

ИММУНООНКОЛОГИЯ

ИЗУЧЕНИЕ ПЕРФОРИНОВОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ НА ФОНЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ

Буркова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г.

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва, Россия.

Перфориновый путь цитолиза клеток мишеней – один из основных механизмов цитотоксического действия эффекторных клеток иммунной системы. Мы представляем данные исследования перфоринового профиля лимфоцитов периферической крови онкологических больных. Данная работа проводится в ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в рамках протокола первой фазы клинического исследования вакцины на основе аутологичных дендритных клеток.

Цель исследования. Изучить перфориновый потенциал эффекторных клеток у онкологических больных на фоне вакцинотерапии.

Материалы и методы. В работе использована вакцина на основе зрелых аутологичных дендритных клеток (фенотип CD83⁺, CD80⁺, CD54⁺, CD86⁺ и HLA-Dr⁺), нагруженных опухолевыми антигенами данного больного. Проведено исследование лимфоцитов периферической крови 6 онкологических больных с диагнозом диссеминированная меланома, которые получали вакцинотерапию через каждые две недели. В качестве контроля исследовали лимфоциты периферической крови 6 доноров. Забор крови для исследования осуществлялся до начала терапии и через две недели после каждого введения, перед очередным введением. Всем больным было проведено не менее 6 вакцинаций. Для исследования иммунофенотипа мононуклеаров периферической крови использовали моноклональные антитела фирмы Becton Dickinson к поверхностным антигенам CD8, CD16, контрольные антитела и антитела для внутриклеточного окрашивания перфорины. Двухцветный анализ фенотипа периферических лимфоцитов проводили на проточном цитофлюориметре FACScan (Becton Dickinson, San Jose, США) с программным обеспечением Lysis II.

Результаты. Было выявлено, что у онкологических больных до начала вакцинотерапии экспрессия перфорины в периферических лимфоцитах составляла 10-30% (у доноров 25-50%). На фоне вакцинотерапии через 3 месяца (6 введений) составила 30-60%. При двухцветном анализе было выявлено, что перфорин экспрессируется в двух популяциях лимфоцитов периферической крови: CD8⁺-лимфоцитах и CD16⁺ клетках. У доноров перфорин-экспрессирующая популяция CD8⁺-клеток составила 50-60% от общего числа CD8⁺-лимфоцитов, а CD16⁺perforin⁺ – 60-80% от общего числа NK клеток. У 60% онкологических больных до начала вакцинотерапии было выявлено высокое количество CD8⁺-клеток (40-45%, при норме 25-30%), при этом у всех больных было отмечено значительно более низкое содержание перфорины в CD8⁺ популяции Т-лимфоцитов – 30-40% клеток.

На фоне вакцинотерапии через 3 месяца (6 введений) CD8⁺perforin⁺ популяция составляла уже 45-55% от общего числа CD8⁺Т-лимфоцитов, при сохранении повышенной экспрессии CD8 в периферической крови. Экспрессия перфорины в популяции естественных киллеров до начала терапии была в пределах нормы (60-70% от общего числа NK-клеток), а на фоне вакцинотерапии увеличилась до 80-100% CD16⁺perforin⁺ популяции клеток.

Таким образом, на фоне вакцинотерапии отмечается активация эффекторного звена иммунной системы, выражающаяся в усилении перфоринового потенциала CD8⁺ Т-лимфоцитов и NK-клеток.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУННОГО СТАТУСА ЖЕНЩИН С КИСТОЗНЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ В МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ И ЯИЧНИКАХ

Бушуева Т.В., Казанцева С.В., Мамин Э.Л.

УРГМА ЦНИЛ, 7 ГКБ, Екатеринбург, Россия

Введение. Роль иммунитета в развитии злокачественных новообразований достаточно широко освещена в отечественной и зарубежной литературе, однако недостаточно изучена при доброкачественных изменениях. Актуальность проблемы вызвана особенностями течения данной патологии. Наибольшая частота выявления кист молочной железы приходится на возраст 40-49 лет, что примерно на 10 лет предшествует пику заболеваемости раком этой локализации, смертность от которого по сравнению с 1980 г. в России увеличилась на 72%.

Кисты яичников являются социальной и медицинской проблемой, т.к. влияют на репродуктивное здоровье женщин.

Цель. Выявить различия показателей общего иммунного статуса у женщин с кистозными изменениями в яичниках и молочной железе.

Материалы и методы. Проведено исследование показателей клеточного иммунитета с использованием моноклональных антител ф. «МедБиоСпектр» г. Москва, лизоцима (Бартова Л.М.1989г.), циркулирующих иммунных комплексов (Гриневиц Ю.А., Алферова А. Н., 1981г.), иммуноглобулины ИФА методом («Протеиновый контур г. Санкт-Петербург») в крови 20 женщин с кистами яичников (первая группа) и 20 женщин с кистами молочной железы (вторая группа) секреторный иммуноглобулин в кистах ИФА методом (ф. «Вектор -Бест»г. Новосибирск). Женщины были сопоставимы по возрасту.

Результаты исследования. При анализе полученных данных у женщин с патологией яичников выявлено снижение соотношения CD4\CD8 субпопуляций лимфоцитов (0,82), что свидетельствует о супрессии клеточного звена иммунитета по Т-хелперному типу, у женщин с патологией молочной железы этот коэффициент имеет нормальное значение (1,16).

Было выявлено достоверное уменьшение лимфоцитов с маркером апоптоза (CD95) у пациенток с кистами молочной железы, возможно, являющееся одним из факторов озлокачествления, вызванного нарушением программируемой гибели клеток ($0,44 \pm 0,074 \cdot 10^9$ в л. и $0,62 \pm 0,13 \cdot 10^9$ в л. соответственно).

Повышенное содержание циркулирующих иммунных комплексов у женщин второй группы ($111,8 \pm 13,38$), и ($52,14 \pm 11,53$) у первой. Вероятно, это вызвано иммунным ответом на измененную ткань молочной железы, являющуюся в данной ситуации антигеном. Закономерным является повышение лизоцима (являющегося фактором защиты слизистых оболочек, в том числе мочеполового тракта) в сыворотке крови женщин с кистозной патологией яичников. Наиболее активна выработка секреторного иммуноглобулина в кистах яичников, которые в большей степени подвержены инфекционному воздействию.

Таким образом, результаты проведенных исследований выявили отличия в иммунограммах женщин с различной локализацией кист. У женщин с патологией молочной железы преобладают иммунные реакции на измененную ткань пораженного органа, а у женщин с кистами в яичниках активированы неспецифические факторы защиты (лизоцим и секреторный иммуноглобулин).

ПОСЛЕОПЕРАЦИОННАЯ ТЕРАПИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИОМ

Виноградов В.М., Герасимов С.В., Молчанов О.Е.

*Центральный научно-исследовательский
рентгенорадиологический институт МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия*

В настоящее время в лечении большинства злокачественных опухолей головного мозга человека используются комбинации таких методов, как хирургическое вмешательство, различные варианты лучевой терапии, химиотерапии и биотерапии. При этом преследуются две цели: усилить разрушающее воздействие на патологический очаг и тем самым увеличить продолжительность жизни и улучшить качество жизни больного. Последний фактор играет решающую роль в выборе степени интенсивности проводимого лечения, так как связан с целым рядом психологических и социальных проблем. После одного только хирургического вмешательства пациенты с глиомами высокой степени злокачественности живут приблизительно три месяца. При комбинации методов выживаемость пациентов с анапластическими астроцитомами может составлять 3-5 лет, а пациентов с глиобластомами – до двух. Однако, несмотря на все усилия исследователей, прогноз у пациентов с глиомами высокой степени злокачественности за последние три десятилетия значительно не улучшился. Одна из причин этого состоит в повышенной резистентности этих опухолей к конвенциональной радио- и химиотерапии, что ведет к тому, что продолжительность жизни пациентов с глиобластомами в большинстве случаев не достигает одного года.

Послеоперационная лучевая терапия остается стандартом терапии злокачественных астроцитов. Большое количество публикаций, содержащих данные об экспериментальных и клинических исследованиях, указывают на определенные преимущества комбинации химиотерапии и радиотерапии. Основной целью сочетания этих мето-

дов является усиление повреждающего действия на опухоль с возможно большей минимизацией повреждения здоровых тканей. Используемые в настоящее время схемы химиотерапии разработаны с целью преодоления таких отрицательных факторов как, например, гематоэнцефалический барьер, препятствующий проникновению препарата к опухоли; или гетерогенности опухолевых клеток, ведущей к развитию устойчивости к фармакологическим агентам.

В последние годы быстро развивается биотерапия – метод лечения онкологических заболеваний, при котором используются вещества, синтезируемые в организме человека, или их аналоги для активации компонентов иммунной системы, направленных на прямое или опосредованное подавление опухоли. Сообщения о применении, в частности, иммунотерапии в лечении опухолей головного мозга демонстрируют ее положительное влияние как на среднюю продолжительность жизни больных, так и на ее качество.

Целью данного исследования являлось повышение эффективности лечения пациентов с глиомами высокой степени злокачественности (G III-IV). Конкретными задачами стали разработка методики интенсивной послеоперационной химиоиммунолучевой терапии, а также оценка ее переносимости и предварительных непосредственных результатов.

Материалы и методы. В отделении протонной терапии Центрального научно-исследовательского института МЗ РФ за период с октября 2002 г. по май 2004 г. проведено комбинированное лечение 14 больных (9 мужчин, 5 женщин) глиомами высокой степени злокачественности (G III-IV). У шести диагностирована анапластическая астроцитома, в восьми случаях – глиобластома. Средний возраст пациентов составлял 51,2 года (от 19 до 68 лет). Они поступали в отделение с верификацией диагноза после хирургического вмешательства различной степени радикальности. При этом все доступные гистологические препараты повторно пересматривались патоморфологами нашего института. До начала лечения пациентам в обязательном порядке выполнялись общеклинические анализы, осмотр окулиста, невролога и исследование малого ментального статуса (опросник RTOG). Затем данные обследования повторялись в ходе и в конце курса лучевой и химиоиммунотерапии. Перед началом облучения больным проводилась МРТ (при необходимости с контрастным усилением), позитронно-эмиссионная томография и сцинтиграфия головного мозга. Части больных выполнялась МР-спектроскопия. Далее МРТ повторяли через 1 неделю после окончания курса лучевой терапии и в процессе иммунотерапии и динамического наблюдения. После проведения соответствующей подготовки осуществлялась лучевая терапия на линейном ускорителе электронов «SL-75-5» в режиме генерации тормозного излучения с граничной энергией 6 МэВ. Ритм облучения – 5 раз в неделю. Разовая очаговая доза (РОД) составляла 3Гр, суммарная очаговая доза (СОД) – 51Гр. Поля формировали таким образом, что вся определяемая по данным МРТ опухоль и зоны субклинического ее распространения были охвачены по краям 90% изодозой.

По достижении СОД 18, 33 и 48 Гр на фоне лучевой терапии осуществлялось введение 1 мг винкристина, а на следующий день – 50 мг гидрана. Через две недели после окончания первого курса комбинированного лечения проводили второй курс химиотерапии. В первый день вводили винкрестин в дозе 1 мг в/в капельно, во второй –

100 мг нидрана. Такие курсы повторяли еще дважды с интервалами в две недели.

После окончания курса лучевой терапии на следующий же день начинался курс иммунотерапии препаратом «Ронколейкин» производства фирмы «Биотех», Санкт-Петербург, являющимся генноинженерным аналогом эндогенного цитокина – интерлейкина-2 (IL-2) человека. Внутривенно медленно капельно вводилось от 1 до 2 млн. МЕ ежедневно до достижения суммарной дозы 10 млн. МЕ. В дальнейшем подобные курсы повторялись вслед за окончанием каждого из адъювантных введений химиопрепаратов, т.е. еще 3 раза.

Результаты. Лечение по предлагаемой методике переносилось большинством больных хорошо. Из побочных эффектов отмечены лучевые эпидермиты, эпиляция в зоне лучевого воздействия, нарастание перифокального отека мозга в патологической зоне. У четырех больных в ходе лучевой, химио- и иммунотерапии отмечалось плохо контролируемое дегидратационной терапией усиление перифокального отека мозга, что проявлялось нарушением сознания от умеренного оглушения до сопора, нарастанием очаговой неврологической симптоматики. У остальных больных на фоне химиотерапии отмечали лишь умеренное недомогание, а при введении ронколейкина – вечернее повышение температуры тела до 39 градусов по Цельсию. Нормализация температуры наступала самопроизвольно к утру следующего дня. Также наблюдалось снижение показателей содержания тромбоцитов в крови, но они ни в одном случае не были критическими и не требовали переливания тромбоцитарной массы. Умерли пять пациентов с глиобластомами. Их средняя продолжительность жизни составила 8,6 месяца (от 7 до 11,5). При этом в четырех случаях определялся большой объем опухоли после хирургического вмешательства, а индекс Карновского при поступлении был менее 50 баллов.

Выводы.

1. Комбинированная терапия по предлагаемой схеме достаточно хорошо переносится больными, а возникающие при ее проведении побочные эффекты удается купировать.

2. Разработанная методика комбинированного лечения позволяет сократить сроки пребывания больных в стационаре по сравнению с конвенциональной терапией.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У БОЛЬНЫХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМ РАКОМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДО И ПОСЛЕ ОПЕРАТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ

Глазанова Т.В., Черников Р.А., Бубнова Л.Н.

Российский НИИ гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования

Дифференцированная карцинома щитовидной железы (ЩЖ) значительно отличается по характеру течения от других злокачественных новообразований. Это т.н. «ленивый» рак, который развивается медленно, и для его манифестации требуется достаточно долгий срок. Согласно данным многих исследований, около 6% человечества имеет опухолевые клетки в ЩЖ, но преобладающее большинство этих людей умирает, так и не узнав об этом. Если хирургическое вмешательство было выполнено в соответствующие сроки и в нужном объеме, данный вид рака считается излечиваемым почти у всех пациентов.

Целью нашего исследования было изучение иммунологических характеристик у больных дифференциро-

ванным раком ЩЖ. Обследовано 39 пациентов с папиллярной или фолликулярной карциномой. У 12 из них диагностирован рак I или II стадии, и они на момент исследования ожидали хирургической операции, а 27 человек уже подверглись оперативному лечению в сроки от 1 до 6 лет до момента исследования и в настоящий момент получали супрессивную терапию L-тироксин. Контрольная группа состояла из 48 здоровых лиц – доноров крови. Мы изучали относительное содержание основных лимфоидных субпопуляций периферической крови (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD20⁺, CD25⁺, CD95⁺, HLA-DR⁺), уровень сывороточных иммуноглобулинов G, A и M и циркулирующих иммунных комплексов низкой и средней молекулярной массы, а также способность к спонтанной и индуцированной продукции IL-6 мононуклеарными клетками периферической крови.

Полученные данные показали высоко достоверное ($p < 0,001$) повышение содержания следующих субпопуляций лимфоцитов: CD3⁺, CD20⁺, HLA-DR⁺ и CD95⁺. В среднем степень повышения варьировала для различных видов лимфоидных фракций от 1,15 раза (CD3⁺) до 1,8 раза (CD95⁺) по сравнению с нормальными величинами. Кроме того, был повышен уровень сывороточного IgM – в 2,15 раза и очень выражено повышена спонтанная продукция IL-6 – более, чем в 20 раз. При этом результаты, полученные в группе пациентов, подвергшихся оперативному лечению и получавших L-тироксин, не отличались от таковых в группе больных, обследованных до операции и не принимавших тиреоидные препараты, что позволяет исключить стимулирующий эффект тиреоидных гормонов на иммунологические показатели.

Таким образом, у больных дифференцированным раком ЩЖ как до, так и после хирургического вмешательства нами не только не было установлено вторичного иммунодефицита, но, напротив, показано наличие выраженной активации иммунной системы. Возможно, именно эта активация вносит свой вклад в благоприятное течение данного злокачественного опухолевого заболевания.

ЗАВИСИМОСТЬ УРОВНЕЙ АКТИВНОСТИ НАД(Ф)-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ОТ СТАДИИ РАКА ЛЕГКОГО

Денисов И.Н., Савченко А.А., Дыхно Ю.А., Лапешин П.В., Московских М.Н., Слепов Е.В.

Красноярская государственная медицинская академия, ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, Красноярский государственный университет, Красноярск, Россия

В настоящее время доказано, что реактивность иммунной системы в значительной степени определяет развитие и течение онкологических заболеваний. В связи с этим в последнее время все чаще отмечается необходимость внедрения патогенетических принципов оценки функционирования системы иммунитета. С этой точки зрения изучение метаболических показателей лимфоцитов определяется как перспективное направление, позволяющее характеризовать уровень иммунореактивности. Целью исследования явилось изучение особенностей уровней активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови в зависимости от стадии рака легкого.

Обследовано 55 больных с раком легкого мужского пола в возрасте 25 – 50 лет. У 7 больных диагностирована I стадия заболевания, у 15 – II стадия, у 19 – III стадия и у 14 – IV стадия. В качестве контроля обследовано 67 здоровых мужчин аналогичного возрастного диапазона. Определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах проводили биOLUMИнесцентным методом.

Исследуемые ферменты локализируются в разных метаболических путях иммунокомпетентных клеток, занимая ключевые позиции, что позволяет по активности ряда исследуемых оксидоредуктаз характеризовать субстратные потоки ряда метаболических путей и циклов. Особенности метаболизма лимфоцитов у больных на I стадии рака легкого проявляются в изменении уровней активности ферментов метаболизма азота, участвующих в реакциях аминокислотного обмена, – снижение активности НАД- и НАДН-зависимых реакций глутаматдегидрогеназы (НАД-ГДГ и НАДН-ГДГ, соответственно) и повышение уровня НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы. При этом ингибирование НАД-ГДГ, осуществляющей перенос продуктов аминокислотного обмена на реакции цикла трикарбоновых кислот, приводит к снижению активности малатдегидрогеназы.

Метаболизм лимфоцитов у больных на II стадии заболевания характеризуется выраженным снижением активности ключевой и инициализирующей реакции пентозофосфатного цикла, продукты которого определяют ряд важнейших процессов макромолекулярного синтеза. Кроме того, повышение активности НАД-ГДГ, соответственно, отражает повышение интенсивности введения интермедиатов на реакции цикла Кребса.

Значительные изменения в интенсивности метаболических реакций лимфоцитов крови выявлены у больных на III стадии рака легкого. Так, увеличение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (основного конкурента гликолиза за субстрат) и ингибирование глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, осуществляющей перенос продуктов липидного катаболизма на реакции гликолиза, соответственно, может привести к снижению интенсивности анаэробного окисления глюкозы, что, по-видимому, и определяется через пониженный уровень анаэробной реакции лактатдегидрогеназы и НАДН-зависимой реакции малатдегидрогеназы. Кроме того, анализ уровней активности исследуемых ферментов митохондриального компартмента иммунокомпетентных клеток у данной группы больных позволяет охарактеризовать также и недостаточность реакций, определяющих интенсивность аэробного дыхания.

При IV стадии рака легкого метаболизм лимфоцитов характеризуется активацией ключевой реакции липидно-

го анаболизма – малик-фермента, а также изменением активности ферментов обмена азота, что в целом выражается в усилении притока субстратов на реакции цикла трикарбоновых кислот.

Таким образом, интенсивность метаболических процессов меняется в процессе развития рака легкого. Причем, если на I и II стадии рака в лимфоцитах крови при ингибировании активности реакций, характеризующих интенсивность цикла трикарбоновых кислот, активность гликолиза сохраняется на уровне контрольного диапазона, то на III и IV стадии рака легкого метаболизм иммунокомпетентных клеток характеризуется оттоком субстратов на реакции макромолекулярного синтеза при ингибировании анаэробного окисления глюкозы. Независимо от стадии рака легкого в лимфоцитах крови больных раком легкого повышается активность глутатионредуктазы и снижается уровень НАДФ-зависимой реакции изоцитратдегидрогеназы, что отражает, соответственно, активацию глутатион-зависимой антиоксидантной системы и ингибирование вспомогательной дегидрогеназной реакции цикла Кребса.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОТЕРАПИИ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Златник Е.Ю., Кузнецов Д.В., Лобанова И.В.

Научно-исследовательский онкологический институт;
Бассейновая больница,
Ростов-на-Дону, Россия

В работе представлена характеристика динамики иммунного статуса 67 больных раком мочевого пузыря, которым после органосохраняющей операции (трансуретральной резекции) в течение 6 мес. проводили различные варианты противорецидивного лечения: 1-я группа получала внутривульварную химиотерапию (ХТ) доксорубицином, 2-я – аналогичное введение БЦЖ, 3-я – реаферона (по 5 млн. МЕ еженедельно). Иммунологическое исследование проводили до операции, через 5 дней после нее и через 10 недель и 6 мес. проведения послеоперационного лечения.

Результаты представлены в таблице. Проведение операции вызвало снижение уровня IgG на фоне повышения IgA, IgM и ЦИК по сравнению с исходными данными.

Как через 10 недель, так и через 6 мес. после операции больные 1-й группы не демонстрировали статистически значимых различий по сравнению с исходным фоном ни по одному из изученных параметров; при этом от раннего послеоперационного срока исследования (5-х суток) отличаются уровень ЦИК, содержание IgM, IgA и количество

ТАБЛИЦА. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ РМП ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДАХ ЛЕЧЕНИЯ

Показатели		CD2+%	CD4+%	CD8+%	CD16+%	CD20+%	IgG г/л	IgA г/л	IgM г/л	ЦИК у.е.	Инд. НСТ
До операции		48,0±2,5	21,0±1,5	10,0±0,9	6,6±1,2	6,3±1,2	16,2±0,7	1,55±0,08	1,4±0,11	190±20	1,64±0,36
После операции (5-е сут.)		46,0±2,5	20,0±1,3	10,0±1,0	11,66±3,75	7,2±0,4	13,0±1,0*	2,01±0,14*	2,07±0,21*	479±90*	1,48±0,28
Через 6 мес.	1-я гр.	47,5±2,1	19,0±1,5	10,2±1,8	8,7±0,8	8,0±1,0	15,0±0,65	1,58±0,16	1,37±0,14	183±24	1,16±0,09
	2-я гр.	50,0±4,2	24,0±5,5	19,0±1,5 *	11,7±0,49	8,5±0,9	15,1±1,06	1,64±0,13	1,4±0,17	199±10	1,6±0,24
	3-я гр.	50,7±4,0	33,0±5,5*	17,0±2,7*	12,25±0,44*	10,3±1,33	13,0±2,14	1,5±0,1	1,28±0,27	150±10	1,75±0,51

Примечание: * – статистически достоверные отличия от исходного фона ($P<0,05$);

• – статистически достоверные отличия от 1-й группы;

•• – статистически достоверные отличия от срока исследования 5 суток

CD16⁺ клеток, вычисленное в абсолютных значениях, которое снизилось с $(0,184 \pm 0,031)$ до $(0,112 \pm 0,021) \times 10^9/\text{л}$, $P < 0,05$.

У больных 2-й группы происходит статистически достоверное повышение процентного содержания CD8⁺ и CD16⁺ клеток в сопоставлении с исходным и с данными больных 1-й группы, по сравнению с которой возрастает также результат НСТ-теста.

Применение реаферона в течение 6 месяцев после операции вызвало улучшение показателей иммунного статуса больных 3-й группы, которое было наиболее благоприятным (таблица): у них статистически достоверно повысился процентный уровень CD4⁺, CD8⁺ и CD16⁺ и CD20⁺ клеток.

Таким образом, применение как БЦЖ, так и реаферона в послеоперационном периоде у больных, подвергавшихся органосохраняющей операции по поводу РМП, вызывает позитивную динамику основных параметров иммунного статуса, более выраженную в последнем случае. Использование химиотерапии без иммунокоррекции не приводит к благоприятным иммунологическим изменениям у больных. Поскольку сохранность регуляторных систем (в том числе и иммунной) обеспечивает более продолжительный безрецидивный период у больных, оперированных по поводу РМП (а проблема рецидивирования у них остается одной из наиболее актуальных), нам представляется особенно важным иммуностроительный эффект, достигнутый с помощью применения иммуномодуляторов в послеоперационном периоде.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОЧЕТАННЫХ ПАРАМЕТРОВ АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАЦИИ В ТКАНЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У БОЛЬНЫХ С ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ.

Казаков С.П., Кушлинский Н.Е..

Главный военный клинический госпиталь им. акад. Н.Н. Бурденко МО РФ, Москва, Россия;
Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия.

Введение. Известно, что в основе трансформации нормальных клеток тканей в доброкачественные и в злокачественные лежат глубокие процессы, связанные с нарушением баланса между процессами пролиферации и программируемой клеточной гибели клеток. Исследование интимных механизмов такого дисбаланса помогает понять процессы перехода клеток из нормальных в опухолевые, что сопровождается сначала снижением функции органов и тканей, а затем полным прекращением выполнения их основной функции. Оценка нарушения количества различных сочетаний клеток, несущих маркеры апоптоза и пролиферации, их плотности внутри- и на поверхности клеток, является актуальной проблемой канцерогенеза. Выявление нарушений, лежащих в основе этих патологических процессов, позволяет не только раскрыть механизмы нарушений, но и улучшить диагностику таких патологических состояний. Наиболее простой моделью такого изучения могут быть трансформационные процессы, происходящие в тканях щитовидной железы и приводящие к развитию доброкачественных и злокачественных новообразований.

Цель исследования. Исследование отдельных и сочетанных параметров апоптоза и пролиферации (p53, bcl-2,

CD95, Ki-67, p53/Ki-67, CD95/p53, bcl-2/Ki-67, CD95/bcl-2, CD95/Ki-67) в группе клеток больших размеров (опухолевых?) ткани щитовидной железы у больных с доброкачественными и злокачественными новообразованиями.

Материалы и методы. Исследованию подвергались гистологически верифицированные участки тканей щитовидной железы от 19 больных, оперированных в ГВКГ им. Н.Н. Бурденко, по поводу злокачественных – папиллярный рак, умеренной дифференцировки у 11 пациентов (ЗН) и 8-ми доброкачественных – аденомы (ДН) заболеваний щитовидной железы. Исследовались соотношения, как отдельных маркеров апоптоза и пролиферации, так и возможные поверхностноклеточные и внутриклеточные сочетания в тканях щитовидной железы, отражающие процессы апоптоза и пролиферации – p53/Ki-67, CD95/p53, bcl-2/Ki-67, CD95/bcl-2, CD95/Ki-67. Использовали внутриклеточные маркеры: пролиферации – Ki-67-PE, апоптоза – p53-Fits – фирмы «Dako» (Дания), bcl-2-Fits и поверхностно-клеточный маркер CD 95-TC – фирмы «Caltag» (США), которые после окраски клеток, взятых из тканей, анализировали в трехцветных протоколах на проточном цитометре COULTER EPICS XL-MCL. В исследовании изначально обеспечивали одинаковые показатели абсолютных (1×10^6 мкл) и относительных (12,7%) количеств клеток. Анализ проводили по группе клеток большого размера, не встречающихся в нормальной ткани.

Результаты. Результаты исследования представлены в таблице. Анализ полученных данных показывает, что при исследовании группы клеток с увеличенными размерами, которые определяются только у больных с новообразованиями (доброкачественными и злокачественными) имеются достоверные различия по количеству клеток с маркером CD95, p53 в зависимости от характера развившейся патологии. Так, количество клеток, несущих FAS-антиген у больных со злокачественными процессами, составило – $21,5 \pm 3,2\%$, в то время, как при доброкачественных трансформациях лишь – $12,5 \pm 3,8\%$, что было статистически достоверно, $p < 0,05$. Статистически достоверные различия получены нами при анализе клеток, содержащих внутриклеточный белок p53. У больных со злокачественными трансформациями количество клеток, содержащих p53, значительно снижалось до уровня – $28,2 \pm 4,8\%$, а при доброкачественных процессах показатели были значительно выше – $55,5 \pm 5,9\%$. Не отмечалось динамики в количестве клеток, содержащих белок bcl-2, в зависимости от степени патологии. Количество клеток, содержащих внутриядерный маркер пролиферации – Ki-67, в сравнении со доброкачественными процессами, при ЗН имело тенденцию к увеличению, по нашему мнению, из-за того, что в выборку попали только умеренно-дифференцированные раки.

Сравнительная характеристика количества клеток с сочетаниями поверхностноклеточных и внутриклеточных маркеров апоптоза и пролиферации показывают, что имеются статистически достоверные различия в зависимости от патологии в CD95/p53, CD95/bcl-2 клетках. Так, при ЗН количество клеток, несущих маркеры CD95/p53, CD95/bcl-2, было значительно выше, чем у больных с ДН и составляло – $20,6 \pm 3,5$ и $20,7 \pm 3,1\%$ против $11,3 \pm 2,8$ и $13,0 \pm 2,5\%$ соответственно ($p < 0,05$). В то же время количество клеток, экспрессирующих в/на себе – p53/Ki-67, CD95/Ki-67, при ЗН имело тенденцию к увеличению, в сравнении с ДН, но было статистически не достоверно.

ТАБЛИЦА. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАРКЕРОВ АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАЦИИ И ИХ СОЧЕТАНИЙ У БОЛЬНЫХ С НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

№	Показатель	Доброкачественные новообразования	Злокачественные новообразования
1.	Кол-во клеток больших размеров, %	12,7	12,7
2.	Кол-во клеток CD95, %	12,5±3,8	21,5±3,2*
3.	Кол-во клеток p53, %	55,5±5,9	28,2±4,8*
4.	Кол-во клеток bcl-2, %	91,2±3,4	94,3±2,8
5.	Кол-во клеток Ki-67, %	3,97±0,9	4,22±1,3
7.	Кол-во клеток p53/Ki-67, %	3,21±1,9	4,66±1,6
6.	Кол-во клеток bcl-2/Ki-67, %	4,07±1,5	3,98±1,8
8.	Кол-во клеток CD95/p53, %	11,3±2,8	20,6±3,5*
9.	Кол-во клеток CD95/bcl-2, %	13,0±2,5	20,7±3,1*
10.	Кол-во клеток CD95/Ki-67, %	3,2±1,2	4,25±1,5

*- $p < 0,05$ – между группами сравнения

Количество клеток с маркерами – bcl-2/Ki-67 находилось на одинаковом уровне в не зависимости от исследуемой патологии и составляло – $4,07 \pm 1,5\%$ при ДН и $3,98 \pm 1,8\%$ при ЗН, статистически достоверно не различаясь.

Заключение. Таким образом, эти диагностические показатели могут иметь важное значение для дифференцировки злокачественного и доброкачественного процесса и могут использоваться для быстрой диагностики (срок выполнения исследования – 5 часов), как предоперационной, так и послеоперационной. Анализ данных по количеству клеток, содержащих белок CD95, p53 и bcl-2 в исследуемых группах больших клеток позволил сделать вывод, что их количество повышалось с развитием ЗН для маркера CD95, снижалось в 2 раза для внутриклеточного белка p53, имело незначительную тенденцию к повышению количества клеток с маркером пролиферации – Ki-67 и не изменялось для bcl-2. В диагностике ЗН и ДН могут быть полезными и определение количеств клеток с сочетанными маркерами, в особенности с CD95/p53, CD95/bcl-2, позволяет дифференцировать эти процессы. Однако, по-нашему мнению, сравнению не подвергались злокачественные трансформации с низкой и высокой степенью дифференцировки, которые могли бы серьезно дополнить полученные в нашем эксперименте данные. Эти исследования и будут предметом нашего дальнейшего изучения.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА БОЛЬНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ГОЛОВЫ И ШЕИ В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЛОКАЛИЗАЦИИ ОПУХОЛИ

Карпов И.А., Васильев С.А., Зурочка А.В.

Центр пластической хирургии «Пластэс»,
НИИ иммунологии, Челябинск, Россия

Важнейшей проблемой является лечение больных со злокачественными опухолями головы и шеи. В России, как и во всем мире, отмечается отчетливая тенденция к постоянному увеличению показателей заболеваемости и смертности от данной патологии. Целью данного клинико-иммунологического исследования являлась оценка иммунного статуса больных после выполнения пласти-

ческих операций и изучение взаимосвязи между состоянием иммунной системы и локализацией злокачественной опухоли.

Основную группу в наших исследованиях составили 100 больных со злокачественными новообразованиями головы и шеи, которым были выполнены радикальные оперативные вмешательства с пластикой образовавшегося дефекта. При выполнении поставленной цели нами сформированы 3 группы пациентов с различным расположением новообразований: орофарингеальная область, включающая опухоли языка, дна полости рта, верхней и нижней челюсти, верхней и нижней губы (первая группа) – 44 человека; опухоли органа зрения (II группа) – 28 и третья группа относительно редких в наших исследованиях локализаций (область носа, уха, шеи, свода черепа) – 28 человек.

Иммунный статус больных оценивался на 2-4 сутки после операции и складывался из изучения клеточных и гуморальных факторов иммунитета. Содержание лейкоцитов было повышено во всех трех выделенных группах, но без статистически значимой разницы с показателями здоровых доноров. Относительное и абсолютное количество лимфоцитов было снижено во всех группах, но наиболее значительно у больных с новообразованиями органа зрения и орофарингеальной области ($p < 0,001$). Содержание CD3⁺ клеток было резко снижено во всех группах обследованных, но наиболее существенно во второй и третьей ($p < 0,02$). Содержание CD4⁺ лимфоцитов снижалось у больных с редко встречаемыми локализациями ($p < 0,05$), в то время как в других группах сдвиги были выражены не столь значительно. Количество ЦТЛ было незначительно снижено у всех больных без статистически значимой разницы. Во всех группах наблюдалось снижение иммунорегуляторного индекса, но у больных I и II, это была статистически значимая разница, причем в достоверно большей степени у пациентов III группы. Количество CD10⁺ клеток было недостоверно выше показателей здоровых доноров и практически одинаковым во всех группах. Содержание CD16⁺ лимфоцитов было снижено у больных II и III групп. Количество CD25⁺, CD56⁺, CD95⁺ лимфоцитов находилось в пределах нормы, не отличаясь от показателей здоровых доноров. Количество HLA-DR⁺ клеток значительно снижалось в группе больных с опухолями органа зрения ($p < 0,002$). В гуморальном звене иммунитета также имелись отклонения. Содерж-

жение CD20-позитивных лимфоцитов было достоверно выше нормы у всех обследованных пациентов. Повышение содержания IgA было наиболее значительным в I группе больных. Количество IgM и G находилось в пределах нормы у всех обследуемых пациентов. Абсолютное и относительное содержание нейтрофилов крови больных возрастало к 2-4 суткам послеоперационного периода, причем во всех группах такое увеличение было достоверным. Состояние фагоцитарной функции гранулоцитов (активность и интенсивность фагоцитоза), а также лизосомальная активность были наиболее снижены в I группе пациентов. Спонтанная и индуцированная НСТ-редуцирующая активность оставались в пределах нормы у всех наблюдаемых групп. Снижение функционального резерва было выявлено в I и III группах пациентов.

Таким образом, глубина и характер изменений в содержании субпопуляций лимфоцитов, концентрации иммуноглобулинов и функции нейтрофилов мало зависят от локализации опухоли – сдвиги иммунологических показателей были практически одинаковыми у больных с опухолями органа зрения, офтальмогенной области и опухолями других локализаций.

АПОПТОЗ И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЛЕЧЕНИЯ КАРЦИНОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Князькин И.В., Бубнов В.А., Цыган В.Н.

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Генетическая пластичность опухолевых клеток приводит к изменениям, которые придают им селективные ростовые преимущества. В частности, возможен ряд мутаций, помогающих избежать иммунной защиты и повысить устойчивость к действию химиотерапевтических средств – индукторов апоптоза.

Проведено обследование 26 больных со злокачественными опухолями мочевого пузыря. Оценивали: уровень экспрессии Fas рецептора и его лиганда FasL; иммунореактивность различных молекул семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bax, Bcl-x), белка p53. Проводилось сравнение со стандартными прогностическими показателями. Установлено, что Fas, FasL, белки Bcl-2, p53, Bax и другие апоптотические факторы определяются практически во всех случаях. Установлены некоторые особенности взаимосвязи экспрессии исследованных апоптотических факторов со стадией заболевания, степенью злокачественности и прогнозом лечения. Наиболее очевидной оказалась корреляция экспрессии FasL со степенью злокачественности карциномы мочевого пузыря. Очевидно, это отражает нарушение иммунного надзора за счёт взаимодействия FasL, экспрессирующегося на опухолевых клетках с рецепторами Fas цитотоксических лимфоцитов. В других случаях прямых связей между экспрессией какого-либо одного из исследованных факторов, прогрессией опухолей и устойчивостью клеток к апоптозу не установлено. Проведённый факторный анализ показал, что сравнительно независимым для благоприятного прогноза может быть повышение уровня экспрессии Bax, при условии отсутствия аналогичных изменений со стороны Bcl-2.

Полученные результаты предполагается использовать в дальнейшем для совершенствования диагностики и схем терапии больных. Целесообразно расширить спектр исследуемых показателей оценки состояния апоптотических механизмов, в частности, за счёт определения комплекс-

ных параметров, характеризующих коэкспрессию про- и антиапоптотических белков, что должно быть более информативно для оценки прогноза поведения опухоли и клинического исхода, чем уровень экспрессии индивидуального маркера.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО РЕАГИРОВАНИЯ В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ С ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМ И НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Коценко Т.М., Рудаков Д.М., Хайруллина Р.М.

Детская республиканская клиническая больница, Уфа, Россия

Основная цель работы: Характеристика особенностей иммунологического реагирования у пациентов с высокодифференцированным и недифференцированным раком желудка по данным ДНК-цитометрии.

Результаты и обсуждение. За период с 05.2003 г. по 02.2004 г. нами было обследовано 47 больных с диагнозом высокодифференцированная аденокарцинома желудка, 17 больных с диагнозом недифференцированный рак желудка, проходивших стационарное лечение в отделении абдоминальной хирургии и амбулаторное обследование в эндоскопическом отделении Городской клинической больницы №18 (г. Уфа). Возраст обследованных больных был в пределах от 34 до 64 лет; чаще страдали мужчины (68%), чем женщины (32%). При проведении цитометрии крови больных раком желудка были получены следующие данные (см. табл.).

Из таблицы видно, что у больных высокодифференцированным раком желудка (ВДрж) наблюдалось статистически достоверное увеличение процентного содержания CD3⁺, CD4⁺ лимфоцитов по сравнению с контрольными данными, в то время как у пациентов с недифференцированным раком желудка (НДрж) содержание CD3⁺ фракции не отличалось от показателей контрольной группы (CD3⁺ – 66 и 65% соответственно), количество же хелперной субпопуляции (CD4⁺) было ниже контрольных величин. Содержание CD8⁺ субпопуляции достоверно не отличалось в обеих группах пациентов и было выше показателей контрольной группы (р меньше 0,05). Количество натуральных киллеров (CD16⁺/CD56⁺) в группе ВДрж не отличалось от показателей контрольной группы и нормативных данных, но значительно (на 64%) превышало норму в группе больных с НДрж.

Концентрация иммуноглобулинов основных классов в группе ВДрж была ниже, чем в контрольной группе, но не выходила за границы среднестатистического диапазона нормативных величин; содержание В-лимфоцитов (CD19⁺) в этой группе было достоверно (на 54,2%) ниже, чем в контроле. В группе пациентов с НДрж содержание IgA, M, G в периферической крови было ниже, чем в группе контроля и на нижней границе нормативного диапазона при значительно более низком (на 20,9% ниже, чем в группе больных с ВДрж), относительным содержанием CD19⁺ субпопуляции.

Оценка кислород-зависимой микробоцидности полиморфоядерных нейтрофилов (ПЯН) выявила значительное усиление ее в группе НДрж, в отличие от группы ВДрж по сравнению с контролем и нормативными данными.

По результатам оценки иммунного статуса исследуемых групп больных нами сделан ряд **выводов:**

ТАБЛИЦА. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БОЛЬНЫХ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМ ЖЕЛЕЗИСТЫМ И НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Показатель	Клинико-морфологические группы			
	ВДрж	НДрж	Норма	Контроль
Total T (CD3+)(%)	74	66	52,0-76,0	65
T + B + NK	104	99	95,0-105,0	105
CD4/CD8(%)	1,27	1,00	1,0-1,7	1,25
Total B (CD19+)(%)	13	8	6,0-18,0	24
T Help (CD3+.CD4+)(%)	42	33	31,0-46,0	35
T Suppr (CD3+.CD8+)(%)	33	33	23,0-40,0	28
Total NK (CD16+/CD56+)(%)	17	25	9,0-19,0	16
Светосумма(у.е.)	17,50	14,91	2,49-4,82	4,49
Наклон(у.е./мин)	1,36	0,8	0,20	0,18
Ig A(г/л)	1,20	0,82	0,90-4,5	3,94
Ig M(г/л)	1,78	0,71	0,70-2,80	1,56
Ig G(г/л)	9,2	6,8	8,0-18,0	9,3

1. В группе больных с ВДрж общую направленность изменений в системе иммунного гомеостаза можно расценить как активационную (увеличено относительное содержание CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ субпопуляций, ИРИ в пределах нормальных величин). Соотношение CD16⁺/CD8⁺ = 0,52.

2. В группе НДрж активации Т-клеточного ответа не отмечено: содержание CD3⁺, CD4⁺ не отличаются от контрольных показателей; относительное содержание CD8⁺ было несколько выше нормы, что привело к снижению ИРИ до 1,0. Выявлена супрессия гуморального ответа, заключающаяся в снижении содержания основных классов иммуноглобулинов наряду с низким относительным содержанием В-лимфоцитов. Обратило на себя внимание высокое содержание натуральных киллеров (CD16⁺), соотношение CD16⁺/CD8⁺ = 0,76.

Таким образом, анализируя особенности иммунного ответа в группах ВДрж и НДрж, мы сделали заключение об активации Т-клеточного звена при неизменном гуморальном ответе в группе больных ВДрж, и дисбалансе Т-клеточного ответа на фоне значительной супрессии гуморального и повышении относительного содержания натуральных киллеров при увеличенном соотношении CD16⁺/CD8⁺, – в группе пациентов с НДрж.

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ И ЛИМФОУЗЛОВ У БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

Лапешин П.В.

Красноярская государственная медицинская академия, Россия

Рост опухоли сопровождается изменением активности функционального состояния иммунной системы. В настоящее время значительный интерес вызывает иммунная функция лимфоузлов. Связано это с тем, что, с одной стороны, именно в лимфоидной ткани (в том числе и в лимфоузлах) осуществляется наработка специфических Т- и В-лимфоцитов, осуществляющих иммунный надзор, тогда как с другой стороны, внутрилегочные лимфоузлы при раке легкого одними из первых подвергаются мета-

стазирования. Таким образом, целью исследования явилось сравнительное изучение фенотипического состава лимфоцитов крови и лимфоузлов корня легкого у больных аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого.

Материалы и методы. На базе торакального отделения Красноярского краевого онкологического диспансера обследовано 90 мужчин с раком легкого в возрасте 30 – 55 лет. Всем пациентам выполнены расширенные лоб-, биллоб- и пульмонэктомии. Во время операции, при проведении широкой лимфодиссекции, на исследование забиралась лимфатическая узлы корня легкого. Выделение общей фракции лимфоцитов крови и лимфоузлов осуществляли по общепринятому методу в градиенте плотности фиколл-верографина с последующей очисткой от прилипающих клеток. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител. При исследовании особенности фенотипического состава лимфоцитов крови у больных раком легкого обнаружено, что у больных плоскоклеточным раком (ПКР) и аденокарциномой изменение популяционного и субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток относительно контрольных показателей во многом совпадает. Так, независимо от гистологии рака легкого у больных в периферической крови повышается концентрации лейкоцитов при понижении относительно содержания общих лимфоцитов, CD3⁺-клеток и величины иммунорегуляторного индекса. Кроме того, у больных ПКР и аденокарциномой легкого относительно контрольных показателей снижается относительная и абсолютная концентрация CD4⁺-лимфоцитов, но при повышении содержания CD72⁺- и HLA-DR⁺-клеток. Только у больных ПКР легкого относительно контрольного диапазона повышается процентное содержание CD16⁺-лимфоцитов. В то же время, у больных с аденокарциномой легкого относительно показателей больных ПКР повышены абсолютная и относительная концентрация CD8⁺-лимфоцитов, а также выявляется тенденция к повышению величины индекса активации Т-лимфоцитов. При сравнении фенотипического состава лимфоцитов лимфоузлов обнаружено, что у больных аденокарциномой относительно показателей больных ПКР повышено процен-

тное содержание CD3⁺- и CD4⁺-клеток, но снижена величина индекса активации Т-лимфоцитов. С помощью корреляционного анализа установлено, что взаимосвязи между величинами концентраций иммунокомпетентных клеток крови и лимфоузлов значительно различаются у больных ПКР и аденокарциномой. Причем, у больных ПКР данных взаимосвязей значительно больше, чем у больных аденокарциномой. У больных аденокарциномой выявляется значительно меньше корреляционных связей между популяционным и субпопуляционным составом лимфоцитов крови и лимфоузлов. Кроме того, фенотипический статус иммунокомпетентных клеток крови больных аденокарциномой характеризуется повышенным содержанием фракции Т-супрессоров/киллеров по сравнению с больными ПКР. В то же время, только у больных ПКР выявлено повышение относительной концентрации НК-лимфоцитов, т.е. популяции лимфоцитов, обладающей противоопухолевой активностью. У больных ПКР более выражена взаимосвязь фенотипического статуса лимфоцитов крови и лимфоузлов, чем у больных с железистым раком легкого.

Заключение. При сравнительном исследовании особенностей фенотипического статуса иммунокомпетентных клеток крови и лимфоузлов у больных с различной гистологической структурой рака легкого обнаружено, что у больных ПКР и аденокарциномой выявляется значительное сходство изменений в популяционном и субпопуляционном составе лимфоцитов крови, которые выражаются в снижении концентрации Т-лимфоцитов и Т-хелперов/индукторов при повышении содержания В-лимфоцитов. Только у больных ПКР в периферической крови повышается содержание НК-клеток. У больных ПКР и аденокарциномой установлены особенности в фенотипическом статусе лимфоцитов в лимфоузлах корня легкого, которые выражаются в относительном повышении содержания Т-лимфоцитов и Т-хелперов/индукторов у больных аденокарциномой. При этом у больных ПКР обнаружены более выраженные корреляционные связи между содержанием соответствующих типов иммунокомпетентных клеток крови и лимфоузлов, что позволяет предположить у больных данной группы менее выраженную интенсивность иммунных процессов в лимфоузлах.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ РАКА ЛЕГКОГО

Лапешин П.В., Денисов И.Н., Московских М.Н.

Красноярская государственная медицинская академия, ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, Красноярск, Россия

Иммунологическая реактивность организма значительно меняется в процессе канцерогенеза. Ряд исследователей считают, что опухоль, влияя на процессы созревания и селекции Т-лимфоцитов, индуцирует системную иммуносупрессию (Головизнин М.В., 2001; Олейник Е.К. с соавт., 2001). Причем данная иммуносупрессия проявляется в весьма широком диапазоне – от незначительной степени до выраженной иммунной недостаточности. Именно с развитием иммунной недостаточности связывают неэффективность противоопухолевой терапии. Одним из подходов к изучению механизмов развития иммуносупрессии при опухолевом росте является исследование фенотипического состава лимфоцитов, которое ха-

рактеризует не только принадлежность клеток к той или иной популяции или субпопуляции, но и позволяет определять их функциональную активность.

Целью исследования явилось изучение особенности фенотипического состава лимфоцитов периферической крови в зависимости от стадии рака легкого. Обследовано 55 больных с раком легкого мужского пола в возрасте 25 – 50 лет. У 7 больных диагностирована I стадия заболевания, у 15 – II стадия, у 19 – III стадия и у 14 – IV стадия. В качестве контроля обследовано 67 здоровых мужчин аналогичного возрастного диапазона. Общую фракцию лимфоцитов из венозной крови выделяли по общепринятому методу в градиенте плотности фиколла-верографина с последующей очисткой от прилипающих клеток. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD72 и HLA-DR. Дополнительно для морфологической и функциональной характеристики состояния клеточного звена иммунной системы вычисляли величины лейко-Т-клеточного (Лейкоциты/CD3⁺) и лейко-В-клеточного (Лейкоциты/CD72⁺) соотношения, а также определяли величины иммунорегуляторного индекса (CD4⁺/CD8⁺) и индекса активации Т-лимфоцитов (HLA-DR⁺/CD72⁺). Обнаружено, что на I стадии рака легкого выявляются минимальные изменения исследуемых фенотипических характеристик иммунокомпетентных клеток относительно контрольных показателей. У больных на данной стадии рака легкого повышается относительное содержание CD72⁺-лимфоцитов и клеток, экспрессирующих антигены главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR⁺-клетки). В то же время, уже на II стадии рака легкого выявляется повышение уровня лейкоцитов в крови и абсолютной концентрации CD8⁺-клеток, при снижении относительного содержания общих лимфоцитов. Кроме того, у больных II стадии рака легкого в периферической крови повышается относительная и абсолютная концентрация HLA-DR⁺- и CD72⁺-лимфоцитов и величины индекса активации Т-лимфоцитов и лейко-Т-клеточного соотношения. Только у больных на данной стадии развития рака снижается относительная и абсолютная концентрация CD16⁺-клеток. У больных на III стадии рака легкого концентрация лейкоцитов в крови остается повышенной. Также остается сниженной относительное содержание общих лимфоцитов. У больных данной стадии рака легкого выявляется повышение относительной концентрации CD8⁺-, CD16⁺-, HLA-DR⁺- и CD72⁺-лимфоцитов. В результате подобных изменений фенотипического состава лимфоцитов периферической крови снижаются величины иммунорегуляторного индекса и индекса активации Т-лимфоцитов. У больных на IV стадии выявляются максимальные уровни концентрации лейкоцитов в периферической крови, в то время как относительное содержание общих лимфоцитов, CD3⁺- и CD4⁺-клеток минимально. У больных на данной стадии рака легкого относительная концентрация HLA-DR⁺-лимфоцитов остается повышенной. Кроме того, у больных данной группы установлено увеличение абсолютной концентрации CD72⁺-лимфоцитов и величины лейко-Т-клеточного соотношения. Таким образом установлено, что на всех стадиях рака легкого в периферической крови повышено содержание лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности антигены главного комплекса гистосовместимости II класса. В результате нашего исследова-

дования, исходя из величины индекса активации Т-лимфоцитов, можно заключить, что количество активированных Т-лимфоцитов повышается только на II стадии рака легкого и минимально – на III стадии, то есть на I, III и IV стадиях повышение концентрации клеток, экспрессирующих HLA-DR-рецептор, определяется увеличением содержания В-лимфоцитов. Изменение концентрации Т-лимфоцитов и регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови больных раком легкого характеризует повышение напряженности в системе клеточного иммунитета от I стадии к IV. При этом, морфологический состав иммунокомпетентных клеток крови у больных на IV стадии рака легкого определяет снижение реактивности клеточного звена иммунной системы.

ОСОБЕННОСТЬ ФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ И ЛИМФОУЗЛОВ У БОЛЬНЫХ АДЕНОКАРЦИНОМой И ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

**Лапешин П.В., Савченко А.А., Дыхно Ю.А.,
Московских М.Н., Денисов И.Н., Коленчукова О.А.**

Красноярская государственная медицинская академия, ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, Красноярск, Россия

Целью исследования явилось сравнительное изучение фенотипического состава лимфоцитов крови и лимфоузлов корня легкого у больных аденокарциномой и плоскоклеточным раком (ПКР) легкого. На базе торакального отделения Красноярского краевого онкодиспансера обследовано 90 больных раком легкого. Всем пациентам выполнены расширенные лоб- и пульмонэктомии. Во время операции, при проведении широкой лимфодиссекции, на исследование забирались лимфатические узлы корня легкого. В качестве контроля обследовано 106 здоровых мужчин, у которых была взята кровь для иммунологических исследований. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. Для дополнительной характеристики Т-клеточного звена иммунной системы вычисляли иммунорегуляторный индекс ($CD4^+/CD8^+$) и индекс активации Т-лимфоцитов ($HLA-DR^+/CD72^+$).

При исследовании особенности фенотипического состава лимфоцитов крови у больных раком легкого обнаружено, что у больных ПКР и аденокарциномой изменение популяционного и субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток относительно контрольных показателей во многом совпадает. Так, независимо от гистологии рака легкого у больных в периферической крови повышается концентрация лейкоцитов при понижении относительного содержания общих лимфоцитов, $CD3^+$ -клеток и величины иммунорегуляторного индекса. Кроме того, у больных ПКР и аденокарциномой легкого относительно контрольных показателей снижается относительная и абсолютная концентрация $CD4^+$ -лимфоцитов, но при повышении содержания $CD72^+$ - и $HLA-DR^+$ -клеток. Только у больных ПКР легкого относительно контрольного диапазона повышается процентное содержание $CD16^+$ -лимфоцитов. В то же время, у больных с аденокарциномой легкого относительно показателей больных ПКР повышена абсолютная и относительная концентрация $CD8^+$ -лимфоцитов, а также выявляется тенденция к повышению величины индекса активации Т-лимфоцитов. При сравнении фенотипического состава лимфоцитов

лимфоузлов обнаружено, что у больных аденокарциномой относительно показателей больных ПКР повышено процентное содержание $CD3^+$ - и $CD4^+$ -клеток, но снижена величина индекса активации Т-лимфоцитов. С помощью корреляционного анализа установлено, что взаимосвязи между величинами концентраций иммунокомпетентных клеток крови и лимфоузлов значительно различаются у больных ПКР и аденокарциномой. Причем у больных ПКР данных взаимосвязей значительно больше, чем у больных аденокарциномой. Так, у больных ПКР обнаружены положительная корреляционная связь между уровнями процентного содержания $CD3^+$ - ($r=0,70$, $p<0,05$) и $CD16^+$ -лимфоцитов ($r=0,63$, $P<0,05$) крови и лимфоузлов. У больных данной группы относительная концентрация $CD4^+$ -клеток крови также положительно взаимосвязана с содержанием $CD3^+$ - и $CD4^+$ -лимфоцитов в лимфоузлах ($r=0,71$ и $r=0,69$, соответственно, $p<0,05$). В то же время, у больных ПКР относительное содержание $CD72^+$ -лимфоцитов отрицательно коррелирует с уровнем $CD3^+$ - и $CD8^+$ -клеток в лимфоузлах ($r=-0,85$, $p<0,01$ и $r=-0,72$, $p=0,05$, соответственно). У больных аденокарциномой выявляется значительно меньше корреляционных связей между популяционным и субпопуляционным составом лимфоцитов крови и лимфоузлов. Так, у больных данной группы выявляется положительная взаимосвязь между относительной концентрацией $CD16^+$ -лимфоцитов крови и величиной индекса активации Т-лимфоцитов ($r=0,79$, $p<0,05$), а также обнаружены отрицательные корреляционные связи процентного содержания $HLA-DR^+$ -клеток крови с концентрацией $CD4^+$ -лимфоцитов и величиной иммунорегуляторного индекса ($r=-0,82$ и $r=-0,73$, $p<0,05$).

Таким образом, при сравнительном исследовании особенностей фенотипического статуса иммунокомпетентных клеток крови и лимфоузлов у больных с различной гистологической структурой рака легкого обнаружено, что у больных ПКР и аденокарциномой выявляется значительное сходство изменений в популяционном и субпопуляционном составе лимфоцитов крови, которые выражаются в снижении концентрации Т-лимфоцитов и Т-хелперов/индукторов при повышении содержания В-лимфоцитов. Только у больных ПКР в периферической крови повышается содержание НК-клеток. У больных ПКР и аденокарциномой установлены особенности в фенотипическом статусе лимфоцитов в лимфоузлах корня легкого, которые выражаются в относительном повышении содержания Т-лимфоцитов и Т-хелперов/индукторов у больных аденокарциномой. При этом у больных ПКР обнаружены более выраженные корреляционные связи между содержанием соответствующих типов иммунокомпетентных клеток крови и лимфоузлов.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ПРЕДРАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ И РАКЕ ГОРТАНИ

Махов В.А.

*Государственный институт усовершенствования
врачей, Новокузнецк, Россия*

В структуре злокачественных новообразований ЛОР-органов рак гортани занимает первое место (Пачес А.И., 2000). Его доля среди злокачественных опухолей верхних дыхательных путей составляет 65-70% (Вержицкий

Г.В., 1986; Терещенко И.В. и соавт., 1994; Кицманюк З.Д. и соавт., 1998).

Несмотря на постоянное совершенствование хирургического и лучевого метода лечения рака гортани, сколько-нибудь определенно снизить показатели летальности не удалось. При этом существенные успехи в лечении, как правило, достигнуты только на ранних стадиях заболевания (Кицманюк З.Д. и соавт., 1998).

По данным ряда авторов, рак гортани выявляется в III-IV стадиях – в 65-68% случаев (Огольцова Е.С., 1984; Ольшанский В.О. и соавт., 1990; Пачес А.И., 1997, 2000; Rzewnicki I. et al., 2002). Это указывает на недостаточность ранней диагностики рака гортани.

Одним из решений данной проблемы является поиск новых онкомаркеров, на роль которых, в значительной мере, претендуют пептиды кооперации иммунной системы – интерлейкины.

Остановимся на двух интерлейкинах, которые играют одну из лидирующих ролей в онкогенезе – это провоспалительные цитокины – интерлейкин-1 β (IL-1 β) и интерлейкин-6 (IL-6).

Наличие IL-1 – обязательное условие формирования практически всех этапов иммунологического ответа, в первую очередь благодаря способности активировать антигенпрезентирующие клетки и CD4⁺-лимфоциты, влиять на дифференцировку В-лимфоцитов и др. IL-1 активирует естественные киллеры, участвует в регуляции продукции интерлейкина (IL) 2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF и других цитокинов. При этом активными ингибиторами продукции IL-1 являются факторы роста (TGF), интерферон – гамма (IFN- γ) (Berhinmaer S.A., 2001), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-10 (IL-10), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-19 (IL-19), фактор некроза опухоли – α (TNF- α) (Dinarello C.A., 1998).

Значительное число работ посвящено и изучению роли в опухолевом процессе другого провоспалительного цитокина – интерлейкина-6 (IL-6). Подобно IL-1, IL-6 наряду с выраженными провоспалительными обладает и иммуномодулирующими свойствами (Rohn W. et al., 1999). Из последних следует отметить участие в индукции иммунологического ответа способности к регуляции дифференцировки В-лимфоцитов и усиление антителообразования, модуляцию противоопухолевой активности макрофагов вместе с IL-1.

Целью настоящей работы было изучить возможность использования определения концентрации IL-1 и IL-6 сыворотки крови для дифференциальной диагностики рака и предрака гортани.

Материалы и методы. Первую (основную) группу составили 40 больных с клинически достоверным диагнозом рак гортани (РГ), находившиеся в клинике ГКБ № 1 г. Новокузнецка. При гистологической верификации диагноза были получены следующие данные: высокодифференцированный рак выявлен у 37 пациентов (92,5%), высокодифференцированный с участками умеренной дифференцировки у 2 больных (5%), низкодифференцированный рак у 1 больного (2,5%). Все наблюдения относились к плоскоклеточному раку. Обследование данной группы больных проводили до какого-либо лечения.

Вторую группу (группу сравнения) составляли пациенты с предраковыми заболеваниями гортани (ПРГ) – 31 пациент. Возраст больных варьировался в широких пределах – от 23 до 75 лет, при этом средний возраст обследованных составил 47 $\pm$ 2 года (M $\pm$ m). Данную группу составили пациенты с хроническим гиперпластическим ла-

рингитом, лейкокератозом гортани и папилломами гортани. Давность заболевания, по анамнестическим данным, варьировалась от 3 месяцев до 3 лет.

Материалы и методы. Определение концентрации интерлейкинов в сыворотке крови выполнялось твердофазным иммуноферментным методом на тест-системах «ProCon IL-1 β » и «ProCon IL-6» (Протеиновый контур-Тест, Санкт-Петербург, Россия) по инструкции изготовителя. Статистические методы: попарное межгрупповое сравнение показателей производилось по U-критерию Манна-Уитни с использованием пакета SPSS 12 (SPSS Lab., США).

Концентрация IL-1- β в крови больных раком гортани до лечения (M $\pm$ m) составляет 18 $\pm$ 2 пг/мл (CI 95% 13 – 23), у пациентов с предраковыми заболеваниями гортани 35 $\pm$ 5 пг/мл (CI 95% 24 – 46). При этом значение IL-1-бета статистически значимо различалось во всех группах (p<0,05).

Концентрация IL-6 в крови больных раком гортани составляет 65 $\pm$ 4 (CI 95% 57 – 74) пг/мл, у пациентов с предраком гортани 40 $\pm$ 3 (CI 95% 33 – 48) пг/мл. Значение IL-6 статистически значимо различалось во всех группах (p<0,05).

Для оценки диагностической чувствительности, т.е. способности метода распознать заболевание (в данном случае отдифференцировать рак от предрака), и диагностической специфичности – т.е. дать отрицательный результат при отсутствии заболевания, произведен соответствующий расчет показателей.

Оптимальное соотношение чувствительности и специфичности метода (чувствительность 81%, специфичность 78%) определяется при точках раздела для IL-6 в 40 пг/мл, а для IL-1 β 18 пг/мл.

По нашему мнению, представленные данные свидетельствуют о диагностических возможностях использования определения концентрации IL-6 и IL-1- β в комплексной диагностике новообразований гортани.

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ

Огородникова М.В., Бурова О.С., Морозова Л.Ф., Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В.

ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия

Целью нашей работы было исследовать экспрессию внутриклеточных маркеров Bcl-2, Bax, p53 на клеточных линиях меланомы.

В работе было исследовано 14 клеточных линий, полученных из образцов, которые были взяты у пациентов с диагнозом метастатическая меланома кожи. Все клеточные линии прошли более 40 пассажей.

Иммуноцитохимическое исследование. Из полученных клеточных линий готовили цитопрепараты осаждением суспензии клеток на цитоцентрифуге Universal 16A (Германия), просушивали на воздухе, хранили при -20 $^{\circ}$ C. Для проведения реакции стекла прогревали до комнатной температуры, фиксировали 1-2 минуты в охлажденном (-20 $^{\circ}$ C) ацетоне.

Процедура окрашивания. Фиксированные цитопрепараты промывали в PBS 5 минут. Блокировали эндогенную пероксидазу 3% раствором перекиси водорода в течение 20 минут, образцы промывали в двух сменах PBS

10 минут. Затем инкубировали с 1% раствором БСА 20 минут при комнатной температуре, после этого, избыток раствора удаляли и, не промывая образцы, наносили первичные антитела Bcl-2, Вах, p53 (Dako Corp), инкубировали в течение ночи на холоде (+4°C). Образцы промывали в трех сменах PBS. Для визуализации реакции применяли систему LSAB+Detection System (Dako Corp) согласно инструкции. Выявление ферментативной активности проводили с помощью АЕС, докрашивали гематоксилином. Подсчет проводили в областях с максимальным окрашиванием на 200-300 опухолевых клеток используя микроскоп «Axiolab» (ZEISS, Германия).

Результаты исследования. Иммуноцитохимическое исследование провели на 14 клеточных линиях меланомы. Экспрессию всех исследованных маркеров наблюдали в цитоплазме клеток (Bcl-2, Вах), в ядре (p53) с различной интенсивностью. Отсутствие окрашивания или слабое окрашивание принимали за негативную реакцию, окрашивание со средней и сильной интенсивностью – положительная реакция. Экспрессию p53 наблюдали в 5 из 14 исследованных образцах, что составляет 35,7%. Экспрессию Bcl-2 – в 6 из 14 образцов, что составляет 42,8%. Экспрессию Вах – в 9 из 14 образцов, что составляет 64,2%. В зависимости от экспрессии Вах наблюдали следующую тенденцию: в Вах положительных линиях отсутствовала экспрессия p53, Bcl-2, что составляло 8 из 14 образцов (57,1%).

Заключение: исследование экспрессии маркеров Bcl-2, Вах, p53 поможет отобрать те клеточные линии меланомы (Вах положительные), которые в дальнейшем будут использованы как модели для скрининга и изучения лекарственной резистентности препаратов различных классов, вызывающих апоптоз.

ПОЛИМОРФИЗМ GSTM1 И ОСОБЕННОСТИ УРОВНЕЙ АКТИВНОСТИ ОКСИДОРЕДУКТАЗ В КЛЕТКАХ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Савченко А.А., Лапешин П.В., Маркова Е.В., Дыхно Ю.А., Московских М.Н., Денисов И.Н.

ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, Красноярская государственная медицинская академия, Россия

В настоящее время рак легкого занимает ведущее место в структуре онкологической заболеваемости. При этом рост заболеваемости связывают не только с улучшением диагностики и общим старением населения, но и с повышением степени загрязнения окружающей среды и генетическими факторами. Среди генетических факторов наибольшее значение имеют протоонкогены, а также гены «предрасположенности». Рядом исследований показано, что полиморфизм гена GSTM1 (глутатион-S-трансферазы M1) – фермента биотрансформации ксенобиотиков служит фактором риска развития рака легкого. Большой интерес представляет фенотипическое проявление полиморфизма гена GSTM1 на уровне клеточного метаболизма. Связано это с тем, что система катаболизма ксенобиотиков, с одной стороны, использует субстратные и энергетические ресурсы клетки, с другой стороны, осуществляя биотрансформацию ксенобиотиков, защищает метаболическую систему от воздействия патогенных факторов.

Целью исследования явилось изучение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в клетках опухолевой

ткани у больных раком легкого в зависимости от полиморфизма гена GSTM1.

На базе торакального отделения Красноярского краевого онкологического центра обследовано 30 больных мужского пола с раком легкого. Ткань легкого забиралась во время операции. Определение активности дегидрогеназ в опухолевой и здоровой ткани легкого проводили биoluminesцентным методом. Анализ генетического полиморфизма GSTM1 гена проводили методом мультиплексной ПЦР.

При исследовании особенностей уровней активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого с различным генотипом в отношении гена GSTM1 обнаружено, что в клетках здоровой ткани при «нулевом генотипе» статистически достоверно повышены уровни глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), малик-фермента (НАДФМДГ) и глутатионредуктазы (ГР). Кроме того, в клетках здоровой ткани при GSTM1 0/0 значительно снижены уровни активности НАДН-зависимых реакций лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и малатдегидрогеназы (МДГ), но при повышении активности НАД-зависимой реакции МДГ и НАДИЦДГ.

В клетках опухолевой ткани у больных раком легкого с генотипом GSTM1 0/0 по сравнению с показателями больных с генотипом GSTM1+ значительно снижена активность ГР, но повышены уровни анаэробной реакции ЛДГ и НАДН-зависимой реакции МДГ.

При сравнительном исследовании уровней активности оксидоредуктаз в здоровой и опухолевой ткани легкого в зависимости от GSTM1-генотипа установлено, что у больных с генотипом GSTM1+ в клетках опухолевой ткани по сравнению с клетками здоровой ткани увеличена активность НАДФМДГ и ГР, но снижены уровни НАДН-зависимых реакций ЛДГ и МДГ. В то же время у больных с генотипом GSTM1 0/0 в клетках опухолевой ткани по сравнению с клетками здоровой ткани снижена активность Г6ФДГ, НАДФМДГ, ГР и НАД-зависимой реакции МДГ, но при повышении уровней НАДН-зависимых реакций ЛДГ и МДГ.

Таким образом, установлено, что в клетках здоровой ткани легкого при генотипе GSTM1 0/0 выявляется повышенная активация ферментов, определяющих ряд пластических процессов (Г6ФДГ и НАДФМДГ) и дегидрогеназ цикла трикарбоновых кислот (МДГ и НАДИЦДГ). Так как при этом обнаружено снижение уровней активности анаэробной реакции ЛДГ и НАДН-зависимой реакции МДГ, можно предположить, что клетки здоровой ткани при генотипе GSTM1 0/0 являются более аэробными (за счет ингибирования терминальных стадий гликолиза и активации реакций цикла Кребса), в них повышена активность анаболических реакций липидного обмена и пластических процессов, определяемых продуктами пентозофосфатного цикла. В то же время при перерождении здоровой ткани легкого в раковую в метаболической системе клеток легочной ткани происходят обратные процессы в зависимости от полиморфизма гена GSTM1: при генотипе GSTM1+ – ингибирование гликолиза, при активации реакций липидного анаболизма и ГР, тогда как при генотипе GSTM1 0/0 – снижение активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ, характеризующих различные реакции пластического обмена и МДГ, отражающей интенсивность субстратного потока по лимонному циклу, при повышении уровней терминальных реакций гликолиза.

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЯ ДНК В ДИАГНОСТИКЕ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ И РАКА ЖЕЛУДКА

**Тухбатуллин М.Г., Велижинская Т.А.,
Черепнев Г.В., Галеева З.М.**

*Республиканская клиническая больница № 2 МЗ РТ,
Казань, Россия*

Введение. Язвенная болезнь (ЯБ) и рак желудка (РЖ) продолжают занимать лидирующее место среди патологии желудочно-кишечного тракта. Заслуживает внимания применение проточной цитофлуориметрии в гастроэнтерологии и онкологии для анализа пролиферации и апоптоза слизистой при язвенной болезни. Симптомы РЖ часто возникают только на поздней стадии заболевания. Массовый скрининг (гастроскопия с видеоархивированием), выполняемый в популяциях с повышенным риском (Япония), выявляет только 7,8% от оцениваемого числа случаев РЖ. Без комбинации с другими методами исследования биопсия адекватно диагностирует РЖ в 80% случаев. В рутинной онкологической и общетерапевтической практике необходимо качественное расширение спектра РЖ-специализированных диагностических технологий. К последним относится проточная цитометрия ДНК – диагностический тест, определяющий ploидность (содержание ДНК) и пролиферативную активность клеток солидных тканей, в том числе желудка.

Цель и задачи исследования: изучить возможности проточной цитофлуориметрии ДНК в диагностике ЯБ и РЖ, воспроизвести стандартный протокол анализа ploидности и пролиферативной активности клеток солидных тканей (CycleTEST™ Plus DNA reagent kit, BD Biosciences) и апробировать его в рамках комплексного исследования больных с ЯБ и РЖ на разных стадиях.

Материалы и методы. Всего обследованы биоптаты желудка у 21 пациента. Всем пациентам выполнена фиброгастроскопия с биопсией. 9 пациентов подверглись операции по поводу РЖ (3 мужчин и 6 женщин, возраст от 49 до 74 лет). Диагностические образцы ткани желудка получали при эндоскопической или интраоперационной биопсии. Биоптат делили на две части: для проточной цитометрии ДНК и рутинного гистологического анализа. Образцы, предназначенные для цитометрии ДНК, фиксировали в 70% этаноле и хранили при 4 С. Фиксированный биоптат подвергали механической дезагрегации при помощи гомогенизатора Medimachine System (BD Biosciences). Полученную суспензию пропускали через фильтр Filcon с размером пор 50 мкм и окрашивали, используя набор CycleTEST™ Plus DNA reagent kit (#340242, BD Biosciences) по инструкции производителя. Окрашенную суспензию пропускали через фильтр Filcon с размером пор 20 мкм и анализировали на проточном цитометре модели FacsCalibur с двумя лазерами 488 и 635 нм (BD). Вычисляли следующие параметры: а) CV основного пика, б) индекс ДНК (ИДНК), равный отношению содержания ДНК клеток диагностического образца в фазе G0-G1 к содержанию ДНК клеток интактной слизистой желудка в фазе G0-G1, в) фракцию S фазы клеточного цикла. Анализ и интерпретацию ДНК гистограмм проводили в соответствии с методическими рекомендациями Европейского консенсуса по проточной цитометрии ДНК (Ormerod et al., 1998).

Основные результаты. Цитофлуориметрическое заключение было положительным, если присутствовал хотя бы один из следующих признаков злокачественной неоплазии: 1) наличие анеуплоидной (тетраплоидной) популяции, 2) превышение «cut off» S фракции диплоидной популяции. Расхождение цитофлуориметрического заключения с гис-

тологическим диагнозом зарегистрировано в одном случае. Среди обследованных больных у 8 цитофлуориметрические признаки соответствовали злокачественной неоплазии, 2 пациента соответствовали стадии T₂, 6 – стадии T₃-T₄. Оба T₂ случая были диплоидными, тогда как на стадиях T₃-T₄ диплоидный рак наблюдали у 4, тетраплоидный у 1 и анеуплоидию у 1 пациента с перстневидно-клеточным раком. У 13 пациентов с ЯБ полное совпадение цитофлуориметрического заключения с гистологическим диагнозом.

Заключение. На материале биоптатов желудка 21 пациента с ЯБ и РЖ показана хорошая чувствительность метода проточной цитометрии (94,6%). Для верификации злокачественной неоплазии, особенно на ранних стадиях, размер S фракции (%) имеет большее диагностическое значение, чем индекс ДНК.

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ ЛИМФОМ ПО ЛИМФОУЗЛАМ И ТРЕПАНОБИОПТАТАМ КОСТНОГО МОЗГА, ЗАЛИТЫМ В СМОЛУ

Шатинина Н.Н.

*Российский онкологический научный центр
им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия*

В настоящее время вырабатываются стандартизованные методы для оценки диагноза, стадии и ответа на терапию больных лимфомами. Образцы костного мозга – трепано-биоптаты (т/б) наряду с образцами лимфатических узлов снабжают важной информацией относительно диагноза, прогноза и критичны для планирования оптимальной терапевтической стратегии, являясь иногда и единственной диагностической возможностью вначале заболевания или для определения минимальной остаточной болезни в процессе терапии больного. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование т/б костного мозга является важным дополнительным исследованием, поскольку довольно крупные опухолевые инфильтраты в костном мозге могут быть представлены даже тогда, когда проточная цитометрия и PCR дают заключение о том, что аспират костного мозга негативен.

Цель исследования: иммунофенотипирование лимфом по лимфоузлам и трепанобиоптатам костного мозга, залитым в смолу.

Материалы и методы. 100 пациентов с различными диагнозами были исследованы и включены в работу. Срезы лимфатических узлов в парафине и т/б залитые в смолу, в случае необходимости, были проанализированы для ИГХ экспрессии CD20, CD79a, CD3, CD10, CD21, CD5, bcl-2, Mib-1, p53, bcl-6, p21, bcl-1, CD23, CD2, CD4, CD7, CD8, CD68, CD30, CD34, F8, ALK, DBA44, CD15, CD30, p65, BOB-1, OCT-2, bcl-6, CD57, Gly-C, CD34, CD45, CD1a, Mum-1, CD43, TdT, Pax-5, MPO, CD117, Fascin, EMA, KL1 в соответствии со специальными ИГХ панелями для каждого случая (DAKO Kit No K5001).

Результаты. Среди больных дети в нашей группе составили 59% (средний возраст 11 лет) и взрослые 41% (средний возраст 52 года). Больные гемобластомами были представлены 82%; гиперплазия лимфатических узлов была обнаружена у 10% больных, и у 8% больных были другие опухоли. В группе больных гемобластомами на долю лимфом из В- и Т-предшественников пришлось 6% больных; лимфом из зрелых клеток – 75% случаев и лимфом Ходжкина – 19%. В-клеточные лимфомы составили 84% случаев, а Т-клеточные 16% случаев. Лимфомы В-клеточные были представлены следующим образом: хронический лимфоцитарный лейкоз – 12%; волосато-клеточный лейкоз в 2%; фол-

ТАБЛИЦА. КРИТЕРИИ ОТЛИЧИЯ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ АГРЕГАТОВ В КОСТНОМ МОЗГЕ ОТ ВОВЛЕЧЕННЫХ В НЕОПЛАСТИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС

Лимфоидные агрегаты в костном мозге		
1	Доброкачественные	Опухолевые
1	1-3 агрегата на трепанобиоптат	Более 3 на трепанобиоптат
2	Форма агрегата обычно округлая	Могут быть неправильной формы
3	Никогда не расположены паратрабекулярно	Могут быть и паратрабекулярно
4	Обычно мелкие лимфоциты правильной формы	Может иметь место клеточная атипия
5	Зрелая популяция	Разные уровни дифференцировки
6	Иногда могут содержать герминативные центры	Не содержат
7	Возможно наличие плазматических клеток и эозинофилов	Обычно только лимфоидные клетки

ликулярная лимфома – 19%; лимфома зоны мантии – 5%; диффузная В-крупноклеточная лимфома – 53% и лимфома Бёркетта – 9% случаев. Лимфомы Т-клеточные были представлены следующим образом: периферическая Т-клеточная лимфома – 42%; ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома 17% и анапластическая крупноклеточная лимфома – 41%. До иммунофенотипирования с использованием соответствующих панелей антител, отличия доброкачественных лимфоидных агрегатов в костном мозге от вовлечённых в неопластический процесс оценивали, руководствуясь следующими критериями (см. табл.).

Заключение. Иммунофенотипирование трепанобиоптатов костного мозга, залитых в смолу, даёт возможность получать информативные качественные препараты для диагностики лимфом. Этот метод в комбинации с иммунофенотипированием лимфатических узлов, проточной цитометрией и PCR может быть полезен для уточнённой диагностики, стадирования лимфом и определения минимальной остаточной болезни.

*Приношу глубокую благодарность за помощь в организации детской программы «Сердце ребёнка» Совету Лютеранской Церкви и её прихожанам (Япония, г.Хиросима), ESMO за предоставленный грант и проф. А.Джеку и его сотрудникам из NHS Trust (UK) за приём, помощь, реагенты и обсуждение результатов.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНТЕРЛЕЙКИНОВ – IL-1-β, IL-6, IL-10 И TNF-α У БОЛЬНЫХ С НОВООБРАЗОВАНИЯМИ И АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Шебанкова В.Н., Казаков С.П., Сухоруков А.Л., Скворцов С.В., Кушлинский Н.Е.

Главный военный клинический госпиталь им. акад. Н.Н.Бурденко МО РФ, Москва;
Государственный институт усовершенствования врачей МО РФ, Москва;
Российский онкологический научный центр имени Н.Н.Блохина РАМН, Москва, Россия.

Введение. Большое значение в защите организма от злокачественных опухолей имеет иммунная система, ак-

тивность иммунокомпетентных клеток которой напрямую активируется цитокинами. Основным источником таких регуляторных цитокинов являются Т-хелперные лимфоциты, хотя и другие резидентные и циркулирующие клетки иммунной системы и опухоли вносят свою лепту в пул цитокинов организма. Цитокины могут контролировать аномальный клеточный рост, индуцируя дифференцировку и подавляя процессы опухолевой трансформации. Поэтому анализ уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при онкологических и аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы открывает новые возможности и перспективы для иммунодиагностики опухолей, для организации иммуномониторинга, разработки новых средств и методов иммунотерапии и прогнозирования течения онкологических заболеваний.

Цель исследования. Провести сравнительный анализ количественного содержания цитокинов в плазме крови больных со злокачественными, доброкачественными онкологическими и аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы на этапах хирургического лечения.

Материалы и методы. Обследовано 55 больных (12 мужчин и 43 женщин, в возрасте 31-68 лет) с заболеваниями щитовидной железы: рак щитовидной железы – 28, аденомы щитовидной железы – 16, аутоиммунные заболевания – 12. В качестве контроля использовали образцы плазмы крови 16 практически здоровых людей. Концентрации цитокинов: интерлейкинов 1β, 6,10 (IL-1β, IL-6, IL-10), фактора некроза опухоли – α (TNF-α), в плазме крови до начала лечения, после операции (5 и 14 день) определяли иммуноферментным методом наборами реактивов фирмы «Biosource» (США).

Результаты. Анализ динамики цитокинов до начала лечения по сравнению со здоровыми донорами показал достоверные различия в уровне IL-10 у больных с доброкачественными новообразованиями (5,85±1,7 и 0,87±0,74 нг/мл соответственно) и в уровне TNF-α (9,3±2,1 и 0,67±0,51 нг/мл соответственно). Не выявлено корреляционной связи уровня цитокинов в крови с полом, возрастом и длительностью заболевания. После хирургического вмешательства на 5 сутки у всех больных повышался уровень цитокинов, как ответ на выполненную операцию. Наиболее высокие показатели цитокинов отмечались у больных раком щитовидной железы. Уровень IL-1β на 5 день после операции составил 2,91±0,91 нг/мл и был достоверно выше в сравнении с дооперационным уровнем – 0,98±0,65 нг/мл, а содержание IL-6 составило 13,8±2,4 нг/мл, что также достоверно выше, чем до операции – 0,76±0,57. К 14 суткам после операции уровень цитокинов снижался до нормальных показателей у всех групп обследуемых больных. Имело место незначительное повышение уровня IL-6 до 3,9±2,1 нг/мл на 14 сутки у больных с гистологически верифицированными формами аутоиммунной патологии щитовидной железы. Однако корреляционной связи с предыдущими этапами определения цитокинов выявлено не было.

Заключение. Полученные данные указывают на возможное участие цитокинов в механизмах развития опухолевого процесса в щитовидной железе и в иммунокомпенсаторном ответе на хирургическое лечение опухолевого и предопухолевого (аутоиммунные и доброкачественные изменения в щитовидной железе) состояния.