих опухолевых клеток. В результате может развиваться поражение как центральной, так и периферической нервной системы. Частота встречаемости и степень тяжести нейротоксических осложнений в основном связаны с дозой и длительностью лечения и в меньшей степени с такими факторами, как возраст, сопутствующая патология и генетическая предрасположенность, которые могут усиливать возникновение побочных эффектов [3-5]. Но поскольку развитие и выраженность химио-индуцированных неврологических нарушений у детей достаточно индивидуальны и пока не прогнозируемы, поиск новых механизмов повреждения нервной ткани при химиотерапии острых лейкозов у детей и способов их профилактики продолжается.

Нейротоксичность при химиотерапии гемобластозов в определённой степени связывают с синдромом высвобождения цитокинов [6].

Поэтому изучение цитокинового профиля может стать одним из инструментов лабораторного мониторинга при ведении пациентов с ОЛЛ. Ранее нами было показано, что у 47,6% детей с ОЛЛ, получающих химиотерапию по протоколу ALL-MB-2015, развиваются нейротоксические осложнения, преимущественно в виде полиневропатии нижних конечностей. В ходе проведенного исследования было сделано предположение, что уровень хемокинов CXCL10 (IP-10) и CXCL12 (SDF-1 α) может отражать повреждение нервной ткани [7]. В данной работе была поставлена цель — оценить цитокиновый спектр ликвора при нейротоксических осложнениях химиотерапии ОЛЛ у детей.

МЕТОДИКА

В открытом проспективном нерандомизированном исследовании проведён анализ неврологического статуса и лабораторных данных у 24 детей (13 мальчиков и 11 девочек) в возрасте от 3 до 17 лет с ОЛЛ, преимущественно — В-клеточный вариант. Диагноз был установлен на основании стандартных критериев, включающих иммунофенотипирование и молекулярно-генетическое исследование. Пациенты получали лечение по протоколу ALL-MB-2015 и наблюдались в онкогематологическом центре Областной детской клинической больницы Екатеринбурга в 2019-2020 г.г.

Оценка неврологического статуса включала определение неврологической токсичности по шкале National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE), версия 4.0 от 2010 г.

С учётом состояния нервной системы в период проводимой химиотерапии, включающей этапы индукции и консолидации, среди пациентов сформировано две группы: 12 пациентов с ОЛЛ, не имеющие неврологической симптоматики (группа сравнения); и 12 пациентов с ОЛЛ, имеющие нейротоксические осложнения (основная группа). Характеристики групп по полу и возрасту были сопоставимы.

Для получения спинномозговой жидкости выполняли люмбальную пункцию с последующим введением препаратов (винкристина или метатрекса). На этапе индукции пункции выполняли еженедельно. В данной работе приведены результаты исследования четвёртой (последней) пробы, когда у большинства детей второй группы уже развивались неврологические проявления. В ликворе детей определяли содержание следующих цитокинов: CXCL8 (интерлейкин-8, IL-8), CXCL10 (IP10, индуцибельный белок-10, IP-10), CXCL12 (фактор стромальных клеток-1 α , SDF-1 α), CCL2 (MCP-1, макрофагальный воспалительный белок-1), IL-6 (интерлейкин-6), IL-7 (интерлейкин-7), LIF (leukemia inhibitory factor, лейкоз-ингибирующий фактор), SCF (stem cell factor, фактор стволовых клеток), PDFF-BB (platelet-derived growth factor, тромбоцитарный фактор роста).

Концентрацию цитокинов определяли методом мультипараметрического иммунофлуоресцентного анализа с магнитными микросферами (технология xMAP, Luminex 200, США) и использованием тест-системы ProcartaPlex Human Cytokine/Chemokine ("Invitrogen", США) согласно протоколу производителя. Биологический образец инкубировали в 96-луночном планшете со смесью окрашенных инфракрасными флуоресцентными красителями магнитных микросфер, нагруженных моноклональными антителами, специфичными для исследуемых цитокинов, и стрептавидин-R-фикоэритрина (RPE). Полученную суспензию пропускали через проточную камеру Luminex 200. Для детекции магнитных частиц прибор Luminex имеет два лазера: красный для различения спектральной сигнатуры и зелёный для определения количества флуоресценции RPE, которое пропорционально количеству белка, присутствующего в образце. Концентрацию каждого цитокина рассчитывали на основе средней

интенсивности флуоресценции частиц (MIF) по калибровочному графику с помощью программного обеспечения xPONENT.

В пробах ликвора также определяли концентрацию общего белка фотометрическим колориметрическим методом в реакции с пирогаллоловым красным, детекцию результата осуществляли с помощью автоматического биохимического анализатора Sapphire 400 ("Tokyo Boeki Medisys Inc.", Япония).

Статистическую обработку материала проводили методом вариационной статистики с использованием компьютерной статистической программы Statistica, версия 10 ("Dell StatSoft", США). Достоверность полученных результатов оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Результаты представлены в виде медианы (M) и межквартильного диапазона (Q1, Q3).

Для оценки связи изучаемых лабораторных параметров с вероятностью развития неврологических осложнений рассчитывали относительный риск (RR) с помощью четырёхпольной таблицы и он-лайн калькулятора (www.medcalc.org).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У 12 детей основной группы в период индукции консолидирующей терапии регистрировали неврологическую симптоматику, описанную нами ранее [7]. По шкале токсичности (NCI-CTCAE) с одинаковой частотой выявлялась слабая, умеренная и сильная степень нейротоксичности. В группе сравнения у пациентов не было выявлено неврологических/нейротоксических нарушений. В процессе обследования у пациентов наряду с другими лабораторными параметрами оценивали основные физико-химические свойства ликвора, которые не различались между группами существенно. В частности, концентрация белка составила в группе сравнения и основной группе 0,21 г/л и 0,20 г/л ($p>0,05$) соответственно.

В обеих группах пациентов были определены и проанализированы уровни некоторых цитокинов с учётом развития нейротоксических осложнений на фоне проводимой химиотерапии (табл. 1).

Таблица 1. Сравнительный анализ уровня цитокинов у детей с ОЛЛ в зависимости от развития химио-индуцированных неврологических расстройств

Цитокины, пкг/мкл	Пациенты без неврологических расстройств (группа сравнения, n=12)	Пациенты с неврологическими расстройствами (основная группа, n=12)
CXCL8 (IL-8)	28,7 [0-46,9]	12,0 [0-76,7], $p=0,38$
CXCL10 (IP-10)	99,5 [67,1-120,3]	99,01 [91,2-184,3] $p=0,93$
CXCL12 (SDF-1 α)	358,0 [335,3-458,7]	476,1 [413,5-568,2], $p=0,05$
CCL2 (MCP-1)	1700,5 [1098,5-1963,7]	2203,0 [1261,2-2689,4], $p=0,09$
SCF	3,8 [3,6-5,3]	8,6 [5,8-17,2] $p=0,03$
LIF	0,9 [0,8-2,4]	2,0 [0,9-4,2] $p=0,39$
PDGF-BB	0,0 [0-6,5]	24,4 [0-76,1] $p=0,21$
IL-6	0,1 [0-0,5]	0,0 [0-2,5] $p=0,76$
IL-7	1,4 [1,1-3,3]	2,8 [2,0-7,1] $p=0,11$

ЦИТОКИНЫ ЛИКВОРА ПРИ ХИМИОИНДУЦИРОВАННОЙ ПОЛИНЕВРОПАТИИ

Таблица 2. Относительный риск развития нейротоксических осложнений у детей с ОЛЛ с разным уровнем цитокинов

Показатель	Критическое значение	Относительный риск (RR)	Чувствительность	Специфичность
CXCL12 (SDF-1 α)	>410 пкг/мл	2,182	0,727	0,667
SCF	>5,5 пкг/мл	2,000	0,667	0,750

У детей основной группы, у которых сформировались неврологические нарушения, в сравнении с пациентами группы сравнения отмечено, что наиболее заметным было повышение уровня CXCL12 (SDF-1 α) на 32% ($p=0,05$) и фактора стволовых клеток на 126% ($p<0,05$). На этом основании данные показатели можно выделить как потенциальные маркеры химио-индуцированных неврологических расстройств. Стоит отметить, что в ранее проведенном исследовании нами были показаны аналогичные изменения в сыворотке крови у этих пациентов, но наиболее значимым было повышение в крови содержания CXCL10 (IP-10) и CXCL12 (SDF-1 α) [7].

Поскольку выявленные закономерности могут иметь значение в клинической практике, нами был рассчитан показатель относительного риска (RR), который характеризует вероятность исхода (в данном случае — развитие нейротоксических осложнений) в зависимости от наличия факторов риска, то есть при превышении критического значения концентрации конкретных цитокинов (табл. 2).

Установленные значения RR указывают на достаточно высокий уровень относительного риска развития неврологических расстройств при повышении в ликворе содержания SDF-1 α и SCF.

Полученные результаты об изменениях уровня изученных цитокинов при химио-индуцированных неврологических осложнениях представляются нам вполне логичными с учётом известных данных. Факт повышенной продукции SCF при В-клеточных опухолях ранее был отмечен, хотя его и не связывали с нейротоксичностью. При этом показано разнонаправленное влияние этого цитокина на различные типы клеток, в том числе — на дифференцировку нейронов [8, 9]. SDF-1 α является одним из ключевых факторов нейрорегуляции и формирования нервной ткани, регуляции гематоэнцефалического барьера, а также восстановительных процессов в ЦНС. Кроме того он играет важную роль в механизмах нейровоспаления [10, 11].

Мы далеки от мысли, что указанные цитокины SDF-1 α и SCF являются абсолютными диагностическими признаками токсической невропатии при химиотерапии ОЛЛ. Из приведённых выше данных литературы очевидно, что повышение их продукции носит реактивный характер как в ответ на опухолевую пролиферацию лимфоидных клеток, так и на реакции повреждения и восстановления нервной ткани. Однако возможно, что эти цитокины могут быть “суррогатными” лабораторными критериями нейротоксического действия химиопрепаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Нейротоксичность химиотерапии остаётся одной из актуальных проблем клинической практики. В настоящее время отсутствуют чёткие лабораторные биомаркеры химио-индуцированных неврологических осложнений. Широко принятые в неврологии методы диагностики также не дают ответов на этот вопрос клинической практики лечения ОЛЛ. В настоящее время сформировано представление об участии цитокинов в механизмах регуляции гомеостаза нервной ткани при химиотерапии ОЛЛ. Однако данная концепция требует детализации в вопросе оценки участия цитокинов в процессах повреждения нервной ткани при химиотерапии ОЛЛ.

В проведённом нами исследовании впервые показано, что у пациентов с ОЛЛ, у которых сформировались нейротоксические осложнения на фоне химиотерапии, отмечаются изменения цитокинового профиля ликвора. Наиболее заметны и значимы повышение концентрации CXCL12 (SDF-1 α) и фактора стволовых клеток. Полученные данные могут стать основанием для совершенствования методов диагностики в рамках алгоритма лабораторного мониторинга при химио-индуцированных поражениях нервной системы у детей с ОЛЛ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю признательность заместителю главного врача по онкологии и гематологии Областной детской клинической больницы, к.м.н. Л.Г. Фечиной за неоценимую помощь в организации и проведения исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование поддержано Грантом Учёного Совета Уральского государственного медицинского университета (УГМУ).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (Helsinki, 2000). От законных представителей пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании. Дизайн исследования, его новизна, допустимость и приемлемость были одобрены на заседании локального этического комитета УГМУ от 16.12.2018 (протокол №10).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Румянцев А.Г. (2015) Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, **14**(1), 5-15. [Rumyantsev A.G. (2015) Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, **14**(1), 5-15.]
2. Pui C.H. (2020) Front. Med., **14**, 689-700.
3. Ковтун О.П., Базарный В.В., Корякина О.В., Абдуллаев А.Н. (2020) Педиатрическая фармакология, **17**, 12-17. [Kovtun O.P., Bazarny V.V., Koryakina O.V., Abdullaev A.N. (2020) Pediatric Pharmacology, **17**, 12-17.]
4. Guram S., Richards E., Messahel B. (2016) Arch. Dis. Child., **101**, A15. DOI: 10.1136/archdischild-2016-310863.21
5. Pellacani C., Eleftheriou G. (2020) Adv. Med. Sci., **65**(2), 265-285.
6. Freyer C.W., Porter D.L. (2020) J. Allergy Clin. Immunol., **146**(5), 940-948.
7. Koryakina O., Bazarnyi V., Fechina L., Kostromina P., Maksimova A. (2020) BIO Web Conf., **22**, 02003. DOI: 10.1051/bioconf/20202202003
8. Lee W.C., Hsu P.Y., Hsu H.Y. (2020) Sci. Rep., **10**(1), 11257. DOI: 10.1038/s41598-020-68061-8
9. Piao C.S., Li B., Zhang L.J., Zhao L.R. (2012) Differentiation, **83**(1), 17-25.
10. Hickey K., Stabenfeldt S.E. (2018) Biomed. Mater., **13**(4), 044106. DOI: 10.1088/1748-605X/aaad82
11. Watson A.E.S., Goodkey K., Footz T., Voronova A. (2018) Neurosci. Lett., **715**, 134533. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.134533.

Поступила в редакцию: 16. 04. 2021.
После доработки: 07. 06. 2021.
Принята к печати: 11. 06. 2021.

A PILOT STUDY OF CYTOKINE PROFILE IN CEREBROSPINAL FLUID OF CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA AND NEUROTOXIC SIDE EFFECTS OF CHEMOTHERAPY

V.V. Bazarnyi^{1*}, O.P. Kovtun¹, O.V. Koryakina^{1,2}, L.G. Polushina¹, A.Yu. Maksimova¹

¹Ural State Medical University,

3 Repina str., Yekaterinburg, 620028 Russia; *e-mail vlad-bazarny@yandex.ru

²Regional Children's Clinical Hospital, 32 S. Deryabina str., Yekaterinburg, 620149 Russia

In some cases standard chemotherapy of acute lymphocytic leukemia (ALL) leads to neurotoxicity; its mechanisms, methods of prognosis, and prevention are being actively studied. The aim of this study was to assess the cytokine profile in cerebrospinal fluid (CSF) of children with ALL and neurotoxic side effects of chemotherapy. This prospective study included 24 children with ALL aged from 3 to 17 years. Patients were further subdivided into ALL patients with (main group) and without neurological complications (comparison group). The level of cytokines in CSF was measured by Xmap technology (Luminex) using Invitrogen test systems (eBioscience) and the Luminex 200 system. The comparative analysis of the cytokine profile in the group of children with chemotherapy-induced neurotoxic complications revealed elevated levels of chemokine CXCL12 (SDF-1 α) and stem cell factor (SCF). Increased level of these cytokines in CSF was characterized by a relatively risk for development of toxic peripheral neuropathy.

Key words: cytokines; acute lymphocytic leukemia; neurotoxicity

Funding. The study was supported by a grant from the Academic Council of the Ural State Medical University.

Received: 16.04.2021, revised: 07.06.2021, accepted: 11.06.2021.