

ОНКОИММУНОЛОГИЯ, ГЕМОБЛАСТОЗЫ

СПОНТАННЫЙ И ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ В ДИНАМИКЕ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ

Антонеева И.И.¹, Бойчук С.В.²

¹ Ульяновский государственный университет,
г. Ульяновск, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

Влияние опухолевого процесса на популяцию лимфоидных клеток установлено в эксперименте и подтверждено в клинике. Онкогены относят к эндогенным индукторам апоптоза, то есть можно предполагать, что иммунодепрессивное действие канцерогенеза может быть связано с апоптогенным действием опухоли на лимфоциты крови (ЛФ).

Целью исследования было изучение спонтанного и индуцированного апоптоза ЛФ больных раком яичников (РЯ) на различных клинических стадиях заболевания.

В ЛФ 7 здоровых женщин и 16 первичных больных РЯ, находящихся в I-IV клинической стадии заболевания (по FIGO) оценивали уровень спонтанного и индуцированного апоптоза ЛФ методом проточной цитофлуориметрии на приборе «FacsScan» («Becton Dickinson»). В качестве индуктора апоптоза использовали ФГА. Время инкубации составило 72 ч. Устанавливали процент клеток, обнаруживаемых в гиподиплоидной зоне при окрашивании пропидия йодидом (hupo DNA); изменения величины митохондриального потенциала (МП) ($\Delta\Psi$) и экспрессию фосфатидилсерина (ФС). Достоверность различия данных определялась с применением непараметрического критерия Манна-Уитни (критерий U).

Полученные результаты представлены в таблице.

Показано более выраженное снижение МП, экспрессии ФС на поверхности ЛФ и уровень упорядоченной фрагментации ДНК ЛФ больных РЯ по сравнению с донорами при спонтанном апоптозе и существенно более

выраженное при действии ФГА. При этом чувствительность к апоптозу ЛФ больных РЯ нарастает в динамике опухолевой прогрессии.

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ CXCR4 И МИГРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ОСТРОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ

Белевцев М.В., Черняк Л.П., Вашкевич Е.П., Кустанович А.М.

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии», г. Минск, Беларусь

Рецептор CXCR4 (fusin, LESTR) и фактор SDF-1 α определяют степень миграции нормальных гемопоэтических и лейкозных клеток в периферические органы.

Цель исследования: изучение экспрессии хемокинового рецептора CXCR4 и миграционной способности опухолевых клеток при остром лейкозе у детей.

Объект и методы. Исследовано 35 образцов костного мозга и 27 образцов периферической крови, полученных у 37 детей с острым лейкозом (27 больных с В-ОЛЛ, 3 – Т-ОЛЛ, 7 – ОМЛ). Экспрессию CXCR4 определяли с помощью проточной цитометрии (FACSscan, BD, США) и Real-time PCR (iCycler IQ, Bio-Rad). Миграционная способность лейкозных клеток определялась в миграционном тесте [Rombouts E., 2004] с использованием культуральных вставок (Costar Transwell, США).

Результаты. Хемокиновый рецептор CXCR4 экспрессировался на всех лейкозных клетках, полученных как из костного мозга, так и периферической крови больных ОЛЛ. Было обнаружено, что экспрессия CXCR4 зависит от линейной принадлежности лейкозных клеток. Так уровень экспрессии CXCR4 при В-ОЛЛ был 90%, при Т-ОЛЛ – 63% и при ОМЛ – 23%.

Было показано, что рекомбинантный SDF-1 α индуцирует миграцию лейкозных клеток и клеточных линий *in vitro* вне зависимости от их линейной принадлежности. Хемокин-индуцированная миграция лейкозных клеток,

ТАБЛИЦА. СПОНТАННЫЙ И ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РЯ В ДИНАМИКЕ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ (к работе Антонеевой И.И. и Бойчук С.В.)

Серия		contro			PHA		
Группа		$\Delta\Psi$	PS	hupo DNA	$\Delta\Psi$	PS	hupo DNA
Доноры n = 7		9,1 $\pm$ 1,96	6,8 $\pm$ 0,62	–	11,7 $\pm$ 1,21	7,2 $\pm$ 1,34	2,2 $\pm$ 0,60
Больные РЯ n = 16	I ст. n = 4	10,0 $\pm$ 1,14	7,6 $\pm$ 0,57	1,6 $\pm$ 0,49	11,7 $\pm$ 1,24	14,1 $\pm$ 1,13*	2,5 $\pm$ 0,41
	II ст. n = 4	10,0 $\pm$ 1,20	9,4 $\pm$ 1,32	1,9 $\pm$ 0,61	11,5 $\pm$ 1,33	15,7 $\pm$ 1,60*	3,7 $\pm$ 0,65
	III ст. n = 4	18,0 $\pm$ 1,78*	10,8 $\pm$ 1,12*	2,3 $\pm$ 0,97	21,3 $\pm$ 1,93*	28,6 $\pm$ 2,04*	6,1 $\pm$ 0,82*
	IV ст. n = 4	19,0 $\pm$ 2,01*	12,3 $\pm$ 1,09*	3,2 $\pm$ 0,52*	28,0 $\pm$ 2,23*	31,0 $\pm$ 2,11*	6,3 $\pm$ 1,02*

Примечание: * – показатели, достоверно отличающиеся от аналогичных у доноров.

полученных из периферической крови ($n = 7$) больных ОЛЛ, была 39%, в то время как хемокин-индуцированная миграция лейкозных клеток из костного мозга ($n = 12$) больных ОЛЛ – 17,7%.

Выводы. В результате проведенных исследований было выявлено, что миграционная способность лейкозных клеток, полученных из периферической крови была выше, чем миграционная способность лейкозных клеток из костного мозга больных ОЛЛ ($p = 0,027$). Экспрессия CXCR4 на белковом (определялась с помощью проточной цитометрии) и молекулярном (Real-time PCR) уровнях была достоверно выше на клетках периферической крови в сравнении с клетками костного мозга.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ СУБПОПУЛЯЦИИ CD8⁺-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ МЕТАСТАТИЧЕСКИМ РАКОМ ПОЧКИ ПРИ ВАКЦИНОТЕРАПИИ

Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Носов Д.А., Кадагидзе З.Г.

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Цель данного исследования – изучить динамику субпопуляции CD8⁺-лимфоцитов периферической крови больных с диагнозом метастатический рак почки на фоне вакцинотерапии дендритными клетками, нагруженными опухолевым лизатом.

Материалы и методы. Иммунофенотип лимфоцитов периферической крови исследовали в реакции иммунофлюоресценции с коммерческими МКА к CD3, CD4, CD8, CD16 антигенам и изотипическими контролями, конъюгированными FITC, PE и PE-Cy5, с последующим анализом на проточном цитофлуориметре FACSscan (Becton Dickinson). В исследование были включены больные метастатическим раком почки ($n = 12$), получившие по 6 вакцинаций и доноры ($n = 15$). До начала вакцинотерапии у 7 больных (группа № 1) значение иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8) было в пределах нормы ($1,75 \pm 0,4$), и на фоне лечения наблюдалась стабилизация процесса. А у 5 больных (группа № 2) – снижено ($0,53 \pm 0,2$), и в процессе вакцинотерапии наблюдалось прогрессирование основного заболевания.

Результаты. При исследовании Т-клеточного звена иммунитета было выявлено, что у больных 1-й группы количество CD3⁺-лимфоцитов до начала терапии было в пределах нормы ($73,1 \pm 7,1\%$), а в процессе лечения увеличивалось до $81,4 \pm 5,4\%$ за счет субпопуляции CD3⁺CD8⁺-клеток. У прогрессирующих больных количество CD3⁺-клеток, как до начала терапии, так и в процессе лечения было на уровне 60-67%. Субпопуляция CD3⁺CD4⁺-клеток так же была стабильна в процессе терапии (22-25%). Количество CD8⁺-лимфоцитов до начала лечения значительно превышало норму, составляя $45,3 \pm 6,3\%$ ($p < 0,002$). На фоне вакцинотерапии эта популяция уменьшалась в 1,3 раза ($p < 0,002$), достигая $33,3 \pm 5,1\%$ после 6-го введения. Интересным оказался тот факт, что у больных 2-й группы не все CD8⁺-лимфоциты экспрессировали на своей поверхности CD3-антиген. Популяция CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов до начала терапии составляла $20,3 \pm 4,3\%$ и в процессе лечения оставалась на этом уровне. Тогда как количество CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов в процессе вакцинотера-

пии уменьшалось: от $25,3 \pm 5,1\%$ до $13,3 \pm 3,2\%$ ($p < 0,002$). Анализ ко-экспрессии CD16-, CD3- и CD8-антигенов показал, что у прогрессирующих больных до начала терапии $10,3 \pm 3,6\%$ лимфоцитов экспрессировали на своей поверхности и CD16- и CD8-антиген, и при этом были лишены экспрессии CD3-антигена. В процессе терапии у больных этой группы CD3⁺CD8⁺CD16⁺ популяция лимфоцитов оставалась на уровне 9-13%, тогда как у больных в стабилизации эта субпопуляция лимфоцитов составляла менее 1%. Следует отметить, что количество CD16⁺ NK-клеток у больных двух групп и до начала вакцинотерапии, и в процессе лечения было в пределах нормальных показателей (10-15%). Популяция CD3⁺CD8⁺CD16⁺-лимфоцитов у больных всех больных была в пределах нормальных значений процессе лечения (2-4%). Количество CD3⁺CD8⁺CD16⁺-лимфоцитов у больных 1-й группы было на уровне нормы 10-12%. Тогда как у больных 2-й группы популяция истинных NK-клеток была значительно ниже ($p < 0,001$), составляя $2,6 \pm 1,1\%$ лимфоцитов до начала вакцинотерапии, и на фоне лечения их количество оставалось без изменений.

Выводы. Было выявлено различие в структуре CD8⁺-лимфоцитов у больных с различным клиническим течением заболевания на фоне вакцинотерапии. Для прогрессирующих больных было характерно наличие популяции CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов; половина этих клеток экспрессировала CD16-антиген. У больных в стабилизации, несмотря на увеличение количества CD8⁺-лимфоцитов, структура субпопуляции соответствовала показателям здорового донора.

ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС ПРИ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У ДЕТЕЙ В ПРОЦЕССЕ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

Головкин А.С.¹, Шабалдин А.В.², Головкина Н.М.³

¹ Кузбасский научный центр СО РАМН, Россия

² Институт экологии человека СО РАН, Россия

³ Кемеровский областной клинический онкологический диспансер, Россия

Динамическое исследование уровня цитокинов в сыворотке крови при лимфомах и гемобластазах у детей позволит оценить степень нарушения регуляторного потенциала в иммунобиологическом надзоре, а также эффективность восстановления его при стандартной химиотерапии.

Материалы и методы исследования. Обследован 21 пациент с онкогематологическими заболеваниями (лимфогранулематоз – 9, острый лимфобластный лейкоз – 9, острый миелобластный лейкоз – 2, острый миеломонобластный лейкоз – 1) на разных этапах специальных видов химиотерапевтического лечения. Все больные были разделены на 2 группы: лимфомы и острые лейкозы по виду происхождения злокачественной опухоли. Изучали уровень цитокинов периферической крови: фактор некроза опухоли α (ФНО α), интерферон γ (ИФН), интерлейкины (ИЛ) 1 β , 4, 6. Исследования проводились методом твердофазного иммуноферментного анализа наборами реактивов производства ЗАО «Вектор-Бест» г. Новосибирск.

Результаты. В процессе проводимого лечения у больных с лимфогранулематозом значительно снижались уровни интерферона γ (в 18,3 раза) и интерлейкина 6 (в 9,5 раз) по сравнению с показателями при впервые выявленном злокачественном заболевании. Уровень других изучаемых цитокинов исходно был низким и в процессе лечения изменялся незначительно. При сравнительном анализе показателей цитокинового статуса первичных больных с острыми лейкозами и поступающих на повторные курсы лечения выявлено достоверное снижение уровня ФНО α и ИФН. Уровень фактора некроза опухоли снизился в 3,2 раза, а интерферона в 4,6 раза. Кроме того, отмечается заметное снижение уровня ИЛ-1 и ИЛ-6.

Обсуждения. Интерферон- γ и фактор некроза опухоли α относятся к индукторам апоптоза и результатом их действия является позитивный контроль за злокачественной клеткой. Тем самым низкий уровень этих цитокинов способствует дефициту иммунологического надзора за опухолевым ростом. Высокий уровень интерлейкина 6 при лимфогранулематозе связан с аутокринной продукцией этого цитокина клетками Березовского-Штернберга. Его функция заключается в стимуляции пролиферации и защите от апоптоза опухолевых клеток. Значительное снижение — в 9,5 раз, на фоне проводимого лечения демонстрирует эффективность терапии и уменьшение пула клеток опухоли и микроокружения.

Заключение. Изменение цитокинового статуса у больных онкогематологическими заболеваниями в процессе полихимиотерапии отражает динамику состояния противоопухолевого иммунобиологического надзора, что можно использовать с целью мониторинга течения заболевания при стандартной химиотерапии.

15-ЛЕТНИЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИИ В ГУ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН

Заботина Т.Н., Борунова А.А., Кадагидзе З.Г.

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

Успехи лечения онкологических больных напрямую зависят от уровня и точности диагностических мероприятий, в том числе от результатов проводимых клинко-лабораторных исследований. Это стало возможным в связи с разработкой и внедрением в клиническую практику современных тест-систем для определения поверхностных и внутриклеточных структур клеток и ДНК-специфичных зондов, а также с максимальным использованием возможностей самого современного лабораторного оборудования в сочетании с компьютерным обеспечением для анализа и статистической обработки данных. Методом предпочтения в научно-практической работе современной клинко-иммунологической лаборатории сегодня является проточная цитофлюориметрия.

Проточная цитофлюориметрия имеет целый ряд достоинств: анализу подвергается единичная клетка, а не группы клеток; всегда есть отрицательный контроль, не зависящий от субъективного мнения исследователя; скорость анализа составляет десятки тысяч клеток в секунду; возможно одновременное изучение

нескольких параметров в/на одной клетке, основанное на количественной оценке интенсивности флюоресценции; отсутствует необходимость фрагментации исследуемого материала на отдельные субпопуляции, что значительно сокращает время приготовления образца.

В ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН метод проточной цитофлюориметрии обязателен при проведении рутинных клинических и научных исследований. Так, мониторинг состояния иммунной системы больных с солидными новообразованиями включает оценку показателей клеточного иммунитета с применением двух-, и трехцветного анализа поверхностных антигенов лимфоидных клеток, а также оценку функциональной активности иммунокомпетентных клеток. Иммунодиагностика гемобластозов основана на выявлении линейной принадлежности и уровня дифференцировки бластных клеток по экспрессии поверхностных дифференцировочных антигенов. Однако в ряде случаев (ОМЛ, ХМЛ) проводится изучение экспрессии и функциональной активности белков, опосредующих множественную лекарственную устойчивость — Р-гликопротеин (CD243), MRP-1 и др. В наших исследованиях большое внимание уделяется оценке прогностической значимости экспрессии гликопротеидов, регулирующих апоптоз. Определение уровня внутриклеточных белков Bcl-2, Bax, p53mut, маркера ядерной пролиферации Ki-67 позволяет прояснить механизмы развития лимфопролиферативного заболевания, а также совершенствовать терапевтические подходы, направленные на создание новых препаратов для быстро развивающейся таргетной терапии.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ РАКОВЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ И АНТИ-HER2/neu МИНИ-АНТИТЕЛ

Здобнова Т.А., Баландин Т.Г., Эдельвейс Э.Ф., Дорофеев С.Г., Васильев Р.Б., Деев С.М.

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Московский Государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Важным направлением в современной биомедицине является поиск новых путей визуализации опухолевых клеток для высокоточной диагностики онкологических заболеваний. В последние годы с развитием нанотехнологий появился принципиально новый класс флюоресцентных меток — полупроводниковые нанокристаллы (квантовые точки), которые благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам являются чрезвычайно перспективными для биомедицинских исследований и успешно конкурируют с традиционными органическими красителями и флюоресцентными белками. Однако необходимым условием визуализации опухолевых клеток с помощью флюоресцентных меток является обеспечение их специфического связывания.

Целью данной работы являлась разработка системы, обеспечивающей направленную доставку квантовых точек к опухолевым клеткам и их специфическую визуализацию.

Для направленной доставки флюоресцентных меток к опухолевым клеткам мы использовали анти-HER2/neu

мини-антитела. HER2/neu — онкомаркер, локализованный на поверхности многих опухолевых клеток (при раке молочной железы, яичника, предстательной железы, желудка, легких и др.) Его гиперэкспрессия является важным прогностическим фактором и коррелирует с неблагоприятным прогнозом течения заболевания, а его раннее обнаружение имеет важное клиническое значение.

Для связывания квантовых точек с мини-антителом использовали модуль барназа-барстар. Бактериальная рибонуклеаза барназа из *Bacillus amyloliquefaciens* и ее природный ингибитор барстар являются белками небольшого размера (12 и 10 кД соответственно) и обладают уникально высоким сродством друг к другу ($K_D \sim 10^{-14} \text{M}^{-1}$). Таким образом, один из компонентов разработанной нами системы представляет собой рекомбинантный белок состоящий из анти-HER2/neu мини-антитела и барназы. Показано, что этот белок связывается с поверхностью HER2/neu-позитивных клеток и не связывается с HER2/neu-негативными клетками. Второй компонент системы — барстар, конъюгированный с квантовыми точками, покрытыми меркаптоуксусной кислотой и активированными водорастворимым карбодиимидом.

После обработки клеток рекомбинантным белком анти-HER2/neu мини-антитела-барназа и конъюгатом квантовых точек с барстаром, с помощью флуоресцентной микроскопии обнаружено характерное свечение мембран HER2/neu-позитивных клеток человеческой аденокарциномы яичника SKOV-3 и молочной железы человека SKBR-3. Неспецифического связывания самого конъюгата барстара с квантовыми точками с этими клетками не обнаружено.

Таким образом, разработана система, позволяющая с помощью флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов визуализировать опухолевые клетки, гиперэкспрессирующие онкомаркер HER2/neu.

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ТКАНЕВЫХ ЦИТОКИНОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОПУХОЛЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Златник Е.Ю., Никипелова Е.А., Кучкина Л.П.

*Научно-исследовательский институт,
г. Ростов-на-Дону, Россия*

Цитокины, как стало известно в настоящее время, являются медиаторами не только иммунного ответа,

но и регуляторами процессов пролиферации и апоптоза различных клеток, в том числе и опухолевых, которые и сами способны их продуцировать. В связи с этим представляет интерес изучение их содержания в ткани опухоли и перифокальной зоны.

Нами проводилось изучение локального содержания ряда цитокинов в гомогенатах пораженной и визуально здоровой ткани молочной железы при раке (РМЖ, $n = 7$), фиброзно-кистозной мастопатии (ФКМ, $n = 9$) и олегрануле (ОГ, $n = 3$). Объем интраоперационно взятых биоптатов составлял 1 см³. Уровень цитокинов определяли методом ИФА тест-системами фирмы «Вектор-Бест» и ООО «Протеиновый контур».

Было обнаружено, что разброс индивидуальных значений количества всех цитокинов был весьма значителен (таблица). Тем не менее, отмечено, что в ткани опухоли при РМЖ был выше уровень IFN α , IL-4 и IL-1RA, чем при ФКМ, несмотря на то, что уровень общего белка в этих пробах не имел статистически достоверных различий ($4,3 \pm 2,2$ и $3,33 \pm 1,3$ г/л соответственно). В перифокальной зоне при РМЖ был статистически значимо выше, чем при ФКМ, уровень IL-4; аналогичная тенденция наблюдалась по всем изученным цитокинам, кроме IL-1 β и IL-1RA. Поскольку при ОГ доступна только перифокальная зона, проводилось ее сравнение с перифокальными зонами РМЖ и ФКМ; при этом обнаружено более низкое содержание IFN γ у больных ФКМ и IL-1RA у больных РМЖ (табл.). Сходные тенденции отмечены по уровням TNF α , IL-8 и IL-1RA. Сопоставление уровней цитокинов в ткани опухоли и перифокальной зоны показало, что при ФКМ статистически значимо отличается только уровень IFN α , который в опухолевой ткани был ниже. При этом в опухоли были выше уровни IFN γ , IL-8, IL-1RA и ниже — содержание IL-1 β , однако, все эти различия были статистически недостоверны. При РМЖ в ткани опухоли количество IL-1RA было в 10 раз выше, чем в перифокальной зоне, определялись тенденции к более высокому содержанию IFN γ и IL-8.

По-видимому, различия состава цитокинов ткани молочной железы при доброкачественных и злокачественных опухолях отражают особенности тканевого гомеостаза, однако, для выявления их происхождения (из клеток опухоли или микроокружения) и роли в процессах малигнизации ткани и опухолевого роста необходимо проведение дальнейших исследований.

ТАБЛИЦА. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В ТКАНИ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ИХ ПЕРИФОКАЛЬНЫХ ЗОН
(к работе Златник Е.Ю. и соавт.)

Пробы	IFN γ	IFN α	IL-1 β	IL-1RA	IL-4	IL-8	TNF α
ОГ периф. зона	28 $\pm$ 2,7 (23-32)	10,4 $\pm$ 4,96 (4-20)	303 $\pm$ 50 (210-375)	1797 $\pm$ 667 (490-2450)	10,5 $\pm$ 2,2 (7-14,5)	35,3 $\pm$ 30 (4-95)	7,0 $\pm$ 3,6 (0-11)
ФКМ	Периф. зона	16 $\pm$ 3,2* (0-28)	8,3 $\pm$ 1,4 (1,9-15)	221 $\pm$ 41,5 (0-340)	500 $\pm$ 344,5 (0-3200)	7,7 $\pm$ 1,8 (0-14,5)	6,7 $\pm$ 4,2 (0-40)
	Опухоль	23,1 $\pm$ 14,6 (0-138)	3,3 $\pm$ 0,9** (0-8,1)	148 $\pm$ 32,8 (0-325)	1148 $\pm$ 451 (56-3900)	7,5 $\pm$ 1,9 (0-16,5)	52,4 $\pm$ 48 (1-437)
РМЖ	Периф. зона	38,4 $\pm$ 19,2 (8-150)	11,1 $\pm$ 2,6 (2,9-23)	259 $\pm$ 38 (89-380)	250,6 $\pm$ 86,3 (70-738)* **	14,1 $\pm$ 1,6*** (11-23)	20,5 $\pm$ 12 (1-90)
	Опухоль	64,6 $\pm$ 51,9 (0-370)	7,5 $\pm$ 1,5*** (1,8-13)	301 $\pm$ 157 (0-1200)	2569 $\pm$ 518*** (545-4560)	14,1 $\pm$ 1,3*** (10-19)	62,2 $\pm$ 54 (5-438)
							2,9 $\pm$ 1,7 (0-12)

Примечания: * — отличия от ОГ; ** — отличия от перифокальной зоны; *** — отличия от ФКМ.

СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ НИЗКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ И ПЕРСТЕНЕВИДНОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Казакова Н.Н., Щербина А.С., Яцинов М.В., Савченко А.А., Дыхно Ю.А.

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

Второе место среди онкологических заболеваний занимают злокачественные новообразования желудка, по своей распространенности они уступают только раку легкого. В патогенезе рака важную роль играют механизмы контроля за развитием и распространением опухоли. В первую очередь, сюда следует отнести иммунологический надзор — участие в противоопухолевой защите Т-лимфоцитов, NK-клеток, макрофагов.

Целью исследования явилось изучение состояния клеточного и гуморального иммунитета у больных низкодифференцированной аденокарциномой и перстневидноклеточным раком желудка.

На базе Краевого онкологического диспансера обследовано 62 больных раком желудка в возрасте от 32 до 84 лет. Кровь на исследование забиралась на следующий день после поступления. Диагноз ставился на основе гистологического анализа после эндоскопического исследования. В качестве контроля обследовано 106 практически здоровых людей аналогичного возраста.

Выделение общей фракции лимфоцитов осуществляли по стандартной методике в градиенте плотности фикол-верографина с последующей очисткой от прилипающих клеток. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. Концентрацию иммуноглобулинов класса А, М, G в сыворотке крови определяли методом иммунодиффузии по Манчини. Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов определяли в сыворотке крови фотокolorиметрическим методом.

При исследовании особенности фенотипического состава лимфоцитов крови у больных раком желудка обнаружено достоверное снижение относительной концентрации CD3⁺- и CD4⁺-клеток, достоверное увеличение относительной и абсолютной концентраций CD16⁺-, CD19⁺- и HLA-DR⁺-лимфоцитов как при низкодифференцированной аденокарциномой, так и при перстневидноклеточном раке. У больных низкодифференцированной аденокарциномой желудка также обнаружено увеличение абсолютной концентрации CD3⁺-, CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов и снижение величины иммунорегуляторного индекса, что, по-видимому связано с незначительным увеличением относительного и абсолютного числа лимфоцитов. Изучение показателей гуморального иммунитета также позволило обнаружить как характерные для каждого типа гистологической структуры рака изменения, так и независимые. И для низкодифференцированной аденокарциномы, и для перстневидноклеточного рака характерно снижение сывороточной концентрации IgG и уровня относительного синтеза IgG. У больных низкодифференцированной аденокарциномой обнаружено увеличение концентрации IgA. Только у больных перстневидноклеточным раком выявляется снижение концентрации IgA и уровней относитель-

ного синтеза IgA и IgM, а также повышение концентрации циркулирующих иммунных комплексов относительно контрольных величин.

Анализ фенотипического статуса клеток иммунной системы у больных раком желудка позволил обнаружить снижение содержания Т-лимфоцитов и фракции цитотоксических Т-клеток. Выявлено повышение концентрации В-лимфоцитов. У больных в периферической крови повышена концентрация NK-клеток. Известно, что NK-клетки совместно с цитотоксическими Т-лимфоцитами являются основной популяцией клеток иммунной системы ответственной за реализацию противоракового иммунитета. Можно предположить, что повышение содержания NK-клеток в периферической крови больных раком желудка (независимое от гистологического типа) является компенсаторной реакцией, реализуемой на фоне развивающегося Т-зависимого иммунодефицита.

Таким образом, у больных раком желудка независимо от гистологического типа опухоли выявляется иммунная недостаточность преимущественно по Т-клеточному типу. Вероятно, повышение количества NK-клеток можно рассматривать как компенсаторную реакцию, направленную на повышение уровня противоопухолевой защиты на фоне недостаточности цитотоксических Т-лимфоцитов. В то же время, у больных низкодифференцированной аденокарциномой желудка выявляется более выраженное снижение содержания популяции и субпопуляции Т-лимфоцитов, чем у больных перстневидноклеточным раком. Установлено, что по уровню показателей, характеризующих состояние гуморального иммунитета, также выявляются значительные различия в зависимости от исследуемых гистологических типов рака желудка.

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ: ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУННОГО СТАТУСА У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Калинина Н.М.¹, Савинов И.П.², Шафировский Б.Б.², Павелец К.В.³, Улейская Г.И.⁴, Щёкина Л.А.⁴, Алексеев П.С.²

¹ ФГУЗ Всероссийский Центр Экстренной медицины МЧС РФ

² СПб ГМА им. И.И. Мечникова

³ ГУЗ Городская больница № 31

⁴ СПб ГМПА

Введение. Метод ФДТ основан на использовании способности опухолевых клеток накапливать фотосенсибилизатор в значительно большей степени, чем здоровые ткани. Последующее лазерное облучение опухоли осуществляется на длине волны, соответствующей одному из максимумов поглощения препарата. По данным литературы у больных, прошедших курс ФДТ, отмечается положительный клинический эффект. В то же время отсутствуют объективные критерии его оценки, включая иммунный статус больных этой категории.

Цель: изучить влияние фотодинамической терапии на иммунный статус у онкологических больных в динамике: до и после сеанса фотодинамической терапии.

ТАБЛИЦА. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

(к работе Калининой Н.М. и соавт.)

	Лейкоциты	CD4	CD8	ИРИ	CD16	CD20	HLA-DR	IgM	IgG	IgE
До ФДТ	6,2	0,81	0,36	2,7	0,24	0,18	0,43	3,1	14,2	119
После ФДТ	7,4	0,73	0,38	2,0	0,31	0,21	0,55	2,5	18,7	69

Материалы и методы. В работу включено 13 пациентов со злокачественными новообразованиями желудочно-кишечного тракта II-IV стадией развития опухолевого процесса, у 7 из них был диагностирован рак поджелудочной железы, у 5 рак толстой кишки и у 1 больного – рак пищевода. У 13 больных было выполнено хирургическое удаление опухоли. Всем больным проводилась системная внутривенная фотодинамическая терапия по методике профессора М.А. Каплана (вводилось 10 мл препарата «Радахлорин» с одновременным лазерным облучением крови аппаратом «Аткус-0,1»). Непосредственно до ФДТ и спустя две недели после его проведения исследовались количественные показатели клеточного (CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25, CD71, HLA-DR), гуморального иммунитета (IgM, IgG, IgA, IgE), определяются опухолевые маркеры (CA19-9, CA 242, РЭА, α -ФП).

Основные результаты. В клеточном звене иммунитета после проведения терапии по сравнению с показателями до начала лечения выявлены тенденции к увеличению содержания лейкоцитов ($6,2-7,4 \times 10^9/\text{л}$), натуральных киллеров ($0,24-0,31 \times 10^9/\text{л}$), активированных Т-клеток ($0,43-0,55 \times 10^9/\text{л}$). Отмечается нормализация иммунорегуляторного индекса ($2,7-2,0$). В гуморальном звене выявлена нормализация содержания IgM ($3,1-2,5 \text{ г/л}$), увеличение содержания В-лимфоцитов ($0,18-0,20 \times 10^9/\text{л}$), IgG ($14,2-18,7 \text{ г/л}$). Выраженные изменения содержания IgE ($119-69 \text{ МЕ/л}$) с тенденцией к нормализации.

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКТИВНОСТЬ У ЖЕНЩИН С МИОМОЙ МАТКИ, ПРОЖИВАЮЩИХ В ВЫСОКИХ ШИРОТАХ

Корниенко Е.Б., Щёголева Л.С., Незговоров Д.В.

Институт физиологии природных адаптаций УрО РАН, г. Архангельск, Россия

Введение. Изменения в функциях иммунной системы имеют в своей основе сопряженные реакции с нейроэндокринным аппаратом, общими метаболическими сдвигами и другими выражениями адаптационных процессов на организменном уровне. Получены данные о том, что дисбаланс параметров, характеризующих функциональную активность иммунной системы, наблюдается в дискомфортной для человека климатической среде и усугубляются экологическим неблагополучием антропогенного характера. Патогенез миомы матки и механизмы, лежащие в основе ее роста, остаются до конца не изучены. Имеются отдельные данные, которые свидетельствуют о том, что развитие миомы матки происходит на фоне изменения функций клеток иммунной системы.

Цель: изучить состояние иммунологической реактивности у женщин репродуктивного возраста с миомой матки, проживающих в высоких широтах.

Материалы и методы. Проведено исследование состояния иммунной системы у 83 женщин с миомой матки

(до 10 недель беременности), жительниц города Архангельска, в возрасте 35-45 лет. Забор крови проводили из периферической вены утром. Фенотипы лимфоцитов определяли в непрямой иммунопероксидазной реакции с моноклональными антителами. Определение цитокинов проводили ИФА с помощью тест-систем «Cytimmune sciens», США.

Результаты. Получено, что у женщин с миомой матки содержание IL-2 в периферической крови превышает общепризнанные нормативы ($78,38 \pm 4,58 \text{ пг/мл}$; $p < 0,01$), высока и частота выявления повышенных концентраций этого цитокина (98,80%). Обращает на себя внимание тот факт, что на фоне высокого содержания IL-2 содержание клеток с маркером CD25⁺ у женщин с миомой матки было в 2 раза ниже, чем у практически здоровых ($p < 0,01$). Подобные результаты, на наш взгляд, отражают нарушение процессов саморегуляции чувствительности клетки по типу обратной связи. Также при миоме матки регистрируются высокие концентрации TNF α ($70,01 \pm 0,06 \text{ пг/мл}$; $p < 0,05$) и низкое содержание CD95⁺ ($0,36 \pm 0,08 \times 10^9 \text{ кл/л}$; $p < 0,01$), при этом частота дефицита клеток с рецептором к апоптозу регистрируется чаще у женщин с патологией, чем у практически здоровых женщин (соответственно, 56,63% и 45,22%). У женщин с миомой матки по сравнению с практически здоровыми женщинами репродуктивного возраста выше содержание естественных киллеров ($0,76 \pm 0,09$ и $0,55 \pm 0,02 \times 10^9 \text{ кл/л}$; $p < 0,01$) и частота повышенных их концентраций (53,01% и 40,87%) и цитотоксических Т-клеток ($p < 0,05$), а частота выявления аномально высоких их концентраций наблюдалась в 69,88% и 57,39% случаев. Наиболее выраженные различия выявлены относительно содержания в крови Т-лимфоцитов с рецептором к трансферину: средние концентрации CD71⁺ при миомах матки выше в 2 раза ($0,96 \pm 0,13$ и $0,47 \pm 0,02 \times 10^9 \text{ кл/л}$; $p < 0,001$), частота повышенных уровней – в 1,7 раза ($87,95 \pm 5,32$ и $51,40 \pm 3,26\%$; $p < 0,01$, чем у здоровых женщин).

Таким образом, повышение уровня провоспалительных цитокинов, активация клеточной цитотоксичности и выраженная активизация Т-клеток с рецептором к трансферину на фоне снижения уровня апоптоза составляют параметры риска развития миомы матки.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ В ПРОЦЕССЕ БИОТЕРАПИИ

Короткова О.В., Заботина Т.Н., Тимофеев И.В., Кадагидзе З.Г.

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

В настоящее время ведущую роль в лечении распространенных форм рака почки (РП) играет иммунотерапия с использованием IFN α и IL-2 отдельно или в комби-

нации друг с другом. Однако лишь незначительное число больных отвечает на этот вид лечения. В то же время РП является опухолью, практически нечувствительной к системной химиотерапии и крайне мало чувствительной к лучевой терапии. Несомненный интерес вызывает исследование иммунологической реактивности больных с данной патологией для рационального применения в клинике препаратов, обладающих иммуностимулирующими противоопухолевым эффектом, и разработки принципиально новых подходов к лечению.

Цель исследования: изучение иммунного статуса больных с диагнозом рак почки в процессе биотерапии комбинацией GM-CSF, IFN α 2b и IL-2.

Материалы и методы. Оценку иммунологического статуса проводили до начала лечения и после каждого курса терапии. Обследовали 28 радикально оперированных больных с диагнозом рак почки III и IV стадии. Больные на протяжении 6 месяцев после операции получали комбинированную иммунотерапию на основе 3-х цитокинов (GM-CSF — 1 неделя каждого месяца п/к 1мкг/кг; IFN α 2b — 2 неделя 1, 3, и 6 месяцев, 2-3 неделя 2, 4, и 5 месяцев п/к 10 MIU; IL-2 — 3 неделя 1, 3 и 6 месяцев в/в 1MIU/м²). Фенотипирование лимфоцитов проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител (НПЦ «МедБиоСпектр»). Сывороточные иммуноглобулины G, A, M определяли методом радиальной иммунодиффузии по Манчини. Для оценки цитотоксического действия НК-клеток применяли колориметрический метод с использованием МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид). В качестве клеточ-мишеней использовали клетки эритромиелоидной лейкоэмической линии человека K-562, чувствительной к воздействию НК-клеток.

Результаты исследования. До лечения при оценке индивидуальных параметров иммунограмм у 20% больных выявлено снижение показателей Т-клеточного звена иммунитета (CD3⁺-, CD4⁺-, CD5⁺-, CD7⁺-лимфоциты) и у 40% больных снижение цитотоксической активности НК-клеток. Динамическое наблюдение больных проводилось на протяжении всего курса лечения. По окончании 6-ти мес у 31% больных зафиксировано прогрессирование основного заболевания, а у остальных (69%) стабилизация опухолевого процесса. В группе больных со стабилизацией процесса наблюдалась тенденция к нормализации исходно низкого количества Т-клеток, у 54% больных установлено увеличение числа лимфоцитов, экспрессирующих активационные антигены HLA-DR и CD38, и восстановление до нормальных значений продукции иммуноглобулинов G и M ($p < 0,05$). Несмотря на то, что у 63% больных этой группы выявлено снижение количества НК-клеток, цитотоксическая активность естественных киллеров достоверно возросла. У 40% больных с прогрессированием заболевания отмечено значительное повышение числа НК-клеток при одновременном снижении их активности. Кроме того, у данной группы пациентов показано статистически достоверное значительное снижение CD8⁺-лимфоцитов и как следствие этого резкое возрастание иммунорегуляторного индекса с 1,5 до 4,1, а также снижение активационного маркера HLA-DR. Таким образом, необходимо проводить динамическое наблюдение за состоянием иммунитета больных РП для повышения эффективности иммунотерапии

цитокинами и выявления иммунологических критериев, коррелирующих с прогнозом заболевания.

ОНКОМАРКЕРЫ СЛЮННОЙ ЖИДКОСТИ В ДИАГНОСТИКЕ ПАЦИЕНТОВ С ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ПОЛОСТИ РТА

**Кочурова Е.В., Серяков А.П., Козлов С.В.,
Казаков С.П.**

*Главный военный клинический госпиталь
им. акад. Н.Н. Бурденко МО РФ, Москва, Россия*

В последнее время, в связи с особенностями биологического роста плоскоклеточного рака органов полости рта (ПКР ОПР), возможность уточнения диагноза и прогноза заболевания остается достаточно трудной задачей. Также это связано с поздним обращением больных, из которых 70% и к моменту диагностирования уже имеют опухоли со стадиями T₃N_xM_x и T₄N_xM_x.

ПКР ОПР представляет собой наиболее распространенную форму злокачественных заболеваний челюстно-лицевой области.

Вместе с тем, в настоящее время единственным методом скрининга являются: определение онкомаркеров (ОМ) в плазме крови. Недостаток этого обследования заключается в сложности его проведения, т.к. метод инвазивный и требует определенных условий. В связи с этим нами разработан неинвазивный метод определения ОМ в слюнной жидкости.

В ходе исследования были получены результаты:

Проведено обследование 25 пациентов с ПКР ОПР (М:Ж = 22:3). Медиана возраста пациентов — 46,2 лет. Для исследования ОМ производили забор крови и слюнной жидкости стандартным способом. Исследование следующих ОМ — СА 72-4, АФП, СА 19-9, РЭА, СА-125, НСЕ, CYFRA 21-1, CA15-3, ПСА и ХГ — выполняли иммуноэлектрохемилюминисцентным методом на аппарате Elecsys-2010 фирмы «Рош-Москва» (Швейцария).

Все больные проходили стандартное клиничко-инструментальное и лабораторное обследование. Для установления связи содержания ОМ в крови и слюнной жидкости эти ОМ определяли с разницей между заборами крови и слюны не более 24 ч.

В ходе исследования были получены следующие результаты: средний уровень ОМ у больных равен: РЭА — 230±80 нг/мл, CYFRA 21-1 — 23,5±5,2 нг/мл, НСЕ 5,6±1,0 нг/мл (примечание: $p < 0,05$ — различия достоверны).

Из них параллельность повышенных результатов в крови и слюне одновременно наиболее часто наблюдали: РЭА (32,5%), CYFRA 21-1 (27,5%), НСЕ (27,5%).

Полученные результаты доказывают возможность исследования гемато-саливарного барьера по данным ОМ у больных с ПКР ОПР. Практически все ОМ имели повышенный результат в сравнении с нормой (в слюне и/или в крови). В то же время, наибольшей значимостью обладали следующие ОМ — РЭА, CYFRA 21-1, НСЕ.

Таким образом, данные ОМ можно использовать как дополнительный метод для ранней диагностики, мониторинга и скрининга больных плоскоклеточным раком полости рта.

ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ СТВОЛОВОКЛЕТОЧНОГО АНТИГЕНА CD34 В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗОВ

Купрышина Н.А., Френкель М.А., Тупицын Н.Н.

*ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, лаборатория
иммунологии гемопоэза, Москва, Россия*

Исследование иммунофенотипических характеристик лейкозного клона и, в частности, наиболее ранней фракции бластных клеток больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), экспрессирующих антиген CD34, представляется актуальным в силу ряда причин. По наличию стволовых клеток CD34 и уровню его экспрессии можно судить о степени зрелости лейкоэмической популяции в целом. Во фракции CD34⁺-бластов определяются наименее дифференцированные лейкозные стволовые клетки (ЛСК) с фенотипом CD34⁺CD38⁻, которые, как полагают, обуславливают резистентность клеток к медикаментозному лечению.

Морфологическое, цитохимическое и иммунофенотипическое исследование бластов в аспиратах костного мозга было выполнено у 81 больного первичным ОМЛ. Иммунофенотипирование проводилось методом проточной цитометрии с использованием тройной флуоресцентной метки с общелейкоцитарным антигеном CD45 на приборе FACScan (Becton Dickinson, США). Панель моноклональных антител включала антитела к стволовым клеточному антигену CD34, линейно-нерестриктированным антигенам CD38 и HLA-DR, антигенам миелоидной линии дифференцировки CD13 и C33, моноцитарной — CD64 и CD14, эритроидной — GlyA, мегакариоцитарной — CD61, общему антигену острого лимфобластного лейкоза CD10, B-, T- линейным и NK- клеточным антигенам.

Экспрессия антигена CD34 (> 10%) выявлена у 62 из 81 больного (76,5%) ОМЛ. Частота экспрессии антигена при различных ФАБ-вариантах составила: M0 — 100%, M1 — 66,7%, M2 — 94,4%, M3 — 20%, M4 — 78,6%, M4эоз — 100%, M5 — 50%. Высокие уровни (> 50% позитивных клеток) были характерны только для бластных клеток с минимальными признаками дифференцировки (M0 по ФАБ-классификации). При всех остальных вариантах ОМЛ (M1-M6) среднее число CD34-положительных клеток не превышало 50% (11,0-49,6%) и было достоверно ниже, чем при M0 (82,5%, $p < 0,01$). Особый интерес представили бласты 9 (11,1%) пациентов ОМЛ, на которых определялась aberrантная коэкспрессия антигена стволовых клеток CD34 и фермента миелопероксидазы, характерной для клеток, коммитированных в гранулоцитарном направлении. Aberrантная экспрессия лимфоидного антигена CD7 при ОМЛ была обнаружена в 21% случаев, причем отмечена высокая корреляция между экспрессией CD7 и CD34 ($p = 0,005$). Фракция CD34⁺CD38⁻ ранних гемопоэтических предшественников определялась у 23,4% больных при большинстве вариантов, за исключением M3, M6 и M7 ОМЛ. Частота ее выявления при различных ФАБ-вариантах оказалась примерно равной: при M0 — 33,3% (3/10), M1 — 22,2% (4/18), M2 — 35,3% (6/17), M4 — 25,0% (4/16), M5 — 14,3% (1/7).

Таким образом, выявление стволовых клеток CD34 при ОМЛ позволяет охарактеризовать представительство наименее дифференцированных клеток

в злокачественном клоне: экспрессия антигена CD34 коррелировала с наименее морфологически дифференцированным типом бластов, ассоциировалась с наличием антигена CD7. У четверти больных ОМЛ определялась фракция самых ранних лейкоэмических клеток CD34⁺CD38⁻.

ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА ХЕМОКИНОВ CCR5 В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ИММУНИТЕТА ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Литвяков Н.В., Стахеева М.Н., Гарбуков Е.Ю.,
Пономарева А.А., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В.**

*ГУ НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН,
г. Томск, Россия*

Введение. CCR5 — один из рецепторов мононуклеарных клеток к ряду ключевых хемокинов: MIP-1, MCP-2α, MCP-2β, RANTES, которые регулируют миграцию иммунных клеток в опухолевый очаг, участвуют в противоопухолевом иммунном ответе и могут контролировать хемотаксис опухолевых клеток, определяя их метастатический потенциал. Связывание CCR5 с лигандом приводит к хемотаксису клеток памяти и активированных Th0, моноцитов, В-лимфоцитов, а также активации Th1- и Th2-клеток. В регуляции экспрессии CCR5 в различных иммунных клетках участвуют ИФНγ, ФНОα, ИЛ10, ИЛ12, ИЛ-15, М-КСФ и хемокины [Azenshtein E. et al., 2002, Zella D. et al., 1999]. В то же время, иммунологические механизмы регуляции экспрессии CCR5 в лейкоцитах крови при раке молочной железы (РМЖ) практически не изучены.

Цель работы: исследование взаимосвязи экспрессии CCR5 в лейкоцитах крови больных РМЖ с показателями иммунного статуса.

Материалы и методы. В исследование было включено 55 больных РМЖ, находящихся на лечении в ГУ НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, с морфологически верифицированным диагнозом и операбельной формой (T1-4N0-3M0). Уровень экспрессии гена CCR5 определялся в лейкоцитах крови до лечения методом обратнo-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени, относительно экспрессии конститутивного гена «домашнего хозяйства» — GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase). Показатели иммунного статуса определяли стандартными методами. Оценивали продукцию цитокинов лейкоцитами крови: ИЛ-1β, TNFα, ИЛ-2, ИЛ-4, ИФНγ; пролиферацию лимфоцитов крови: спонтанную, ФГА и ЛПС — стимулированную; количество лейкоцитов и лимфоцитов, абсолютное и% содержание субпопуляций CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4/CD8, CD16⁺, CD25⁺, CD72⁺; концентрацию иммуноглобулинов М, А, G в крови. Для выборок определяли коэффициент корреляции Спирмена, статистические различия оценивали с использованием t-критерия Стьюдента для независимых групп в программе STATISTICA 6.0.

Результаты. Мы выявили существенное различие уровня экспрессии гена CCR5 в лейкоцитах крови в зависимости от размера первичной опухоли (в соответствии с классификацией TNM). У больных с большим размером первичной опухоли (T₃ и T₄) экспрессия CCR5 выше, чем у больных меньшим размером опухолевого узла (T₁ и T₂)

(76,38±7,49% и 53,61±4,31% соответственно, $p = 0,0132$). Известно, что больные РМЖ с сохраненным менструальным циклом имеют более неблагоприятный прогноз. Нами было показано, что у больных РМЖ с сохраненным менструальным циклом уровень экспрессии CCR5 ниже, чем у больных в период менопаузы (56,88±5,51% и 71,25±5,19% соответственно, $p = 0,027$). В дальнейшем мы анализировали взаимосвязь экспрессии CCR5 с показателями иммунного статуса отдельно по группам. У больных T_1 и T_2 экспрессия CCR5 коррелирует с относительным содержанием в крови $CD16^+$ -клеток ($r = 0,49^*$) и не ассоциирована с количественными показателями других субпопуляций лейкоцитов. У больных T_3 и T_4 экспрессия CCR5 ассоциирована с абсолютным количеством $CD8^+$ -клеток в крови ($r = 0,87^*$), тогда как, в общей группе отмечается лишь слабая корреляция с относительным количеством $CD25^+$ -лимфоцитов ($r = 0,35^*$). Можно полагать, что у больных T_1 и T_2 CCR5 экспрессируют, главным образом, NK-клетки, а у больных T_3 и T_4 — $CD8^+$ -клетки. В общей группе и у больных T_1 и T_2 (но не у больных T_3 и T_4) имеется взаимосвязь экспрессии CCR5 в лейкоцитах крови с уровнем продукции ИЛ-4 ($r = 0,57^*$ и $r = 0,58^*$). В то же время экспрессия CCR5 не ассоциирована с ИЛ-1 β , TNF α , ИЛ-2 и ИФН γ . По-видимому, при РМЖ ИЛ-4 регулирует экспрессию CCR5 в лейкоцитах крови. У больных с сохраненным менструальным статусом экспрессия CCR5 не связана с конкретной субпопуляцией лимфоцитов (лимфоциты% $r = -0,67^*$), а отрицательный коэффициент корреляции может указывать на взаимосвязь с другими популяциями лейкоцитов, например, с моноцитами, а как указывает Stewart T.H.M. et al. (1997) моноцитарная инфильтрация опухоли РМЖ коррелирует с неблагоприятным прогнозом. У больных в период менопаузы CCR5 экспрессируется равномерно всеми субпопуляциями лимфоцитов ($r = 0,63-0,84$). Таким образом, у больных РМЖ экспрессия рецептора CCR5 имеет различные взаимосвязи с показателями иммунитета в зависимости от клинико-патологических особенностей.

ВАКЦИНОТЕРАПИЯ АУТОЛОГИЧНЫМИ ЦЕЛЬНЫМИ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ, МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ГЕНОМ TAG7, БОЛЬНЫХ СОЛИДНЫМИ ОПУХОЛЯМИ

Моисеенко В.М.¹, Данилов А.О.¹, Ларин С.С.², Данилова А.Б.¹, Балдуева И.А.¹, Тюкавина Н.В.¹, Фахрутдинова О.Л.¹, Орлова Р.В.¹, Туркевич Е.А.¹, Анисимов В.В.¹, Гафтон Г.И.¹, Кочнев В.А.¹, Барчук А.С.¹, Канаев С.В.¹, Гнучев Н.В.², Георгиев Г.П.²

¹ НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова Росздрава, Санкт-Петербург

² Институт биологии гена РАН, Москва

Введение. Одним из наиболее перспективных подходов к созданию противоопухолевых вакцин является модификация опухолевых клеток генами цитокинов. При этом продукты, синтезируемые модифицированными опухолевыми клетками, активируют антигенпрезентирующие клетки (АПК), стимулируют цитотоксические Т-лимфоциты, в том числе против антигенов клеток данной опухоли. В настоящее время проводится большое количество

исследований с целью клинической оценки этого метода биотерапии при опухолях различных локализаций. Белок Tag7 является гомологом семейства фактора некроза опухоли, обладает цитотоксическими свойствами, способен активировать через посредство АПК лимфоциты, которые, в свою очередь, атакуют и разрушают как модифицированные, так и неизмененные опухолевые клетки.

Цель работы: оценить клиническую и иммунологическую эффективность вакцинотерапии с помощью модификации геном tag7 аутологичных опухолевых клеток у больных диссеминированной меланомой кожи и метастатическим раком почки.

Материал и методы. Исследование основано на клиническом материале 59 пациентов (45 больных меланомой кожи (МК) и 14 больных раком почки (РП), получавших лечение в НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова с 2001 по 2006 гг. Технология приготовления противоопухолевой вакцины, модифицированной геном tag 7, предполагает дезагрегацию образцов опухоли, культивирование клеток, их трансфекцию с помощью липосом, анализ экспрессии введенных генов методом иммуноблотинга и облучение с целью блокады пролиферации.

Результаты. Были получены культуры опухолевых клеток, модифицированные геном tag 7 (45 культур МК и 14 культур РП) для 59 больных. Минимальное количество трансфицированных клеток в образцах составило 2%, максимальное — 30% (в среднем 8,79±1,82%). Паллиативная вакцинотерапия проводилась 41 пациенту (31 — МК, 10 — РП), адъювантная — 18 (14 — МК после полных циторедуктивных операций и 4 — РП после радикальной нефрэктомии).

Больные получили от 1 до 10 введений вакцины (в среднем 5 введений). Пяти пациентам (8%) выполнены от 18 до 35 введений вакцины. Установлено, что изучаемый аутологичный вакцинный препарат безвреден для больных. Полный регресс у больных не зарегистрирован. Частичный регресс метастазов в легких выявлен у 2 больных (20%) РП из 10 (продолжительность эффекта 23 месяца + и 9 месяцев +) и 1 больного МК (3%) из 31, получавших паллиативное лечение (36 месяцев). Стабилизация процесса — у 11 (27%) пациентов (8 больных МК и 3 больных РП). Средняя продолжительность эффекта составила 6 месяцев (от 2 до 24 месяцев). У 2 больных РП зарегистрирован минимальный регресс метастазов в легких (регресс < 50%) (12 месяцев) и лимфатических узлов (4 месяца).

Медиана безрецидивной выживаемости больных МК составила 8 месяцев. Медиана безрецидивной выживаемости больных РП не достигнута.

Реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) через 48 и 72 ч выявлена у 74% (31 из 42) больных МК и 93% (13 из 14) больных РП. При этом размер гиперемизованного участка увеличился в среднем на 3-4 мм в процессе лечения. У 3 больных (5%) МК во время проведения 1/2 цикла вакцинотерапии зарегистрирована реакция ГЗТ в контрольной точке — месте введения аутологичных немодифицированных опухолевых клеток («bystander effect»).

Иммунологический мониторинг показателей периферической крови больных в процессе вакцинотерапии выявил тенденцию к увеличению абсолютного содержания Т-клеток в периферической крови и усилению их функциональной активности.

Заключение. Вакциноterapia аутологичными опухолевыми клетками, модифицированными геном tag 7, хорошо переносится больными и сопровождается иммунологическим эффектом у 74% больных МК и 93% больных РП. Клинический эффект: частичный и минимальный регресс наблюдали у 12,1% больных (4 РП и 1 МК), у 27% пациентов (3 РП и 8 зарегистрировали стабилизацию заболевания).

Исследование поддержано средствами Правительства Москвы.

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АНТИГЕННОГО СОСТАВА КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ КОЖИ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ВАКЦИН

Моисеенко В.М., Данилова А.Б., Данилов А.О.,
Балдуева И.А.

НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова Росздрава,
Санкт-Петербург, Россия

Введение. Меланома кожи, особенно ее метастатические формы, характеризуются большим гистологическим разнообразием и способностью злокачественных меланоцитов менять уровень экспрессии опухолеассоциированных антигенов (ОАА). Применение противоопухолевой клеточной иммунотерапии в данном случае имеет два существенных ограничения: 1) число пациентов, восприимчивых к этому виду лечения, определяется наличием экспрессии ОАА; 2) меланома может приобретать свойства, позволяющие игнорировать иммунную систему путем снижения синтеза молекул, являющихся мишенью для иммунокомпетентных клеток, и/или антигенов главного комплекса гистосовместимости (МНС). В настоящее время на клетках меланомы идентифицированы несколько типов меланомаассоциированных антигенов (МАО): MART1/melan A, тирозиназа, MITF, gp100, члены семейства MAGE, S100, CD63, CD146. Пептиды, выделенные из этих молекул, способны вызывать ответ цитотоксических Т-лимфоцитов, рестриктивный по МНС. Показано, что уровень и характер экспрессии МАО клетками меланом связан со стадией заболевания. Установлена взаимосвязь уровня выживаемости больных меланомой и степени экспрессии МАО на опухолевых клетках, выделенных из организма пациентов.

Вследствие генетической нестабильности в процессе опухолевой прогрессии клеточная популяция приобретает гетерогенность, в том числе и по экспрессии специфических антигенов. При длительном курсе лечения или при необходимости создания клеточного пула для аллогенной вакцинации используют длительно культивируемые опухолевые клеточные линии. При этом возможен процесс «дивергенции» свойств клеток меланомы, культивируемых *in vitro*, и метастатических клеток, развивающихся в организме больного, что может оказать влияние на клиническую эффективность проводимого лечения.

Цели и задачи. Изучить динамику антигенных свойств клеток меланомы кожи, выделенных от разных больных в процессе их пассирования в культуре с целью получения клеточных линий, способных сохранять стабильный антигенный фенотип.

Результаты. За период 2001-2006 гг. выделены и переведены в культуру клетки из опухолевых образцов от 151

больных меланомой кожи. При этом после процессов диссоциации адаптировались к росту *in vitro* первичные культуры 101 пациента (66,9%), неудачи в культивировании наблюдали в 50 случаях (33,1%). Оптимальными условиями для культивирования большинства культур меланомы кожи являются: среда DMEM/F12, содержащая 20% эмбриональной сыворотки коров, 20% кондиционированной среды культуры FLECh, инсулин, трансферрин, селен в стандартной дозе. Культуры меланомы, полученные от разных больных, проявляли вариабельность в морфологии, типе роста и пролиферативной активности. При анализе изменчивости антигенных свойств в процессе пассирования тестировали на меланомаассоциированные антигены (МАО), антигены HLA I и II класса опухолевые образцы и выделенные из них клетки, обладающие стабильной пролиферативной активностью, на 5, 10, 15, 20, 25, 30 и 35 пассаже. На ранних пассажах (1-5) большинство культур имели антигенный профиль, сходный с определяемым в тканевых образцах. Затем наблюдали усиление гетерогенности экспрессии антигенов в пределах каждой клеточной популяции и одновременно увеличение количества клеток в митотическом цикле, ядра которых окрашиваются антителами к Ki-67. К 25 пассажу MelanA выявляли в 24,3% культур; тирозиназу — 20,5%; MITF — 42,1%; S100 — 33,3%; gp100 — 21,6%; MAGE1 — 80,0%; CD63 — 58,9%; CD146 — 46,6%. В результате длительного пассирования (более 45 пассажей) удалось получить 8 клеточных линий, стабильно воспроизводящих свой антигенный профиль (7,9%), сходный с выявленным в гистологических образцах опухоли. В процессе культивирования клеток меланом происходит потеря экспрессии молекул HLA A/B/C: 1-5 пассаж — окрашенные клетки выявили в 68,9% культур, 35 пассаж — в 36,3% случаев. В тоже время идентификация молекул HLA DQ/DP/DR показала обратную зависимость: 5 пассаж — 44,1%; 35 пассаж — 100%.

Заключение. Длительное культивирование клеток меланом *in vitro* приводит к значительному снижению присутствия исследуемых антигенов. Отсутствие или потеря экспрессии в процессе культивирования МАО и антигенов главного комплекса гистосовместимости является лимитирующим фактором в процессе приготовления вакцин. Необходимо создавать банк опухолевых клеточных линий, используя материал от значительного количества больных.

МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЙ КООПЕРАЦИИ ЭОЗИНОФИЛОВ И ИММУНОЦИТОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СИНДРОМА ЭОЗИНОФИЛИИ

Новицкий В.В., Литвинова Л.С., Рязанцева Н.В.

ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Росздрава», г. Томск, Россия

В последние годы в клинической практике врачей различных специальностей все чаще встречаются заболевания и синдромы, ассоциированные с высокой эозинофилией периферической крови. В интерпретации механизмов формирования феномена эозинофилии открытым остается вопрос о молекулярной природе кооперативных взаимодействий иммунокомпетентных клеток и эозинофилов, где важнейшую роль играет цитокин-рецепторная

сеть. Именно посредством цитокинов, синтезируемых и секретируемых клеткой, осуществляются лиганд-рецепторные взаимодействия, обеспечивающие процессы проведения сигнала внутрь клетки и, соответственно, последующие изменения ее внутриклеточного метаболизма. Дизрегуляция функционирования компонентов, составляющих основу межклеточной кооперации, может обуславливать нарушение процессов созревания, активации и реализации запрограммированной гибели эозинофильных гранулоцитов и приводить к длительному пребыванию последних в периферической крови.

В связи с этим **целью** настоящего исследования явилось установление ключевых механизмов нарушений кооперативного взаимодействия иммунцитов и эозинофилов при заболеваниях, сопряженных с высокой эозинофилией периферической крови.

У 187 чел (92 мужчин и 95 женщин в возрасте от 18 до 50 лет) со злокачественной патологией системы крови (лимфогранулематозом, множественной миеломой и неходжкинскими лимфомами), инвазией *O. felineus*, ассоциированных с синдромом эозинофилии и 38 здоровых доноров с использованием методов иммуноцитохимии, иммуноферментного анализа, проточной цитофлуориметрии была произведена оценка иммунофенотипического профиля лимфоцитов периферической крови, функциональных свойств эозинофилов (определение цитотоксического потенциала и презентации рецепторов к IL-3, IL-5 и эотаксину), концентрации ключевых цитокинов, опосредующих процессы клеточного гомеостаза эозинофильных гранулоцитов (IL-5, IL-3, GM-CSF, eotaxin) в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов и сыворотке крови, уровней спонтанной и индуцированной *in vitro* рекомбинантными формами цитокинов (г-IL-5, г-IL-3, г-eotaxin) клеточной гибели эозинофилов.

В результате проведенных исследований было установлено, что синдром эозинофилии, сопутствующий течению лимфопролиферативных заболеваний системы крови и описторхозной инвазии, сопровождается увеличением продукции ключевых эозинофилспецифичных цитокинов (IL-3, IL-5, GM-CSF) мононуклеарными лейкоцитами и уровня эотаксина в периферической крови на фоне количественного дефицита Т-клеточного звена иммунитета. У всех обследованных пациентов нами было зарегистрировано повышенное количество эозинофильных клеток, несущих рецепторы к IL-3, IL-5 и эотаксину; при дополнительном воздействии на культуру эозинофилов *in vitro* рекомбинантных форм цитокинов (г-IL-3, г-IL-5 и г-эотаксина) было установлено снижение функционального потенциала эозинофильных гранулоцитов в отношении экспрессии рецепторов к IL-3 и IL-5, при их неизменной способности презентировать рецептор к эотаксину. Показано, что у всех обследованных категорий больных вне зависимости от нозологии был снижен уровень спонтанного апоптоза эозинофилов; культивирование *in vitro* эозинофильных лейкоцитов с г-IL-5, г-IL-3 и г-eotaxin у больных описторхозом сопровождалось снижением числа клеток, подвергшихся апоптозу по сравнению с уровнем их спонтанной гибели, в то время как у пациентов со злокачественными заболеваниями системы крови, инкубация эозинофилов с вышеуказанными цитокинами (г-IL-5, г-IL-3 и г-eotaxin), позволила констатировать отсутствие чувствительности эозинофильных

клеток к их антиапоптотическому влиянию. Кроме этого, у всех обследованных пациентов с высокой эозинофилией периферической крови было выявлено значительное напряжение процессов, обеспечивающих реализацию микробицидности эозинофилов, что обуславливает формирование высокого цитотоксического потенциала изученных клеток.

Таким образом, выявленная нами избыточная продукция эозинофилспецифичных медиаторов мононуклеарными клетками с одной стороны и усиление рецепторэкспрессирующей способности эозинофильных гранулоцитов, а также низкий уровень их апоптотической гибели — с другой, могут обуславливать дисбаланс в системе кооперативного взаимодействия изучаемых клеток и являться одним из механизмов, лежащих в основе пролонгированного пребывания эозинофилов в периферической крови при изученных патологиях. В свою очередь, усиление цитотоксического потенциала эозинофильных гранулоцитов, действие которого может реализоваться не только в отношении антигенных структур, но и клеток макроорганизма, позволяет сделать предположение о негативном влиянии длительной эозинофилии крови при патологических процессах разного генеза.

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ IL-4, IL-10, TGF- β ЛИМФОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Олейник Е.К.¹, Олейник В.М.¹, Донников М.Ю.², Чуров А.В.¹, Чурова М.В.¹, Герасимова Л.А.²

¹ Карельский научный центр РАН, Институт биологии, г. Петрозаводск, Россия

² Республиканский онкологический диспансер, г. Петрозаводск, Россия

В настоящее время большой интерес онкоиммунологов вызывает проблема формирования иммунной супрессии у онкологических больных. Одним из механизмов супрессии считается повышенная секреция цитокинов-ингибиторов, продуцентами которых являются клетки опухоли, опухоль-ассоциированные АПК, а также циркулирующие на периферии и инфильтрирующие опухоль регуляторные CD4⁺T-клетки. Исследования последних лет показали, что при опухолевом росте формируется пул регуляторных Т-лимфоцитов (CD4⁺CD25⁺ Treg, Th3 и Tr1), что приводит к усиленной секреции супрессорных цитокинов (TGF- β , IL-10, IL-4) и формированию толерантности по отношению к опухолевым антигенам.

Целью исследования было изучение функциональной активности регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови онкологических больных по уровню экспрессии мембранных маркеров активации и ингибиторных цитокинов IL-10, TGF- β , IL-4, а также влияния рекомбинантного IL-2 (ронколейкина) на экспрессию этих цитокинов.

Методы исследования. Для определения уровня экспрессии мРНК IL-10, TGF- β и IL-4 применяли метод ОТ-ПЦР (метод полимеразной цепной реакции, совмещенный с обратной транскрипцией). С целью изучения влияния IL-2 пробы крови онкологических больных (рак легкого, рак желудка, и рак мочевого пузыря) предвари-

тельно инкубировали с ронколейкином (150 МЕ на 500 мкл крови) в течение 30 минут при 37°C. Тотальную РНК выделяли из цельной крови с использованием набора «AquaPure RNA Blood Kit» (BIO-RAD). Обратную транскрипцию проводили с использованием MMLV-обратной транскриптазы и random праймера. Для ПЦР-анализа использовали Colored Taq-полимеразу и в качестве положительного контроля β -actin. Фенотипирование лимфоцитов проводили методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием мАТ с ФИТЦ. Пробы крови брали у онкологических больных (группа из 12 лиц), которым была проведена комплексная терапия с использованием ронколейкина. Ронколейкин вводился в дозе 1 млн МЕ, начиная с 5-х суток после операции, внутривенно капельно с интервалом 48 ч трехкратно.

Результаты. Изучение уровня экспрессии ингибиторных цитокинов позволяет сделать вывод о том, что у всех больных выявляется экспрессия IL-10 и TGF- β . Анализ динамики экспрессии поверхностных маркеров на фоне иммунотерапии ронколейкином показал, что после введения препарата значительно возрастал уровень экспрессии рецепторов CD25 и CD95. Изучение модулирующего действия IL-2 *in vitro* показало, что предварительная инкубация лимфоцитов с ронколейкином приводит к значительному усилению экспрессии IL-10, тогда как уровень экспрессии TGF- β существенно увеличивался только у больных раком мочевого пузыря. В отличие от IL-10 и TGF- β экспрессия IL-4 у больных была незначительной, однако под влиянием ронколейкина происходило заметное повышение экспрессии этого цитокина.

Таким образом, лимфоциты периферической крови онкологических больных характеризуются увеличением экспрессии маркеров активации CD25 и CD95, а также усилением экспрессии IL-10, и в меньшей мере TGF- β . Ронколейкин в целом усиливает экспрессию иммуносупрессорных цитокинов, но при этом наибольшее влияние оказывает на экспрессию IL-4.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ p53 В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ ЯИЧНИКОВ

**Паниченко И.В., Богатырёв В.Н., Кузнецов В.В.,
Жордания К.И., Заботина Т.Н.**

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

Экспрессия p53 может служить маркером резистентности у больных раком яичников (РЯ) при химиотерапии препаратами платины, вместе с тем прогностическое значение этого показателя остается дискуссионным.

Цель исследования: сопоставление p53-статуса опухоли больных РЯ с клинико-морфологическими показателями, в том числе с оценкой эффективности химиотерапии и отдаленными результатами лечения.

Материалы и методы: в исследование включены 94 больные РЯ I-IV стадий, которым проведено лечение в ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН с 1998 по 2002 гг. Оценку экспрессии мутантного p53 (p53-mut) осуществляли иммуноцитохимически (метод определения экспрессии молекулярно-биологических маркеров на цитологических

препаратах). Для выявления внутриклеточного белка p53 использовали моноклональные антитела DO-7 («ДАКО», Дания).

Результаты. Определение экспрессии p53-mut выполнено у 94 больных РЯ, из них в 69 (73,4%) случаях отмечалась позитивная иммуноцитохимическая реакция. Проведенный анализ экспрессии p53-mut в зависимости от клинико-морфологических факторов у больных РЯ позволил выявить ряд закономерностей. Оказалось, что с увеличением стадии заболевания количество p53-позитивных опухолей также увеличивается. При I стадии заболевания данный белок определялся в опухолях только у 4 (23,5%) пациентов, при II — у 7 (77,8%), при III — у 21 (80,4%) и при IV стадии — у 21 (100%) больной. Различия достоверны при сравнении показателей I и остальных стадий, ($p < 0,05$). Экспрессия p53-mut чаще определялась в светлоклеточных аденокарциномах и в низкодифференцированных новообразованиях по сравнению с другими морфологическими вариантами, но не зависела от размера остаточной опухоли после хирургического вмешательства. Проведенный анализ отдаленных результатов лечения в пределах ранних и поздних стадий показал, что общая и безрецидивная 5-летняя выживаемость больных с p53-mut позитивными опухолями достоверно меньше по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с p53-негативными новообразованиями.

Заключение. Проведенное исследование позволило установить, что p53-статус опухоли у больных РЯ коррелирует со стадией заболевания, морфологическим типом и степенью дифференцировки новообразования. В клинической практике данный показатель вероятно может служить маркером резистентности к химиотерапии препаратами платины. Наличие p53-mut в опухоли больных РЯ является неблагоприятным прогностическим фактором.

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

**Петровский Я.Л., Шевела Е.Я., Курганова Е.В.,
Тихонова М.А., Кулагин А.Д., Лисуков И.А.,
Черных Е.Р., Останин А.А.**

*ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН,
г. Новосибирск, Россия*

Введение. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) представляют собой минорную субпопуляцию клеток костного мозга. Обладая свойствами соматических стволовых клеток, такими как способность к самоподдержанию и дифференцировке в мезенхимальном направлении, МСК формируют микроокружение для кроветворных стволовых клеток и, таким образом, участвуют в регуляции гемопоэза. Кроме того показана низкая иммуногенность МСК и наличие у них супрессорной активности в отношении иммунокомпетентных клеток. Это позволяет с одной стороны рассматривать МСК как важный восстановительный резерв в процессах репарации в постнатальном периоде, с другой — как оптимальный клеточный материал для клеточной терапии, тканевой инженерии и генотерапии.

Целью исследования явился сравнительный анализ морфологических, фенотипических и функциональных свойств МСК больных гемобластозами ($n = 8$) и здоровых волонтеров ($n = 7$).

Материалы и методы. Группа больных включала пациентов с лимфомами ($n = 6$), острым лимфобластным лейкозом ($n = 1$) и множественной миеломой ($n = 1$). МСК получали стандартно из фракции прилипающих клеток аспирата костного мозга, которые длительно культивировали в течение 1-2 пассажей. Количество МСК оценивали по числу колоний фибробластоподобных клеток (CFU-F на 10^6 МНК); фенотип МСК — по экспрессии CD34, CD73, CD90, CD3, CD14, CD20, CD16 и HLA-DR антигенов методом проточной цитофлюориметрии. Распределение клеток по размеру их диаметра оценивали с использованием компьютеризированной видеосистемы и программы MicroMed Images 1.0. Супрессорную активность определяли по способности МСК ингибировать пролиферацию МНК доноров.

Результаты исследования. Количество CFU-F колоний на 14 сутки было достоверно снижено у больных гемобластозами (5,6 vs 30), при этом регистрировалось 2-кратное увеличение периода времени, необходимого для субслияния колоний (31 vs 16 суток). Также выявлены морфологические особенности МСК по характеру распределения в зависимости от диаметра клеток. Так, в популяции МСК больных отсутствовали клетки большого диаметра (> 45 мкм), тогда как количество клеток размером менее 20 мкм было достоверно выше. Тем не менее, в обеих анализируемых группах фракция клеток с диаметром 20-30 мкм являлась доминирующей. Исследования экспрессии поверхностных маркеров выявили общий для доноров и больных гемобластозами фенотип МСК: CD3-CD16-CD20-CD14-CD34-HLA-DR-CD73⁺CD90⁺. МСК доноров характеризовались дозозависимым супрессорным эффектом в смешанной культуре лимфоцитов и в культурах МНК, стимулированных КонаА. Так, МСК при соотношении 1:5 подавляли пролиферативный ответ МНК в среднем на 66% (от 52 до 77% супрессии). В целом по группе больных выявлялся схожий уровень супрессорной активности МСК (до 90%, в среднем 54%). Тем не менее, у одного больного неходжкинской лимфомой супрессорная активность МСК была минимальной и составляла только 23%. Важно отметить, что именно в этом случае в отличие от других пациентов с лимфомами течение основного заболевания характеризовалось вовлечением в опухолевый процесс клеток костного мозга.

Заключение. Таким образом, проведенные сравнительные исследования морфологических, фенотипических и функциональных свойств МСК показали, что при гемобластозах снижено количество, пролиферативный и клоногенный потенциал МСК, а также изменена структура распределения в зависимости от размера клеток. Тем не менее, в процессе культивирования МСК больных, так же как и МСК здоровых волонтеров, формируют однородную популяцию клеток с характерным фенотипом (CD3-CD16-CD20-CD14-CD34-HLA-DR-CD73⁺CD90⁺), которые проявляют выраженную супрессорную активность в отношении активно пролиферирующих моноклеарных клеток. Согласно нашим предварительным данным, снижение супрессорного потенциала МСК у больных лимфомами

сопряжено с вовлечением в опухолевый процесс клеток костного мозга, что может свидетельствовать об участии МСК в локальных механизмах негативного контроля пролиферации клонов опухолевых клеток при гемобластозах.

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ГЕМОБЛАСТОЗОВ

Попов Е.А., Левитан Б.Н., Рий А.А., Овсянникова Е.Г., Медянцев Л.Г.

Медицинская академия, г. Астрахань, Россия

Введение. Изучение особенностей иммуногенетического статуса больных острыми и хроническими лейкозами позволило выдвинуть рабочую гипотезу, что гены HLA кодируют не только отдельные нозологические формы гемобластозов, но и ту или иную клеточную линию кроветворения, к которой относится опухолевый субстрат лейкоза.

Цель исследования: поиск иммуногенетических маркеров лимфопролиферативных и миелолипролиферативных заболеваний системы кроветворения из числа специфичностей HLA в популяции русских астраханской географической зоны.

Материалы и методы. Проведено иммуногенетическое обследование 128 больных гемобластозами. Группу «лимфопролиферативные заболевания» (ЛПЗ) составили 74 пациента: 11 больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), 31 — хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) и 32 — множественной миеломой (ММ). В сборную группу «миелолипролиферативные» заболевания (МПЗ) вошли 54 пациента: 17 больных острым миелобластным лейкозом (ОМЛ), 14 — хроническим миелолейкозом (ХМЛ), 15 — идиопатическим миелофиброзом (ИМФ) и 8 — истинной полицитемией (ИП). Серологическим методом определялись антигены HLA класса I локусов A, B и C. Контроль — 200 здоровых лиц. В установленных ассоциациях рассчитывались показатели относительного риска (RR), этиологической (EF) и превентивной (PF) фракции, степень достоверности (p) полученных результатов с помощью критерия χ^2 .

Основные результаты: В группе больных ЛПЗ установлено достоверное повышение частоты регистрации антигенов HLA-A10 (36,5% $> 21,5\%$ в контроле; RR = 2,10; EF = 0,21; $\chi^2 = 5,614$; $p_c < 0,05$), A28 (20,3% $> 4,5\%$; RR = 5,25; EF = 0,16; $\chi^2 = 14,894$; $p_c < 0,005$), B5 (32,4% $> 17,5\%$; RR = 2,26; EF = 0,24; $\chi^2 = 6,272$; $p_c < 0,05$), B21 (10,8% $> 2,5\%$; RR = 4,54; EF = 0,08; $\chi^2 = 6,518$; $p_c < 0,05$), B35 (24,3% $> 13,0\%$; RR = 2,16; EF = 0,13; $\chi^2 = 4,333$; $p < 0,05$) и B40 (25,7% $> 12,0\%$; RR = 2,53; EF = 0,17; $\chi^2 = 6,637$; $p_c < 0,05$). Кроме того, у больных ЛПЗ зарегистрировано статистически значимое снижение уровня специфичностей HLA-B7 (6,8% $< 21,5\%$; RR = 0,29; PF = 0,19; $\chi^2 = 9,178$; $p_c < 0,05$) и B12 (6,8% $< 17,0\%$; RR = 0,38; PF = 0,11; $\chi^2 = 5,519$; $p < 0,05$). Таким образом, высокий риск развития ЛПЗ ассоциируется с присутствием в фенотипе индивида антигенов HLA-A10, A28, B5, B21, B35 и B40. Превентивным эффектом при ЛПЗ обладают аллели HLA-B7 и B12. Большое число HLA-маркеров риска развития опухолевого перерождения клеток лимфоидного ростка кроветворения является подтверждением

патогенетической гетерогенности нозологических форм, включенных в анализируемую выборку.

Несколько иначе выглядел аллельный полиморфизм HLA в объединенной группе пациентов с МПЗ. Так, зарегистрировано статистически значимое повышение уровня типирования аллелей HLA-A19 ($24,1\% > 10,5\%$; $RR = 2,72$; $EF = 0,17$; $\chi^2 = 5,637$; $p < 0,05$), B5 ($31,5\% > 17,5\%$; $RR = 2,18$; $\chi^2 = 4,283$; $p < 0,05$), B21 ($12,96\% > 2,5\%$; $RR = 5,61$; $\chi^2 = 8,147$; $p < 0,05$) и B35 ($31,5\% > 13,0\%$; $RR = 3,07$; $\chi^2 = 9,055$; $p < 0,05$). Показатель атрибутивно-го риска был наиболее высоким для HLA-B5 ($EF = 0,32$) и B35 ($EF = 0,22$). Это указывает на первичность установленной ассоциации аллелей HLA-B5 и B35 с МПЗ. С частотой, ниже контрольной, в группе больных МПЗ типировалась специфичность HLA-B7 ($9,3\% < 21,5\%$; $RR = 0,40$; $PF = 0,21$; $\chi^2 = 4,994$; $p < 0,04$). Таким образом, маркерными специфичностями высокого риска развития системного заболевания крови из миелоидного ростка кроветворения являются антигены HLA-A19, B5, B21 и B35. Превентивный эффект обусловлен присутствием в фенотипе индивида аллеля HLA-B7.

Заключение. Сравнительный анализ иммуногенетических маркерных спектров ЛПЗ и МПЗ показал, что гены HLA-B5, B21 и B35 являются универсальными маркерами предрасположенности к злокачественному перерождению кроветворной ткани. Происхождение опухолевого клона из лимфоидной клеточной линии связано с генами HLA-A10, A28 и B40. Миелоидная направленность патологического клона кроветворных клеток ассоциируется с геном HLA-A19. Аллель HLA-B7 обладает превентивным эффектом, маркируя резистентность к гемобластозам в целом.

ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

Савченко А.А., Лапешин П.В., Дыхно Ю.А.

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

Метастазы злокачественных опухолей значительно осложняют течение заболевания. При этом, метастазирование развивается не только на поздних стадиях развития опухоли, но в ряде случаев уже на ранних стадиях заболевания метастазы обнаруживаются в региональных лимфоузлах.

Целью исследования явилось изучение состояния иммунного статуса у больных немелкоклеточным раком легкого.

На базе торакального отделения Красноярского краевого онкологического диспансера обследовано 90 пациентов в возрасте 30-55 лет, страдающих раком легкого. Всем пациентам выполнены расширенные лоб-, биллоб- и пульмонэктомии. В качестве контроля обследовано 106 здоровых мужчины аналогичного возраста. Фенотипический состав лимфоцитов оценивали с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции. Концентрацию иммуноглобулинов А, М и G в сыворотке определяли методом радиальной иммунодиффузии по Манчини. Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК)

в сыворотке изучали методом селективной преципитации в полиэтиленгликоле.

При исследовании состояния клеточного иммунитета у больных раком легкого в зависимости от метастазирования обнаружено значительное сходство изменений величин исследуемых показателей относительно контроля в группах больных без метастазов и с метастазами в лимфоузлы корня легкого. Так, независимо от метастазирования в лимфоузлы у больных мужчин повышается концентрация лейкоцитов в периферической крови, снижается относительный уровень общих лимфоцитов, понижается относительное и абсолютное содержание CD3⁺- и CD4⁺-клеток. Снижение содержания CD4⁺-лимфоцитов соответственно приводит к понижению величины иммунорегуляторного индекса. Кроме того, также независимо от метастазирования у больных относительно контрольных значений у больных раком легкого повышается относительная концентрация CD16⁺-лимфоцитов и процентный и абсолютный уровень CD72⁺- и HLA-DR⁺-клеток. Только у больных раком легкого с метастазированием в лимфоузлы понижается относительная и абсолютная концентрация CD8⁺-лимфоцитов. Состояние гуморального иммунитета у больных раком легкого также практически не зависит от метастазирования в лимфоузлы корня легкого. Так, независимо от метастазирования у больных мужчин относительно контрольных значений повышается концентрация IgA и снижается уровень IgG и ЦИК в сыворотке крови. Также независимо от метастазирования в лимфоузлы снижается уровни относительного синтеза IgA, IgM и IgG. Однако только у больных раком легкого с метастазированием в лимфоузлы корня легкого статистически достоверно повышается сывороточная концентрация IgM. Изучение популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов в лимфоузлах корня легкого показало, что различий в исследуемых показателях в зависимости от метастазирования у больных раком легкого нет. Однако, выявляются особенности в корреляционных взаимосвязях между клеточным составом крови и лимфоузлов. Так, у больных раком легкого без метастазирования величина индекса HLA-DR⁺/CD72⁺ в лимфоузлах положительно взаимосвязана с величиной данного соотношения крови ($r = 0,60$, $p < 0,05$). В то же время, у больных мужчин с метастазированием опухоли концентрация В-лимфоцитов лимфоузлов также положительно взаимосвязана с уровнем данной популяции клеток крови ($r = 0,51$, $p < 0,05$).

Таким образом, при исследовании особенностей иммунного статуса и уровней активности метаболических ферментов в лимфоцитах крови в зависимости от метастазирования обнаружено, что состояние клеточного и гуморального иммунитета в крови незначительно изменяется при метастазировании. Особенностью у больных раком легкого при метастазировании опухоли в региональные лимфоузлы является снижение содержания цитотоксических Т-лимфоцитов и повышение уровня IgM. Различий в фенотипическом составе иммунокомпетентных клеток у больных раком легкого без метастазов и с метастазами не обнаружено. Однако, с помощью корреляционного анализа установлено, что у больных раком легкого в зависимости от метастазирования опухоли выявляются различия в особенностях циркуляции клеток между кровью и лимфоузлами.

**ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ
ОТ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ
ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ****Смирнова О.В., Манчук В.Т., Савченко А.А.***ГУ НИИ Медицинских проблем Севера СО РАМН,
г. Красноярск, Россия*

Введение. Хронический миелолейкоз (ХМ) — распространенный вид лейкоза, на долю которого приходится около 20% среди всех лейкозов. Тяжелое течение заболевания, неуклонное прогрессирование процесса, не смотря на проводимое лечение, большое количество осложнений, трудоспособный возраст заболевших — все это определяет чрезвычайную актуальность дальнейшего изучения патогенеза ХМ с позиций механизмов иммунореактивности.

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей клеточного и гуморального иммунитета у больных ХМ в зависимости от стадии заболевания.

Материалы и методы. Всего под наблюдением находилось 44 больных ХМ. Средний возраст заболевших составил $55,2 \pm 2,4$ года. У 20 больных ХМ заболевание диагностировалось в развернутую стадию, а у 24 больных — в терминальную стадию. В качестве контроля обследовано 106 здоровых лиц аналогичного возраста.

Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, HLA-DR. Дополнительно вычислялись иммунорегуляторный индекс, лейко-Т-клеточный, лейко-В-клеточный индексы и индекс активации Т-лимфоцитов. Концентрация иммуноглобулинов класса А, М и G в сыворотке определяли иммуноферментным методом. Оценка клеточного, гуморального иммунитета проводилась при поступлении больных до начала патогенетического лечения. Описание выборки производили с помощью подсчета медианы и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ STATISTICA 7.0.

Основные результаты. При исследовании состояния клеточного звена иммунитета у больных ХМ установлено, что в терминальной стадии снижаются абсолютное содержание лейкоцитов и лимфоцитов в крови, относительно контроля, а последний параметр и относительно показателей больных в развернутой стадии. У больных ХМ снижаются относительные уровни CD3⁺-, CD4⁺-клеток, повышается процентный уровень CD72⁺-лимфоцитов, относительно показателей контроля. У больных в терминальной стадии ХМ снижаются абсолютные концентрации CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD16⁺-, CD72⁺-лимфоцитов и лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR⁺-антиген, относительно контроля, показатели абсолютного содержания CD8⁺-, CD72⁺-, HLA-DR⁺-лимфоцитов достоверно ниже, чем у больных в развернутой стадии. У больных в развернутой стадии абсолютные показатели CD72⁺- и HLA-DR⁺-лимфоцитов достоверно выше, чем у больных в терминальной стадии и контрольной группы. У больных ХМ независимо от стадии заболевания снижен лейко-В-клеточный коэффициент, относительно контроля.

У больных в развернутой стадии снижен иммунорегуляторный индекс, по сравнению с контролем.

При исследовании состояния гуморального иммунитета установлено, что у больных в развернутой стадии, относительно контроля, снижены коэффициенты относительного синтеза IgA и IgM, при чем последний показатель достоверно ниже, чем у больных в терминальной стадии. У больных в терминальной стадии снижены концентрации IgA и IgM в крови, относительно контроля.

Заключение. На всех стадиях ХМ обнаружены значительные изменения состояния иммунного статуса. Так, у больных в развернутой стадии выявлены нарушения клеточного и гуморального звеньев иммунитета, характеризующиеся снижением относительных уровней общих Т-лимфоцитов и их подгрупп, увеличением абсолютного и относительного содержания В-лимфоцитов и абсолютного уровня лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR антиген. У больных в терминальной стадии ХМ обнаружены более выраженные изменения иммунного статуса, характеризующиеся снижением не только лейкоцитов и общих лимфоцитов в крови, но и снижением относительного и абсолютного содержания общих Т-лимфоцитов и их иммунорегуляторных подгрупп, снижением абсолютного количества в крови NK-клеток, В-лимфоцитов и лимфоцитов, продуцирующих HLA-DR антиген. На этой стадии только повышен относительный уровень В-лимфоцитов. У больных в терминальной стадии ХМ наиболее выражены изменения гуморального иммунитета, проявляющиеся в виде снижения концентрации в крови иммуноглобулинов IgA и IgM. У больных ХМ и в развернутую, и в терминальную стадии развивается Т-иммунодефицит. Особенностью терминальной стадии больных ХМ является снижение содержания NK-клеток и В-лимфоцитов.

**ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ
ОТ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ
ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ****Смирнова О.В., Манчук В.Т., Савченко А.А.***ГУ НИИ Медицинских проблем Севера СО РАМН,
г. Красноярск, Россия*

Введение. Острые лимфобластные лейкозы (ОЛЛ) — это лейкозы, число которых значительно увеличилось в последние годы среди других онкологических заболеваний крови. В настоящее время недостаточно исследованы иммунологические механизмы, способствующие возникновению заболевания, не оценена их роль в прогрессировании лейкоза. Все это определяет чрезвычайную актуальность дальнейшего изучения патогенеза ОЛЛ с позиций механизмов иммунореактивности.

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей состояния метаболического статуса лимфоцитов крови у больных ОЛЛ в зависимости от стадии заболевания.

Материалы и методы. Всего под наблюдением находилось 73 больных ОЛЛ с иммуновариантом пре-пре-В. Средний возраст заболевших составил $35,4 \pm 1,7$ лет. У 25 больных ОЛЛ диагностировался в стадии первичной атаки, у 26 больных — в стадии полной ремиссии, у 22 больных — в стадии повторного рецидива. В качестве контроля изучены 106 здоровых лиц аналогичного возраста.

Определение активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови проводилось биолюминесцентным методом. Данным методом определялась активность следующих ферментов: Г-6-ФДГ, Г-3-ФДГ, НАД-ФМДГ, ЛДГ, НАДН-ЛДГ, МДГ, НАДН-МДГ, НАДФ-ГДГ, НАДФН-ГДГ, НАД-ГДГ, НАДН-ГДГ, НАД-ИЦДГ, НАДФ-ИЦДГ, ГР. Оценка активности метаболических ферментов проводилась при поступлении больных до начала патогенетического лечения. Описание выборки производили с помощью подсчета медианы и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по критерию Манна-Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете программ STATISTICA 7.0.

Основные результаты. При оценке состояния метаболического статуса лимфоцитов крови у больных ОЛЛ установлено, что активность Г-3-ФДГ снижена относительно контроля на стадиях атаки и рецидива заболевания. При ремиссии активность данного фермента достоверно выше, чем при рецидиве заболевания. Независимо от стадии заболевания в лимфоцитах крови больных снижена активность ЛДГ и МДГ. На стадии атаки у больных снижена активность НАД-ГДГ. Активность НАД-ИЦДГ в лимфоцитах крови у больных на стадиях атаки и ремиссии снижена относительно контроля, а при рецидиве повышена, по сравнению с уровнем, при атаке. Исследование активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови позволило установить, что у больных независимо от стадии заболевания, при сравнении с контролем, снижен уровень НАДФ-ИЦДГ. При этом снижение активности фермента при рецидиве заболевания проявляется, и по сравнению, с уровнем при атаке. Активность ГР в лимфоцитах крови снижена при ремиссии и рецидиве.

При исследовании активности НАДН-зависимых реакций оксидоредуктаз в лимфоцитах крови установлено, что независимо от стадии ОЛЛ снижен уровень НАДН-ЛДГ относительно контроля. При ремиссии и рецидиве заболевания активность НАДН-МДГ в лимфоцитах ниже, чем в контроле и у больных на стадии атаки. Только при рецидиве обнаружено снижение активности НАДН-ГДГ в лимфоцитах крови, относительно контроля.

Заключение. В целом у больных ОЛЛ наибольшие изменения в активности ферментов наблюдались при рецидиве. У больных с атакой снижен уровень переноса продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза. Ингибирование ферментативных реакций гликолиза в лимфоцитах больных осуществляется на терминальных реакциях. Снижается интенсивность субстратного потока по лимонному циклу у больных с атакой. У этих больных определяется недостаточность метаболических реакций митохондриального компартмента. У больных в стадии ремиссии дополнительно к нарушениям в циклах Кребса и лимонном, присоединяется снижение перекисных процессов в клетках крови. У больных при рецидиве снижается интенсивность переноса продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза, стимулируется анаэробное окисление глюкозы, ингибируется гликолиз на терминальных реакциях. У больных снижается субстратный поток по лимонному циклу, снижается митохондриальный транспорт, нарушаются взаимосвязи с белковым обменом и перекисные процессы в клетках крови.

На всех стадиях ОЛЛ наблюдается выраженное уменьшение интенсивности метаболических процессов лимфоцитов, однако, на стадии атаки дополнительно увеличиваются пластические процессы и изменения метаболизма регистрируются в углеводном, жировом и белковом обменах, при ремиссии и рецидиве — дополнительно снижается антиоксидантная защита клеток, при этом изменения в ремиссии только в углеводном обмене, а при рецидиве — во всех видах обмена.

АНАЛИЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ОТ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ НЕЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Смирнова О.В., Савченко А.А., Манчук В.Т.

ГУ НИИ Медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск, Россия

Введение. Острые нелимфобластные лейкозы (ОНЛЛ) — наиболее частые заболевания среди острых лейкозов. В настоящее время остаются малоизученными многие патогенетические аспекты возникновения и прогрессирования этой патологии, причины и механизм развития осложнений.

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей состояния клеточного и гуморального иммунитета у больных ОНЛЛ в зависимости от стадии заболевания.

Материалы и методы. Всего под наблюдением находились 100 больных ОНЛЛ, с иммуновариантом М4. Средний возраст заболевших составил $42,7 \pm 1,5$ лет. У 30 больных ОНЛЛ был в стадии первичной атаки, у 49 — в стадии полной ремиссии после проведенного лечения, и у 21 — в стадии повторного рецидива. В качестве контроля обследовано 106 здоровых лиц аналогичного возраста и пола.

Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, HLA-DR. Дополнительно вычисляли иммунорегуляторный индекс, лейко-Т-клеточный, лейко-В-клеточный индексы и индекс активации Т-лимфоцитов. Концентрация иммуноглобулинов класса А, М и G в сыворотке определяли иммуноферментным методом. Оценка иммунитета проводилась при поступлении больных до начала патогенетического лечения. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ STATISTICA 7.0.

Основные результаты. При исследовании состояния клеточного иммунитета у лиц контрольной группы и больных ОНЛЛ установлено, что на стадии атаки у больных снижается процентное количество CD3⁺- и CD4⁺-клеток. На стадии ремиссии относительно контроля снижены абсолютное количество лейкоцитов, абсолютный и относительный уровни лимфоцитов, CD3⁺-, CD4⁺- и CD8⁺-клеток. Снижение абсолютного количества клеток выявляется относительно показателей контроля и у больных на стадии атаки. На стадии рецидива ОНЛЛ у больных относительно контроля и больных на стадии атаки установлено снижение абсолютного количества лимфоци-

тов и CD8⁺-клеток. Только относительно показателей больных на стадии ремиссии, при рецидиве повышается процентный уровень лимфоцитов крови. Содержание CD16⁺-, CD72⁺- и HLA-DR⁺-лимфоцитов у больных на стадии атаки не изменяется относительно контроля. На стадии ремиссии относительно показателей контроля и атаки снижены процентное и абсолютное содержание CD16⁺-клеток и абсолютные уровни CD72⁺- и HLA-DR⁺-лимфоцитов. При рецидиве обнаружено снижение относительного и абсолютного содержания CD16⁺-лимфоцитов и абсолютного уровня HLA-DR⁺-клеток. У больных на стадии ремиссии повышается величина индекса активации Т-лимфоцитов относительно контроля. Снижение CD3⁺- и CD72⁺-лимфоцитов на стадии ремиссии привело к увеличению величин лейко-Т- и лейко-В-клеточных коэффициентов относительно контроля.

При исследовании состояния гуморального иммунитета установлено, что при первичной атаке концентрация иммуноглобулинов основных классов и величина уровней относительного синтеза иммуноглобулинов не отличается от контроля, при ремиссии снижена концентрация IgG относительно контроля и показателей при атаке, а также повышены величины уровней относительного синтеза IgM и IgG. При рецидиве снижены концентрации всех основных классов иммуноглобулинов. Снижение концентрации IgG установлено относительно контроля и больных при атаке. Также снижен уровень относительного синтеза IgG относительно больных на стадии ремиссии.

Заключение. На всех стадиях ОНЛЛ обнаружены значительные изменения состояния иммунного статуса, наиболее выраженные у больных с рецидивом. Так, на стадии атаки выявлены самые незначительные изменения, в виде снижения относительного уровня Т-лимфоцитов и CD4⁺-клеток, при этом состояние гуморального звена иммунной системы соответствует контролю. На стадии ремиссии заболевания выявлены выраженные изменения, в виде снижения всех параметров клеточного иммунитета и содержания IgG в крови. На стадии рецидива сохраняются сниженные параметры клеточного иммунитета, и наблюдается гипогаммаглобулинемия по всем классам.

На стадии атаки и ремиссии ОНЛЛ развивается Т-иммунодефицит, на стадии рецидива — комбинированный иммунодефицит с поражением Т- и В-систем иммунитета. Истощение NK-клеток способствует прогрессированию заболевания и развитию рецидива.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В КЛЕТКАХ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Смирнова О.В., Савченко А.А., Манчук В.Т.

ГУ НИИ Медицинских проблем Севера СО РАМН,
г. Красноярск, Россия

Введение. Хронический лимфолейкоз (ХЛ) является неоднородным заболеванием, имеющим множество форм с различной клинической картиной, длительностью болезни и ответом на терапию. В настоящее время окончательно не уточнены патофизиологические характеристики этого заболевания, что и послужило поводом для проведения нашего исследования.

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей состояния метаболического статуса лимфоцитов крови у больных ХЛ в зависимости от стадии заболевания.

Материалы и методы. Всего под наблюдением находилось 57 больных ХЛ. Средний возраст заболевших составил 55,4±1,6 лет. У 32 больных ХЛ заболевание диагностировалось в развернутую стадию, у 25 больных — в терминальную стадию. В качестве контроля обследовано 106 здоровых лиц аналогичного возраста.

Определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови проводилось биOLUMИ-несцентным методом. Данным методом определялась активность следующих ферментов: Г-6-ФДГ, Г-3-ФДГ, НАДФ-МДГ, ЛДГ, НАДН-ЛДГ, МДГ, НАДН-МДГ, НАДФГДГ, НАДФН-ГДГ, НАД-ГДГ, НАДН-ГДГ, НАД-ИЦДГ, НАДФ-ИЦДГ, ГР. Оценка активности метаболических ферментов проводилась при поступлении больных до начала патогенетического лечения. Описание выборки производили с помощью подсчета медианы и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по критерию Манна-Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете программ STATISTICA 7.0.

Основные результаты. При исследовании состояния метаболического статуса лимфоцитов крови у больных ХЛ установлено, что на всех стадиях заболевания снижается активность ферментов ЛДГ, НАДФ-ИЦДГ, МДГ, НАД-ИЦДГ, НАДН-ЛДГ относительно контроля. У больных в развернутой стадии дополнительно снижается активность НАД-ГДГ, а у больных в терминальной стадии — Г-3-ФДГ, НАДФ-МДГ, НАДН-МДГ, НАДН-ГДГ, относительно контроля.

При исследовании состояния метаболического статуса лимфоцитов крови у больных ХЛ вне зависимости от стадии заболевания нарушалась активность НАД-, НАДФ- и НАДН-зависимых дегидрогеназ, при этом наибольшие изменения в активности ферментов лимфоцитов наблюдались у больных в терминальной стадии. У больных в развернутую стадию снижена интенсивность гликолиза и уменьшен уровень концентрации интермедиаторов для цикла трикарбоновых кислот. При этом можно предположить, что ингибирование ферментативных реакций гликолиза в лимфоцитах крови больных осуществляется на терминальных реакциях. У больных снижается интенсивность субстратного потока по лимонному циклу. У больных в развернутой стадии имеется недостаточность метаболических реакций митохондриального компартмента, и нарушены взаимосвязи между реакциями цикла Кребса и процессами аминокислотного обмена. У больных в терминальной стадии ХЛ обнаружено снижение интенсивности переноса продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза, возможно ингибирование процессов липидного анаболизма, ингибируются ферментативные реакции гликолиза в лимфоцитах крови больных на терминальных реакциях. У больных данной группы в митохондриальный компартмент поступает пониженное количество субстрата, что, соответственно, приводит к ингибированию ферментативных реакций цикла трикарбоновых кислот. Также снижаются интенсивности субстратного потока по лимонному циклу. Недостаточность метаболи-

ческих реакций митохондриального компартмента также определяется снижением активности вспомогательной дегидрогеназной реакции и нарушением взаимосвязей между реакциями цикла Кребса и процессами аминокислотного обмена.

Заключение. У больных ХЛ в развернутую и терминальную стадии уменьшается интенсивность метаболических процессов ферментов лимфоцитов, однако, наибольшие биохимические изменения в развернутую стадию обнаруживаются в углеводном и белковом обменах, а в терминальную — в углеводном, белковом и жировом обменах.

ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА, ПРОЛИФЕРАЦИИ И ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РМЖ

Стахеева М.Н., Чердынцева Н.В., Слонимская Е.М., Гарбуков Е.Ю., Бабышкина Н.Н., Кухарев Я.В., Галимуллина М.Р.

НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, г. Томск, Россия

Количественный гомеостаз и функциональная активность иммунной системы являются результатом динамического равновесия между гибелью клеток и восполнением их в процессе пролиферации. Одним из основных факторов регуляции как пролиферации, так и апоптоза клеток иммунной системы выступают цитокины [А.А. Ярилин, 1999]. Известно, что развивающаяся злокачественная опухоль обладает апоптоз-индуцирующим влиянием в отношении иммунокомпетентных клеток [Р.И. Сепиашвили и соавт., 2000]. Компенсация потери клеток требует, вероятно, напряжения пролиферативной функции и модификации регуляторных влияний у онкологических больных по сравнению со здоровыми лицами.

Целью работы явилось проследить динамику взаимоотношений между показателями апоптоза, пролиферативной активности и продукции основных факторов роста лимфоцитов интерлейкина-2 (ИЛ-2) и интерлейкина-4 (ИЛ-4) мононуклеарными клетками периферической крови у больных раком молочной железы (РМЖ).

Материал и методы. В исследование включены 66 больных РМЖ с T₁₋₄N₀₋₂M₀. Диагноз верифицирован морфологически. Уровень апоптоза мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови, выделенных стандартным методом, определяли с использованием ядерного красителя Hoechst 33342 [Н. Stridh et al., 2002]. Наряду с этим исследовали количество CD95⁺-клеток цитохимическим методом. Пролиферативную активность МНК оценивали в реакции бласттрансформации (РБТЛ) в спонтанном и стимулированном вариантах [В.В. Хоробрых и соавт., 1983]. Уровень продукции цитокинов в супернатантах 24-часовых клеточных культур определяли методом иммуноферментного анализа («Цитокин», Санкт-Петербург). В качестве контрольной группы выступили 29 практически здоровых женщин. Статистическую обработку материалов проводили с использованием программы Statistica.

Результаты. Уровень клеток периферической крови с морфологическими признаками апоптоза у больных РМЖ статистически значимо превышал показатели у здоровых лиц: 30,14±1,42% по сравнению с 18,33±1,09%. Спонтанная пролиферативная активность лимфоцитов

периферической крови у больных РМЖ и здоровых женщин не имела отличий: 3491±302 имп./мин и 3472±193 имп./мин соответственно. Однако показатели стимулированного ФГА варианта РБТЛ у больных РМЖ снижены в 1,86 раза (p < 0,05) по сравнению с таковыми у здоровых людей: 26254±2556 имп./мин и 48714±2908 имп./мин соответственно. Оценка уровня продукции ИЛ-2 и ИЛ-4, основных регуляторов пролиферации лимфоцитов, показала, что у больных РМЖ данные показатели снижены в 6,84 и 2,64 раза соответственно по сравнению с контролем (p < 0,05). При этом стимуляция продуцентов ФГА не приводила к увеличению уровня исследованных цитокинов в кондиционных средах у больных РМЖ в отличие от здоровых женщин.

Заключение. На основании полученных данных можно предположить следующую цепь событий: увеличение гибели мононуклеарных клеток периферической крови у больных раком молочной железы приводит к восполнению их численности за счет пролиферации. Обеспечение адекватного клеточным потерям уровня пролиферации требует напряжения этой функции, что проявляется в снижении как ФГА-стимулированного ответа РБТЛ, так и низким уровнем спонтанной и стимулированной продукции основных факторов роста лимфоцитов ИЛ-2 и ИЛ-4 по сравнению с показателями у здоровых лиц.

К ВОПРОСУ О ВЗАИМОСВЯЗИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И РАКА: АССОЦИИРОВАННЫЕ С РАКОМ ЛЕГКОГО ПОЛИМОРФИЗМЫ НЕ СВЯЗАНЫ С АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Чердынцева Н.В.¹, Васильева М.В.², Климов В.В.², Гервас П.А.¹, Тузиков С.А.¹, Добродеев А.Ю.¹, Белявская В.А.³, Воевода М.И.³

¹ ГУНИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, г. Томск, Россия

² ГОУ ВПО Сибирский Госмедуниверситет, г. Томск, Россия

³ ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», г. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Введение. Вопрос о взаимоотношении аллергических и злокачественных патологий был поставлен еще в первой половине 20 века А.А. Богомольцем. О возможности снижения риска рака у лиц с аллергическими заболеваниями свидетельствуют многочисленные авторы [Бережная Н.М., Ялкуп С.И., 1983; Адо В.А., Васильев Н.В., Горячкина Л.А., 1986; Бережная Н.М., Чехун В.Ф., Сепиашвили Р.И., 2005; Lightfoot et al., 2004; Wiemels et al., 2004; Boffetta et al., 2005], однако есть и противоположные сведения. В плане прояснения вопроса о векторе взаимоотношений аллергии и рака представляется целесообразным исследование различий или сходства патогенетических признаков бронхиальной астмы (БА) и рака легкого (РЛ) как заболеваний, развивающихся на основе общей ткани-мишени. РЛ и БА являются заболеваниями мультифакториальной природы, риск формирования которых обусловлен взаимодействием большого количества генов с этиологически значимыми средовыми факторами. Для получения более объективных данных о взаимосвязи БА и РЛ мы сочли целесообразным изучение генетических

полиморфизмов, для которых есть сведения о значимой ассоциации с РЛ, у больных БА.

Целью работы явилось исследование распределения генотипов и аллелей генов, вовлеченных в патогенез рака легкого (гены ферментов биотрансформации ксенобиотиков 2 фазы GSTT1 и GSTM1, гена онкосупрессора p53, гена хемокинового рецептора CCR5) у больных бронхиальной астмой разного генеза и ХОБЛ и их связи с показателями местного иммунитета.

Материалы и методы. В исследование были включены 420 больных с патологией легких, из них 180 больных РЛ, 158 — БА и 83 — ХОБЛ. Материалом для исследования служили периферическая кровь и индуцированная мокрота (ИМ). Выбор полиморфизмов осуществляли на основе литературных данных об их ассоциации с РЛ, не менее, чем в 2 разных популяциях, а также вовлечении функционирования этих генов в патогенез аллергических заболеваний или физиологию бронхиального тракта [Schwartzbaum et al., 2005]. Генотипирование осуществляли методом ПЦР и ПДРФ анализа. В качестве промежуточной группы сравнения была выбрана группа больных ХОБЛ — хроническим воспалительным заболеванием легких, которое протекает с участием иммунологических механизмов без формирования гиперчувствительности немедленного типа и сопровождается метаплазией и диспластическими изменениями бронхоальвеолярного эпителия, предрасполагающими к малигнизации. Контрольные выборки были сформированы из здоровых мужчин и женщин отдельно для больных ХОБЛ и РЛ, и для больных БА, с учетом соответствия возрастного и полового состава.

Результаты. У больных РЛ отмечено увеличение частоты встречаемости Arg аллеля гена p53 ($OR = 1,4$, $p < 0,05$) по сравнению с контролем и больными БА. Нулевой генотип GSTM1 (0/0) чаще встречался у больных РЛ и БА смешанного генеза ($OR = 2,59$, $p < 0,001$; $OR = 7,42$, $p < 0,000$), у больных atopической БА (АБА) различий с контролем не выявлено. У больных БА частота делеционного аллеля CCR5del32 существенно ниже, чем в популяционном контроле, и минимальна при АБА (2,5% при 11% в контроле, $OR = 0,58$, $p < 0,05$). У пациентов с АБА частота сочетания генотипов CCR5/CCR5del32-Arg/Arg ниже, а комбинации генотипов CCR5/CCR5del32-Pro/Pro выше, чем в контроле, то есть можно говорить об ассоциации последней комбинации с повышенным риском формирования БА atopического генеза. Среди больных РЛ и ХОБЛ не найдено лиц с сочетанием CCR5/CCR5del32-Pro/Pro, при этом для БА и РЛ выявлены ассоциации с разными сочетаниями генотипов, что служит дополнительным указанием на различия механизмов вовлечения генов CCR5 и p53 в патогенез этих заболеваний и указывает на разный характер генетических изменений у больных atopической БА и РЛ.

Заключение. Таким образом, в пределах одной популяции выявлены существенные различия в распределении генотипов и аллелей патогенетически значимых для РЛ генов у больных БА и РЛ. Разный характер генетических изменений у больных БА atopического и смешанного генеза свидетельствует, во-первых, о различной роли изучаемых генов в патогенезе этих форм БА, во-вторых, указывает на неоднородность группы БА в плане возможной предрасположенности к РЛ. С одной стороны, это объясняет противоречивость результатов клинико-

эпидемиологических исследований влияния БА на риск формирования РЛ, с другой стороны, позволяет говорить о существовании факторов, как способствующих, так и не предрасполагающих к развитию РЛ у больных БА.

IFN α -ИНДУЦИРОВАННЫЕ ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ГЛИОМАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Черных Е.Р.¹, Леплина О.Ю.¹, Ступак В.В.², Козлов Ю.П.², Пендюрин И.В.², Останин А.А.¹

¹ ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН

² ФГУ «Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии» Росздрава, г. Новосибирск, Россия

Введение. Злокачественные опухоли головного мозга (ЗОГМ) имеют крайне неблагоприятный прогноз, что диктует необходимость поиска новых терапевтических стратегий. Среди них особое внимание в последние годы уделяется методам иммунотерапии и, в частности, лечебным вакцинам на основе дендритных клеток (ДК). До настоящего времени в клинической практике апробировались ДК, генерируемые из прилипающей фракции моноклеональных клеток в присутствии GM-CSF и IL-4. В то же время известно, что частично зрелые ДК можно быстро получить при культивировании моноцитов с GM-CSF и IFN α . Данный путь представляется более физиологичным, а полученные ДК (ИФНДК) имеют ряд преимуществ (более высокую миграционную активность и функциональную стабильность).

Цель: настоящее исследование посвящено оценке безопасности и эффективности комбинированной иммунотерапии с использованием ИФНДК в комплексном лечении внутримозговых злокачественных опухолей.

Материалы и методы. Исследуемую группу составили 119 больных ЗОГМ в возрасте от 16 до 69 лет. Гистологически верифицированная глиобластома (ГБ) была диагностирована у 42% больных, астроцитомы 3 степени анаплазии (АА) — у 58% пациентов. Основная группа включала 39 пациентов, которым оперативное лечение и радиотерапия были дополнены комбинированной иммунотерапией (КИТ) с использованием ДК. Группу сравнения составили 80 больных, которым проводилось оперативное удаление опухоли и лучевая терапия. КИТ с использованием ДК проводилась в режиме пилотных исследований в послеоперационном периоде и включала курс адаптивной иммунотерапии (2-кратное локальное введение лимфокин-активированных киллерных клеток и 2-кратное введение цитотоксических Т-клеток в ложе удаленной опухоли) и курс вакцинаций дендритными клетками (6 вакцин с 2-недельным интервалом) в сочетании с IL-2 («Ронколейкин®»).

Результаты исследования. Проведение КИТ сопровождалось развитием иммунного ответа к опухолевым антигенам (ОА), источником которых служил лизат опухолевых клеток. Сенсибилизация к ОА проявлялась в 10-кратном усилении пролиферации МНК на ОА ($с 663 \pm 154$ до 5170 ± 1507 имп./мин; $P < 0,05$) и возрастании индекса миграции лейкоцитов больных ($с 1,02 \pm 0,05$ до $1,48 \pm 0,26$; $P < 0,05$) в реакции ГЗТ *in vitro* после завершения курса вакцинаций. Кроме того, анализ кожной

пробы на ОА в группе 25 пациентов продемонстрировал, что если исходно кожная проба на ОА была отрицательной у всех пациентов, то после 3 и 6 иммунизаций положительная кожная проба регистрировалась, соответственно у 7 (28%) и 16 (64%) пациентов. Проведение КИТ позитивно сказывалось на качестве жизни пациентов. Так, через 6, 12 и 24 месяца после операции показатели индекса качества жизни в основной группе были достоверно выше ($84 \pm 1,4$; $86 \pm 1,6$; $91 \pm 2,3$ балла), чем в группе сравнения ($66 \pm 1,6$; $66 \pm 1,8$ и $61 \pm 3,7$ баллов соответственно). Анализ выживаемости выявил, что количество выживших больных в основной группе к исходу 12, 24 и 36 месяцев было достоверно выше, чем в группе сравнения (74 vs 53,5%, 64 vs 27,5% и 50 vs 19% соответственно). Наиболее выраженный клинический эффект наблюдался у больных с ГБ. Так, в группе сравнения к исходу 24 месяца показатель выживаемости снижался до нуля. В то же время в основной группе 37,5% пациентов ГБ были живы и не имели рецидива.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о хорошей переносимости иммунотерапии с использованием ИФН-индуцированных ДК и о клинической эффективности данного подхода, что подтверждается значимым увеличением показателей качества жизни и выживаемости больных злокачественными опухолями головного мозга.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЮВЕНИЛЬНОГО РЕСПИРАТОРНОГО ПАПИЛЛОМАТОЗА ГОРТАНИ

Шабалдина Е.В.¹, Шабалдин А.В.², Павленко С.А.¹

¹ ГОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Росздрава

² Институт экологии человека СО РАН

Ювенильный респираторный папилломатоз гортани (ЮРПГ) относится к разделу тяжелой, инвалидизирующей патологии ЛОР-органов. Предполагают, что в патогенезе этого заболевания значительную роль играет дефицит клеточного звена иммунитета, который возникает из-за нарушения поляризации Т-хелперного ответа лимфоцитов на вирусные инфекции. Исходя из этого, целью настоящего исследования была оценка иммунологических и инфекционных характеристик ЮРПГ. В оториноларингологическом отделении для детей Кемеровской областной клинической больницы проходили лечение 24 ребенка, страдающих папилломатозом гортани. Среди них 14 мальчиков и 12 девочек. Всем детям проводили исследование субпопуляций лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25. Оценивали фагоцитарную активность нейтрофилов в тесте с нитро-синим тетразолам. Определяли в сыворотке крови уровень циркулирующих иммунных комплексов и иммуноглобулинов А, М, G, E. Из удаленных папиллом выделяли суммарную ДНК и проводили генетическую идентификацию с помощью полимеразно-цепной реакции вирусов папиллом, герпетических вирусов, цитомегаловирусов и вируса Эпштейна–Барр. Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ для Windows XP, STATISTICA 6.0. Различия считались до-

стоверными при ошибке менее 5%. Выявлено, что у 16% детей с ЮРПГ был выраженный дефицит Т-лимфоцитов периферической крови (CD3⁺ ниже 25%). Кроме того, у этих детей на фоне общего снижения Т-лимфоцитов имел место и дефицит Т-хелперов (CD4⁺). У 8% детей, напротив, CD4⁺-лимфоциты преобладали в периферической крови (более 47%), что приводило к увеличению соотношения CD4/CD8 (коэффициент более 2,6). У большинства детей (71%) иммунные нарушения были связаны с увеличением в периферической крови иммуноглобулина Е свыше 120 нг/мл и циркулирующих иммунных комплексов более 0,100 усл.ед. Эти данные говорят о различном иммунологическом течении ЮРПГ. Так у 16% детей ЮРПГ развивался по иммунодефицитному сценарию, у 8% — по аутоиммунному и у 71% — по аллергическому (атопическому и инфекционно-аллергическому). Поиск генетических маркеров вирусов папиллом и герпеса показал следующее. У 13% больных выявлен общий генетический маркер папилломатозных вирусов. Генотипирование выделенного ампликона не привело к идентификации типа вируса папилломатоза. У 8% больных обнаружен вирус Эпштейна–Барр и у 13% — вирус простого герпеса. У одного ребенка (4%) обнаружено микстовое инфицирование вирусами простого герпеса и Эпштейна–Барр. Проведенное исследование показало, что по этиологии и патогенезу ЮРПГ полиморфен. Причем рецидивы заболевания в большей степени связаны с аллергическим фоном ребенка, чем с активной репликацией вирусов.

УРОВНИ АКТИВНОСТИ НАД- И НАДФ-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ТИПАХ РАКА ЖЕЛУДКА

Щербинина А.С., Савченко А.А., Дыхно Ю.А., Яцинов М.В., Казакова Н.Н.

ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАН, Красноярская государственная медицинская академия, г. Красноярск, Россия

Ключевую роль в этиопатогенезе рака желудка осуществляет иммунная система. Между тем доказано, что уровень иммунореактивности определяется не только морфологическим составом клеток иммунной системы и концентрацией иммуноглобулинов в сыворотке крови, но и уровнем метаболических процессов в лимфоцитах.

Целью исследования явилось изучение уровня активности внутриклеточных ферментов в лимфоцитах крови в зависимости от гистологического типа рака желудка.

Обследовано 62 больных раком желудка в возрасте от 32 до 84 лет. Диагноз ставился на основе гистологического анализа после эндоскопического исследования. В качестве контроля обследовано 106 практически здоровых людей аналогичного возраста. Определение активности ферментов в лимфоцитах проводили биоломинесцентным методом. Данным методом определялась активность следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), малик-фермента (НАДФ-МДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и НАДН-ЛДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и НАДН-МДГ), НАДФ-

и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФ-ГДГ и НАДФН-ГДГ), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАД-ГДГ и НАДН-ГДГ), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАД-ИЦДГ и НАДФ-ИЦДГ) и глутатионредуктазы (ГР).

Обнаружено, что независимо от гистологического типа опухоли у всех больных раком легкого в лимфоцитах крови понижается активность ЛДГ, НАДФ-ИЦДГ, НАД-ИЦДГ и НАДН-ГДГ относительно уровней контрольной группы. Характерной особенностью метаболизма лимфоцитов у больных умереннодифференцированной аденокарциномой желудка является понижение активности НАД-ГДГ. В то же время, у больных низкодифференцированной аденокарциномой и перстневидноклеточным раком в лимфоцитах крови понижается активность НАДН-ЛДГ, НАДН-МДГ, ГР и НАДФН-ГДГ. Только у больных низкодифференцированной аденокарциномой желудка повышается активность НАДФ-МДГ. Характерной особенностью метаболизма лимфоцитов крови у больных перстневидноклеточным раком желудка является снижение активности МДГ.

Анализ полученных результатов позволяет предположить, что у больных раком желудка независимо от гистологического типа опухоли в лимфоцитах крови снижается активность метаболических реакций, стимулирующих аэробные энергетические процессы. Так, снижение активности аэробной реакции ЛДГ может привести к понижению выработки пирувата в цитоплазматическом компартменте и, соответственно, к ингибированию вхождения пирувата на реакции цикла трикарбоновых кислот. По-видимому, снижение активности НАД-ИЦДГ и НАДФ-ИЦДГ и характеризуют пониженный уровень субстратного потока на начальных этапах цикла Кребса. При этом, в лимфоцитах крови у больных умереннодиф-

ференцированной аденокарциномой снижается уровень НАДФ-зависимого переноса субстратов на энергетические процессы через НАДФ-ГДГ. У больных низкодифференцированными раками желудка снижение стимуляции аэробных процессов сопровождается понижением активности ферментов, отражающих уровень анаэробного окисления глюкозы. Также при данных гистологических типах опухоли выявляется понижение активности ГР, что может привести к активации перекисных процессов в лимфоцитах. У больных перстневидноклеточным раком желудка в лимфоцитах крови также снижается активность МДГ, характеризующее более выраженное снижение интенсивности субстратного потока в лимонном цикле, и Г-6-ФДГ, что определяет ингибирование выработки субстратов для реакций синтеза.

Таким образом, при исследовании особенностей метаболизма в лимфоцитах в зависимости от гистологического типа опухоли обнаружено, что при умереннодифференцированной аденокарциноме желудка выявляется снижение активности дегидрогеназных реакций, стимулирующих процессы аэробного дыхания. В то же время, для низкодифференцированных раков характерно снижение активности реакций, определяющих состояние как аэробных процессов, так и анаэробных. Кроме того, особенностью метаболизма лимфоцитов у больных перстневидноклеточным раком является то, что на фоне снижения интенсивности энергетических процессов, выявляется пониженный уровень выработки интермедиатов для реакций макромолекулярного синтеза. Безусловно, что более выраженное нарушение энергетических процессов, и тем более во взаимосвязи со снижением интенсивности пластического обмена, может привести к более значимому понижению функциональной активности лимфоцитов и, как следствие, более быстрому развитию опухоли.