

**Clinico-immunological features of invasive aspergillosis in patients with Hodgkin's disease**

O.V. Shadrivova<sup>1</sup>, Ye.V. Frolova<sup>1</sup>, L.V. Filippova<sup>1</sup>,  
A.Ye. Uchevatkina<sup>1</sup>, S.N. Khostelidi<sup>1</sup>, R.M. Chernopyatova<sup>1</sup>,  
Ye.A. Desyatik<sup>1</sup>, A.G. Volkova<sup>2</sup>, Ye.V. Shagdileeva<sup>1</sup>,  
L.S. Zubarovskaya<sup>2</sup>, A.V. Rysev<sup>1</sup>, S.M. Ignatyeva<sup>1</sup>,  
T.S. Bogomolova<sup>1</sup>, Yu.N. Vinogradova<sup>3</sup>,  
N.V. Vasilyeva<sup>1</sup>, and N.N. Klimko<sup>1</sup>

**ABSTRACT**

Invasive aspergillosis is a serious mycotic infection with high mortality that mostly occurs in patients with hematological malignancies and severe immunodeficiency. Immunological defects in the various groups of hematological patients with invasive aspergillosis are not well understood. We are the first to present the results of studying clinico-immunological features of invasive aspergillosis in the patients with Hodgkin's lymphoma.

**Keywords:** invasive aspergillosis, Hodgkin's lymphoma, immune response.

**Accepted:** April 21, 2014

<sup>1</sup>I.I. Metchnikov Northwest State Medical University, St. Petersburg

194291, ul. Santiago de Cuba, d. 1/28, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup>R.M. Gorbacheva Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, I.P. Pavlov St. Petersburg State Medical University

1997758, ul. Leningradskaya, d. 70, Pesochnyy, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>3</sup>Russian Research Centre for Radiology and Surgical Technologies, RF

Ministry of Health

197022, ul. Renthena, d. 12, St. Petersburg, Russian Federation

O.V. Shadrivova, Graduate student in subdepartment of clinical mycology,

allergology and immunology

Ye.V. Frolova, PhD, Head of research laboratory of immunology and allergology

L.V. Filippova, Scientific worker of research laboratory of immunology and allergology

A.Ye. Uchevatkina, PhD, Senior scientific worker of research laboratory of immunology and allergology

S.N. Khostelidi, PhD, Associate professor in subdepartment of clinical mycology, allergology and immunology

R.M. Chernopyatova, PhD, Head of unit № 2

Ye.A. Desyatik, Physician

A.G. Volkova, Pulmonologist

Ye.V. Shagdileeva, Graduate student in subdepartment of clinical mycology, allergology and immunology

L.S. Zubarovskaya, DSci, Professor, Deputy director

A.V. Rysev, PhD, Deputy head doctor for medical treatment

S.M. Ignatyeva, PhD, Leading scientific worker of research laboratory of molecular-genetic microbiology

T.S. Bogomolova, PhD, Head of laboratory for mycological monitoring

Yu.N. Vinogradova, PhD, Senior scientific worker of the department for radiation therapy of systemic diseases and radiation injury

N.V. Vasilyeva, DSci, Professor, Director, Head of subdepartment of medical microbiology

N.N. Klimko, DSci, Professor, Head of subdepartment of clinical mycology, allergology, and immunology

**Address correspondence to:**

O.V. Shadrivova

194291, ul. Santiago de Cuba, d. 1/28, St. Petersburg, Russian Federation

Tel.: +7 (812) 3035146, e-mail: olshadr@mail.ru

**Клинико-иммунологические особенности инвазивного аспергиллеза у больных с лимфомой Ходжкина**

О.В. Шадривова<sup>1</sup>, Е.В. Фролова<sup>1</sup>, Л.В. Филиппова<sup>1</sup>, А.Е. Учеваткина<sup>1</sup>,  
С.Н. Хостелиди<sup>1</sup>, Р.М. Чернопятова<sup>1</sup>, Е.А. Десятник<sup>1</sup>, А.Г. Волкова<sup>2</sup>,  
Е.В. Шагдилеева<sup>1</sup>, Л.С. Зубаровская<sup>2</sup>, А.В. Рысев<sup>1</sup>, С.М. Игнатъева<sup>1</sup>,  
Т.С. Богомолова<sup>1</sup>, Ю.Н. Виноградова<sup>3</sup>, Н.В. Васильева<sup>1</sup>, Н.Н. Климова<sup>1</sup>

**РЕФЕРАТ**

Инвазивный аспергиллез — тяжелая грибковая инфекция с высокой летальностью, возникающая преимущественно у онкогематологических больных на фоне выраженного иммунодефицита. Иммунные нарушения при инвазивном аспергиллезе у различных групп гематологических больных изучены недостаточно. Впервые мы представляем результаты исследования клинико-иммунологических особенностей инвазивного аспергиллеза у пациентов с лимфомой Ходжкина.

**Ключевые слова:**

инвазивный аспергиллез, лимфома Ходжкина, иммунный ответ.

**Принято в печать:** 21 апреля 2014 г.

**ВВЕДЕНИЕ**

Инвазивный аспергиллез (ИА) — грибковая инфекция, которая развивается преимущественно у пациентов со сниженным иммунитетом, осложняет течение онкогематологических заболеваний и составляет 60–82 % всех инвазивных микозов у этой категории пациентов [1, 2]. Среди больных ИА в Санкт-Петербурге, по данным нашего регистра, пациенты с опухолями кроветворной и лимфоидной тканей составляют 88 %, из них около 8 % больных страдают лимфомой Ходжкина (ЛХ) [3]. Летальность, несмотря на раннюю диагностику и адекватную терапию, остается высокой и достигает 36–90 % у различных категорий пациентов. Увеличение частоты развития ИА у гематологических больных в последние годы связано с применением

новых медицинских технологий: высокодозной цитостатической и иммуносупрессивной терапии, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Известно, что клинические проявления ИА, тяжесть течения заболевания и эффективность противогрибковой терапии зависят как от особенностей фонового заболевания, так и от выраженности нарушений врожденного и адаптивного иммунного ответа [4]. Изучение взаимосвязи иммунологических параметров с прогнозом грибковой инфекции необходимо для дальнейшей разработки перспективных стратегий лечения аспергиллезной инфекции у больных с иммунодефицитом [5]. Однако иммунологические особенности инвазивного аспергиллеза у пациентов с ЛХ изучены недостаточно.

В данной статье мы представляем результаты исследования клинико-

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

194291, ул. Сантьяго-де-Куба, д. 1/28, Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup> НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

197758, Песочный, ул. Ленинградская, д. 70, Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» МЗ РФ

197022, ул. Рентгена, д. 12, Санкт-Петербург, Российская Федерация

иммунологических особенностей ИА, развившегося у пациентов с ЛХ.

**Цель** исследования — изучить клинико-иммунологические особенности инвазивного аспергиллеза у больных ЛХ.

**Задачи исследования:**

1. Определить факторы риска инвазивного аспергиллеза у больных ЛХ.
2. Изучить основные клинические проявления инвазивного аспергиллеза у больных ЛХ.
3. Изучить особенности иммунного ответа.
4. Сравнить эффективность противогрибковой терапии у пациентов с ЛХ и острым лимфобластным лейкозом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 13 пациентов с ЛХ II–IV стадии в возрасте 23–52 лет (медиана 32 года). Мужчин было 6, женщин — 7 (1-я группа). Группа сравнения состояла из 10 пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) в возрасте 5–60 лет (медиана 26,5 года). Во 2-й группе лиц женского и мужского пола было поровну. Контрольную группу составили 20 практически здоровых людей с медианой возраста 28,5 года.

### Инструментальные методы диагностики

Пациентам проводили компьютерную томографию (КТ) органов грудной клетки в режиме высокого разрешения, КТ придаточных пазух носа, органов брюшной полости и забрюшинного пространства, по показаниям — пункцию придаточных пазух носа, а также биопсию тканей. Всем пациентам выполняли фибробронхоскопию с забором бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ). Лабораторная диагностика ИА включала микроскопическое и культуральное исследования. Из образцов биосубстратов (мокрота, БАЛ) готовили препараты в просветляющей жидкости (10% раствор КОН в 10% водном растворе глицерина) с добавлением флюоресцирующего маркера (калькофлуор белый). Окрашенный препарат просматривали в люминесцентном микроскопе, отмечали наличие септированных нитей мицелия, ветвящихся под углом 45°. Для определения культуры гриба выполняли посев патологического материала на специализированную среду и инкубировали в течение 10 дней при температуре 28 и 37 °С. Содержание галактоманна в сыворотке и БАЛ определяли иммуноферментным методом с использованием специфической диагностической тест-системы PLATELIA® *Aspergillus* (BIO-RAD Laboratories, США). Наличие галактоманна оценивали спектрофотометрическим методом путем сравнения оптической плотности исследуемого материала и контрольного образца, содержащего 1 нг/мл галактоманна. Диагностически значимым считали индекс выше 0,5 в сыворотке и выше 1,0 в БАЛ.

Для постановки диагноза ИА использовали клинические и лабораторные критерии, предлагаемые Европейской организацией по исследованию и лечению рака (EORTC/MSG, 2008) [6].

Иммунологические показатели изучали в первые 12 нед. от развития ИА. Состояние иммунореактивности оценивали по показателям клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа, а также факторов врожденной резистентности организма. Абсолютной

лимфоцитопенией считали снижение абсолютного числа лимфоцитов до менее  $1 \times 10^9/\text{л}$ , значимой нейтропенией считали снижение абсолютного числа нейтрофилов менее  $0,5 \times 10^9/\text{л}$ . Субпопуляционный состав лимфоцитов определяли иммуноцитохимическим методом с использованием моноклональных антител ДАКО. Кислородзависимую бактерицидность нейтрофилов оценивали в НСТ-тесте (тест с нитросиним тетразолам), фагоцитарную и киллерную активность — с использованием референтного штамма *C. albicans*. Продукцию интерферона- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ), интерлейкина-10 (ИЛ-10), ИЛ-17, фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) определяли в супернатантах клеток крови после 24-часовой индукции фитогемагглютинином с использованием коммерческих иммуноферментных тест-систем («Цитокин», «Вектор-Бест»). Уровень иммуноглобулинов в сыворотке оценивали нефелометрическим методом на анализаторе белков Turboxplus. Полученные в процессе исследования медико-биологические данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA for Windows (версия 6.0) с применением непараметрической статистики — критерия Уилкоксона—Манна—Уитни. Для описания количественных признаков использовали медиану с 25–75-м процентилем. Различия считали статистически значимыми при значении  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

У всех включенных в исследование пациентов с ЛХ диагностировали «вероятный» ИА на основании критериев EORTC/MSG 2008. Характеристика фоновых состояний и особенностей терапии представлена в табл. 1.

Преобладающим гистологическим вариантом ЛХ в исследуемой группе был нодулярный склероз — 85 %. Смешанно-клеточный вариант и лимфоидное преобладание составили 15 %. У пациентов 1-й и 2-й групп ИА в большинстве случаев развился после цитостатической химиотерапии (85 vs 90 %) и аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (15 vs 10 %). Глюкокортикостероиды в составе химиотерапии получали 70 и 60 % больных соответственно. При анализе факторов риска было установлено, что агранулоцитоз длительностью более 10 дней наблюдали реже у пациентов с ЛХ, чем в группе сравнения: 38 vs 90 % ( $p = 0,02$ ). В то же время лимфоцитопению регистрировали у 85 % больных ЛХ vs 60 % больных ОЛЛ ( $p = 0,03$ ).

При установлении диагноза ИА у пациентов с ОЛЛ чаще выявляли сопутствующую или недавно перенесенную бактериальную и вирусную инфекции (табл. 2).

Из клинических проявлений ИА у пациентов с ЛХ реже, чем в группе сравнения, фиксировали лихорадку, рефрактерную к антибиотикам широкого спектра действия (см. табл. 2). Отсутствие лихорадки в период развития грибковой инфекции у части больных ЛХ может быть связано с применением глюкокортикостероидов, которые обладают выраженным противовоспалительным свойством и способны подавлять продукцию провоспалительных цитокинов [7].

У 100 % пациентов с ЛХ диагностировали легочную локализацию микотического процесса. Следует отметить, что в данной группе больных редко встречаются

**Таблица 1.** Клиническая характеристика больных с лимфомой Ходжкина и инвазивным аспергиллезом

№	Возраст/пол	Стадия по Ann Arbor	Вариант ЛХ	Схема терапии	Лучевая терапия	Агранулоцитоз > 10 дней	Лимфоцитопения
1	36/М	IIB	Нодулярный склероз	BEACOPP Escalated	+	+	+
2	23/Ж	IIA	Нодулярный склероз	BEACOPP, DHAP	-	-	+
3	39/Ж	IVBE	Нодулярный склероз	DHAP, VGPP	-	-	+
4	25/М	IVA	Нодулярный склероз	BEACOPP, DexamBEAM, CHOP	-	-	+
5	32/М	IVB	Смешанно-клеточный вариант	BEACOPP, DHAP	-	-	+
6	42/Ж	IIA	Нодулярный склероз	BEACOPP Escalated	+	-	+
7	19/Ж	IIA	Нодулярный склероз	ABVD	-	-	+
8	32/М	IVB	Нодулярный склероз	ABVD, BEACOPP Escalated, DHAP	-	-	-
9	26/Ж	IIB	Нодулярный склероз	BEACOPP, аллоТГСК	+	+	+
10	37/Ж	IIB	Нодулярный склероз	ABVD, DexamBEAM, DHAP	-	+	-
11	42/М	IVA	Нодулярный склероз	ABVD, BEACOPP Escalated, DHAP	-	+	+
12	52/Ж	IIB	Нодулярный склероз	ABVD	-	-	+
13	31/М	IVA	Лимфоидное преобладание	ABVD, аллоТГСК	-	+	+

аллоТГСК — аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

**Таблица 2.** Клинические особенности инвазивного аспергиллеза

Опухоль	Бактериальная инфекция	Цитомегаловирусная инфекция	Лихорадка	Кашель	Характерные КТ-признаки
ЛХ (1-я группа)	30 %	8 %	53 % <i>p</i> = 0,01*	70 %	15 %
ОЛЛ (2-я группа)	40 %	20 %	90 %	50 %	40 %

\* Статистически значимые различия с группой сравнения (*p* < 0,05).

специфичные для ИА признаки поражения легких. Так, симптом «ореола» наблюдали всего у 2 пациентов (см. табл. 2). Кроме того, КТ-диагностика осложняется при III–IV стадии ЛХ, когда в опухолевый процесс вовлекается легочная ткань. В нашем исследовании у половины больных отмечали двусторонние инфильтраты легочной ткани при КТ-исследовании органов грудной клетки. В группе сравнения (ОЛЛ) поражение легких имело место в 80 % случаев, ЦНС — в 10 %, у 1 пациента развилось изолированное поражение толстой кишки. Специфические для ИА КТ-признаки при поражении легких (симптом «ореола» и симптом «матового стекла») выявили у 40 % больных ЛХ.

Серологическое подтверждение диагноза ИА получено у большинства пациентов обеих групп (92 vs 90 %), микологическое (микроскопия и посев БАЛ) — у 31 vs 40 % соответственно. В 1-й группе возбудителями были *A. fumigatus*, *A. niger* и *A. flavus*. У 1 пациента наблюдали сочетанную инфекцию, обусловленную *Aspergillus* spp. и *Rhizopus* spp. В группе сравнения (ОЛЛ) во всех случаях возбудителем был *A. fumigatus*.

Все пациенты после установления диагноза ИА получали противогрибковую терапию. В большинстве случаев — вориконазол (77 vs 90 %), комбинированную терапию получали 23 и 30 % пациентов в 1-й и 2-й группах соответственно.

Общая выживаемость в течение 12 нед. не отличалась между группами и составила 92 % в каждой. У 61 % больных ЛХ в течение 6 мес. была достигнута ремиссия ИА и прекращена противогрибковая терапия. В группе сравнения ремиссия ИА диагностирована в 10 % случаев (*p* = 0,03).

При исследовании иммунного статуса установлены сходные изменения иммунологических показателей у больных обеих групп в сравнении со значениями в контрольной группе: снижение абсолютного числа Т-хелперов (CD4+), В-лимфоцитов (CD20+), есте-

ственных киллеров (CD16+), числа лимфоцитов с активационными маркерами (CD25+) (табл. 3), снижение уровня иммуноглобулина М (табл. 4) и снижение продукции клетками крови ИФН-γ, ИЛ-17 и ИЛ-10 (табл. 5).

У больных ЛХ в отличие от пациентов с ОЛЛ выявлено снижение числа лейкоцитов за счет лимфоцитов, а также абсолютного числа цитотоксических Т-лимфоцитов в сравнении с контрольной группой (см. табл. 3). Однако микробицидная активность нейтрофилов, оце-

**Таблица 3.** Количественные показатели субпопуляционного состава лимфоцитов у больных с инвазивным аспергиллезом

Показатель	1-я группа, ЛХ (n = 13)	2-я группа, ОЛЛ (n = 10)	Контрольная группа (n = 20)
Лейкоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	3,95 (2,0–5,6) * <i>p</i> = 0,028	3,8 (2,5–8,7)	5,9 (5,25–6,45)
Лимфоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	0,99 (0,71–1,28) * <i>p</i> = 0,000	1,23 (0,67–2,31)	2,19 (2,02–2,33)
Нейтрофилы, ×10 <sup>9</sup> /л	1,93 (1,87–4,00)	3,89 (1,66–6,02)	3,06 (2,70–3,37)
CD3+, ×10 <sup>9</sup> /л	0,68 (0,61–1,27) * <i>p</i> = 0,020	1,01 (0,46–1,92) * <i>p</i> = 0,019	1,469 (1,323–1,624)
CD4+, ×10 <sup>9</sup> /л	0,23 (0,18–0,44) * <i>p</i> = 0,000	0,46 (0,19–0,65) * <i>p</i> = 0,013	0,892 (0,731–0,975)
CD8+, ×10 <sup>9</sup> /л	0,33 (0,30–0,56) * <i>p</i> = 0,033	0,47 (0,26–1,34)	0,588 (0,532–0,640)
CD20+, ×10 <sup>9</sup> /л	0,11 (0,07–0,22) * <i>p</i> = 0,000	0,11 (0,04–0,17) * <i>p</i> = 0,000	0,331 (0,287–0,368)
CD25+, ×10 <sup>9</sup> /л	0,09 (0,04–0,14) * <i>p</i> = 0,000	0,11 (0,03–0,18) * <i>p</i> = 0,002	0,292 (0,237–0,325)
CD16+, ×10 <sup>9</sup> /л	0,13 (0,08–0,25) * <i>p</i> = 0,047	0,13 (0,06–0,21) * <i>p</i> = 0,029	0,220 (0,206–0,259)
Иммунорегуляторный индекс, CD4+/CD8+	0,7 (0,6–0,8) * <i>p</i> = 0,000	0,9 (0,44–1,00) * <i>p</i> = 0,000	1,49 (1,36–1,67)

ПРИМЕЧАНИЕ. Приведены значения медианы (25–75-й процентиль).

\* Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой (*p* < 0,05).

**Таблица 4.** Показатели функциональной активности нейтрофилов и гуморального иммунного ответа у больных с инвазивным аспергиллезом

Показатель	1-я группа, ЛХ (n = 13)	2-я группа, ОЛЛ (n = 10)	Контрольная группа (n = 20)
НСТ спонтанный, %	34,0 (31,0–43,0) * p = 0,05	32,5 (21,5–35,5)	22,5 (20,0–29,5)
НСТ активированный, %	66,0 (61,0–84,0) * p = 0,016	77,0 (50,0–83,5)	56,5 (51,0–60,5)
Фагоцитарный индекс, %	72,0 (69,0–75,0)	70,5 (62,5–79,5)	68,5 (66,0–73,5)
Кoeffициент киллинга, %	25,0 (14,0–26,0) ** p = 0,009	8,0 (7,0–9,0) * p = 0,000	25,0 (23,5–28,5)
IgA, г/л	1,4 (1,12–2,39)	0,8 (0,35–1,04)	1,78 (1,78–1,84)
IgM, г/л	0,71 (0,35–1,07) * p = 0,018	0,46 (0,25–0,58) * p = 0,000	1,16 (1,06–1,17)
IgG, г/л	11,9 (4,8–13,8)	5,92 (4,8–10,4)	13,5 (12,95–14,83)

ПРИМЕЧАНИЕ. Приведены значения медианы (25–75-й процентиль).

\* Статистически значимые различия в сравнении с контрольной группой (p < 0,05).

\*\* Статистически значимые различия с группой сравнения (p < 0,05).

ниваемая в НСТ-тесте, способность клеток к киллингу микроорганизмов (см. табл. 4), а также продукция клетками крови ФНО-α и Г-КСФ в ответ на грибковую инфекцию были выше у больных ЛХ в сравнении с показателями в группе ОЛЛ (см. табл. 5). Это подтверждает необходимость оценки не только количественного содержания клеток, участвующих в развитии иммунного ответа, но и их функциональной активности.

## ОБСУЖДЕНИЕ

ЛХ — лимфопролиферативное заболевание, возникающее вследствие злокачественной трансформации В-лимфоцитов зародышевого центра фолликулов. Заболевание составляет около 11 % всех лимфом и приблизительно 15 % злокачественных новообразований у лиц молодого возраста. За последние десятилетия отмечается рост заболеваемости ЛХ. Заболеваемость в европейских странах достигает 2,3–3,1 случая на 100 000 мужчин и 1,6–2,3 на 100 000 женщин [8]. Полагают, что в молодом возрасте (15–44 года) заболеванию способствует первичная инфицированность вирусом Эпштейна—Барр, который определяется примерно у 40 % больных. Вероятно, вирусная инфекция предшествует опухолевой трансформации клеток при ЛХ. Имеются исследования, подтверждающие роль аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, саркоидоз и др.) в возникновении ЛХ [9]. Причиной такой взаимосвязи может быть использование в терапии данных заболеваний длительных курсов иммуносупрессивных препаратов и системных глюкокортикостероидов, влияющих на противоопухолевый иммунитет.

ЛХ гетерогенна по своему клиническому течению. По данным различных авторов, в 20–40 % случаев ЛХ резистентна к стандартной химиотерапии, что проявляется как отсутствием полных ремиссий, так и возникновением рецидивов заболевания [10]. В настоящее время широко применяют химиотерапию в сочетании с лучевой, а также таргетные препараты (моноклональные антитела), представляющиеся наиболее перспективным методом в лечении классической ЛХ [11]. Кроме того, при рецидивирующем течении заболевания все чаще исполь-

**Таблица 5.** Цитокиновый профиль различных групп больных с инвазивным аспергиллезом

Показатель, ед/мл	1-я группа, ЛХ (n = 13)	2-я группа, ОЛЛ (n = 10)	Контрольная группа (n = 20)
ИФН-γ	330,0 (214,0–641,0) * p = 0,003	195,5 (70,0–795,0) * p = 0,020	749,0 (544,0–1258,0)
ИЛ-17	28,0 (4,0–71,0) * p = 0,000	38,0 (11,0–176,0) * p = 0,028	150,0 (123,0–186,0)
ИЛ-10	102,0 (64,0–185,0) * p = 0,001	40,5 (35,0–324,0) * p = 0,028	333,0 (302,0–411,0)
ФНО-α	422,5 (398,0–467,0) ** p = 0,020	189,5 (87,0–434,0) * p = 0,001	466,5 (455,0–472,5)
Г-КСФ	201,5 (198,0–284,0) ** p = 0,008	39,5 (16,0–159,0) * p = 0,009	299,0 (178,0–408,0)

ПРИМЕЧАНИЕ. Приведены значения медианы (25–75-й процентиль).

\* Статистически значимые различия в сравнении с контрольной группой (p < 0,05).

\*\* Статистически значимые различия с группой сравнения (p < 0,05).

зуют трансплантацию аутологичных или аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Подавление иммунного ответа в результате химиотерапии приводит к нарушению эффективности защиты от грибковой инфекции.

Известно, что одним из факторов риска инфекционного процесса служит длительная нейтропения [12]. Однако в нашем исследовании снижение числа нейтрофилов было установлено только у 38 % пациентов с ЛХ по сравнению с 90 % в группе ОЛЛ. Таким образом, особенностью пациентов с ЛХ можно считать отсутствие выраженной нейтропении в период, предшествующий возникновению ИА. Возможно, это связано с тем, что при ЛХ используются прерывистые схемы терапии, включающие, как правило, стандартные дозы цитостатических средств. Тем не менее препараты, применяемые в онкогематологии, обладают цитотоксическим и иммуносупрессивным свойствами. Известно, что циклофосфамид, метотрексат и системные глюкокортикостероиды, входящие в комплексную полихимиотерапию онкогематологических больных, способны подавлять пролиферацию и активацию Т-лимфоцитов, а также выработку провоспалительных цитокинов [13, 14]. Экспериментальные данные подтверждают, что в защите от оппортунистических грибковых инфекций ведущая роль принадлежит Т-хелперам 1-го типа и провоспалительным цитокинам, активирующим нейтрофилы и макрофаги, которые являются первой линией защиты организма от грибов [15]. Следовательно, противогрибковая резистентность и исход инфекционного процесса обеспечиваются балансом между ключевыми провоспалительными (ИФН-γ, ФНО-α, ИЛ-6, ИЛ-8) и противовоспалительными цитокинами (ИЛ-4 и ИЛ-10) [16]. Существует предположение, что уровень цитокинов в крови при ИА может служить как маркером течения заболевания, так и показателем эффективности противогрибковой терапии. Однако изучения отдельных медиаторов иммунного ответа недостаточно для понимания роли цитокинов в формировании защитного иммунного ответа при развитии грибковой инфекции [12, 17].

Мы впервые представляем результаты изучения иммунологических особенностей при ИА у пациентов с ЛХ. Установлено снижение числа лейкоцитов за счет лимфоцитов у больных ЛХ как в сравнении с контрольной группой, так и больными ОЛЛ. Обнаружено изменение способности предшественников лимфоцитов к дифференцировке в различные субпопуляции у всех включенных в

исследование пациентов: снижение абсолютного числа Т-хелперов (CD4+), естественных киллеров (CD16+), числа лимфоцитов с активационными маркерами (CD25+) (см. табл. 3), что согласуется с нашими предыдущими результатами [18].

Считается, что снижение числа нейтрофилов и нарушение их функциональной активности вследствие цитотоксической химиотерапии способствует прогрессированию грибковой инфекции [19]. В нашем исследовании количество нейтрофилов статистически не различалось между группами (см. табл. 3). Однако микробицидная (действие фагоцитирующих клеток) активность нейтрофилов у больных ЛХ, исследованная в НСТ-тесте, была выше контрольных значений, а киллерная способность была статистически значимо выше показателей у больных ОЛЛ, хотя и не отличалась от контрольной группы (см. табл. 4). Это свидетельствует о том, что оценка функциональной активности нейтрофилов предпочтительнее их количественных показателей.

Необходимость изучать способность клеток крови к продукции про- и противовоспалительных цитокинов связана с тем, что их баланс контролирует функциональную активность фагоцитирующих и других эффекторных клеток иммунного ответа, определяющих течение инфекционного процесса.

Однако существуют противоречивые данные о взаимосвязи уровня цитокинов и исходом ИА. Исследования показали, что прогрессирующее течение ИА у гематологических больных сопровождалось низкой пролиферативной активностью Т-лимфоцитов, снижением продукции ИФН- $\gamma$  и повышением уровня ИЛ-10 по сравнению с показателями функциональной активности клеток у пациентов с благоприятным исходом грибковой инфекции [20].

Напротив, в последующих работах выявлено, что высокое содержание ИЛ-10 в сыворотке гематологических больных коррелировало с благоприятным исходом ИА, в то время как повышение уровня ИЛ-6 и ИЛ-8 служило предиктором неблагоприятного прогноза заболевания [17].

В нашем исследовании установлено снижение продукции ИФН- $\gamma$ , определяющего напряженность клеточного иммунного ответа, и противовоспалительного цитокина ИЛ-10 у всех гематологических больных ИА (см. табл. 5). Эти результаты позволяют предположить, что роль ИЛ-10 в развитии инфекционного процесса неоднозначна и он может быть ключевым регулятором воспалительного ответа.

Существует ограниченное количество клинических исследований, характеризующих роль ИЛ-17 в защите организма от аспергиллезной инфекции. При инкубации мононуклеарных клеток человека с конидиями грибов было установлено, что *A. fumigatus* является слабым индуктором ИЛ-17, что подтверждается низким уровнем цитокина в БАЛ и сыворотке больных ИА [21]. В нашем исследовании также показано снижение способности лейкоцитов к продукции ИЛ-17 у всех обследованных больных (см. табл. 5).

Известно, что наряду с ИФН- $\gamma$  такие провоспалительные цитокины, как ФНО- $\alpha$  и Г-КСФ, секретируемые преимущественно клетками миелоидного происхождения (альвеолярными макрофагами, дендритными клетками, моноцитами/макрофагами и нейтрофилами), играют

важную роль в поддержании противогрибковой активности фагоцитов [22]. По данным нашего исследования, у больных ЛХ выявлена более высокая способность лейкоцитов к продукции ФНО- $\alpha$ , Г-КСФ и киллерная активность нейтрофилов по сравнению с пациентами с ОЛЛ (см. табл. 4 и 5). Полученные нами результаты подтверждают важное значение этих цитокинов в защитном иммунном ответе против *Aspergillus* spp. Высокая продукция ФНО- $\alpha$ , Г-КСФ коррелирует с клиническими данными. В течение 6 мес. у 61 % больных ЛХ достигнута полная ремиссия ИА, что позволило прекратить противогрибковую терапию. В группе сравнения ремиссия ИА диагностирована только в 10 % случаев ( $p = 0,03$ ).

## ВЫВОДЫ

1. Основным фактором риска инвазивного аспергиллеза у пациентов с ЛХ является длительная (> 10 дней) лимфоцитопения ( $< 1 \times 10^9/\text{л}$ ). Нейтропения у данной категории пациентов реже предшествует развитию грибковой инфекции, чем у больных ОЛЛ.

2. Установлены сходные изменения иммунологических показателей у больных ЛХ и ОЛЛ на ранних стадиях развития инвазивного аспергиллеза в сравнении с показателями в контрольной группе: снижение абсолютного числа Т-хелперов (CD4+), В-лимфоцитов (CD20+), естественных киллеров (CD16+), числа лимфоцитов с активационными маркерами (CD25+), снижение уровня иммуноглобулина М, продукции клетками крови ИФН- $\gamma$ , ИЛ-17 и ИЛ-10.

3. При ЛХ выявлена высокая продукция ФНО- $\alpha$ , Г-КСФ, способствующих повышению противогрибковой активности нейтрофилов, что подтверждает значение этих цитокинов в защитном иммунном ответе против *Aspergillus* spp. и служит признаком благоприятного течения инвазивного аспергиллеза у пациентов с ЛХ в сравнении с больными ОЛЛ.

4. Ремиссия инвазивного аспергиллеза с завершением противогрибковой терапии в течение 6 мес. наблюдения достигнута у 61 % больных ЛХ и у 10 % больных ОЛЛ.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kousha M., Tadi R., Soubani A.O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. Eur. Respir. Rev. 2011; 20(21): 156–72.
2. Попова М.О., Зубаровская Л.С., Клишко Н.Н., Афанасьев Б.В. Инвазивные микозы при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Тер. арх. 2012; 7: 50–7.  
[Popova M.O., Zubarovskaya L.S., Klimko N.N., Afanasyev B.V. Invasive mycoses in hematopoietic stem cell transplantation. Ter. arkh. 2012; 7: 50–7. (In Russ.)].
3. Klimko N.N., Shadrivova O.V., Khostelidi S.N. et al. Invasive aspergillosis in Saint Petersburg, Russia: analysis of 445 proven and probable cases. Mycos. Diagn. Ther. Prophyl. Fungal Dis. 2013; 56(3): 113.
4. Chaudhary N., Staab J.F., Marr K.A. Healthy Human T-Cell Responses to *Aspergillus fumigatus* Antigens. PLoS One 2010; 5(2): e9036.
5. Carvalho A., Cunha C., Biston F., Romani L. Immunotherapy of aspergillosis. Microbiol. Infect. 2012; 18(2): 120–5.
6. De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly J.P. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin. Infect. Dis. 2008; 46(12): 1813–21.

7. Drgona L., Colita A., Klimko N. et al. Triggers for driving treatment of at-risk patients with invasive fungal disease. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68(3): 17–24.
8. Landgren O., Pfeiffer R.M., Kristinsson S.Y., Bjorkholm M. Survival patterns in patients with Hodgkin's Lymphoma with a pre-existing hospital discharge diagnosis of autoimmune disease. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(34): 5081–7.
9. Landgren O., Engels E.A., Pfeiffer R.M. et al. Autoimmunity and Susceptibility to Hodgkin Lymphoma: A Population-Based Case–Control Study in Scandinavia. *J. Nat. Cancer Inst.* 2006; 98(18): 1321–30.
10. Brusamolino E., Carella A.M. Treatment of refractory and relapsed Hodgkin's lymphoma: facts and perspectives. *Hematol. J. Open Access Publ.* 2007; 92(1): 6–10.
11. Лимфомы: научно-практическое издание. Под ред. А.М. Гранова, Н.В. Ильина. СПб., 2010: 272.  
[Limfomy: nauchno-prakticheskoe izdanie. Pod red. A.M. Granova, N.V. Ilin (Lymphomas: scientific-and-practical publication. Ed. by: A.M. Granov, N.V. Ilin). SPb., 2010: 272.]
12. Chai L.Y., Vonk A.G., Kullberg B.-J., Netea M.G. Immune Response to *Aspergillus fumigatus* in Compromised Hosts: From Bedside to Bench. *Fut. Microbiol.* 2011; 6(1): 73–83.
13. Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F., Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Immunology* 2008; 8: 59–73.
14. Motoyoshi Y., Kaminoda K., Saitoh O. et al. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide. *Oncol. Rep.* 2006; 16(1): 141–6.
15. Segal B.H. Role of macrophages in host defense against aspergillosis and strategies for immune augmentation. *Oncologist* 2007; 12(2): 7–13.
16. Stevens D.A. Th1/Th2 in aspergillosis. *Med. Mycol.* 2006; 44(1): 229–35.
17. Chai L.Y., Netea M.G., Teerenstra S. et al. Early Proinflammatory Cytokines and C-Reactive Protein Trends as Predictors of Outcome in Invasive Aspergillosis. *J. Infect. Dis.* 2010; 202(9): 1454–62.
18. Фролова Е.В., Шадринова О.В., Филиппова Л.В. и др. Состояние иммунного статуса у гематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом. *Журн. инфектол.* 2012; 4(4): 59–64.  
[Frolova Ye.V., Shadrivova O.V., Filippova L.V., et al. Immune status in hematological patients with invasive aspergillosis. *Zhurn. infektol.* 2012; 4(4): 59–64. (In Russ.)].
19. Park S.J., Mehrad B. Innate Immunity to *Aspergillus* Species. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009; 22(4): 535–51.
20. Hebart H., Bollinger C., Fisch P. et al. Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood* 2002; 100(13): 4521–8.
21. Chai L.Y., van de Veerdonk F., Marijnissen R.J. et al. Anti-*Aspergillus* human host defense relies on type 1 T helper (Th1), rather than type 17 T helper (Th17), cellular immunity. *Immunology* 2010; 130(1): 646–54.
22. Van de Veerdonk F., Netea M.G. T-cell Subsets and Antifungal Host Defenses. *Curr. Fung. Infect. Rep.* 2010; 4(4): 238–43.

**О.В. Шадринова** — аспирант кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии

**Е.В. Фролова** — кандидат медицинских наук, заведующая НИЛ иммунологии, аллергологии

**Л.В. Филиппова** — научный сотрудник НИЛ иммунологии, аллергологии

**А.Е. Учеваткина** — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник НИЛ иммунологии, аллергологии

**С.Н. Хостелиди** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии

**Р.М. Чернопятова** — кандидат медицинских наук, заведующая отделением №2

**Е.А. Десятник** — врач-специалист

**А.Г. Волкова** — врач-пульмонолог

**Е.В. Шагдилеева** — аспирант кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии

**Л.С. Зубаровская** — доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора

**А.В. Рысев** — кандидат медицинских наук, заместитель главного врача по терапии

**С.М. Игнатьева** — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник НИЛ молекулярно-генетической микробиологии

**Т.С. Богомоллова** — кандидат биологических наук, заведующая НИЛ микологического мониторинга и биологии грибов

**Ю.Н. Виноградова** — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения лучевой терапии системных заболеваний и лучевой патологии

**Н.В. Васильева** — доктор биологических наук, профессор, директор НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, заведующая кафедрой медицинской микробиологии

**Н.Н. Климко** — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической микологии, аллергологии и иммунологии

Адрес для переписки: О.В. Шадринова, 194291, ул. Сантьяго-де-Куба, д. 1/28, Санкт-Петербург, Российская Федерация, тел.: +7 (812) 3035146, e-mail: olshadr@mail.ru

