

ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ РАЗЛИЧИЯ СПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА СВЯЗЫВАТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ КЛАССА G

Острейко О.В.¹, Можаяев С.В.¹, Олюшин В.Е.²,
Пантина Р.А.³, Филатов М.В.³

¹ Институт мозга человека Российской Академии Наук, Санкт-Петербург

² ФГУ «Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова Росмедтехнологии», Санкт-Петербург

³ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, г. Гатчина

Резюме. С целью выяснения особенностей противоопухолевого иммунного ответа при опухолях головного мозга различной гистоструктуры и степени злокачественности изучали присутствие иммуноглобулинов класса G (IgG) на поверхности опухолевых клеток с помощью А-протеина стафилококка, меченого флуоресцином. Выявлена различная выраженность поверхностного свечения опухолевых клеток, косвенно отражающая количество связанных с поверхностью клеток молекул IgG. Наиболее выраженная фиксация IgG обнаружена на клетках опухолей злокачественных гистотипов. При этом количество фиксированных иммуноглобулинов коррелировало с быстротой роста опухоли, ее агрессивностью и сокращением срока выживаемости больных. Фиксация IgG, среди которых присутствуют специфические антитела против опухолевых антигенов, на поверхности опухолевых клеток ведет к блокированию поверхностных опухолевых антигенов, препятствуя их распознаванию рецепторами цитотоксических Т-лимфоцитов. Связанная с этим недостаточность эффективности клеточной противоопухолевой защиты может рассматриваться как одна из причин злокачественного типа течения опухолевого процесса.

Ключевые слова: опухоли головного мозга, иммуноглобулины G, иммуногистология, противоопухолевый иммунный ответ.

Ostreiko O.V., Mozhaev S.V., Olushin V.E., Pantina R.A., Filatov M.V.

THE INDIVIDUAL DIFFERENCE OF ABILITY BINDING BRAIN TUMOR CELLS WITH IMMUNOGLOBULIN G

Abstract. Were researched IgG on the surface cells of different histological types tumors of cerebrum, using fluorescing staphylococcus A-protein. The study of target IgG shows divers intensive of microscopic fluorescent illumination. This results associate related with level amount IgG. The maximum concentrate of surface's IgG was on the cells of malignant tumors and there was direct correlate with aggressive manner and quickly recurrence of tumor's growth, and shot survival. The fraction of IgG with specific antitumor's antibody covers tumor's antigens has been block this antigens for receptors of T-lymphocytes. Linked with immunological anticell's deficit phenomenon may be one from famous reasons of malignant clinical type tumor disease. (*Med. Immunol.*, vol. 10, N 6, pp 593-596)

Введение

В России первичные опухоли головного мозга ежегодно выявляются у 30 тыс. человек, они составляют около 10% от всех новообразований.

Адрес для переписки:

Острейко Олег Викентьевич
Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12а.
Тел.: (812) 234-92-41.
Факс: (812) 234-92-40.
E-mail: ostreiko@rambler.ru

Частота встречаемости первичных опухолей головного мозга варьирует от 7,42 до 13,9 на 100 000 населения в год и продолжает увеличиваться с преобладанием злокачественных гистотипов [13]. Лечение злокачественных опухолей мозга остается до настоящего времени трудноразрешимой проблемой, что обусловлено инфильтративным ростом и склонностью к метастазированию. Современной тактикой лечения считается комплексный подход, включающий операцию, лучевую терапию и химиотерапию [6]. При этом средняя продолжительность жизни больных со злокачественными

ТАБЛИЦА 1. ВЫРАЖЕННОСТЬ ПОВЕРХНОСТНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КОМПЛЕКСОВ ИММУНОГЛОБУЛИНА IgG С МЕЧЕНЫМ А-ПРОТЕИНОМ СТАФИЛОКОККА НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ РАЗНЫХ ГИСТОТИПОВ

Гистоструктура опухоли	Количество опухолей с разной степенью выраженности флуоресцентного свечения				
	высокой	средней	низкой	отсутствием	всего
Глиобластома	10	2	4	2	18
Анапластическая астроцитома	1	3	–	2	6
Анапластическая олигоастроцитома	–	–	1	–	1
Фибриллярно-протоплазматическая астроцитома	1	2	1	3	7
Менингиома	2	2	1	2	7
Анапластическая менингиома	–	–	–	1	1
Аденома гипофиза	–	–	1	–	1
Хориоидпапилома	–	–	1	–	1
Невринома VIII нерва	3	–	1	–	4
Медуллобластома	–	–	1	–	1
Метастаз гипернефромы	–	1	–	–	1
Метастаз меланомы	1	–	–	–	1
Смешанная тератома	–	1	–	–	1
Эстезионейробластома	–	–	–	1	1
Всего	18	11	11	11	51

опухолями исчисляется в большинстве случаев несколькими месяцами [6, 9, 15]. Указанные предпосылки активизируют поиск новых методов лечения, в частности, разработку противоопухолевой иммунотерапии [4, 5, 8, 10, 11, 12, 14, 16, 18]. Выбор и целенаправленное применение методов иммунотерапии должны основываться на предварительном изучении индивидуальных особенностей клеточного и гуморального специфического противоопухолевого иммунного ответа при опухолях головного мозга [19].

Ранее с использованием метода Вестерн-Блота было показано, что клетки злокачественных глиальных опухолей головного мозга могут связывать специфические антитела класса IgG против туморассоциированных антигенов (ТАА) *in vivo* [1, 2, 21]. В связи с этим нами было предпринято изучение с помощью А-протеина стафилококка, меченого флуоресцеином, присутствия иммуноглобулинов класса G (IgG) на поверхности опухолевых клеток, полученных при оперативном вмешательстве от больных с опухолями головного мозга разной степени злокачественности.

Материалы и методы

Были исследованы образцы новообразований различной гистоструктуры, взятые во время операций у нейроонкологических больных. Во всех случаях диагноз верифицирован клинически, с помощью методов нейровизуализации (МРТ, ПЭТ,

КТ) и гистологии. Ткань опухоли гомогенизировали в буфере А: 0,05 М Трис/0,15 М NaCl/0,01 М ЭДТА/0,001 М РМСФ pH 7,2 из расчета 10 мл буфера А на 1 г ткани. Обнаружение фиксированных на поверхности опухолевых клеток IgG осуществлялось с помощью конъюгата А-протеин-FITC («Sigma»). А-протеин стафилококка, как известно, является лигандом IgG за счет связывания с Fc-фрагментами молекул IgG, фиксированных на поверхности клеток опухоли за счет взаимодействия Fab-фрагментов с ТАА. Регистрацию флуоресценции осуществляли с использованием микроскопа Opton-Axioplan при длине волны 510 нм.

Проведено исследование 51 фрагмента опухолей головного мозга у больных, оперированных в нейрохирургическом отделении № 2 ИМЧ РАН (44 пациента) и в отделении хирургии опухолей головного и спинного мозга ФГУ «Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова Росмедтехнологии» (7 больных). Возраст больных варьировал от 17 до 67 лет, из них женщин было 27, мужчин – 24. Большинство образцов опухолей (32 наблюдения) были представлены глиомами различной степени анаплазии, в остальных случаях исследовали образцы менингиом, аденомы гипофиза, невриномы VIII нерва, медуллобластомы, хориоидпапилломы, тератомы, эстезионейробластомы. Степень выраженности связывания IgG на поверхности клеток опухолей оценивали как высокую, если 75% и более исследуемых опухолевых

клеток имели поверхностное флуоресцентное свечение, среднюю — если 50-75% исследуемых клеток имели свечение, и низкую — в случаях наличия флуоресцентного свечения менее чем у 50% исследуемых клеток опухоли. Отмечали также отсутствие свечения (табл. 1).

Результаты и обсуждение

Высокую степень выраженности фиксации IgG наблюдали на клетках глиобластом — в 12 случаях из 18 (рис. 1, см. цветную вклейку). Среди 7 образцов опухолей, представленных анапластическими астроцитами и олигоастроцитами, в 3 случаях наблюдали среднюю степень связывания IgG с поверхностью клеток опухолей, а в остальных 4 наблюдениях выраженность фиксации IgG была низкой или полностью отсутствовала. Низкая фиксация или ее отсутствие были выявлены при исследовании 7 образцов фибриллярно-протоплазматических астроцитов (рис. 2, см. цветную вклейку). При исследовании образцов 8 менингиом высокая или средняя интенсивность свечения были обнаружены в половине наблюдений. В случаях низкой выраженности свечения, независимо от гистотипа опухоли, было выявлено неравномерное распределение IgG на поверхности клеток новообразований.

При исследовании суспензии клеток аденомы гипофиза обнаружено относительно редкое присутствие свечения на поверхности клеток опухоли, за исключением одного участка, где свечение обнаруживалось отчетливо (рис. 3, см. цветную вклейку). На клетках хориоидпапилломы выраженность свечения была низкой.

Исследование метастатических опухолей меланомы, гипернефроидного рака, клеток тератомы выявило высокую степень выраженности флуоресцентного свечения. Исследование образцов первичных опухолей показало, что низкокодифференцированные глиомы имеют высокую и среднюю степень выраженности флуоресцентного свечения в 64% наблюдений, доброкачественные астроцитомы несколько реже — в 42% случаев. Новообразования менингососудистого ряда имели высокую и среднюю степень выраженности свечения в половине наблюдений. Таким образом, выраженность свечения напрямую зависела от степени анаплазии новообразования (рис. 4).

Полученные результаты продемонстрировали разную степень выраженности поверхностного свечения исследованных опухолевых клеток, косвенно отражающую количество связанных с поверхностью клеток молекул IgG. Исследование различных гистотипов опухолей показало, что более выраженная фиксация молекул IgG имеется на клетках более злокачественных опухолей, т.е. новообразований с более выраженными

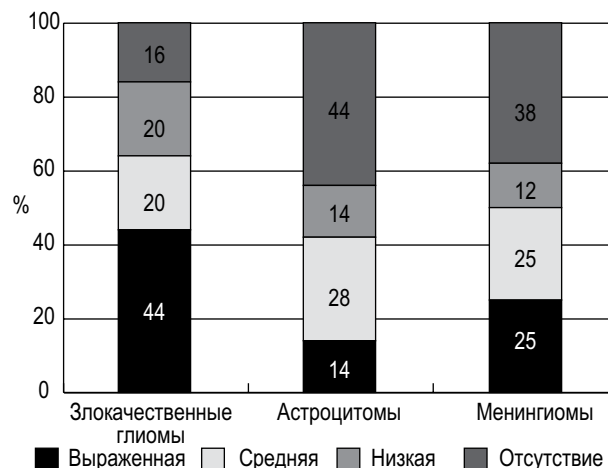


Рисунок 4. Распределение исследованных опухолей различной гистоструктуры по степени выраженности поверхностного флуоресцентного свечения на клетках

атипичными свойствами. При этом количество фиксированного на клетках IgG в ряде случаев глиобластом коррелировало со скоростью роста опухоли, выраженностью агрессии новообразования и краткостью сроков выживания больных.

Повышенная фиксация молекул IgG на поверхности опухолевых клеток может свидетельствовать об усиленной экспрессии ТАА на поверхности этих клеток. Фиксация молекул IgG, среди которых присутствуют специфические антитела против ТАА, на поверхности опухолевых клеток ведет к блокированию ТАА, препятствуя их распознаванию рецепторами цитотоксических Т-лимфоцитов. Связанная с этим недостаточность эффективности клеточной противоопухолевой защиты может рассматриваться как одна из причин повышенной злокачественности таких опухолей.

Высокие уровни фиксации молекул IgG на поверхности опухолевых клеток, полученных непосредственно из ткани удаленных наиболее злокачественных опухолей, согласуются с ранее полученными нами данными о доступности клеток злокачественных опухолей центральной нервной системы *in vivo* для взаимодействия со специфическими антителами [2]. Выраженная фиксация молекул IgG за счет взаимодействия антител с поверхностными ТАА клеток злокачественных опухолей головного мозга косвенно свидетельствуют о повышенной проницаемости гематоэнцефалического (гематоопухолевого) барьера у таких больных и, возможно, об усиленном синтезе специфических противоопухолевых антител. Это позволяет предполагать доминирование у таких больных гуморального иммунного ответа над клеточным, который играет основную защитную роль в противоопухолевом иммунитете [3, 7].

Этими наблюдениями может быть обоснована необходимость использования при лечении

злокачественных опухолей головного мозга методов иммунокоррекции, направленных на избирательную стимуляцию клеточного иммунного противоопухолевого иммунного ответа. В литературе последних лет такие свойства приписываются так называемым дендритным вакцинам.

Собственный клинический опыт применения специфической противоопухолевой иммунотерапии больным с продолженным ростом глиобластом в послеоперационном периоде (патент РФ № 2192263) показал возможность двукратного увеличения продолжительности их жизни по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$) [9]. Положительные результаты иммунотерапии с использованием дендритных клеток отмечают и другие авторы [7, 8, 12, 17, 20]. Однако механизмы защитного действия использованных нами индивидуальных дендритных вакцин требуют дальнейшего изучения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке грантов, выделенных Санкт-Петербургским Научным Центром Российской Академии Наук в 2004, 2005 гг.

Список литературы

1. Близнюков О.П., Климович В.Б., Козмин Л.Д., Тарасов В.А., Филатов М.В. Особенности IgG, связанных с клетками карцином человека // Иммунология. — 2000. — № 1. — С. 18-21.
2. Близнюков О.П., Козмин Л.Д., Олюшин В.Е., Острейко О.В., Филатов М.В. Злокачественные опухоли центральной нервной системы могут быть доступны для атаки специфическими антителами // Вопр. онкологии. — 2001. — Т. 47, № 1. — С. 49-51.
3. Гнедкова И.А. Проблемы иммунотерапии глиом головного мозга // Украинский нейрохирургический журнал. — 2002. — № 2. — С. 57-65.
4. Горбунов В.И., Лихтерман Л.Б., Ганнушкина И.В. Иммунопатология травматической болезни головного мозга. — Ульяновск, 1998. — С. 114-141.
5. Гриневич В.В., Акмаев И.Г., Волкова О.В. Основы взаимодействия нервной, эндокринной и иммунной систем. — СПб.: Symposium, 2004. — 158 с.
6. Марченко С.В. Комплексное лечение злокачественных глиом больших полушарий головного мозга // Вопр. онкологии. — 1997. — № 6. — С. 610-612.
7. Моисеенко В.М., Балдуева И.А., Хансон К.П. Вакциноterapia злокачественных опухолей // Вопр. онкологии. — 1999. — Т. 45, № 3. — С. 327-332.
8. Моисеенко В.М., Урманчеева А.Ф., Хансон К.П. Возможности вакцинотерапии меланомы кожи // Лекции по фундаментальной и клинической онкологии. — СПб.: Издательство Н-Л, 2004. — С. 517-530.
9. Острейко О.В., Олюшин В.Е., Тиглиев Г.С., Шевченко Е.Н., Пантина Р.А., Качурина Н.М., Филатов М.В. Противоопухолевая иммунотерапия у больных с продолженным ростом глиобластом: оценка результатов // Нейрохирургия. — 2003. — № 4. — С. 40-45.
10. Прокопович С.К., Винницкий В.Б. Дендритные клетки и перспективы их использования в иммунотерапии злокачественных новообразований // Онкология. — 2001. — № 2. — С. 126-131.
11. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. — М.: Мир, 2000. — С. 384-385.
12. Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Основные свойства дендритных клеток // Иммунология. — 2001. — № 4. — С. 7-15.
13. Улитин А.Ю. Эпидемиология первичных опухолей головного мозга среди населения крупного города и пути совершенствования организации медицинской помощи больным с данной патологией: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 1997. — 210 с.
14. Cao X., Zhang W., Wang J., Zhang M., Huang X., Hamada H., Chen W. Therapy of established tumor with hybrid cellular vaccine generated by using GM-CSF genetically modified dendritic cells // Immunology. — 1999. — Vol. 97, N 4. — P. 616-625.
15. Cushing H. Tumeurs intracraniennes. — Paris, 1937. — 237 p.
16. Galili U., La Temple D.C. Natural anti-Gal antibody as a universal augmentor of autologous tumor vaccine immunogenicity // J. Immunol. today. — 1997. — Vol. 18. — P. 281-285.
17. Harshyne L., Flomenberg P., Andrews D.W. Immunotherapy strategies for treatment of malignant gliomas // Principles of molecular neurosurgery. Prog. Neurol. Surg. / Ed. by A. Freese, F.A. Simeone, P. Leone, C. Janson. — Basel, Karger, 2005. — Vol. 18. — P. 499-520.
18. Holladay F.P., Heitz T., Chen Y.L., Chiga V., Wood G.W. Successful treatment of a malignant rat glioma with cytotoxic T lymphocytes // Neurosurg. — 1992. — Vol. 31, N 3. — P. 528-533.
19. Kondo S., Miyatake S., Iwasaki K., Oda Y., Kikuchi H., Zu Y., Shamoto M., Namba Y. Human glioma-specific antigens detected by monoclonal antibodies // Neurosurg. — 1992. — Vol. 30. — P. 506-511.
20. Melcher A., Todryk S., Bateman A., Chong H., Lemoine N.R., Vile R.G. // Adoptive transfer of immature dendritic cells with autologous or allogeneic tumor cells generates systemic antitumor immunity // Cancer res. — 1999. — Vol. 59, N 12. — P. 2802-2805.
21. Modak Sh., Kramer K., Gultekin S.H., Guo H.F., Nai-Kong V. Cheung. Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors // Cancer research. — 2001. — Vol. 61, N 10. — P. 4048-4054.

поступила в редакцию 10.07.2008

принята к печати 30.07.2008

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ РАЗЛИЧИЯ СПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА СВЯЗЫВАТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ КЛАССА G» (АВТОРЫ: ОСТРЕЙКО О.В., МОЖАЕВ С.В., ОЛЮШИН В.Е., ПАНТИНА Р.А., ФИЛАТОВ М.В.) (с. 593-596)

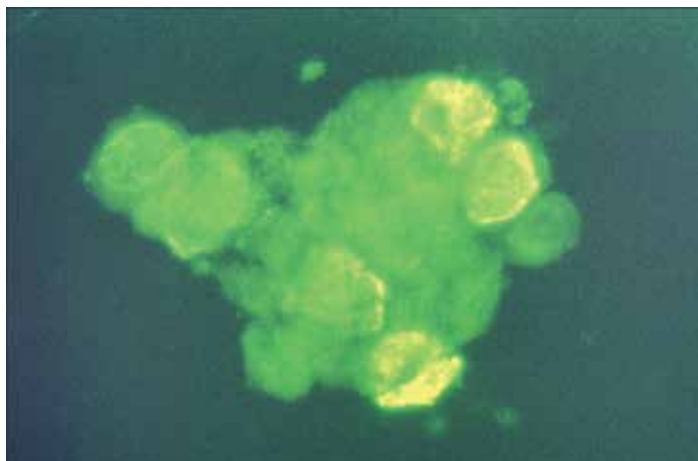


Рисунок 1. Клетки глиобластом, обработанные белком А, меченным флуоресцином. Микрофотография х400

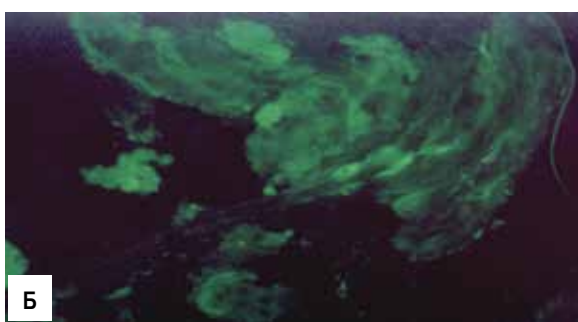
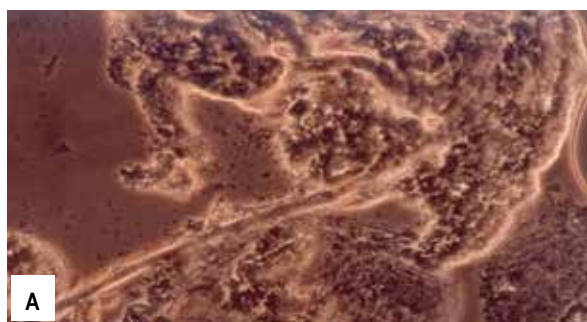


Рисунок 2. А – клетки астроцитомы в проходящем свете, Б – этот же препарат при флуоресцентной микроскопии. Микрофотография х400

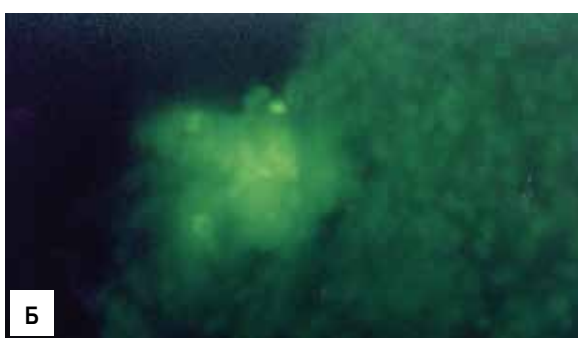
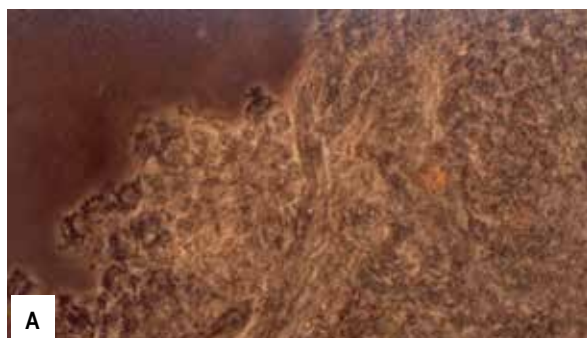


Рисунок 3. А – клетки аденомы гипофиза в проходящем свете, Б – этот же препарат при флуоресцентной микроскопии. Микрофотография х400