

# ОНКОИММУНОЛОГИЯ, ГЕМОБЛАСТОЗЫ

## ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ С ГЛИОБЛАСТОМОЙ

Ананьева И.И.<sup>1</sup>, Захаров А.В.<sup>1</sup>, Кочережкин Б.А.<sup>1</sup>,  
Корсакова Н.А.<sup>1</sup>, Гнучев Н.В.<sup>2</sup>, Дорофеев А.Е.<sup>4</sup>,  
Пинегин Б.В.<sup>2</sup>, Качков И.А.<sup>1</sup>, Пронина О.А.<sup>4</sup>,  
Черепихина Н.Е.<sup>1</sup>, Бурдакова Ю.А.<sup>4</sup>, Сучков С.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>МОНИКИ, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Институт иммунологии Росздрава, Москва,  
Россия;

<sup>3</sup>ММА им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

<sup>4</sup>Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

**Введение.** Несмотря на значительный прогресс в современной диагностике и терапии опухолей, прогноз для больных с глиобластомами, наиболее частой злокачественной опухолью головного мозга (ЗОГМ), остается неутешительным. Сложившаяся ситуация диктует необходимость поиска и создания новых принципиально иных технологий ранней диагностики, мониторинга и лечения пациентов, перенесших операции по поводу злокачественных новообразований головного мозга. Одним из направлений исследований в этой области является изучение адаптационных возможностей иммунной системы пациентов с глиобластомами в пред- и послеоперационном периоде, изучение особенностей иммунного статуса в пред- и послеоперационном периодах. Это позволит выработать показания для применения современных средств противоопухолевой иммунофармакотерапии, задача которой заключается в мобилизации собственных ресурсов иммунной системы и усилении противоопухолевого иммунитета [Graf M.R., Merchant R.E., 1999].

**Цель работы.** Исследование состояния клеточного, гуморального и других звеньев иммунитета у больных с глиобластомой в предоперационном периоде.

**Материалы и методы.** Сыворотки больных с глиобластомой (n=28), получили в нейрохирургическом отделении МОНИКИ. Возраст больных колебался от 23 до 60 лет, длительность заболевания - 2-6 мес. Сыворотки исследовали методом ИФА на содержание онкомаркеров – AFP, СЕА и NSE; методом иммунофенотипирования определяли уровень субпопуляций CD<sup>+</sup>-клеток. Также определяли содержания IgG, IgM и IgA, уровень фагоцитарной активности, естественной цитотоксичности и циркулирующих иммунных комплексов.

**Результаты.** В зависимости от выявленных иммунологических нарушений больных распределили на 2 группы: I (n=19) - с выраженным иммунодефицитом и II (n=9) - со слабовыраженным иммунодефицитом или его отсутствием.

У 12 из 19 больных группы I отмечена супрессия клеточного звена иммунитета: снижено содержание активных Т-лимфоцитов, некоторых иммунорегуляторных индексов и уровень естественной цитотоксичности в среднем на 5-30%. Данный феномен связан со значительным дефицитом Т-клеток и диспропорциями в составе субпопуляций. Признаки иммунодефицита гуморального звена были менее

выражены: снижены титры сывороточных иммуноглобулинов IgM, IgG и IgA на 5-25% и индексы активации В-клеток на 5-15%. В отдельных случаях (у 6 из 19 больных) в крови обнаруживали различные сочетания онкомаркеров.

Для группы II в 4 из 9 случаев обнаружено незначительное снижение уровней естественной цитотоксичности и субпопуляции CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов. Не отмечено снижения показателей гуморального звена иммунитета или фагоцитарной активности. Не обнаружено онкомаркеров.

**Заключение.** Таким образом, при глиобластоме существует два иммунологических фенотипа, что должно учитываться при разработке клинико-иммунологических критериев лечения глиобластоме.

## МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ПРИ БАЗАЛЬНОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ КОЖИ

Антонова И.В., Смирнова И.О., Мамонтова Е.А.,  
Котова Ю.А.

*Санкт-Петербургская государственная  
медицинская академия им. И.И.Мечникова,  
Санкт-Петербургская государственная  
педиатрическая медицинская академия,  
Санкт-Петербург, Россия*

Среди опухолей кожи лидирующее положение по частоте занимает базальноклеточный рак (БКРК), составляющий до 80% ее эпителиальных новообразований. Анализ данных эпидемиологических исследований позволяет предполагать, что инициация канцерогенеза в коже происходит в первую очередь под действием ультрафиолетового излучения (УФИ) в возрасте до 20 лет, а манифестация – в 40-60 лет. Однако факторы, способствующие росту латентных трансформированных клеток или инициации новых опухолей, практически не изучены. Известно, что решающую роль в канцерогенезе, детерминации длительности каждой из его стадий (в том числе латентной) и скорости пролиферации (прогрессии) трансформированных клеток играют изменения в микроокружении поврежденной клетки.

**Целью** исследования явилось изучение морфо-функциональных свойств тучных клеток (мастоцитов), которые считают координаторами локальной иммунной и нейроэндокринной активности, при БКРК.

Изучено 37 наблюдений БКРК из архивов кафедр патологической анатомии и дерматовенерологии Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И.Мечникова. Парафиновые срезы кожи окрашивали гематоксилином и эозином, тучные клетки выявляли 1% раствором толуидинового синего (Fluka) в 0,5М HCl при pH 0,5. При иммуногистохимическом исследовании использовали антитела к хромогранину А (CgA) (Novocastra, RTU), антигенам Ki67 (Novocastra; 1:200) и CD1a (Novocastra, RTU). Контрольным материалом являлась кожа заушной (закрытой от инсоляции) и височной (подверженной хроническому ультрафиолетовому облучению) области головы, полученная при пластических операциях

от 53 пациентов. Подсчет количества позитивных клеток и определение интенсивности экспрессии молекул проводили с помощью компьютерной системы анализа гистологических изображений (Nikon, Япония).

В большинстве исследованных случаев (26 наблюдений, 70,3%) появление БКРК ассоциировалось с гиперплазией тучных клеток, экспрессирующих CgA. Основные функции этого белка связывают с участием в биосинтезе секреторных гранул эндокринных клеток и укладке в них биологически активных пептидов, причем интенсивность его иммуноокрашивания отражает плотность этих гранул. Количество тучных клеток в соединительной ткани, прилегающей к опухоли, достигало  $1604,96 \pm 16,34$  клеток на  $1 \text{ мм}^2$  кожи и достоверно превышало содержание мастоцитов в коже височной ( $950,64 \pm 16,47$  клеток,  $p < 0,01$ ) и заушной ( $359,15 \pm 12,99$  клеток,  $p < 0,0001$ ) области у здоровых пациентов. Показатели оптической плотности экспрессии CgA мастоцитами превышали таковые в коже здоровых пациентов, как на закрытых, так и подверженных инсоляции участках, что свидетельствует об активации их секреторной деятельности.

По современным представлениям, изменения функциональной активности стромы могут быть промотором опухолевой трансформации клеток эпителия. Имеются указания на наличие корреляции между количеством тучных клеток в дерме и степенью чувствительности кожи к повреждающему действию ультрафиолета. Нами установлена отрицательная связь между количеством CgA-иммунопозитивных мастоцитов и числом клеток Лангерганса, а также площадью экспрессии ими антигена CD1a, то есть по мере возрастания числа мастоцитов в дерме количество клеток Лангерганса в эпидермисе и число их отростков уменьшается. Следовательно, определенная часть иммуносупрессивных изменений в коже при хроническом воздействии на нее УФ-излучения опосредована через действие сигнальных молекул, секретлируемых тучными клетками.

Анализ полученных результатов позволяет предположить, что гиперплазия тучных клеток и повышение их нейроэндокринной активности может являться фактором, повышающим риск развития и прогрессии БКРК в коже, подверженной инсоляции.

#### **СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ И IL-4 У БОЛЬНЫХ РАКОМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ В ДИНАМИКЕ НАБЛЮДЕНИЯ**

**Арипова Т.У., Курьязов Б.Н., Камалов З.С., Алимова М.Т., Миркамалова Л.И.**

*Институт иммунологии АН РУз, Ташкент;*

*Ургенский филиал Ташкентской медицинской академии, Узбекистан*

Рак ободочной кишки (РОК) в 75% случаев поражает левый селезеночный изгиб ободочной кишки. Степень инвазивности, определяемая на операции, служит единственным критерием прогноза. Так, 90% 5-летнего выживания характерно для РОК слизистой и подслизистой оболочек (стадия А), 70-85% - для РОК при распространении на мышечный (стадия В1) или серозный (стадия В2) слои, 30-60% - при РОК с вовлечением региональных лимфатических узлов (стадия С), 5% - при РОК с отдаленными метастазами в печень, легкие, кости (стадия D). Одним из критериев плохого прогноза является повышение уровня карциноэмбрионального антигена в сыворотке крови перед операцией.

**Целью** нашей работы явилось исследование роли цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-4 в прогнозировании послеоперационного состояния больных с РОК. Исследования проводились в Хорезмском областном онкологическом диспансере. Обследовано 10 больных РОК в возрасте от 41 до 74 лет, у которых до операции и через 1 и 7 суток после операции определяли уровень цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-4 и TNF $\alpha$  в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем ООО “Протеиновый контур” и “Цитокин” (Гос НИИ ОЧБ, С.-Петербург) по инструкции изготовителя. В качестве контроля взяты уровни цитокинов сыворотки 10 практически здоровых лиц.

Исследования показали, что у больных РОК до операции по сравнению с контролем определялось повышение уровня TNF $\alpha$  в 6, IL-1 $\beta$  в 3 и IL-4 в 4,3 раза соответственно до  $176,8 \pm 29,17$ ,  $28,6 \pm 8,93$  и  $101,8 \pm 7,30$  пг/мл против  $27,8 \pm 5,58$ ,  $27,8 \pm 5,58$  и  $23,7 \pm 5,62$  пг/мл в контроле, что свидетельствует о проявлении противоопухолевой активности иммунной системы. Через сутки после операции наблюдалось значительное возрастание концентрации провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  до  $516,5 \pm 56,84$  и  $1109,8 \pm 138,52$ , связанное с развитием системной или генерализованной воспалительной реакции на обширную хирургическую травму со снижением уровня противовоспалительного цитокина IL-4 до  $7,8 \pm 1,90$ . Через 7 суток после операции определялась тенденция к нормализации уровней сывороточных провоспалительных цитокинов ( $87,6 \pm 11,13$  и  $100,7 \pm 13,18$ ) с повышением уровня IL-4 до  $31,3 \pm 11,30$ .

Таким образом, анализ изменений уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов до и в ранний период после операции, характеризующих особенности функционирования иммунной системы организма, помогает в прогнозировании послеоперационного состояния больных с целью выбора дальнейшей тактики ведения и повышения эффективности терапии.

#### **РОЛЬ ЦИТОКИНОВ И РЕЦЕПТОРА CCR5 В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ И ПРОГРЕССИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

**Бабышкина Н.Н.**

*НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, Томск, Россия*

**Введение.** Иммунная система играет важную роль в регуляции пролиферации, апоптоза, дифференцировки клеток и вовлекается в патогенез злокачественных новообразований. Подтверждением этого служат данные об ассоциации полиморфизма генов цитокинов и их рецепторов с риском возникновения и прогрессии рака молочной железы. Хемокиновый рецептор CCR5 экспрессируется воспалительными и опухолевыми клетками и участвует в формировании иммунологических реакций. Регуляторная активность CCR5 проявляется путем вовлечения его в передачу сигнала на белок-онкосупрессор p53, модуляции опухолевого микроокружения за счет инфильтрации воспалительных клеток и непосредственной экспрессии на клетках опухоли. Все эти данные, указывая на вовлечение CCR5 в патогенез РМЖ, не позволяют сделать однозначных выводов о роли CCR5 в развитии и прогрессии этого заболевания и делают актуальными исследования полиморфизма этого гена, а также возможных его взаимосвязей с продукцией цитокинов и функциональной активностью системы иммунитета у больных с предопу-

холевой патологией и со злокачественными новообразованиями молочной железы.

**Цель.** Изучить полиморфизм гена хемокинового рецептора CCR5, уровень продукции регуляторных и эффекторных цитокинов и показателей иммунитета у больных с предопухолевыми заболеваниями и раком молочной железы и исследовать их взаимосвязь с характером клинического течения и исходом заболевания.

**Материалы и методы.** В исследование включены 182 пациентки с раком молочной железы (РМЖ), 92 пациентки с фибroadеномой (ФА) и 44 женщины с фиброзно-кистозной мастопатией (ФКМ). Для сравнения использовали среднепопуляционные данные по частоте распределения генотипов CCR5 гена у здоровых доноров региона Западной Сибири (Н.Юдин, 1998). В группу контроля для сравнения иммунологических параметров и уровня продукции цитокинов включены 53 практически здоровые женщины без патологических изменений в молочных железах. Генотипирование аллелей гена CCR5 проводили методом ПЦР-амплификации фрагмента размером 276 п.н, несущего потенциальную делецию в 32 п.н, с использованием фланкирующих праймеров (Н.Юдин и соавт., 1998). Иммуный статус оценивался с помощью комплекса стандартных унифицированных тестов I и II уровня (Р.В.Петров и соавт., 1992), включая продукцию IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 и TNF $\alpha$  в супернатантах мононуклеаров иммуноферментным методом.

**Результаты.** Сравнительная оценка распределения генотипов гена CCR5 выявила значимое повышение частоты встречаемости гетерозиготного генотипа CCR5/CCR5del32 у больных ФА и ФКМ, объединенных в общую группу пациенток с предопухолевыми заболеваниями (24,3% при  $\chi^2=4,41$ ;  $p<0,03$ ; OR=2,74; CI95% = 0,94-7,95) и пациенток раком молочной железы (23,9% при  $\chi^2=5,09$ ;  $p<0,02$ ; OR=2,2; CI95% = 1,05-4,70), по сравнению со среднепопуляционной нормой (12,5%), что можно рассматривать как свидетельство его ассоциации с повышением риска РМЖ. Нами показано, что пациенты с нормальным генотипом, который ассоциирован с более низким риском РМЖ, обладают способностью отвечать более высокой продукцией TNF $\alpha$  лимфоцитами крови на адекватный стимул, чем здоровые доноры. При этом у них выявлена повышенная спонтанная пролиферация лимфоцитов и доля активированных – CD25<sup>+</sup>-клеток, что свидетельствует об активации иммунной системы и позволяет считать их факторами, способствующими снижению риска развития рака. Кроме того, мы показали значимое увеличение частоты встречаемости делеционного варианта гена CCR5 у больных РМЖ с локализованным процессом, в сравнении с контрольной выборкой (25,7% и 12,5%, при  $\chi^2=4,88$ ;  $p<0,02$ ; OR=2,43; CI95%=1,02-5,84), что указывает на ассоциацию данного генотипа с более благоприятным прогнозом клинического течения заболевания. Подтверждением этому являются и наши данные о повышении частоты встречаемости гетерозигот среди больных РМЖ, у которых морфологически подтверждена умеренная степень дифференцировки опухолевых клеток. У пациенток РМЖ, имевших благоприятный исход заболевания (отсутствие в период наблюдения от 2 до 5 лет отдаленных метастазов, рецидивов или летального исхода), отмечено значимое увеличение частоты встречаемости CCR5/CCR5del32 генотипа по сравнению с группой контроля ( $\chi^2=6,48$ ;  $p\leq 0,01$ ; OR=2,58; CI95%=1,2-5,8) и больными с неблагоприятным исходом ( $\chi^2=2,67$ ;  $p\leq 0,1$ ; OR=2,83; CI95%=0,7-7,18). У больных РМЖ с нормальным генотипом, который ассоциирован

с более высоким риском прогрессии, отмечено повышение продукции TNF $\alpha$  лимфоцитами в ответ на стимул и уровень IL-4 при снижении доли Т-хелперов и естественных киллерных клеток, стимулированной пролиферации лимфоцитов по сравнению с уровнем здорового контроля. Эти результаты дают основания полагать, что факторы иммунной системы могут вовлекаться в механизмы прогрессии РМЖ.

**Заключение.** Таким образом, гетерозиготный генотип гена хемокинового рецептора CCR5 ассоциируется как с повышенным риском возникновения РМЖ, так и благоприятным прогнозом течения заболевания. Неоднозначная роль гена CCR5 на этапах злокачественной трансформации и при опухолевой прогрессии, видимо, связана с различными механизмами, посредством которых иммунная система вовлекается в формирование и прогрессию РМЖ.

### ОСОБЕННОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЦИТОКИНОВОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА И УРОВНЯ КОРТИЗОЛА ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКИХ

Баймахашева А.Н.

Казахский НИИ онкологии и радиологии Минздрава РК, Алматы, Казахстан

Последние данные литературы свидетельствуют о важности исследования противоопухолевого иммунитета, его цитокинового звена, а также кортизола, который является стрессовым фактором и показателем адаптационных возможностей организма больных при хирургическом и комплексном лечении рака легких. После оперативных вмешательств в объеме долевых резекций, пневмонэктомий и реконструктивно-пластических операций с лимфодиссекцией 76 больным раком легкого проводилась адьювантная химиотерапия и химиотерапия. Стандартная химиотерапия (везид, цисплатин) осуществлялась параллельно с аутоцитокинотерапией эндотоксином *Salmonella typhi* (фармакопейный пирогенал), который вводился в виде аутогеомпрепарата №5 (15 мл аутокрови + 25 мкг пирогенала  $\Rightarrow$  термостатирование в течение 90 минут). Метод аутоцитокинотерапии основан на использовании аутологичных цитокинов активированных *ex vivo* и возвращенных в организм больного с терапевтической целью: иммуномодулирующей и противоопухолевой. Сэндвичевым методом на иммуноферментном анализаторе Anthos 2010 с применением стандартного коммерческого набора CYTELISA™ исследовали уровень IL-2, TNF- $\alpha$  и IFN $\gamma$  в сыворотке крови у всех больных (до лечения, после операции, после химиотерапии), а также у 30 здоровых лиц. Всем больным выполнялось иммунологическое обследование, включающее определение Т-системы иммунитета, иммуноглобулинов М, G, А и макромолекулярных комплексов. Новым преципитационным методом (предпатент РК) определяли концентрацию кортизола в сыворотке крови всех исследуемых групп больных в динамике лечения. Статистическая обработка результатов выполнена с использованием пакета статистических программ Excell. Были исследованы корреляционные взаимосвязи между показателями содержания иммунокомпетентных клеток, цитокинов и кортизола.

У 87,3% больных отмечено повышенное содержание IL-2, TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  в сыворотке крови до лечения. После проведения химиотерапии отмечена стимуляция эндогенного цитокинообразования изучаемых цитокинов.

В частности, повышение уровня IFN $\gamma$  свидетельствует об активации Т-хелперного ответа в сторону Th1-типа иммунного ответа. В группе больных раком легких, получавших химиотерапию, отмечено их некоторое снижение. Концентрация эндогенного кортизола в сыворотке обеих групп больных до лечения, определенная преципитационным методом обнаружена достоверно повышенной в среднем на  $37,5 \pm 3,4\%$  от нормы. При хирургическом лечении и дальнейшем проведении химиотерапии и химиоиммунотерапии уровень кортизола остается повышенным. Корреляционный анализ показал наличие прямой положительной связи между показателями изучаемых цитокинов и уровнем кортизола ( $r=0,42$ ).

### **ESCHERICHIA COLI У ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ЛИЦ**

**Билалов Ф.С., Туйгунов М.М., Габидуллин З.Г., Мамбетова Э.Ф., Аминев Р.А.**

ФГУП НПО «Микроген» МЗ и СР РФ, Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

**Введение.** За последние 20-30 лет существенно возросла роль энтеробактерий в патологии человека – все чаще оппортунистические инфекции у пациентов с иммунодефицитами вызываются представителями этого семейства. При различных состояниях, сопровождающихся ослаблением резистентности макроорганизма, энтеробактерии, способные проникать в ткани и тканевые жидкости, могут составлять до 80% клинических изолятов всех грамотрицательных бактерий и вызывать до 50% всех случаев бактериемий, до 70% гастроэнтеритов и более 70% инфекций мочевыводящих путей (Бондаренко В.М., 2004, Митрохин С.Д., 2005).

Онкологические больные – особая группа больных. У этих пациентов всегда присутствуют дефекты иммунной системы, с чем связано, прежде всего, развитие самого онкологического заболевания. Дефекты Т-лимфоцитов или моноцитарно-фагоцитарной системы (клеточного иммунитета) имеют место при остром и хроническом лимфобластном лейкозе, лимфогранулематозе, после трансплантации костного мозга, трансплантации органов (почек, сердца). Дисфункция В-клеток может привести к развитию хронического лимфоцитарного лейкоза, множественной миеломы. Дефекты гуморального иммунитета обычно представлены нарушением выработки брадикининов, фибринолитической системы, системы арахидоновой кислоты и так далее. Кроме того, сама опухолевая ткань вырабатывает биологически активные вещества, обладающие иммуносупрессивным действием (Волкова З.В., 2005). Все онкологические больные получают терапию кортикостероидами, химиолучевое лечение, имеют длительные эпизоды нейтропении. Все эти факторы в комплексе способствуют усугублению иммунодефицита, увеличению частоты различных инфекционных заболеваний. Инфекционные осложнения онкологических больных часто нивелируют результаты удачно проведенного и дорогостоящего противоопухолевого лечения, приводя больных к гибели (Багирова Н.С., 2001, Дмитриева Н.В., 2001). Патогенез таких состояний обычно обусловлен наличием у представителей семейства энтеробактерий, к которым относятся и *Escherichia coli*, множества факторов патогенности, изучение которых является на сегодня актуальным.

Для преодоления защитных сил макроорганизма бактерии должны продуцировать целый ряд биологических факторов, которые обуславливают развитие инфекционного процесса. В последние годы появились данные (Козлов Р.С., 2000 г., Сидоренко С.В., 2004г.), в определенной степени проясняющие проблему появления внутри видов типичных кишечных комменсалов популяций микроорганизмов, способных вызывать внекишечные инфекции. Так, установлено, что всю популяцию штаммов *E.coli* можно разделить на несколько филогенетических групп. При этом внекишечные инфекции вызывают практически только представители группы В2.

**Целью** нашего исследования явилось изучение некоторых факторов патогенности бактерий *E.coli*, выделенных при инфекционных осложнениях у онкологических больных.

**Материалы и методы.** В работе были использованы 56 штаммов *E.coli*, выделенные от онкологических больных и 67 штаммов *E.coli*, изолированные от неонкологических больных с гнойно-воспалительными заболеваниями. Культуры были любезно предоставлены Республиканским онкологическим диспансером (зав. бак.лабораторией Горшкова В.И.), Республиканской Клинической больницей им. Куватова Г.Г. (зав. бак.лабораторией Кудакеева Р.Х.), Городской Клинической Больницей №21 (зав. бак. лабораторией Хасанова С.Г.). Штаммы были идентифицированы стандартными методами по морфологическим, культуральным, тинкториальным и биохимическим свойствам.

Адгезивную активность изучали в реакции гемагглютинации с эритроцитами различных животных, птиц и цыпленка (Габидуллин З.Г. и соавт. Авторское свидетельство №1312098).

$\alpha$ -гемолитическую активность определяли путем посева уколом суточной агаровой культуры на 2% агар Хоттингера, содержащий 5% суспензию эритроцитов кролика (Габидуллин З.Г., рац. предл. №168, 1978).

Триолзависимый гемолизин бактерий *E.coli* определяли путем посева суточных агаровых культур на среду для определения триолзависимого гемолизина (Appelbaum P.C., Prozecky O.W.).

Определение продукции термолабильного энтеротоксина у культур проводили тестом “отека лап” по методу Ю.П. Вартанян с соавт.

Фагочувствительность определяли стандартно принятыми методами бляшкообразования к поливалентному жидкому фиобактериофагу производства ФГУП НПО «Микроген» филиал «Иммунопрепарат» г.Уфа.

Для статистической обработки результатов применяли общепринятые формулы (Ашмарин И.П., Воробьева А.А.) и программу Microsoft Office Excel 2003.

**Основные результаты.** Сравнительное изучение адгезивности показало, что штаммы *E.coli*, выделенные от онкологических больных при инфекционных осложнениях, достоверно чаще обладали способностью давать маннозочувствительную (73,2%) так и маннозорезистентную (57,1%) реакции гемагглютинации с эритроцитами цыпленка, в то время как культуры *E.coli*, изолированные от неонкологических больных - 46,2 и 35,8% соответственно ( $p \leq 0,005$ ).

Результаты исследований  $\alpha$ -гемолитической активности показали, что 32,4% штаммов обладали высокой гемолитической активностью, 17,3% штамма - средней, 13,7% - слабой и не обладали гемолитической активностью 38,6% культур, изолированных от онкологических больных

с инфекционными осложнениями. Тогда как штаммы выделенные от неонкологических больных с гнойно-воспалительными заболеваниями 3,5% обладали высокой гемолитической активностью, 7,3% штаммов - средней, 13,6% штамма - низкой и не обладали активностью 75,6%.

Наряду с  $\alpha$ -гемолизином некоторые бактерии кишечной группы синтезируют тиолазависимый гемолизин, который лизируют эритроциты при наличии цестина и может быть использован при изучении патогенного потенциала возбудителя.

Способностью синтезировать тиолазависимый гемолизин в обеих группах штаммов обладали 56 штаммов. Из них 21,4% проявляли высокую активность, 17,5% - среднюю и 61,1% обладали слабой тиолазависимой гемолитической активностью. При этом достоверно значимых различий не наблюдалось.

Особенностью грамотрицательных бактерий, к которым относится и *E. coli*, является их высокая способность продукции множества ферментов патогенности, одним из которых является термолабильный (ЛТ) - энтеротоксин.

Результаты показали, что из 56 штаммов *E. coli* 17 (30,3%) обладали ЛТ-энтеротоксин продуцирующей способностью и вызывали отек лап от 60 до 120 мг, в то время как из 67 культур *E. coli*, изолированных у неонкологических больных, вызывали отек только 11 (16,4%) штаммов ( $p \leq 0,05$ ).

Результаты изучения фагочувствительности к поливалентному пиобактериофагу характеризовало, что 59,61% штаммов *E. coli*, выделенных от онкологических больных с инфекционными осложнениями, были чувствительными к поливалентному пиобактериофагу, в то время как культуры *E. coli*, изолированные от неонкологических больных лишь 46% культуры, оказались чувствительны к этому фагу.

**Заключение.** Таким образом результаты исследований свидетельствуют, что клинические штаммы *E. coli*, выделенные при инфекционных осложнениях у онкологических больных достоверно чаще обладали адгезивной,  $\alpha$ -гемолитической и ЛТ - энтеротоксинной активностью ( $p \leq 0,05$ ), что означает о высоком патогенном потенциале обычных кишечных комменсалов при изменении нормального биотопа у иммунокомпрометированных лиц. На практике определение этиологически значимых факторов патогенности, что позволило бы проведению мер, направленных на профилактику и лечение инфекций, вызванных условно-патогенными энтеробактериями. Использование поливалентного пиобактериофага в качестве дополнительного терапевтического препарата у онкологических больных в состоянии вторичного иммунодефицита может являться необходимостью в этиотропной терапии бактериальных инфекций.

#### **ИЗМЕНЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ПРОЦЕССЕ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ПО ПОВОДУ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ**

**Борисова Е.В., Кратнов А.Е., Марушков В.И., Иванова Н.Н., Сурьянинова О.В.**

Государственная медицинская академия,  
Ярославль, Россия

Нейтрофилы (НФ) – класс гранулоцитов, основными функциями которых является элиминация чужеродных

агентов путем фагоцитоза либо выброса токсичных медиаторов. Вследствие короткого жизненного цикла НФ могут служить удобной тест-системой для оценки повреждающего действия химиотерапии (ХТ) на все быстроразмножающиеся клетки.

**Цель** - изучить внутриклеточный метаболизм НФ и выявить возможную связь его состояния с процессом гибели клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) на разных этапах ХТ и после ее завершения.

**Материалы и методы.** Обследовано 25 детей с ОЛЛ в возрасте от 2 до 16 лет. Все дети находились в стадии клинико-гематологической ремиссии и были разделены на 5 групп. I: получающие на момент обследования интенсивную ХТ (n=5). II: на поддерживающей терапии (ПТ) (n=8). III: 1 год после отмены ХТ (n=5), IV: от 1 до 5 лет (n=4) и V более 5 лет (n=3) после отмены ХТ. Группу сравнения (ГС) составили 15 здоровых детей в возрасте от 6 до 14 лет. Дополнительно дети с ОЛЛ были разделены по факту наличия сепсиса во время лечения. Использовались общеклинические и специальные методы исследования.

**Результаты.** Общий анализ крови выявил у детей, находящихся на ХТ (группы I и II) более низкое, чем у детей групп III и IV содержание лейкоцитов (Л) ( $3,1 \pm 1,3 < 3,2 \pm 0,9 < 5,7 \pm 1,5 < 6,4 \pm 1,1; \times 10^9/\text{л}; P_{\text{I-III}} = P_{\text{II-III}} = 0,01, P_{\text{II-IV}} = 0,002$ ), в частности НФ ( $1,4 \pm 1,0 = 1,4 \pm 1,1 < 3,4 \pm 0,9 < 3,6 \pm 1,0; \times 10^9/\text{л}; P_{\text{I-III}} = P_{\text{I-IV}} = 0,02, P_{\text{II-IV}} = 0,03$ ). Обращает на себя внимание снижение количества Л ( $5,5 \pm 1,6 \times 10^9/\text{л}$ ) и НФ ( $2,8 \pm 1,0 \times 10^9/\text{л}$ ) у детей V группы после практически полного восстановления. Активность миелопероксидазы (МПО) НФ у детей I группы была значительно выше, чем в ГС ( $16,5 \pm 9,6 > 11,4 \pm 5,6$  SED). Однако при переходе на ПТ ее активность значительно снижалась ( $6,5 \pm 4,8 < 16,5 \pm 9,6$  SED). После отмены ХТ активность фермента постепенно восстанавливалась, резко снижаясь в V группе ( $7,8 \pm 3,8 < 12,8 \pm 6,0 > 4,9 \pm 3,8$  SED). Уровень пероксида водорода изменялся аналогично. Высокие значения у детей на интенсивной ХТ ( $0,5 \pm 0,6 > 0,4 \pm 0,3$  ед.опт.пл.) сменялись очень низкими после ее завершения и постепенно восстанавливались с течением времени, снижаясь в V группе ( $0,1 \pm 0,1 < 0,3 \pm 0,3 < 0,5 \pm 0,1 > 0,1 \pm 0,06$  ед.опт.пл.;  $P_{\text{II-IV}} = 0,0006$ ). Активность каталазы (К) менялась противоположным образом, что объяснимо, учитывая, что пероксид водорода является ее основным субстратом. В I группе активность К была выше, чем в ГС ( $626,0 \pm 252,2 > 529,6 \pm 240,5$ ; мкатал), затем снижалась, достигая минимальных значений после завершения ХТ и восстанавливаясь впоследствии до значений группы сравнения, и даже превышая их в группе V ( $544,6 \pm 182,4 > 269,7 \pm 188,8 < 584,7 \pm 149,7 < 701,3 \pm 162,9$  мкатал;  $P_{\text{II-III}} = 0,04, P_{\text{III-IV}} = 0,02$ ). Уровень малонового диальдегида в сыворотке крови у детей с ОЛЛ был выше, чем в ГС ( $80,4 \pm 73,8 < 98,7 \pm 46,5 < 112,8 \pm 122,4 < 131,6 \pm 98,2 < 133,4 \pm 211,9$ ; мкмоль/л), что свидетельствует об активации перекисного окисления липидов под действием ХТ. Однако в V группе его содержание снижалось до значений ГС ( $80,4 \pm 73,8 > 77,7 \pm 30,3$ ; мкмоль/л). Содержание лактата в НФ, снижение которого свидетельствует о повышении апоптотической готовности клетки, у детей I группы было приблизительно таким же, как в ГС ( $2,9 \pm 2,1 > 2,8 \pm 2,1$  ммоль/л). На ПТ и после завершения ХТ его содержание прогрессивно снижалось, но с течением времени возрастало вновь ( $1,9 \pm 0,8 > 1,1 \pm 0,2 < 3,8 \pm 1,2$  ммоль/л;  $P_{\text{III-IV}} = 0,02$ ). Корреляционный анализ выявил положительную связь между содержанием лактата и активностью МПО ( $r = 0,52; p = 0,0003$ ). Снижение активности МПО может быть

проявлением общего токсического действия ХТ на клетку. В ранее проводимых исследованиях у онкологических больных с солидными опухолями и хроническим миелолейкозом было выявлено снижение активности МПО на фоне лечения, сочетающееся с развитием лейкопении, что не противоречит полученным нами результатам. У детей, лечение которых осложнялось сепсисом, было выявлено достоверное снижение уровня пероксида водорода ( $0,1 \pm 0,1 < 0,3 \pm 0,3$  ед.опт.пл.,  $p=0,04$ ) и лактата ( $1,9 \pm 0,5 < 3,1 \pm 1,7$  мкмоль/л,  $P=0,04$ ) в НФ, сопровождающееся снижением активности МПО ( $8,1 \pm 1,4 < 9,3 \pm 5,6$  SED,  $P=0,07$ ) и К ( $437,7 \pm 115,9 < 593,0 \pm 315,6$  мкатал). Количество Л в периферической крови у этих детей было ниже ( $4,3 \pm 1,9 < 6,1 \pm 1,9$ ,  $\times 10^9$ /л) и достоверно снижено по сравнению с ГС ( $6,1 \pm 1,9 < 6,8 \pm 1,2$ ,  $\times 10^9$ /л;  $P=0,04$ ).

**Выводы.** На фоне химиотерапии по поводу ОЛЛ происходит угнетение функциональной активности нейтрофилов, сопровождающееся снижением устойчивости клеток к внешним воздействиям. Указанные изменения сопровождаются повышением интенсивности процессов перекисного окисления липидов. Высокая выраженность описанных процессов служит предрасполагающим фактором для развития тяжелых инфекционных осложнений.

**ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ CD16<sup>+</sup> ЛИМФОЦИТОВ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ НА ФОНЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ**

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

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

**Цель** – изучить структуру популяции CD16<sup>+</sup> лимфоцитов у онкологических больных на фоне вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками, нагруженными опухолевыми антигенами больного.

**Материалы и методы.** Иммунофенотип лимфоцитов периферической крови больных исследовали в реакции иммунофлюоресценции с МКА к поверхностным антигенам CD3, CD8, CD16 и контрольными антителами производства Becton Dickinson, конъюгированными FITC, PE и TRI, с последующим анализом на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, San Jose, США) с программным обеспечением Lysis II.

В исследование были включены больные с диагнозом диссеминированная меланома (n=30), получившие 6-15 введений и доноры (n=10). Полная клиническая ремиссия до начала вакцинотерапии наблюдалась у 10 пациентов, в процессе лечения у 7 больных была выявлена стабилизация процесса (группа №1) и у 3 – рецидив (группа №2). Распространенная стадия заболевания до начала ле-

чения была у 20 больных, на фоне вакцинаций у 7 пациентов наблюдалась стабилизация процесса (группа №3) и у 14 – прогрессирование основного заболевания (группа №4).

**Результаты.** При исследовании CD16<sup>+</sup> позитивных клеток было выявлено, что эта популяция гетерогенна. У доноров  $3,6 \pm 1,3\%$  NK клеток периферической крови являются CD16<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> и  $12,5 \pm 4,6\%$  имеют фенотип CD16<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. У онкологических больных (1-3 групп) до начала вакцинотерапии популяция CD16<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток была в пределах нормы, тогда как у больных 4<sup>-ой</sup> группы она в 5,3 раза превышала показатели донорской группы. На фоне лечения у больных 1<sup>-ой</sup> и 3<sup>-ей</sup> групп количество NK клеток, экспрессирующих T клеточные антигены, незначительно увеличивалось до 5-7%. У больных 2<sup>-ой</sup> и 4<sup>-ой</sup> групп субпопуляция CD16<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов возрастала с количеством вакцинаций (таблица). При этом следует отметить, что популяция истинных NK клеток CD16<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> лимфоцитов у больных всех групп оставалась в пределах нормальных значений (8-12%).

Таким образом, у больных диссеминированной меланомой на фоне вакцинотерапии была выявлена корреляция между увеличением количества CD16<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> NK клеток и прогрессированием основного заболевания.

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИ - ТОПОИЗОМЕРАЗНЫХ АУТОАНТИТЕЛ, АФФИННО ОЧИЩЕННЫХ ИЗ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ЦИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Вигонтина О.Г., Лизогубов В.В.<sup>1</sup>, Хворостенко М.И.<sup>2</sup>, Погребной П.В.<sup>3</sup>, Усенко В.С.<sup>1</sup>, Сидорик Л.Л.

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина;*

*<sup>1</sup>Морфологическая лаборатория БИОНТЕКС, Днепрпетровск, Украина;*

*<sup>2</sup>Областная клиническая больница им. Мечникова МОЗ Украины, Днепрпетровск, Украина;*

*<sup>3</sup>Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого, НАН Украины, Киев, Украина.*

Топоизомеразы – важнейшие ферменты, модифицирующие и регулирующие фолдинг ДНК в ядре и митохондриях. Они участвуют в большинстве клеточных процессов, ассоциированных с репликацией, рекомбинацией и сегрегацией/десегрегацией хромосом.

**ДИНАМИКА СУБПОПУЛЯЦИИ CD16<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ НА ФОНЕ ВАКЦИНОТЕРАПИИ**

| Группы больных                   | Больные в стадии полной клинической ремиссии |                                     | Больные с распространенной стадией заболевания |  |
|----------------------------------|--|-------------------------------------|--|--|
|                                  | Группа №1 (стабилизация на фоне лечения)     | Группа №2 (рецидив на фоне лечения) | Группа №3 (стабилизация на фоне лечения)       | Группа №4 (прогрессирование на фоне лечения) |
| Время исследования               |  |                                     |  |  |
| До начала лечения                | 2,3±0,9%                                     | 2,5±1,1%                            | 3,9±1,3%                                       | 17,6±5,2%                                    |
| После 6 <sup>-го</sup> введения  | 5,1±3,2%                                     | 10,1±5,5%*                          | 7,9±3,2%                                       | 26,5±6,3%*                                   |
| После 15 <sup>-го</sup> введения | 5,5±3,9%                                     | 26,6±5,9%*                          | 8,1±3,2%                                       | –  |

Примечание: \*  $p=0,001$  (достоверность по Стьюденту).

ДНК – Топоизомераза 1 (Топо 1) является основной клеточной мишенью для многих противоопухолевых химиопрепаратов и большинства антибиотиков.

Как первый ядерный аутоантиген человека Топоизомераза 1 была идентифицирована при склеродерме. Анти-Топоизомеразные антитела регистрируются у половины пациентов больных склеродермой и у 87% с ее диффузной формой, и считаются клиническим маркером данной патологии. Установлено, что при данной патологии высок риск развития рака кожи, прямой кишки, щитовидной железы, особенно у пациентов с повышенным титром анти-Топо 1 антител. Данные антитела обладали ингибирующим действием на ферментативную активность Топо 1. Более того, у данной группы пациентов в сыворотках крови были также идентифицированы и охарактеризованы антиидиотипические анти-Топо 1 антитела, которые обладали Топо 1 – подобной (рестриктазной) активностью, относящейся к группе каталитических антител. Недавно обнаруженное для антител свойство проникать не только через клеточные, но и ядерные мембраны клеток выдвигает резонное предположение об участии биологически активных антиядерных аутоантител в патогенезе многих аутоиммунных патологий, вследствие возможного модифицирующего действия на антигены – мишени. С этой точки зрения представляет собой интерес изучение механизмов действия биологически активных антиядерных антител при некоторых раковых заболеваниях с сопутствующими аутоиммунными процессами.

**Целью работы** являлось изучение биологической активности анти-Топо 1 антител аффинно очищенных из крови пациентов со злокачественными и доброкачественными новообразованиями, с сопутствующими аутоиммунными процессами щитовидной железы. Были исследованы сыворотки больных раком щитовидной железы (34), с доброкачественными новообразованиями щитовидной железы (59) а также здоровых доноров (39).

**Материалы и методы.** ДНК – Топоизомераза 1 была получена из ядер плаценты человека по разработанной нами схеме. Чистоту и специфичность препаратов Топо 1 определяли гелем электрофорезом и иммуноблоттингом (Western – blot). Активность полученного фермента определяли в реакции релаксации суперскрученной плазмиды рBR322 с последующим анализом полученных продуктов реакции электрофорезом в агарозном геле. Наиболее иммунореактивные сыворотки больных отбирали по данным иммуноферментного анализа (ELISA). Анти-Топо 1 антитела из наиболее иммунореактивных сывороток крови больных раком щитовидной железы, больных с доброкачественными новообразованиями щитовидной железы и здоровых доноров были аффинно очищены на Protein G – Sepharose. Активность анти-Топо 1 аутоантител, аффинно очищенных из наиболее иммунореактивных сывороток крови исследованных пациентов определяли, исследуя влияние различных концентрации аутоантител на ферментативную активность Топо 1 в реакции релаксации.

Было обнаружено дозозависимое ингибирующее влияние анти-Топо 1 аутоантител, (аффинно очищенных) из сывороток крови больных раком щитовидной железы на активность Топо 1 в реакции релаксации. Ig G здоровых доноров и анти-Топо 1 аутоантитела из сывороток крови больных с доброкачественными новообразованиями щитовидной железы не оказывали влияния на активность исследуемого фермента.

Таким образом, на основании полученных результатов и анализа литературных данных высказано предположение об участии аутоиммунных механизмов в малигнизации щитовидной железы.

## ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Гильдиева М.С.

*Республиканский онкологический научный центр МЗРУз, Ташкент, Узбекистан*

Иммунобиологический надзор в организме обеспечивается чрезвычайно гетерогенными механизмами, реализуемыми цитотоксическими эффекторными клетками. Эта система находится под строгим регуляторным контролем и обладает высокими компенсаторными возможностями (Моисеев В.М., Синеглазов В.Ф., 1996).

Особое место в этой системе занимает естественные киллерные клетки (ЕКК), являющиеся «первой линией обороны» против роста опухоли (Былинский Б.Т., Шпарык Я.В., 1990; Халеев Д.А. и др., 1997).

Отмечено, что уровень активности ЕКК в большой степени зависит от генетических факторов, чем от внешних влияний (Шпарык Я.В., Шлага Д.В., 1990).

**Целью** работы было изучение количественного содержания ЕКК и их активности у больных раком молочной железы с отягощенным семейным онкологическим анамнезом - синдром «раковая семья» и у пациентов со спорадической формой.

Анализ показал, что как в группе пациентов с отягощенным онкологическим анамнезом (I), так и в группе пациентов со спорадическим раком молочной железы (II) наблюдается повышение содержания ЕКК  $1,3 \pm 1,0$  в I группе;  $19,12 \pm 0,5$  во второй группе;  $9,5 \pm 0,1$  у здоровых; ( $p < 0,05$ ).

Средняя активность ЕКК у 83% больных I группы была снижена до 38,3% и только у одной больной была близка к норме (51,6%). У большинства больных этой группы наряду со снижением ЕК-активности были выявлены существенные нарушения и в других звеньях иммунной системы.

У пациентов II группы индивидуальный показатель ЕК-активности значительно варьировал, поэтому больные были разделены на 2 подгруппы (IIa и IIb). В IIa подгруппу вошли больные, у которых ЕК-активность не превышала максимальных значений здоровых женщин и составила 50,8%, в подгруппе IIb ЕК-активность составила 76,3%, что можно объяснить более выраженным региональным метастазированием.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что у больных из «раковых семей» количественное содержание ЕКК незначительно отличалось от здоровых, но наблюдалось снижение их активности. У пациентов со спонтанным опухолевым процессом выявлено увеличение как количества ЕКК, так и повышение их активности, а также увеличение количества ЕКК с проявлением нормальной активности.

## ИЗУЧЕНИЕ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ HER2/NEU ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ)

Гильдиева М.С., Нишанов Д.А., Нигманова Н.А., Умарова А.А., Казимова Г.В.

*Республиканский онкологический научный центр МЗ РУз, Ташкент, Узбекистан*

Известно, что белок HER2/неу, являясь продуктом гена c-erbB-2, представляет собой тирозин – киназный рецептор. По своим структурным характеристикам HER2/неу относится к семейству рецепторов эпидермального

фактора роста, стимуляция HER2/neu приводит к запуску транскрипционных механизмов, которые и ускоряют пролиферацию и рост клеток. При РМЖ гиперэкспрессия HER2/neu наблюдается в 30-50% случаев. Установлено, что экспрессия HER2/neu часто коррелирует с прогностически важными неблагоприятными признаками: молодой возраст, инфильтративное строение, высокая степень злокачественности и большие размеры первичной опухоли, метастатическое поражение лимфатических узлов. По данным литературы известно, что блокирование HER2/neu может существенно замедлить или остановить рост опухолей, зависимых от подобных стимулов, однако эффективное использование биологически активных препаратов предусматривает предварительную оценку индивидуальной чувствительности больных к данному виду лечения. Все вышесказанное обуславливает актуальность данной работы.

**Цель.** Изучить экспрессию HER2/neu на морфологическом материале с использованием моноклональных антител у женщин с РМЖ.

**Материал и методы.** В рамках исследования был оценен материал, полученный от 17 женщин РМЖ. Возраст женщин варьировал от 35 до 63 лет. Средний возраст составил  $48 \pm 3,2$  лет. В исследовании использовали моноклональные антитела HER2/neu фирмы «Dako» 2005г.

**Результаты.** Экспрессию HER2/neu оценивали от 0 до 3+ окрашивания мембраны. За положительную реакцию принимали окрашивание с интенсивностью 2+ и 3+ целой клеточной мембраны более чем в 10% опухолевых клеток. Окрашивание с интенсивностью 1+ не считали положительной реакцией. Из числа обследованных нами положительный результат 2+ и 3+ выявлен у 9 женщин, что составило 52,9%. В 4-х образцах интенсивность окрашивания была равна 1+, который в процентном отношении составил 23,6%. У 4-х женщин с РМЖ результат был отрицательным, что составило 23,5%.

Следовательно, применение иммуногистохимического метода для определения HER2/neu позволяет точнее определить биологию опухолевого процесса и подобрать соответствующее лечение. Будучи важными компонентами жизненно важных процессов в клетках, они являются потенциальными мишенями биотерапии.

### **ЗАВИСИМОСТЬ СОСТОЯНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА И УРОВНЕЙ АКТИВНОСТИ НАД(Ф)-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ЛИМФОЦИТАХ ОТ СТАДИИ РАКА ЛЕГКОГО**

**Денисов И.Н., Савченко А.А., Лапешин П.В., Дыхно Ю.А.**

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

Взаимоотношения злокачественной опухоли и организма-носителя многообразны. С одной стороны, организм создает опухоли необходимые условия для существования и роста, с другой стороны – противодействует развитию рака. Безусловно, что в динамике роста и развития опухоли меняются ее взаимоотношения с иммунной системой.

**Целью** исследования явилось изучение состояния иммунного статуса и уровней активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах в зависимости от стадии рака 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-, билоб- и пульмонэктомии. В качестве контроля обследовано 106 здоровых мужчины аналогичного возраста. Фенотипический состав лимфоцитов оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. 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. Определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах и в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого проводили биолюминесцентным методом.

Уже на I стадии немелкоклеточного рака легкого выявляются изменения величины иммунных параметров крови, которые характеризуют снижение функциональной активности клеточного и гуморального звена иммунной системы. Установлено снижение содержания лимфоцитов, Т-лимфоцитов, CD4<sup>+</sup>-клеток при повышении уровня НК-клеток и В-лимфоцитов. При этом выявлено снижение функциональной активности В-лимфоцитов, разнонаправленное изменение концентрации иммуноглобулинов в сыворотке и понижение уровня ЦИК. Тенденция к восстановлению состояния иммунного статуса наблюдается на II стадии заболевания (максимальная концентрация Т-лимфоцитов и CD4<sup>+</sup>-клеток в крови, снижение процентного содержания НК-клеток до контрольного диапазона). Однако величины большинства параметров иммунного статуса не достигают диапазона нормы, сохраняется дисбаланс показателей гуморального иммунитета. Однако с III стадии патологического процесса проявляется снижение реактивности иммунной системы. Вместе с тем, у больных с III стадией рака легкого выявляется повышение количества НК-клеток и активированных Т-лимфоцитов, что определяется как развитие компенсаторной реакции. Сниженное количество лимфоцитов, Т-лимфоцитов и CD4<sup>+</sup>-клеток, а также дисбаланс концентрации сывороточных иммуноглобулинов и пониженный уровень ЦИК сохраняется и при IV стадии заболевания. Патогенетическая значимость изменения величин иммунологических параметров крови характеризуется корреляционными взаимосвязями и нейросетевой информативностью. На I стадии немелкоклеточного рака легкого обнаружено ингибирование анаэробных и аэробных энергетических процессов при снижении активности дегидрогеназных реакций, определяющих состояние пластических и анаболических процессов. На II стадии заболевания выявляется некоторое восстановление интенсивности анаэробного окисления глюкозы при выраженных нарушениях метаболического состояния митохондриального компартмента иммунокомпетентных клеток крови (повышенная активность НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы и ингибирование малатдегидрогеназы). Можно предположить, что ингибирование терминальных стадий цикла трикарбоновых кислот осуществляется за счет повышения оттока субстратов на реакции аминокислотного обмена. В лимфоцитах крови больных с III стадией заболевания сохраняется снижение активности ключевой реакции липидного анаболизма, но при восстановлении активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и интенсивности гликолиза. Однако при этом выявленные уровни активности метаболических ферментов митохондриального компартмента

иммунокомпетентных клеток, позволяют предположить снижение интенсивности аэробных дыхательных процессов. При IV стадии немелкоклеточного рака легкого восстанавливается интенсивность метаболических реакций, определяющих интенсивность пластических и анаболических процессов, но при выраженном снижении уровня активности анаэробного окисления глюкозы и аэробных процессов.

### ИНСУЛИНОПОДОБНЫЙ ФАКТОР РОСТА I КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ПОКАЗАТЕЛЬ КЛЕТочНОЙ НЕОПЛАЗИИ

Дрыгина Л.Б., Соколян Н.А., Алхутова Н.А.

Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

В настоящее время получены убедительные данные о регулирующем влиянии инсулиноподобного фактора роста I (IGF-I) на рост и развитие практически всех клеток: мышечных, хрящевых, костных, печеночных, почечных, нервных, кожных, легочных и др. Известно, что IGF-I секретируется в печени под воздействием гормона роста. Поэтому большинство физиологических эффектов, связанных с гормоном роста, опосредуется через IGF-I. Высказывается мнение, что высокие уровни IGF-I в плазме крови обуславливают повышенный риск развития колоректального рака, рака предстательной железы и рака молочной железы в пременопаузе (Pollak M.N., *Natur Reviews-Cancer*, 2004).

Нами обследовано 50 мужчин, наблюдающихся по поводу гиперплазии предстательной железы. Возраст пациентов составлял от 46 до 74 лет. В сыворотке крови пациентов проводили определение простатспецифического антигена (PSA) – общей (tPSA) и свободной (fPSA) фракции (IMMULITE 2000, DPC), IGF-I (IMMULITE 2000, DPC) и гормона роста (IMMULITE 2000, DPC). По результатам определения tPSA все обследованные были разделены на две группы: со значениями ниже 4 нг/мл (1-ая группа) и значениями выше 4 нг/мл (2-ая группа) (табл.1).

Референтный диапазон изменения IGF-I для мужчин 40-70 лет составил 10-27 нмоль/л. Анализ результатов исследования показал, что у пациентов 1-ой группы средняя концентрация IGF-I в сыворотке крови достоверно не отличалась от аналогичных значений во 2-ой группе и лежала внутри референтного интервала. Выявлено возрастное понижение уровня IGF-I и концентрации гормона роста.

Известно, что при значениях fPSA/tPSA < 0,15 увеличивается вероятность злокачественной гиперплазии предстательной железы. Нами показано наличие отрицательной корреляционной связи между уровнем fPSA/tPSA и IGF-I в периферической крови обследованных пациентов.

Полученные нами данные соответствуют мнению, что повышение уровня IGF-I может служить показателем риска развития рака предстательной железы. Исследования в данном направлении продолжаются.

### ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ-РЕГУЛЯТОРОВ АПОПТОЗА НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Заботина Т.Н.

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

Молекулярные механизмы гибели клеток исследуются уже более 30 лет. Одной из причин такого внимания является причинно-следственная взаимосвязь тяжелых заболеваний с нарушениями программы клеточной гибели, при которых клетки либо перестают погибать, и тогда возможно возникновение опухолей, либо гибель захватывает избыточное число клеток, что в свою очередь приводит к патологической дегенерации тканей. Различают два основных пути активации апоптотической программы в клетке, это внешний путь и внутренний путь. Внешний или рецепторно-опосредованный путь индукции сигнала апоптоза реализуется через «рецепторы смерти» плазматической мембраны клетки при взаимодействии со специфическими активаторами, в частности, через рецепторно-лигандную систему CD95. Условно к рецепторно-опосредованному пути супрессии апоптоза относится экспрессия белка CD243, продукта гена множественной лекарственной устойчивости *mdr1*, а также экспрессия белка-транспортера MRP. Внутренний или рецепторнонезависимый (митохондриальный) путь контролируется белками семейства Bcl-2. Эти пути могут быть как независимыми друг от друга, так и взаимосвязанными. В обоих случаях конечным этапом гибели клетки является процесс фрагментации ДНК.

Целью данной работы было изучение роли апоптотических биомаркеров при онкогематологических заболеваниях лимфоидного и миелоидного происхождения.

**Материалы и методы.** В качестве исследуемого материала использовали мононуклеарную фракцию костного мозга (КМ) и/или периферической крови (ПК) больных ОЛЛ (n=54), ХЛЛ (n=116), ММ (n=14), ОМЛ (n=30), ХМЛ (n=121), МДС (n=61). Контрольная группа включала образцы клеток ПК взрослых доноров (n=30) и новорожденных детей (n=7), КМ (n=3), Л/У (n=5), тимуса (n=8). Двух- и трехцветный анализ мембранных и внутриклеточных маркеров апоптоза осуществляли с помощью МКА анти-CD243(MDR), CD95(Fas), MRP-1, Bcl-2, Вах, P53, конъюгированных FITC, PerCP или PE (Becton Dickinson, США; ДАКО, Дания). Фрагментацию ДНК лейкозных клеток до лечения и в процессе терапии оценивали по окрашиванию PI и методом TUNEL, экстернализацию фосфатидилсерина по связыванию с Аннексином V в сочетании с PI. Проточно-цитофлуориметрический анализ проводили на приборе FACSCalibur (Becton Dickinson).

**Результаты.** В результате исследований было установлено, что на ранних этапах лимфоидной дифференциров-

#### ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ tPSA, fPSA, IGF-I У ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРПЛАЗИЕЙ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

| n=50        | Возраст  | tPSA, нг/мл                | fPSA, нг/мл | IGF-I, нмоль/л             |
|-------------|----------|----------------------------|-------------|----------------------------|
| 1-ая группа | 60,0±7,8 | 1,51±0,79<br>(0,64 - 3,20) | 0,20±0,05   | 14,9±3,7<br>(1,2 - 22,2)   |
| 2-ая группа | 63,3±9,5 | 14,92±2,7<br>(5,2 - 152,0) | 2,15±0,75   | 15,4±2,1<br>(9,71 - 26,10) |

Примечание: в скобках указан диапазон изменения показателя.

ки (ОЛЛ) у детей и взрослых в КМ выявляются бластные клетки с проапоптотическим фенотипом CD95<sup>+</sup>/Bcl-2; однако у всех взрослых пациентов Bcl-2 экспрессирован в гомодимерной форме, поскольку не выявлялся индуктор апоптоза белок Вах. Лейкозные клетки больных ХЛЛ не экспрессировали CD95, а высокая экспрессия Bcl-2 обнаружена у всех больных независимо от стадии развития заболевания. В 83% случаев первичные больные ХЛЛ имели гетеродимерную структуру белков семейства Bcl-2 как при анализе клеток в относительных величинах (%), так и при сравнении показателей среднего канала интенсивности флуоресценции (MFI). Анализ фрагментации ДНК клеток больных ОЛЛ и ХЛЛ до лечения составил менее 3%, достоверно увеличивался в процессе терапии до 64,6±17,3% и 50,3±20,1% соотв. (окрашивание PI). С помощью метода TUNEL обнаружены специфические одно- и двухнитевые разрывы ДНК лейкозных клеток больных ХЛЛ в процессе лечения (1,43±0,4 – до; 30,9±13,2% – в процессе лечения). Коэкспрессия на бластных клетках больных ХМЛ CD95 антигена с антигенами CD13, CD33 свидетельствует о том, что он является маркером ранних этапов миелоидной дифференцировки. На полиморфноядерных клетках миелоидного ряда CD95 отсутствует на всех стадиях ХМЛ. В стадии БК ХМЛ у 32% больных выявляется функционально активный белок CD243, представленный на CD34<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup> клетках. Количество ранних (FITC<sup>+</sup>/PE<sup>-</sup>) апоптотических клеток в КМ первичных больных МДС-РА, МДС-РАИБ, МДС-РАИБ-t составило 19,5±7,8; 18,1±17,3 и 7% соответственно, а клетки КМ в поздних стадиях апоптоза (FITC<sup>+</sup>/PE<sup>+</sup>) статистически достоверно снижались по мере прогрессирования заболевания (30,1±3,5; 11,5±5,2 и 8,4%).

Таким образом, судьба гемопоэтических клеток в процессе созревания и дифференцировки зависит от соотношения экспрессии антиапоптотических и проапоптотических белков. Перспектива развития заболевания и прогностическая ценность использованных маркеров апоптоза может быть оценена только при их комплексном анализе.

#### ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ С ГЛИОБЛАСТОМОЙ

Захаров А.В.<sup>1</sup>, Ананьева И.И.<sup>1</sup>, Кочережкин Б.А.<sup>1</sup>, Корсакова Н.А.<sup>1</sup>, Гнучев Н.В.<sup>2</sup>, Дорофеев А.Е.<sup>4</sup>, Пинегин Б.В.<sup>2</sup>, Качков И.А.<sup>1</sup>, Пронина О.А.<sup>4</sup>, Черепашина Н.Е.<sup>1</sup>, Бурдакова Ю.А.<sup>4</sup>, Сучков С.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>МОНИКИ, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Институт иммунологии Росздрав, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ММА им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

<sup>4</sup>Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

**Введение.** Дендритные клетки (вместе с костимуляторными молекулами) участвуют в презентации опухолевоассоциированных антигенов Т-лимфоцитам, обеспечивая активацию последних и формирование у них цитотоксических свойств, рестриктированных по фенотипу CD1 (CD1<sup>+</sup>-NKT-клетки).

**Цель работы.** Определить уровень дендритных клеток, экспрессирующих маркеры CD80/CD86 с костимуляторными и иммунорегуляторными функциями, в крови больных с глиобластомой при установленном синдроме опухоль ассоциированного вторичного иммунодефицита.

**Материалы и методы.** Образцы крови 82 пациентов с диагнозом глиобластомы головного мозга, находящихся в предоперационном периоде, получены из нейрохирургического отделения МОНИКИ и нейроонкологического отделения НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН. Иммуносупрессивная терапия вышеуказанным больным не проводилась. Содержание дендритных клеток ДК оценивали с учетом рекомендаций, изложенных в работах Willmann K. с соавторами (2000), Metelitsa L. с соавторами (2004).

**Результаты.** Две важнейших субпопуляции дендритных клеток, экспрессирующих маркеры CD80/CD86 с костимуляторными и иммунорегуляторными функциями, заметно уменьшены в крови больных с синдромом опухоль ассоциированного вторичного иммунодефицита, снижая возможности для активации Т-иммунитета. Вместе с тем, выявлен факт экспрессии указанных маркеров на клетках самой опухоли.

Данный факт отражает одну из причин формирования диспропорций в составе иммунорегуляторных субпопуляций, ибо обеднение периферической крови столь пластичными в функциональном отношении субпопуляциями дендритных клеток (Liu Y.J. с соавторами, 2001; Smyth M.J. с соавторами, 2001) влечет за собой резкое истощение ресурсов противоопухолевого иммунитета уже на самых ранних (в первые 2-4 месяца после установления диагноза) стадиях развития глиобластомы, т.е., в период, когда механизмы наследственного иммунитета заметно ослаблены, что мы и наблюдаем у больных с синдромом опухоль-ассоциированного вторичного иммунодефицита.

Вполне допустимо, что недостаточность функции дендритных клеток (клеток микроглии у больных с глиобластомой) и входящих в их состав антиген-презентирующих клеток, обуславливает нарушение процессов презентации опухоль-ассоциированных антигенов клеткам иммунной системы, а, в конечном итоге, формирование низкой иммуногенности большинства форм глиобластом, столь значимой для формирования синдрома опухоль-ассоциированного вторичного иммунодефицита.

**Заключение.** Экспрессия данных маркеров на клетках опухоли, вероятно, определяет взаимодействие клеток глиобластомы с Т-лимфоцитами и формирует тем самым новый механизм ускользания глиобластомы от иммунного надзора (Schreiner V. с соавторами, 2003).

#### ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ У ДЕТЕЙ С УЗЛОВЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Златник Е.Ю., Козель Ю.Ю., Кудинова Э.Е., Бубнова Л.Н.

НИИ онкологии, Ростов-на-Дону;

Станция переливания крови Ростовской обл. Ростов-на-Дону;

Российский НИИ гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург, Россия

**Целью** данной работы было изучение особенностей иммунологических и иммуногенетических факторов у 102 детей в возрасте 10-15 лет с узловыми доброкачественными и злокачественными новообразованиями щитовидной железы (ЩЖ). Проводили оценку иммунного статуса, определение тиреоглобулина (ТГ) и антител к нему в ИФА, а также типирование лимфоцитов по главному комплексу гистосовместимости 1 типа с помощью типи-

рующей панели НИИ гематологии и трансфузиологии (С.-Петербург). Всем детям проводили хирургическое лечение, а именно, операции различного объема с гистологической верификацией диагноза, в ходе которой выявлялись доброкачественные новообразования, а также фолликулярный и папиллярный рак ЩЖ.

Полученные результаты говорят о том, что при доброкачественных опухолях показатели иммунитета были статистически достоверно выше, чем при раке ЩЖ, а после оперативного лечения их динамика была значительно благоприятнее. Так, после операции по поводу доброкачественных новообразований ЩЖ у детей происходит нормализация 7 из 10 исходно сниженных параметров (абсолютных и относительных уровней Т- и В-лимфоцитов, CD8<sup>+</sup> клеток, содержания БГЛ и IgG). Тем не менее, содержание CD4<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> клеток и функциональной активности у них и после лечения остаются ниже нормы. В отличие от них, у больных раком ЩЖ после проведенного лечения не произошло нормализации ни одного из исходно сниженных иммунологических показателей, хотя была выполнена радикальная операция, а в дальнейшем применялась заместительная гормонотерапия L-тироксина. В группе больных раком ЩЖ значения антител к ТГ статистически достоверно возросли после операции с (48,5±17) до (139,5±53,6) МЕ/мл (P<0,05), а у больных с доброкачественными узловыми новообразованиями произошли благоприятные изменения их уровня: после лечения ни у одного больного не было обнаружено превышение нормативных значений этого параметра, тогда как до операции у 12% больных он превышал норму и составлял от 120 до 560 МЕ/мл.

Результаты иммуногенетических исследований показали, что у больных доброкачественными опухолями по сравнению с контролем (здоровыми лицами) выявлялось статистически достоверное повышение частоты МНС А3 (41,27 и 25,15% соответственно) и В7 (34,92 и 19,57 % соответственно) при снижении А1 (6,35 и 21,32 % соответственно). При раке ЩЖ обнаружено повышение частоты выявления А10 (55,56, у здоровых лиц 23,94 %) и В35 (44,44 и 16,64 % соответственно), причем это относится именно к папиллярному раку, а частота встречаемости В13 у больных РЩЖ была снижена (с 11,67 у здоровых лиц до 5,13% у больных). При фолликулярном РЩЖ, в отличие от папиллярного, обнаружено повышение частоты выявления МНС В5 (41,67 против 13,39% у здоровых лиц) и В21 (25,0 против 6,35% соответственно).

Таким образом, нам удалось установить ряд различий иммунологических и иммуногенетических характеристик доброкачественных и злокачественных узловых новообразований ЩЖ у детей, что может быть использовано для дифференциальной диагностики и мониторинга данных заболеваний.

#### **ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОКИНОВ TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ И IL-4 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЯМОЙ КИШКИ ДО И ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ**

**Камалов З.С., Курьязов Б.Н., Арипова Т.У., Алимова М.Т., Миркамалова Л.И.**

*Институт иммунологии АН РУз, Ташкент;*

*Ургенский филиал Ташкентской медицинской академии, Узбекистан*

В структуре онкологических заболеваний частота встречаемости рака прямой кишки (РПК) занимает пятое

место и имеет устойчивую тенденцию к росту. Лечение РПК остается одной из серьезных хирургических проблем, одним из критериев которой является частота местных рецидивов, варьирующих от 3 до 50% (Барсуков Ю.А. и соавт., 2000, Б.А. Бердов и соавт., 2002).

**Целью** нашей работы явилось исследование роли цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-4 в прогнозировании послеоперационного состояния больных РПК, лечившихся в Хорезмском областном онкологическом диспансере. Обследовано 10 больных РПК в возрасте от 30 до 65 лет до операции и через 1 и 7 суток после операции, у которых определяли уровни цитокинов в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем ООО "Протеиновый контур" и "Цитокин" (Гос НИИ ОЧБ, С.-Петербург). Контролем служили показатели сыворотки крови 10 практически здоровых доноров.

У больных РПК до операции выявлены высокие уровни цитокинов, превышающие контрольные значения: TNF $\alpha$  - в 7 раз (198,1±35,88 пг/мл), IL-1 $\beta$  - в 4,9 раза (38,6±10,46 пг/мл) и IL-4 - в 5 раз (127,3±20,82 пг/мл), что, возможно, связано с противоопухолевой активностью иммунной системы организма больных или продукцией цитокинов опухолью. Через сутки после операции наблюдалось возрастание уровней провоспалительных (TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$ ) и снижение противовоспалительного (IL-4) цитокинов, как реакция организма на обширную хирургическую травму. Через 7 суток после операции уровни цитокинов, хотя и снижались, но достоверно превышали данные контроля. Уровни TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-4 соответственно составили 102,1±12,25 пг/мл; 116,6±15,28 пг/мл и 42,3±11,40 пг/мл.

Анализ полученных данных показал, что повышение уровня TNF $\alpha$  характерно для развития опухолевого процесса. Через сутки после операции уровень его по-прежнему значительно увеличен, однако снижается на 7 суток после операции. Более значительное повышение IL-1 $\beta$  в ранний послеоперационный период характерно для удовлетворительного и хорошего клинического состояния. Индивидуальный анализ соотношения цитокинов может явиться одним из критериев в прогнозировании дальнейшего состояния больных РПК.

#### **ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ HSP60 ПРИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОЙ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

**Капустян Л.Н., Лизогубов В.В.<sup>1</sup>, Хожаенко Ю.С.<sup>1</sup>, Гуртовой В.А.<sup>1</sup>, Гагаркин Н.И.<sup>2</sup>, Хворостенко М.И.<sup>2</sup>, Лутай Н.В.<sup>3</sup>, Усенко В.С.<sup>1</sup>, Сидорик Л.Л.**

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина;*

*<sup>1</sup>Морфологическая лаборатория БИОНТЕК, Днепропетровск, Украина;*

*<sup>2</sup>Областная клиническая больница им. Мечникова МОЗ Украины, Днепропетровск, Украина;*

*<sup>3</sup>Днепропетровская медицинская академия, Днепропетровск, Украина*

Белки теплового шока (HSPs) являются наиболее древней защитной системой всех клеточных организмов. HSPs функционируют как молекулярные шапероны в регуляции клеточного гомеостаза и обеспечивают выживание клеток

в стрессовых условиях. Молекулярные шапероны вовлечены в развитие множества патологий, включая канцерогенез, в основном посредством изменения уровня их клеточной локализации и экспрессии. Была обнаружена позитивная корреляция между изменением уровня экспрессии и клеточной локализацией некоторых шаперонов (в частности, Hsp70 и Hsp60) с плохим прогнозом и развитием резистентности к химиотерапии у пациентов с раком молочной железы и раком эндометрия матки, однако у пациентов с остеосаркомой или раком пищевода коррелировала с благоприятным прогнозом и нормальной чувствительностью к химиотерапии. Все эти данные однозначно указывают на необходимость дальнейших детальных исследований роли молекулярных шаперонов в канцерогенезе и механизмах развития лекарственной резистентности с учетом особенностей данного конкретного вида рака.

**Целью** наших исследований было изучение возможных изменений экспрессии и клеточной локализации Hsp60 при доброкачественной и злокачественной патологии щитовидной железы, а также определение уровня анти-Hsp60 аутоантител в сыворотке крови пациентов исследуемых групп.

Для определения уровня анти-Hsp60 аутоантител были исследованы сыворотки крови 49 пациентов (женщины, 20-57 лет). В качестве контрольных использовали сыворотки 12 здоровых доноров. При морфологическом исследовании удаленного материала щитовидной железы были установлены диагнозы: узловая гиперплазия щитовидной железы у 12 пациенток, аутоиммунный тиреоидит Хашимото у 12 пациенток, фолликулярная аденома у 18 пациенток, рак у 7 пациенток (из них 6 папиллярных и 1 фолликулярная карцинома). В зависимости от установленного диагноза пациенты были разделены на группы. В качестве контрольной ткани исследовали 5 нормальных щитовидных желез, полученных на аутопсии от умерших в результате причин, не связанных с патологией щитовидной железы, опухолевых и системных процессов, а также 5 участков ткани щитовидной железы без морфологических признаков патологии, удаленных у пациентов с узловым зобом во время операции.

Уровень аутоантител к Hsp60 в исследуемых сыворотках крови определяли твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA), гистологическое и иммуногистохимическое исследование срезов опухолей проводили, используя стандартные методики.

При анализе средних значений уровня аутоантител к Hsp60 в сыворотках пациентов, определенного с помощью метода ELISA, установлено увеличение титра аутоантител у пациентов с патологией щитовидной железы на 207-353% по сравнению с контрольными сыворотками. Наибольшее увеличение титра аутоантител к Hsp60 выявлено в группе злокачественных новообразований.

Данные иммуногистохимического исследования не выявили повышенного содержания Hsp60 в ткани щитовидной железы при аутоиммунном тиреоидите. Найдены единичные более интенсивно окрашенные клетки в зонах лимфоидной инфильтрации. Очаговое увеличение количества Hsp60 найдено в ткани при узловой гиперплазии и в тканях фолликулярных аденом. По характеру окрашивания данные клетки соответствовали таковым, выявленным в контрольных тканях. Однако в 20% при узловой гиперплазии и в 22% фолликулярных аденом количество таких клеток превышало 10%. При исследовании папиллярных карцином были выявлены интенсивно окрашенные отдельные группы клеток, как правило, располагаю-

щиеся в пределах одного эпителиального компартмента. Следует отметить, что в ткани опухолей значительно более выраженными были признаки склеротических изменений стромы и лимфоидной инфильтрации. Можно сделать предположение, что потребность в обеспечении выживания клеток в неблагоприятных условиях микроокружения определяют высокий уровень Hsp60 в клетках.

Корреляционный анализ по Спирмену показал отсутствие корреляционной связи между уровнем аутоантител в сыворотке крови пациентов и уровнем экспрессии Hsp60 в исследованных тканях ( $r=0,012$ ,  $p=0,94$ ). Полученные данные указывают на отсутствие связи между простым увеличением количества Hsp60 в ткани и появлением аутоантител в крови. Это указывает на необходимость поиска возможной функциональной связи между клеточными функциями шаперона при раке щитовидной железы и индукцией иммунного ответа на развитие опухоли. Наши исследования являются первым примером изучения возможной связи экспрессии и функциональной активности молекулярного шаперона при развитии опухолей щитовидной железы (как злокачественных, так и доброкачественных), сопровождающихся индукцией аутоиммунных процессов.

**Выводы.** При незлокачественной патологии щитовидной железы (узловой гиперплазии, аутоиммунном тиреоидите и доброкачественных новообразованиях) имеет место повышение титра аутоантител к Hsp60 в сыворотке крови пациентов в 50% случаев. У всех обследованных пациентов с раком щитовидной железы имеется повышенный уровень аутоантител к Hsp60.

При опухолевой и аутоиммунной патологии щитовидной железы происходит изменение количества и локализации Hsp60. Повышение экспрессии в тканях носит гетерогенный характер, связано с различными морфологическими проявлениями патологии: лимфоидной инфильтрацией, склеротическими изменениями стромы, процессами гибели и пролиферации клеток.

Нет корреляции между уровнем аутоантител и количеством Hsp60 в ткани щитовидной железы.

## ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АПОПТОЗА У БОЛЬНЫХ С ГЛИБЛАСТОМОЙ

**Качков И.А.<sup>1</sup>, Ананьева И.И.<sup>1</sup>, Захаров А.В.<sup>1</sup>, Корсакова Н.А.<sup>1</sup>, Кочережкин Б.А.<sup>1</sup>, Гнучев Н.В.<sup>2</sup>, Дорофеев А.Е.<sup>4</sup>, Пинегин Б.В.<sup>2</sup>, Черепихина Н.Е.<sup>1</sup>, Бурдакова Ю.А.<sup>4</sup>, Сучков С.В.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>МОНИКИ, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Институт иммунологии Росздрава, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ММА им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

<sup>4</sup>Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

**Введение.** Для больных глиобластомой характерен феноменом ассоциированного с опухолью вторичного иммунодефицита (ВИД), получившего название синдрома опухолевоассоциированного ВИД (СОАВИД). Для СОАВИД фенотипа I характерно наличие ярко выраженных диспропорций в составе субпопуляций, затрагивающих эффекторные и регуляторные звенья сразу двух ветвей иммунитета - наследственного и адаптивного. В группе с фенотипом II картина субпопуляционного спектра крови имеет минимальные отличия от значений нормы, иног-

да патологические сдвиги касались лишь отдельных параметров субпопуляционного спектра клеток периферической крови.

**Цель.** Изучение активности апоптоза у больных с глиобластомой.

**Материалы и методы.** Образцы крови 82 пациентов с диагнозом глиобластома в предоперационном периоде получены из нейрохирургического отделения МОНИКИ и нейроонкологического отделения НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН. Иммуносупрессивная терапия вышеуказанным больным не проводилась. Средняя продолжительность заболевания составила два месяца. Диагноз верифицирован гистологически в послеоперационном периоде.

Исследование субпопуляционного состава клеток периферической крови проводили путем иммунофенотипирования субпопуляций на проточных цитометрах моделей FACS Calibur™ и FC500 фирм Becton-Dickinson и Beckman-Coulter (США), а также Cyан фирмы Dako Cytomation (Бельгия).

**Результаты.** Наиболее яркие отклонения показателей апоптоза наблюдаются у больных с фенотипом СОАВИД I. Выявлена активизация Fas-опосредованного апоптоза лимфоцитов, что приводит к ослаблению клеточного звена противоопухолевого иммунитета. Обнаружены различия в уровнях проапоптотической активности иммуноцитов, опосредуемой через рецепторы апоптоза CD95 и CD27 (рецептор TNF- $\alpha$  на иммуноцитах). При СОАВИД I величина такой активности в случае Fas-опосредованного апоптоза достаточно высока. Для второго пути, требующего наличия на клетках глиобластомы маркера CD70 (поверхностного лиганда для TNF- $\alpha$ ), такого рода активность сохраняется в пределах значений доноров. В группе с фенотипом II показатели апоптоза имели минимальные отличия от значений нормы.

**Заключение.** Не исключено, что именно Fas-опосредованный апоптоз, обуславливающий гибель основных субпопуляций Т-лимфоцитов, играет у больных с СОАВИД I определяющую роль в прогрессировании опухоли.

## СОСТОЯНИЕ ЯДЕРНОГО ГЕНОМА ЛИМФОЦИТОВ В ОРГАНИЗМЕ БОЛЬНЫХ ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

**Койков В.В., Муравлева Л.Е.**

*Карагандинская государственная медицинская академия, Караганда, Республика Казахстан*

Рост онкозаболеваний в последние годы в значительной мере связан с опухолями легкого. Около 75 % всей легочной онкопатологии составляет немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ).

В условиях опухолевого роста функциональная активность клеток значительно меняется за счет окислительной

модификации различных внутриклеточных биомакромолекул (Дубинина Е.Е., Шугалей И.В., 1993). Поскольку же состояние окислительного метаболизма в организме во многом определяется уровнем функциональной активности клеток крови – лейкоцитов – важную роль играет изучение комплекса параметров метаболизма белков в этих иммунокомпетентных клетках, нарушение противоопухолевого иммунитета которых имеет патогенетическую значимость при онкогенезе (Попова Н.А., 2001).

**Целью** нашей работы явилось изучение уровня гистоновых белков лимфоцитов у больных НМКРЛ на отдельных стадиях заболевания.

**Материалы и методы.** Объектом исследования явились лимфоциты от 30 больных с морфологически верифицированным диагнозом НМКРЛ. При этом 15 больных имели III стадию опухолевого процесса, и 15 больных IV стадию заболевания. Контрольную группу составили 15 практически здоровых лиц соответствующей возрастной (35-58 лет) и половой принадлежности.

Лимфоциты выделяли из крови на градиенте фиколл-верографин. Гистоны в лимфоцитах определяли методом Johns E.W. (1964) в модификации Маркушева Л.И. и соавт. (2000). Определяли процентное содержание каждой фракции гистонов от общего их количества, считая его за 100 %. Полученные данные были обработаны методом вариационной статистики. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

**Результаты.** Анализ результатов определения соотношения фракций гистоновых белков в лимфоцитах показал достоверное снижение процентного содержания фракции Н1-гистонов на 26% при III стадии НМКРЛ и на 39% при IV стадии опухолевого процесса.

Доля смешанной фракции Н2А-, Н3-, Н4-гистонов в лимфоцитах на обеих стадиях опухолевого процесса возрастает – при III и IV стадиях соответственно на 16 и 24%. Изменение доли фракции Н2В-гистонов не носит существенного характера. Таким образом, соотношение лизин/аргинин в лимфоцитах снижается прежде всего за счет увеличения доли лизинсодержащих Н1-гистонов – на 36 и 50% при III и IV стадиях опухолевого процесса.

Полученные результаты свидетельствуют о нарушении соотношения ядерных белков хроматина в лимфоцитах больных НМКРЛ. Соотношение этих белков строго дозировано и изменяется в узких пределах в процессе функционирования организма. Поэтому четкая тенденция к усилению нарушений в процентном содержании гистоновых белков при НМКРЛ с ростом степени тяжести заболевания свидетельствует о наличии тесной связи между уровнем ядерных белков хроматина лимфоцитов и стадией опухолевого процесса. Изменение соотношения фракций гистоновых белков в лимфоцитах свидетельствует о деконденсации хроматина. Учитывая известный факт о подавлении противоопухолевого иммунитета, можно предположить, что изменение конденсации хроматина в лимфоци-

### РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИЙ ГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ НМКРЛ

| Группы больных      | Н1-гистоны, %      | Н2А-, Н3-, Н4-гистоны, % | Н2В-гистоны, %   | Лизин/аргинин         |
|---------------------|--------------------|--------------------------|------------------|-----------------------|
| Контроль            | 38,7 $\pm$ 1,9     | 47,0 $\pm$ 2,5           | 14,2 $\pm$ 0,7   | 0,823 $\pm$ 0,043     |
| До полихимиотерапии |                    |                          |                  |                       |
| III стадия          | 28,6 $\pm$ 1,7 *   | 54,3 $\pm$ 1,8 *         | 17,3 $\pm$ 1,7   | 0,527 $\pm$ 0,044 *   |
| IV стадия           | 23,6 $\pm$ 1,5 * # | 58,4 $\pm$ 1,7 *         | 17,8 $\pm$ 1,1 * | 0,411 $\pm$ 0,037 * # |

\* - достоверность показателей по отношению к контролю ( $p < 0,001$ ); # - достоверность показателей IV стадии по отношению к III стадии ( $p < 0,05$ ).

тах связано с повреждением ядерных структур клетки. В роли такого повреждающего фактора могут выступать как свободные радикалы, так и продукты окислительной деструкции белков, высокий уровень которых был отмечен нами в организме больных НМКРЛ в ряде наших предыдущих исследований.

## ЛИМФОЦИТЫ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ

**Колбаская О.П., Тупицын Н.Н.**

*ГУ РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН, Москва;*

*НИИ КО, Москва, Россия*

**Введение.** Изучение лимфоцитов костного мозга при диагностике острых лейкозов методом проточной цитометрии долгое время представляло сложную проблему в силу сходства характеристик светорассеяния лимфоцитов и бластов. Гейтинг бластов на основании экспрессии CD45 позволяет решить этот вопрос в большинстве случаев острых лейкозов.

**Цель.** Оценить субпопуляции лимфоцитов костного мозга при диагностике ОЛЛ и ОМЛ у детей и взрослых.

**Материалы и методы.** Исследование проведено у 68 больных острыми лейкозами на этапе диагностики. Зрелые лимфоциты отличались от бластов более яркой экспрессией CD45 во всех 25 случаях острого миелоидного лейкоза (ОМЛ, дети – 6, взрослые – 19) и в 38 из 43 случаев острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ, дети – 26, взрослые – 12); 5 случаев пре-Т ОЛЛ характеризовались выраженной экспрессией CD45 на бластах и были исключены из последующего анализа.

**Результаты.** Во всех случаях ОЛЛ у детей уровни Т-лимфоцитов (CD3) были повышены, а В-лимфоцитов (CD19, CD20) – снижены в сравнении с нормой, NK-клетки были повышены в 61% случаев, соотношение CD4/CD8 – в 52%, CD8-клетки – в 91%. Изменения в субпопуляциях лимфоцитов у взрослых были в основном такими же, за исключением CD8-клеток, которые были повышены лишь в 27% случаев, и более частого повышения соотношения CD4/CD8 (в 91% случаев). Отличие ОМЛ взрослых от ОЛЛ взрослых заключалось в более частом повышении CD8-клеток и NK-клеток (83%).

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о существовании определенных различий в составе субпопуляций эффекторных лимфоцитов костного мозга больных острыми лейкозами при диагностике в зависимости от возраста (дети, взрослые) и варианта лейкоза (ОЛЛ, ОМЛ).

## ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ ЛИМФОЦИТОВ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИРОДЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И УСТАНОВЛЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ВАРИАНТА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОМ

**Кузьмина Е.Г., Неприна Г.С., Павлов В.В., Шахтарина С.В., Двинских Н.Ю., Рогова Н.М., Константинова Т.В., Сироткина Н.П., Курасова В.Г.**

*Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск, Россия*

**Цель работы** - изучить возможности иммуноцитофлуориметрии тканевых лимфоцитов для определения

природы опухолевых клеток (гемопоэтические или негемопоэтические опухоли) и для установления иммунологического варианта злокачественных лимфом.

**Методы.** Исследовали иммунофенотип суспензии клеток лимфоузлов, ЛУ, полученных от 37 больных с подозрением на лимфопролиферативные заболевания. Суспензию клеток (биопсийный или операционный материал) получали, используя стеклянный гомогенизатор. Применяли моноклональные антитела фирмы Becton Dickinson: CD14/CD45, CD10/CD19, CD20/CD5, CD3/CD22, CD7/CD33, HLADR/CD13, CD3/CD19, CD4/CD8, CD3/HLADR, CD16+56/CD3, CD8/CD38, каппа/лямбда, а также МКА к антигенам клеток-предшественников, CD34, ранних этапов активации, CD69, пролиферирующих лимфоцитов, CD71, субпопуляцию зрелых (V<sub>2</sub>) лимфоцитов, CD23. Использовали проточный цитофлуориметр FacScan (программы Lysis и SIMULSET).

**Результаты.** При реактивных лимфаденитах, РЛА, количество В-лимфоцитов составляло 25-40%, Т-лимфоцитов 15-25% (CD8), 25-50 (CD4) до 55-68 (CD3). Уровни активации Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> – 19% и CD69<sup>+</sup> – 32%. У больных лимфомой Ходжкина, 10 чел., показатели активации Т-лимфоцитов в ЛУ были существенно выше - 37 (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) и 59% (CD69), чем при РЛА.

У 12 больных по экспрессии линейноспецифических антигенов определен иммунологический вариант неходжкинской лимфомы (НХЛ), подтвержденный в дальнейшем гистологическими исследованиями. У 4 из них обнаружена В-лимфоидная зрелоклеточная пролиферация, признаками которой явилось значительное усиление экспрессии основных пан-В-клеточных маркеров CD19- 65-100, CD20 - 47-93, CD22 - 65-95, HLA-DR - 80-95, CD5 - 80-95 % при снижении уровней экспрессии основных пан-Т-лимфоидных маркеров (CD7, CD3, CD2, в среднем - до 9-20%). Важное диагностическое значение имеет экспрессия маркера CD5. В этой группе больных она существенно варьировала от слабой при диффузной крупноклеточной и фолликулярной ЗЛ (28% и 14%) до сильной при (про)лимфоцитарной и микролимфобластной лимфомах (100%). Экспрессия В-маркера CD23 также отличалась при диффузной крупноклеточной ЗЛ - 9% и (про)лимфоцитарной ЗЛ - 70%. Таким образом, уровень экспрессии маркеров CD5 и CD23 является важным диагностическим признаком различных иммунологических вариантов периферических В-клеточных НХЛ. Как известно, экспрессия маркера CD23 положительна при лимфоме из малых лимфоцитов и ХЛЛ, но отрицательна при лимфоме из клеток мантийной зоны. Экспрессия маркера CD5 нехарактерна для фолликулярной и диффузной крупноклеточной лимфом. У 5 больных в суспензии ЛУ обнаружена Т-лимфоидная пролиферация: усиление экспрессии пан-Т-клеточных маркеров, в том числе маркеров активации (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) при значительном снижении уровней В-клеток, причем у 4 больных определена опухоль Т-хелперного фенотипа (CD4), у 1 - Т-супрессорного фенотипа (CD8).

В одном случае в суспензии лимфоузлов выявлены aberrantные клетки с миеломоноцитарными антигенами CD13, CD33 на ранней стадии дифференцировки (высокая экспрессия антигена стволовых клеток и ранних гемопоэтических предшественников CD34), диагноз хронический миелолейкоз в стадии бластного криза, миелоидный вариант. В другом случае фенотип клеток (CD34<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), был характерен для Т-лимфобластного лейкоза.

Слабая экспрессия общего лейкоцитарного антигена CD45 на клетках лимфоузлов свидетельствует в пользу негематологической природы поражения (рак и т.д.).

**Заключение.** Иммуноцитофлуориметрия суспензии лимфоцитов из пораженных лимфоузлов позволяет определить природу опухолевых клеток (лимфоидная, нелимфоидная), линейную принадлежность, иммунологический вариант, степень зрелости и уровень активации опухолевых клеток, их клональность. Можно рекомендовать как дополнительный методический подход при диагностике злокачественных лимфом.

## ГАЛЕКТИНЫ КАК МИШЕНЬ ПРИ ЛЕЧЕНИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Курмышкина О.В., Рапопорт Е.М., Пазынина Г.В., Бовин Н.В.**

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

**Введение.** Галектины – семейство бета-галактозидсвязывающих лектинов, имеющих гомологию в аминокислотной последовательности, составляющей углеводсвязывающий сайт. В настоящее время известно 14 представителей этого семейства. Как правило, галектины – небольшие белки (с молекулярной массой 14 – 35 кДа), не имеющие других функциональных доменов, кроме углеводсвязывающего (УСД). Галектины узнают Lac/LacNAc последовательность в составе гликолипидов и гликопротеинов. Основная функция галектинов связана с их ролью как адгезивных молекул. Галектин-1 и -3 принимают участие в межклеточной адгезии и в адгезии клеток к клеточному матриксу. С адгезивными свойствами галектинов-1 и -3 связана их роль при онкотрансформации. Галектин-1, экспрессируясь на опухолевых клетках, способствует адгезии их к эндотелию, что приводит к инвазии и развитию метастаз при раке молочной железы. Повышенная экспрессия галектина-3 на эндотелиальных клетках также стимулирует клеточную адгезию к опухолевым клеткам и ангиогенез. В связи с этим актуален поиск аффинных углеводных лигандов клеточных галектинов, которые могут быть использованы в противораковой антигалектиновой терапии.

**Целью** данной работы было: идентификация и исследование специфичности галектинов, экспрессирующихся на опухолевых клетках больных раком молочной железы на разных стадиях заболевания.

**Методы.** Опухоли были получены от больных во время операции; стадия заболевания  $T_3N_1M_0$  и  $T_2N_1M_0$ . В исследовании использовали полиакриламидные гликоконъюгаты Gluc–PAA-fluo (30 кДа, 20 мольн. % углевода), содержащие 1 мольн. % флуоресцеина. Взаимодействие клеток с Gluc–PAA-fluo анализировали методом цитофлуориметрии.

**Результаты.** 1) Клетки, полученные из опухолей человека, связывались с антителами к галектину-1, -2, -3 и -4. 2) Наибольшее связывание клеток наблюдалось с асиалоGM1-PAA-fluo (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ -PAA-fluo, 75%), LacNAc-PAA-fluo (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-PAA-fluo, 63%) и 6-O-Su-LacdiNAc-PAA-fluo (GalNAc $\beta$ 1-4(6HSO $_3$ )GlcNAc-PAA-fluo, 81%). 3) Взаимодействие клеток с асиалоGM1-PAA-fluo и 6-O-Su-LacdiNAc-PAA-fluo ингибировалось антителами к галектинам-2 и -4. Взаимо-

действие галектинов с LacNAc возрастало при дегалектозилации клеток, что указывает на возможность маскировки галектинов гликоконъюгатами, экспрессирующимися на этих же клетках.

**Заключение.** 1) Галектины-1, -2, -3 и -4 идентифицированы на поверхности клеток, полученных от больных раком молочной железы. 2) АсиалоGM1 и 6-O-Su-LacdiNAc являются лигандами галектинов-2 и -4. Активность галектинов определяется стадией заболевания. 3) АсиалоGM1 и 6-O-Su-LacdiNAc могут быть использованы для связывания галектинов, экспрессирующихся на опухолевых клетках, при лечении рака молочной железы. (Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований – грант N-04-04-49689).

## ПРОДУКЦИЯ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ РАКА ЖЕЛУДКА

**Курьязов Б.Н.**

*Ургенский филиал Ташкентской медицинской академии, г.Ургенч, Узбекистан*

При оперативном вмешательстве большое прогностическое значение придается содержанию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

**Целью** нашего исследования явилось исследование содержания в сыворотке крови цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-4 при оперативном лечении рака желудка (РЖ). До и через 1 и 7 суток после операции было обследовано 10 больных в возрасте от 44 до 70 лет, лечившихся в Хорезмском областном онкологическом диспансере. В сыворотке крови больных методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем ООО “Протеиновый контур” и “Цитокин” (Гос НИИ ОЧБ, С.-Петербург) определяли концентрацию цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-4. Контролем служили соответствующие анализы 10 практически здоровых лиц.

В контрольной группе содержание TNF $\alpha$  не превышало 30 пг/мл и в среднем составляло 27,8 $\pm$ 5,58 пг/мл. Содержание IL-1 $\beta$  и IL-4 равнялось 8,0 $\pm$ 2,02 пг/мл и 23,7 $\pm$ 5,62 пг/мл при соотношении 1:3.

У больных РЖ до операции исходные концентрации TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , и IL-4 были повышены и составляли 176,8 $\pm$ 29,17 пг/мл, 28,6 $\pm$ 8,93 пг/мл и 101,8 $\pm$ 7,30 пг/мл соответственно, что превышало значения контроля в 6,4; 3,6 и 4,3 раза. Несмотря на высокое содержание цитокинов, соотношение IL-1 $\beta$  и IL-4 при этом не отличалось от контроля (1:3).

Через сутки после операции наблюдалось резкое возрастание провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  по сравнению с исходным уровнем – в 3 раза, тогда как IL-4 снижалось в 3 раза при соотношении 1:0,007. Концентрация TNF $\alpha$  увеличилась в 3 раза по сравнению с исходным – до 516,5 $\pm$ 56,84 пг/мл. На 7 сутки после операции концентрации TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , и IL-4 в сыворотке больных снижались до 87,6 $\pm$ 11,13 пг/мл; 100,7 $\pm$ 13,18 пг/мл и 31,3 $\pm$ 11,30 пг/мл, оставаясь выше контрольных значений, при соотношении IL-1 $\beta$  и IL-4 как 1:0,3. Анализ послеоперационного состояния больных и изменения уровня цитокинов показал, что повышенные концентрации IL-4 определялись при хорошем и удовлетворительном состоянии больных. Поэтому уровни про- и противовоспалительных цитокинов могут служить дополнительным диагностическим критерием.

**ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЕЙ АКТИВНОСТИ НАД- И НАДФ-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ ЛИМФОЦИТОВ В КЛЕТКАХ ЗДОРОВОЙ И ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ЛЕГКОГО У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО**

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

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

Одного из перспективных направлений, позволяющих охарактеризовать патофизиологические аспекты развития опухоли в организме – исследование особенности метаболических процессов клеток здоровой и опухолевой ткани при раке легкого. Связано это с тем, что все изменения клеточной генетической программы реализуются, в том числе, и через метаболические процессы. Большой интерес представляет изучение метаболизма лимфоцитов крови. **Целью исследования** явилось сравнительное изучение уровней активности метаболических ферментов лимфоцитов периферической крови и в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого у больных 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-, билоб- и пульмонэктомии. Кровь для исследования забирали при поступлении больных в стационар. В качестве контроля обследовано 106 здоровых мужчин аналогичного возраста. Определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови и в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого проводили биолуминесцентным методом.

Установлено, что у больных раком легкого снижена активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), малатдегидрогеназы (МДГ), НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДИЦДГ), НАДН-зависимых реакций ЛДГ (НАДН-ЛДГ) и МДГ (НАДН-МДГ), но при повышении уровня глутатионредуктазы. Кроме того, в лимфоцитах крови больных мужчин понижена активность НАДФ-зависимых глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ) и изоцитратдегидрогеназы (НАДФИЦДГ). Выявлена взаимосвязь между уровнями активности ряда исследуемых дегидрогеназ в лимфоцитах крови и размером опухоли. Так обнаружено, что размер опухоли у больных раком легкого отрицательно взаимосвязан с уровнями активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) ( $r=-0,35, P<0,01$ ), ЛДГ ( $r=-0,32, P<0,05$ ), НАДФГДГ ( $r=-0,34, P<0,01$ ), НАДИЦДГ ( $r=-0,34, P<0,01$ ) и НАДФН-зависимой реакции глутаматдегидрогеназы ( $r=-0,37, P<0,01$ ). Следовательно, установленные взаимосвязи отражают снижение интенсивности пластических и энергетических процессов в лимфоцитах крови у больных раком легкого с ростом опухоли.

Обнаружено, что в клетках опухолевой ткани легкого повышена активность Г6ФДГ, ЛДГ, НАДФГДГ, МДГ, НАДИЦДГ, но снижен уровень малик-фермента. Кроме того, установлено, что в клетках опухолевой ткани легкого значительно повышен уровень анаэробной реакции ЛДГ. Уровни активности НАДФИЦДГ, НАДН-МДГ и ГР в клетках опухолевой ткани соответствуют диапазону, выявленному в клетках здоровой ткани легкого.

Установлена тесная взаимосвязь между уровнями активности дегидрогеназ клеток здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого: Г6ФДГ ( $r=0,60, P<0,001$ ), НАДФМДГ ( $r=0,52, P<0,001$ ), НАДФИЦДГ ( $r=0,46, P<0,001$ ), НАДИЦДГ ( $r=0,40, P<0,01$ ), НАДН-

МДГ ( $r=0,77, P<0,001$ ). Подобная тесная взаимосвязь позволяет предположить наличие параллельных изменений в системах метаболизма клеток здоровой и опухолевой ткани легкого при раке легкого.

Таким образом, при исследовании особенностей метаболизма клеток здоровой и опухолевой ткани при раке легкого обнаружено, что в клетках опухолевой ткани повышена активность оксидоредуктаз, характеризующих интенсивность анаэробных и аэробных процессов, а также ряда реакций макромолекулярного синтеза. Установлено, что изменения активности ряда исследуемых НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого осуществляются сонаправленно. При этом, интенсивность метаболических процессов в клетках здоровой и опухолевой ткани не взаимосвязана с размером опухоли. Установлено, что метаболизм лимфоцитов крови у больных раком легкого характеризуется снижением активности анаэробных и аэробных энергетических процессов. С помощью корреляционного анализа выявлена отрицательная зависимость между уровнем активности дегидрогеназ лимфоцитов, определяющих интенсивность биоэнергетических и пластических процессов, и размером опухоли. Доказано, что регуляторные взаимосвязи между лимфоцитами крови и клетками здоровой и опухолевой ткани реализуются в системе внутриклеточного метаболизма через малат-аспартатный шунт и реакции аминокислотного обмена.

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ХЕМОКИНОВОГО РЕЦЕПТОРА CCR5 В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ**

**Литвяков Н.В., Пономарева А.А., Стахеева М.Н., Гервас П.А., Чердынцева Н.В., Слонимская Е.М., Гарбуков Е.Ю., Бабышкина Н.Н., Денисов Е.В.**

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

**Введение.** CCR5 рецептор является одним из поливалентных специфических рецепторов к ряду ключевых хемокинов (MIP-1a,-b, MCP-2 и RANTES), участвующих в воспалении и регуляции миграции и активности иммунокомпетентных клеток. Их роль в процессе канцерогенеза неоднозначна, хемокины регулируют миграцию иммунных клеток в опухолевый очаг, участвуют в противоопухолевом иммунном ответе и могут контролировать хемотаксис опухолевых клеток, определяя их метастатический потенциал. Показано, что высокий уровень RANTES в крови может повышать иммунный ответ либо коррелировать с плохим прогнозом у больных раком молочной железы (Leibowitz et.al, 2000). Способность иммунокомпетентных и опухолевых клеток к ответу на хемокины определяется экспрессией белка CCR5 на поверхности этих клеток. Особенности экспрессии гена CCR5 в лимфоцитах крови при злокачественных опухолях и в процессе лечения практически не изучены. Другим важным аспектом функционирования рецептора CCR5 является его взаимосвязь с онкосупрессорным геном p53. Было показано, что активация CCR5 позитивно регулирует транскрипционную активность p53 и его генов-мишеней (p21, Mdm2) в клетках при раке молочной железы посредством JAK2- и p38, а также MAPK-зависимых механизмов и стимулирует таким образом процесс апоптоза (Manes et al., 2003). Вероятно,

CCR5 способен индуцировать апоптоз не только в опухолевых, но и в иммунокомпетентных клетках, что, учитывая способность опухолевых клеток к продукции хемокинов, может являться одним из механизмов иммуносупрессорного действия опухоли.

**Цель.** Исследовать экспрессию гена хемокинового рецептора CCR5 в лимфоцитах периферической крови у больных раком молочной железы на этапах лечения и изучить ее взаимосвязь с клинико-морфологическими особенностями заболевания.

**Материалы и методы.** В работе обследовано 32 больных раком молочной железы, находящихся на лечении в клинике НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, с морфологически верифицированным диагнозом (1-4 стадии). Оценивался уровень экспрессии гена хемокинового рецептора CCR5 в лимфоцитах периферической крови у больных раком молочной железы до лечения, после 2-3 курсов неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) (по схеме CMF или FAC) и после операции в объеме радикальной мастэктомии или радикальной резекции. Экспрессия гена CCR5 оценивалась с помощью метода обратнo-транскриптазной ПЦР в процентах по отношению к конститутивно экспрессируемому гену-рефери фермента GAPDH с помощью денситометрической программы Phoretix 1D. Полиморфизм гена р53 определяли методом ПЦР-ПДРФ.

**Результаты.** В ходе исследования было показано, что уровень экспрессии гена рецептора CCR5 в лимфоцитах периферической крови больных РМЖ до лечения колеблется в пределах от 10 до 113%, средний уровень составил  $58,47 \pm 4,68\%$ . Выявлена взаимосвязь уровня экспрессии гена рецептора CCR5 до лечения со стадией опухолевого процесса: у больных РМЖ 3-4 стадии уровень экспрессии гена CCR5 в лимфоцитах крови достоверно выше ( $78,21 \pm 8,43\%$ ), чем у больных 1-2 стадии ( $51,10 \pm 5,97\%$ ) ( $p=0,021$ ). Уровень экспрессии CCR5 не зависел от регионарного метастазирования, но был связан с уровнем дифференцировки опухолевых клеток, при этом наименьшая экспрессия отмечалась у больных с низкодифференцированными РМЖ. После неoadъювантной химиотерапии в 80% случаев наблюдается снижение уровня экспрессии гена CCR5 в лимфоцитах периферической крови. Уровень экспрессии колебался от 0 до 108%, и средний показатель составил  $46,93 \pm 6,91\%$ . При этом при использовании, схемы FAC уровень экспрессии CCR5 снижался в 100% случаев, а схемы CMF - только в 60% случаев, т.е. применение адриабластина в схеме НАХТ приводит к более существенному ингибированию экспрессии гена CCR5 в лимфоцитах периферической крови больных РМЖ. После операции в 60% уровень экспрессии CCR5 повышается и составляет  $62,17 \pm 23,16\%$ . Повышение экспрессии гена CCR5 обуславливает миграцию лимфоцитов в операционный очаг, где они выполняют свои иммунологические функции, обеспечивая стерилизацию операционного поля и восстановительную регенерацию тканей. Снижение экспрессии CCR5 в 40% случаев, по-видимому, является маркером иммунодепрессии, развивающейся на фоне оперативного вмешательства.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований для определения влияния противоопухолевого лечения на экспрессию CCR5 лимфоцитов и связи экспрессии с клинико-морфологическими особенностями опухолевого процесса для оценки его информативности в прогнозе течения заболевания.

## ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА р53

**Маркова Е.В., Савченко А.А., Лапешин П.В., Дыхно Ю.А., Ушакова Н.В.**

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

Особую роль в канцерогенезе играют дефекты генов, контролирующих повреждения ДНК и клеточную пролиферацию. Получены многочисленные данные, указывающие на то, что продукт гена р53 является ключевым для биохимических событий, контролирующих стабильность генома. Согласно многочисленным литературным данным мутации гена р53 способствуют формированию терапевтически резистентных форм опухолей, поскольку они препятствуют индуцированной гибели клеток путем апоптоза. Целью исследования явилось изучение особенностей иммунного статуса у больных раком легкого в зависимости от полиморфизма гена р53.

На базе торакального отделения Красноярского краевого онкологического диспансера обследовано 90 пациентов в возрасте 30 – 55 лет, страдающих раком легкого. Всем пациентам выполнены расширенные лоб-, билоб- и пульмонэктомии. Кровь для исследования забирали при поступлении больных в стационар. В качестве контроля обследовано 106 здоровых мужчин аналогичного возраста. Фенотипический состав лимфоцитов крови и лимфоузлов оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. 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. Оценку полиморфизма гена р53 осуществляли с помощью ПЦР/ПДРФ-анализа.

Установлено, что у больных с гомозиготой по нормальному аллелю гена р53 выявляется выраженное снижение содержания Т-лимфоцитов в крови, прежде всего за счет CD4<sup>+</sup>-клеток. Повышение содержания В-лимфоцитов в крови определяется клетками со сниженной функциональной активностью, что определяется низкими уровнями относительного синтеза основных классов иммуноглобулинов. Состояние гуморального иммунитета у больных мужчин с гомозиготой по нормальному аллелю характеризуется повышением концентрации Ig A и снижением уровня ЦИК в сыворотке крови. Состояние иммунного статуса у больных с гетерозиготным состоянием гена р53 характеризуется повышением относительно уровней больных с гомозиготой по нормальному аллелю содержания лимфоцитов и Т-лимфоцитов. Причем, повышенный уровень последних преимущественно связан с высоким содержанием цитотоксических Т-лимфоцитов, что, соответственно, приводит к понижению величины иммунологического индекса. Только у данной группы обследованных повышение содержания HLA-DR<sup>+</sup>-клеток связано с увеличением уровня активированных Т-лимфоцитов. Так же, как и при нормальной гомозиготе при гетерозиготном состоянии, повышается количество В-лимфоцитов с низкой функциональной активностью и НК-клеток. Состоянием гуморального иммунитета также близко к выявленному у больных с гомозиготой по нормальному

аллелю за исключением относительного повышения концентрации ЦИК. При исследовании фенотипического состава лимфоузлов корня легкого обнаружено снижение процентного количества CD4<sup>+</sup>-клеток с понижением величины иммунорегуляторного индекса, но при повышении содержания HLA-DR<sup>+</sup>-клеток. Однако отрицательные взаимосвязи между размером опухоли и содержанием Т-лимфоцитов и индексом активации Т-лимфоцитов в региональных лимфоузлах отражает выраженную функциональную недостаточность системы иммунитета, что может повышать вероятность метастазирования. При гомозиготе по мутантному аллелю гена p53 состояние клеточного звена иммунной системы у больных раком легкого характеризуется максимальным уровнем В-лимфоцитов и относительным снижением содержания цитотоксических Т-лимфоцитов. Характерной особенностью иммунного статуса больных данной группы является наиболее низкий уровень величины индекса активации Т-лимфоцитов и максимально высокий уровень концентрации ЦИК. Только у больных с гомозиготой по мутантному аллелю выявляются взаимосвязи между размером опухоли и показателями иммунного статуса, характеризующие компенсаторную реакцию, связанную с НК-клетками, развивающуюся пропорционально росту опухоли. Снижение содержания Т-лимфоцитов за счет регуляторных фракций в лимфоузлах корня легкого при гомозиготе по мутантному аллелю гена p53 отражает пониженный уровень иммунореактивности при раке, что особенно может быть важным при метастазировании в лимфоузлы. При этом, повышение содержания В-лимфоцитов в региональных лимфоузлах также осложняет развитие полноценного иммунитета по отношению к опухолевым клеткам. Повышение содержания НК-клеток в лимфоузлах у больных данной группы, тем не менее, можно охарактеризовать как защитную реакцию на развитие опухоли.

### ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ОПУХОЛЯХ ВЕРХНЕЙ ЧЕЛЮСТИ И ПОЛОСТИ НОСА

**Миркамалова Л.И., Хасанов А.Н., Наврузов С.Н.**

*Республиканский центр экстренной медицинской помощи, Республиканский онкологический научный центр МЗ РУз, Ташкент, Узбекистан*

**Целью работы** явился поиск информативных показателей, характеризующих состояние иммунитета в динамике проводимой комплексной (химио-, лучевой) терапии онкологических больных.

**Материал и методы.** Исследование функционального состояния Т-клеточного иммунитета с помощью реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) по капиллярам в микромодификации ИИ АН Р Уз (2000) у 30 больных с местнораспространенными опухолями верхней челюсти и полости носа (ОЧН) в динамике проводимой комплексной химио- и лучевой терапии. Для постановки использовали 1,0 мл гепаринизированной крови (10 Ед/мл) с изучением следующих показателей: 1) функциональной активности Т-клеточного иммунитета по КонА-индуцированной продукции цитокина - фактора угнетающего миграцию лейкоцитов крови (ФУМ-Л) и фактора стимулирующего миграцию (ФСМ-Л) при дозах КонА оптимальной (10 мкг/мл) и субоптимальной (2,5 мкг/мл); 2) активности спонтанных цитокинов (сФУМ и сФСМ) в сыворотке; 3) сенсибилизации лимфоцитов *in vitro* к туберку-

лину (Т), тканевому антигену из селезенки (АгС) и общему опухолевому (АгОп) из высоко- и низкодифференцированной аденокарциномы (содержание белка 50 мкг/мл) с определением индексов миграции и угнетения миграции (ИМ и ИУМ).

**Результаты.** У больных с ОЧН наблюдался выраженный дисбаланс спонтанных цитокинов сыворотки с активностью с ФУМ в 80% случаях (при ИУМ от 27 до 50% против  $\pm 15\%$  в норме). КонА-индуцированная продукция ФУМ-Л регистрировалась в 46,7% случаях и была сниженной, в то время как продукция ФСМ-Л не определялась в 73,3% случаях, нарушалось соотношение ФУМ/ФСМ, свидетельствующее об изменении функционирования Т-клеточной системы. Реакция на туберкулин была отрицательной в 46,7% случаях, что наблюдается при пониженной иммунологической реактивности организма. Сенсибилизация к АгС выявлена в 73% случаях, к АгОп – в 26,6%. Проведение первого и последующих курсов полихимиотерапии способствовали углублению иммунодефицита и подавлению реактивности организма больных, что определялось в снижении реакции лимфоцитов на КонА, туберкулин и нарушении баланса сФУМ и сФСМ в сыворотке. Такое функциональное состояние Т-клеточного иммунитета показывало необходимость подключения иммунотерапии сопровождения.

**Заключение.** Показатели РТМЛ при своей доступности в выполнении характеризуют функциональные изменения Т-клеточного иммунитета. Они дополняют информативность количественных параметров иммунного статуса, а в динамике наблюдения (в процессе радикальной, комплексной терапии) могут служить самостоятельно в клинике онкологических заболеваний.

### КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ЖЕНЩИН С МИОМОЙ МАТКИ

**Мусаходжаева Д.А., Исанбаева Л.М.<sup>1</sup>, Миркамалова Л.И.**

*Институт иммунологии АН РУз;*

*<sup>1</sup>Институт усовершенствования врачей МЗ РУз, Ташкент, Узбекистан*

Наличие миомы матки у женщин репродуктивного возраста обуславливает многообразный комплекс расстройств. В настоящее время имеются достаточно четкие представления о роли иммунных механизмов организма в сложном комплексе реакции, направленных на торможение и подавление опухолевого роста. Было проведено исследование иммунного статуса у 78 женщин с миомой матки (ММ). Иммунологические исследования проводились с оценкой количественных и функциональных показателей. Было установлено, что у женщин с ММ снижен ФАН и повышен уровень CD16<sup>+</sup>-клеток; снижен процент CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов и повышен - CD20<sup>+</sup>-клеток, а также нарушено соотношение CD4/CD8 с понижением ИРИ, свидетельствующим о нарушениях иммунной системы на уровне регуляторных процессов. Изменение количественных показателей совпадает со снижением функционального состояния Т-клеточного иммунитета. Оно было изучено с помощью реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) на Т-клеточный митоген конконавалин А (КонА) по индуцированной продукции цитокинов, влияющих на миграцию лейкоцитов крови. Один из них фак-

торов угнетающий миграцию лейкоцитов – ФУМ-Л, продуцируемый активированными лимфоцитами при индукции специфическими антигенами или Т-клеточными митогенами, определяется в реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ). Контроль за выработкой ФУМ-Л при индукции КонА или ФГА позволяет определить функциональное состояние клеток-продуцентов (Т-лимфоцитов), а с определением его альтернативного фактора стимулирующего миграцию лейкоцитов (ФСМ-Л) – о состоянии супрессорного звена иммунитета. У женщин с миомой матки было выявлено нарушение баланса сывороточных сФУМ и сФСМ с возрастанием в сыворотке крови активности спонтанных сФУМ и сФСМ (в 36 и 36% случаев соответственно).

Несмотря на количественный и функциональный Т-клеточный дефицит, возрастание функционального ИРИ (ФУМ/ФСМ) до 2,86 против 1,91 в контроле, свидетельствует о напряженном состоянии иммунитета. Средний индекс угнетения миграции (ИУМ) достигал +48, +42 и +31% соответственно, что резко отличало группу женщин с ММ от контрольной.

### ПРИМЕНЕНИЕ ФУКОИДАНА ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ 3-4 СТАДИИ

Незговорев Д.В.

*Институт физиологии природных адаптаций УрО РАН, Архангельск, Россия*

**Введение.** Получен эффект применения сульфатированного полисахарида ламинарии-фукоидана в комплексном лечении злокачественных новообразований.

**Цель.** Изучить влияние препарата водородородного происхождения на состояние иммунной системы человека при онкопатологии.

**Задачи.** Выявить влияние препарата на активность фагоцитоза, содержание фенотипов лимфоцитов и цитокинов.

**Материалы и методы.** В составе обследованных лиц 78 больных, страдающих раком желудка, в возрасте от 45 до 60 лет; больным была проведена радикальная операция и назначена химиотерапия. Больные принимали фукоидан в дозе 10 мг/кг массы в течение 4 недель в перерывах химиотерапии. Фенотипирование лимфоцитов проводили моноклональными антителами в непрямой иммунопероксидазной реакции, содержание цитокинов определяли ИФА методом

**Результаты.** Содержание активных нейтрофильных лимфоцитов у больных онкопатологией регистрируется в пределах  $44,83 \pm 6,57\%$ , а фагоцитарное число  $1,95 \pm 0,61$ , после курса приема препарата % активных нейтрофилов увеличивается до  $67,03 \pm 7,86\%$ , у  $87,61\%$ , а фагоцитарное число возрастает до  $4,66 \pm 0,53$  и  $78,24\%$  обследованных. Экспрессия  $CD5^+$  составляет  $1,02 \pm 0,09 \times 10^9$  кл/л,  $CD3^+$  -  $0,96 \pm 0,14 \times 10^9$  кл/л. После курса приема происходит увеличение концентрации Т-лимфоцитов до  $1,20 \pm 0,08$  и  $1,21 \pm 0,12 \times 10^9$  кл/л у  $51,06\%$  и  $49,34\%$  случаев. Содержание  $CD16^+$  составляет  $0,48 \pm 0,09 \times 10^9$  кл/л, после курса приема фукоидана происходит увеличение до  $0,77 \pm 0,11 \times 10^9$  кл/л ( $p < 0,05$ ), у  $62,36\%$  обследованных. Увеличение содержания  $CD25^+$  выявляется у  $56,23\%$ ,  $CD71^+$  у  $79,67\%$  и  $HLA-DR^+$  у  $54,89\%$ . Концентрация  $CD4^+$  не претерпевает каких-либо значительных изменений в результате приема фукоидана. Концентрация  $CD8^+$  увеличивается с  $0,33 \pm 0,12 \times 10^9$  кл/л до  $0,56 \pm 0,11 \times 10^9$  кл/л ( $p < 0,05$ ),

у  $61,37\%$  обследуемых. С этих позиций было интересно проверить изменения, происходящие с различными цитокинами. Так, концентрация IL-1 при злокачественных новообразованиях находится в пределах физиологической нормы и характеризуется соотношением его форм IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$ . Концентрация IL-1 $\alpha$  почти в 2 раза выше концентрации IL-1 $\beta$ , что не характерно для физиологической нормы (соответственно  $0,46 \pm 0,03$  и  $0,26 \pm 0,08$  пг/мл). Применение фукоидана увеличивает уровень содержания IL-1 $\alpha$  в у  $51,26\%$ , а IL-1 $\beta$  увеличивается у  $53,56\%$ . Содержание IL-2 снижалось с  $0,57 \pm 0,09$  нг/мл до  $0,45 \pm 0,07$  нг/мл у  $43,57\%$  обследованных. Снижение концентрации РЭА происходило с  $11,56 \pm 0,24$  до  $6,26 \pm 0,14$  нг/мл ( $p < 0,01$ ) у  $82,57\%$ , а TNF $\alpha$  с  $0,88 \pm 0,11$  до  $0,63 \pm 0,06$  нг/мл;  $p < 0,05$  у  $59,27\%$  обследованных. Содержание IFN $\gamma$  повышается с  $1,34 \pm 0,34$  до  $2,92 \pm 0,23$  пг/мл ( $p < 0,01$ ) у  $86,55\%$  больных.

**Заключение.** Иммуностимулирующая активность фукоидана в дозе 10 мг/кг проявляется в повышении активности и интенсивности фагоцитоза и активацией Т-клеточных рецепторов лимфоцитов  $CD3^+$ ,  $CD5^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD16^+$ ,  $CD25^+$ ,  $CD71^+$ ,  $HLA-DR^+$  и цитокинов IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ . Выявляется снижение концентрации РЭА, TNF $\alpha$  и IL-2.

### ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛИМФОЦИТОВ КОСТНОГО МОЗГА И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ В-КЛЕТОЧНЫМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ЛИМФОМАМИ

Неприна Г.С., Кузьмина Е.Г., Павлов В.В., Шахтарина С.В., Двинских Н.Ю., Рогова Н.М., Константинова Т.В., Курасова В.Г., Сироткина Н.П.

*ГУ Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск, Россия*

**Цель работы** - характеристика иммунофенотипа опухолевых В-лимфоцитов, определение их количества в костном мозге и периферической крови для выявления поражения костного мозга и лейкемизации у больных В-клеточными злокачественными лимфомами (В-ЗЛ).

**Методы.** Обследовано 190 больных В-ЗЛ, из них 82 больных хроническим лимфолейкозом/ мелкоклеточной лимфомой (ХЛЛ/МЛ), 77 – диффузной В-крупноклеточной (ДКЛ), 24 – фолликулярной лимфомой (ФЛ), 7 – лимфомой зоны мантии (ЛЗМ). Идентификация В-ЗЛ проведена с применением иммуногистохимического исследования. Объекты исследования - периферическая кровь (ПК) и аспират костного мозга (КМ). Иммунофенотипирование (ИФТ) проведено методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к мембранным маркерам лимфоцитов (метка FITC и PE):  $CD19^+/\kappa^+$ ,  $CD19^+/\lambda^+$ ,  $CD20$ ,  $CD22$ ,  $CD23$ ,  $CD5$ ,  $CD3$ ,  $CD4$ ,  $CD8$ ,  $CD7$ ,  $HLA-DR$ ,  $CD43$ ,  $CD10$ ,  $CD38$ . Изучали иммунофенотип опухолевых В-лимфоцитов, их относительное и абсолютное количество в КМ и ПК.

**Результаты.** Частота поражения КМ, по данным ИФТ, у больных МЛ, ЛЗМ и ФЛ соответствовала 60, 95 и 40%, частота выявления опухолевых клеток в ПК в данных группах составила 58, 85 и 21%. Частота поражения КМ и лейкемизация у больных ДКЛ незначительны – около 4%. Для дальнейшего анализа взяты иммунофенотипические показатели больных В-ЗЛ, у которых по результатам ИФТ было выявлено поражение КМ и лейкемизация. Процент опухолевых клеток в КМ иммунофенотипа  $CD19$ ,  $CD20$ ,  $CD22$  был равен у больных ХЛЛ –

74-79%, МЛ – 52-57%, ЛЗМ - 67-70%, ФЛ - 27-36% (при одинаковом количестве миелокариоцитов в образцах КМ у данных групп), в ПК – данный показатель был 75-80, 34-39, 63-65 и 32-34%. Таким образом, наибольший процент клоновых лимфоцитов выявлен у больных ХЛЛ, средний уровень при ЛЗМ и МЛ, наименьший процент у больных ФЛ. Распределение абсолютного количества опухолевых В-лимфоцитов несет аналогичный характер. Отношение процента опухолевых клеток иммунофенотипа CD19, CD20, CD22 в КМ к их проценту в ПК (индекс КМ:ПК) различно при данных видах В-ЗЛ. При ХЛЛ оно соответствует 0,98; 0,98; 0,99 и означает примерно равный процент опухолевых клеток в КМ и ПК, аналогичная картина отмечена у больных с лейкомизацией ФЛ (1,10; 1,04; 0,80) и ЛЗМ (1,01; 1,06; 1,07).

При МЛ соотношение количества опухолевых клеток КМ: ПК достоверно выше и составляет 1,45; 1,54; 1,56. Таким образом, при МЛ процент aberrантных В-клеток в КМ выше, чем в ПК, что может служить дополнительным признаком данной лимфомы и ее отличием от ХЛЛ при одинаковом иммунофенотипе aberrантных лимфоцитов. При определении иммунофенотипа опухолевых В-лимфоцитов у больных В-ЗЛ важное значение имеет экспрессия маркеров CD5 и CD23 (иммунофенотип ХЛЛ/МЛ - CD5<sup>+</sup> CD23<sup>+</sup>, ЛЗМ - CD5<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>, ФЛ - CD5<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>), а также коэкспрессия маркеров CD5<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>: при ХЛЛ этот показатель для КМ и ПК равен 59-59%, при МЛ-36-27%, ЛЗМ- 54-55%, у больных ФЛ – 7-8% (норма до 10%). При относительно невысоком проценте CD5 положительных лимфоцитов показательно соотношение клеток CD5<sup>+</sup>:CD3<sup>+</sup>. У больных ФЛ (CD5 отрицательной) данное соотношение равно 1,0- 1,2, в то время как у больных CD5 положительными В-ЗЛ оно больше 1,5: при ХЛЛ 7,3-5,5, МЛ – 2,1-1,5, ЛЗМ – 3,8-2,5. Aberrантные клетки различных вариантов В-ЗЛ различаются по признаку моноклональности, она установлена у 80% больных ХЛЛ и 57% больных МЛ, а также по коэкспрессии маркеров CD43<sup>+</sup> CD22<sup>+</sup>: у больных ХЛЛ/МЛ коэкспрессия положительная - 30-60%, у больных ФЛ отрицательная - 7%.

Таким образом, поражение КМ и лейкомизация наиболее часто выявлены у больных МЛ и ЛЗМ, в меньшем проценте случаев при ФЛ, редко при ДКЛ. Процент опухолевых лимфоцитов высокий при ХЛЛ, средний при ЛЛ и ЛЗМ, низкий уровень при ФЛ. Важными показателями для характеристики aberrантных В-лимфоцитов являются моноклональность L-цепей Ig, коэкспрессия маркеров CD5<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> и CD22<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>. Сопоставление результатов параллельного ИФТ КМ и ПК повышает их информативность для оценки распространенности В-ЗЛ, предложены показатели: соотношение количества В-лимфоцитов CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup> в КМ к их уровням в ПК, что позволяет получить дополнительные признаки для отличия МЛ с поражением КМ и лейкомизацией от ХЛЛ.

#### ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТКАНЕВЫХ МАРКЕРОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Нишанов Д.А., Гильдиева М.С., Махмудова Н.Э., Умарова А.А.

Республиканский онкологический научный центр  
МЗ РУз, Ташкент

Достижения фундаментальной биологии сделали возможным изучение различных молекулярно-биологичес-

ких и биохимических маркеров при злокачественных опухолях, в том числе и при РМЖ.

В настоящее время иммуногистохимический метод находит широкое применение во всем мире. Данный метод окрашивания гистологического материала позволяет получить уникальный материал для оценки биологического потенциала опухолевых клеток: темп роста, прогноз течения, реакция на гормональное лечение и специфическую иммунотерапию.

Доказано, что возраст пациенток, размеры первичной опухоли, степень злокачественности опухоли и уровень гормональных рецепторов влияют на выживаемость больных РМЖ, в то же время только гормональный статус может быть использован для выбора тактики лечения. Одним из первых вошедших в практику больных РМЖ показателей, относящихся к категории клеточных маркеров, были рецепторы стероидных гормонов. Как известно, это белки специфически и избирательно связывающие соответствующие стероиды после их проникновения в клетку и опосредующие таким образом их биологические эффекты.

**Цель.** Выявить в клетках опухоли молочной железы стероидные рецепторы к эстрогену и прогестерону иммуногистохимическим методом.

**Материал и методы.** Нами проведено обследование больных в амбулаторных условиях, обратившихся в консультативную поликлинику РОНЦ. Обследованы 17 женщин РМЖ. Средний возраст женщин составил 48±3,2 лет. В исследовании использовали моноклональные антитела к эстрогену и прогестерону фирмы «Дако» 2005 г.

**Результаты.** Известно, что гормонозависимые опухоли молочной железы, содержащие оба или хотя бы один из рецепторов стероидных гормонов, имеют более благоприятное течение, и послеоперационный прогноз у больных с такими опухолями, независимо от проводимого адъювантного лечения, лучше, чем у больных с рецепторотрицательными опухолями. Нами выявлено, что у 7-и женщин РМЖ наблюдался положительный результат по эстрогену, а у 10-и – отрицательный.

Из числа обследованных на прогестерон результат был положительным у 8-и больных РМЖ, а у 9-х – отрицательным.

Таким образом, наиболее важной в практическом отношении областью использования результатов определения рецепторов стероидных гормонов является отбор больных, чувствительных к эндокринной терапии.

#### ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ЛОКАЛИЗАЦИЯМИ ОПУХОЛИ

Олейник Е.К.<sup>1</sup>, Олейник В.М.<sup>1</sup>, Назаров П.Г.<sup>2</sup>,  
Моисеенко В.М.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии Карельского научного центра  
РАН, Петрозаводск, Россия;

<sup>2</sup>Институт экспериментальной медицины РАМН,  
Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup>НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова МЗ РФ,  
Санкт-Петербург, Россия

Существует представление о том, что опухоль индуцирует иммуносупрессию, которая может проявляться в широком диапазоне: от слабого иммунного ответа до полной анергии. Именно иммуносупрессией объясняют неэф-

фективность противоопухолевой терапии, направленной на стимуляцию иммунных механизмов у больных с растущими опухолями. Однако закономерности формирования иммунологической недостаточности, причины и механизмы, приводящие к снижению реактивности иммунной системы, до сих пор четко не определены.

**Цель** исследования заключалась в выяснении закономерностей функционального и фенотипического сдвига в субпопуляциях лимфоцитов периферической крови у больных с различными онкологическими заболеваниями. В связи с этим в сравнительном аспекте были изучены особенности пролиферативного ответа Т- и В-лимфоцитов крови при стимуляции поликлональными митогенами (ФГА, КонА, МЛ), а также уровень экспрессии ряда активационных маркеров лимфоцитов у больных с разными онкологическими заболеваниями.

**Материалы и методы.** В исследование включены данные по 264 пациентам: рак легкого (116), рак молочной железы (64), рак желудка (48), колоректальный рак (36). Периферическая кровь для обследования была получена до проведения хирургического лечения. В работе был использован метод оценки пролиферативной активности лимфоцитов в реакции бласттрансформации, индуцированной Т- и В-клеточными митогенами по включению <sup>3</sup>H-тимидина. Исследованы разные дозы ФГА, КонА, МЛ: 1, 5, 10, 20, 40, 100 мкг/мл. Фенотипы лимфоцитов определяли методом непрямой иммунофлуоресценции с набором моноклональных антител, конъюгированных с ФИТЦ.

**Результаты.** Получены данные о системных функциональных и фенотипических сдвигах в лимфоцитах крови онкологических больных. Происходит значительное снижение пролиферативной активности CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-, CD19<sup>+</sup>-лимфоцитов крови при стимуляции митогенами. Одновременно с этим фенотипы лимфоцитов при опухолевом росте характеризуются усилением экспрессии активационных маркеров CD25, CD71, CD95, HLA-DR. При этом у пациентов с разными онкологическими заболеваниями популяции лимфоидных клеток крови отличаются как по набору фенотипических маркеров активации, так и по степени снижения пролиферативного потенциала при стимуляции митогенами. У больных раком легкого значительно снижен пролиферативный ответ лимфоцитов при стимуляции КонА и МЛ, у больных раком желудка – при стимуляции ФГА, а у больных раком молочной железы – при стимуляции МЛ. Была изучена зависимость пролиферативной активности лимфоцитов крови больных раком легкого от стадии заболевания. По мере прогрессирования опухоли происходит углубление функциональной недостаточности лимфоцитов: наименьшая величина суммарного индекса стимуляции отмечается у больных с III-IV стадией (p<0,001).

Анализ показал, что общей закономерностью, характеризующей фенотипические изменения лимфоцитов крови у онкологических больных, является рост числа клеток, экспрессирующих α-цепь рецептора IL-2 (CD25). Самый значительный рост количества CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов (в два и более раза) отмечается у больных раком легкого (p<0,001).

Полученные **результаты** позволяют нам заключить, что разные онкологические заболевания характеризуются различной степенью иммуносупрессии. Главную роль в индукции иммуносупрессии у больных с опухолями могут играть Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клетки, которые при активации синтезируют цитокины-ингибиторы IL-4, IL-10, TGF-, а эти цитокины способны подавлять пролиферацию ауто-

логичных лимфоцитов, о чем свидетельствуют полученные нами результаты. От уровня активации CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg клеток будет зависеть, видимо, степень индуцированной иммуносупрессии. По нашим данным, наиболее значительные функциональные и фенотипические сдвиги характеризуют больных раком легкого и, следовательно, состояние иммунной супрессии наиболее выражено в этой группе больных.

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ И МАСТЭКТОМИИ

Селихова Ю.Б., Останина И.Б.<sup>1</sup>, Черных Е.Р., Останин А.А., Кожевников В.С., Козлов В.А.

ГУ НИИ клинической иммунологии СОРАМН, Новосибирск, Россия;

<sup>1</sup>МУЗ ГКБ №1, Новосибирск, Россия

**Введение.** В большинстве случаев при раке молочной железы (РМЖ) проводится комплексное лечение, которое, к сожалению, приводит к дополнительным нарушениям функций исходно компрометированной иммунной системы. Нарастающая в результате противоопухолевой терапии иммунодепрессия может способствовать развитию инфекционных осложнений и повышать риск рецидива и метастазирования опухоли за счет ослабления функции иммунного надзора. В поиске новых возможностей положительно повлиять на переносимость и эффективность лечения РМЖ представляет интерес оценка иммунного статуса пациентов на разных этапах противоопухолевой терапии.

**Цель работы** – охарактеризовать иммунный статус больных РМЖ после проведения лучевой терапии и хирургического лечения перед началом химиотерапии.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 50 больных РМЖ 2 и 3 стадий (T2-4N0-3M0). Возраст пациентов – от 32 до 68 лет, средний возраст – 52±8,2 года. Обследование было проведено однократно через 15-20 дней после мастэктомии, выполненной после курса лучевой терапии. У всех пациентов проводилась оценка клеточного состава периферической крови и иммунного статуса, у 13 пациентов также – оценка продукции 9 цитокинов. Группу контроля составили 40 практически здоровых доноров аналогичного возраста, в том числе 13 из них – доноры по продукции цитокинов. Общий анализ периферической крови выполнялся на гемоанализаторе. Определение субпопуляционного состава лимфоцитов проводилось методом проточной цитофлуориметрии с помощью моноклональных антител. Определение показателей эффекторных функций лимфоцитов производилось в тесте гиперчувствительности замедленного типа после стимуляции фитогемагглютинином-Р. Функциональную активность фагоцитарных клеток оценивали по показателю активности нейтрофилов (ПАН) и моноцитов (ПАМ), определяемому по продукции перекиси водорода клетками после стимуляции зимозаном. Также активность гранулоцитов и моноцитов оценивалась методом проточной цитометрии после инкубации выделенных клеток с латексом. Содержание в супернатантах цельной крови 9 цитокинов (IL-1β, IL-5, IL-7, IL-12, IL-13, IL-17, CSF, MCP-1, MIP-1β) оценивали методом проточной флуориметрии на двухлучевом лазерном анализаторе.

**Основные результаты.** В группе пациентов относительно группы здоровых доноров было выявлено досто-

верное снижение абсолютного количества лимфоцитов, эритроцитов и гемоглобина периферической крови. С высокой частотой (84%) наблюдались иммунологические нарушения, в основном комбинированные, с поражением нескольких звеньев иммунитета. В большинстве случаев регистрировалась депрессия Т-клеточного иммунитета (64%) и функции моноцитов-макрофагов (69%), реже – депрессия В-клеточного иммунитета (33%) и функции нейтрофилов (31%). В 36% случаев наблюдалось повышение количества НК-клеток (CD16<sup>+</sup>), вероятно, как компенсаторная реакция на уменьшение количества Т-лимфоцитов. Достоверными были следующие изменения: снижение относительного содержания Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), в том числе Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>), повышение относительного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>) и, соответственно, снижение иммунорегуляторного индекса; снижение относительного содержания В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>), фагоцитарной функции гранулоцитов и моноцитов, ПАМ, повышение ПАН. Были выявлены статистически значимые изменения продукции цитокинов относительно уровня здоровых доноров: повышение спонтанной продукции IL-5 (в 1,6 раз), IL-7 (в 6 раз), GCSF (в 1,7 раз), MCP-1 (в 17 раз), MIP-1β (в 90 раз), повышение индуцированной бактериальным липополисахаридом продукции IL-1β (в 17 раз), IL-7 (в 8 раз), IL-17 (в 2 раза), MCP-1 (в 5 раз), MIP-1β (в 64 раза), снижение спонтанной и стимулированной продукции IL-13 (в 5 и 2 раза соответственно).

**Заключение.** Выявленные изменения характеризуют иммуносупрессию, обусловленную самим опухолевым ростом и предшествующими лечебными воздействиями, напряженность работы иммунитета в условиях послеоперационного воспалительного процесса, а также регенераторный потенциал иммунопоэза. Полученные результаты могут послужить основанием для разработки методик промежуточной иммунореабилитации больных РМЖ.

### **ВЛИЯНИЕ ГЕРЦЕПТИНА НА КОЛИЧЕСТВО РЕГУЛЯТОРНЫХ CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

**Славина Е.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н., Ганьшина И.П., Кадагидзе З.Г., Личиницер М.Р.**

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

В 1995 г. Sakagushi S с соавторами в опытах на грызунах впервые показали, что супрессия, осуществляемая CD4<sup>+</sup> Т-клетками, является функцией небольшой субпопуляции CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клеток, получивших название «естественные регуляторные Т-клетки» (Трег). Позднее подобная регуляторная популяция CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Трег была обнаружена и у человека. Многочисленные исследования показывают, что эти клетки играют решающую роль в поддержании иммунного гомеостаза и защите организма от аутоиммунных болезней. Трег способны также эффективно подавлять противоопухолевый иммунитет. Повышенное содержание Трег было выявлено у больных с опухолями легких, желудка, пищевода, поджелудочной железы и молочной железы, с гепатоцеллюлярной карциномой, раком яичника и др.

**Целью** настоящего исследования было изучение изменений популяционного состава лимфоцитов у больных раком молочной железы при лечении Герцептином и, главным образом, исследование влияния этой терапии на пропорцию CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клеток. В исследование были вклю-

чены 19 больных раком молочной железы (I – IIIa стадии) с гиперэкспрессией HER-2/neu. Всем больным на первом этапе было проведено оперативное лечение (радикальная мастэктомия с сохранением грудных мышц, радикальная резекция), адъювантная химиотерапия антрациклинсодержащими режимами, по показаниям лучевая терапия. По показаниям после завершения адъювантной химиотерапии назначалась гормонотерапия. После завершения стандартной адъювантной терапии больные были рандомизированы в группу получения Герцептина (11 больных) или группу наблюдения (8 больных). Препарат вводили внутривенной инфузией в течение 90 минут в дозе 8 мг/кг – нагрузочная доза, далее 6 мг/кг, каждые 3 недели, в течение 1 или 2 лет. Средний возраст больных составил 52 года. Менструальный цикл был сохранен у 8 женщин. Определение иммунологического статуса у всех больных осуществлялся непосредственно после рандомизации (для лечебной группы – перед первой инфузией Герцептина), далее каждые 2 месяца. Популяционный состав лимфоцитов периферической крови больных определяли с помощью набора моноклональных антител к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) с использованием коммерческого пакета программ сбора и анализа данных CellQuest. Пропорцию CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток определяли с использованием двойной флюоресцентной метки прямой иммунофлуоресценцией с PE-мечеными анти-CD4 моноклональными антителами (красное окрашивание), и FITC-мечеными анти-CD25 антителами (зеленое окрашивание). Активность НК-клеток изучали в цитотоксическом МТТ - тесте против линии клеток эритролейкемии K-562. Концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке крови определяли по методу Манчини. Статистическую обработку проводили по Student's *t*-критерию при помощи компьютерной программы SigmaPlot for Windows (Jandel Corporation, USA). Проведенное исследование показало, что у больных группы наблюдения на протяжении всего периода исследования относительное количество клеток различных популяций Т-лимфоцитов, а также количество В-лимфоцитов (CD20<sup>+</sup>) и НК-клеток (CD16<sup>+</sup>) практически не изменялось. Отмечалось лишь, начиная со 2-го месяца наблюдения, статистически значимое увеличение количества лимфоцитов, экспрессирующих маркер апоптоза (CD95<sup>+</sup>) и маркер наивных Т-клеток (CD45RA<sup>+</sup>). Однако эти изменения находились в пределах нормы, а также наблюдались и у леченых больных. Проводимое лечение не влияло на активность НК-клеток и концентрацию сывороточных иммуноглобулинов G, А и М. В то же время количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клеток у всех леченых больных уже при втором тестировании (перед 2-м курсом Герцептина) оказалось в среднем в 5,4 раза меньше, чем до начала лечения. Это уменьшение было статистически значимым, и общая тенденция к уменьшению количества этих клеток сохранялась в течение всего периода исследования. У больных группы наблюдения количество этих клеток также уменьшилось, однако оно было значительно менее выражено (в среднем в 2,2 раза при 3-м тестировании после 4 месяцев наблюдения), отмечалось лишь у 4 из 8 больных, и не было статистически значимым. У леченых больных отмечено также статистически значимое снижение числа Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>-клеток). Таким образом, применение Герцептина у больных раком молочной железы приводит к уменьшению доли CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клеток среди Т-лимфоцитов периферической крови.

## ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА И АКТИВНОСТИ НАД(Ф)-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА

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

ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, Красноярск, Россия

Частота острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) в различных странах достигает 2-3 на 100000 человек в год. У взрослых эта форма острого лейкоза встречается у 10-15% больных. Несмотря на то, что полная ремиссия достигается у 75-80% взрослых больных ОЛЛ, из них переживают 5-летний рубеж менее 30%. Течение ОЛЛ у взрослых более тяжелое и злокачественное. Многочисленные исследования посвящены изучению клинических и лечебных аспектов ведения этих больных. Однако остаются малоизученными многие иммунопатогенетические аспекты данного заболевания.

**Целью** исследования явилось изучение состояния иммунного статуса и активности метаболических ферментов в лимфоцитах крови у больных на разных стадиях ОЛЛ.

В исследование были включены 71 больной ОЛЛ в возрасте 35-65 лет, поступивший в гематологическое отделение Краевой клинической больницы № 1 г. Красноярск. У всех больных ОЛЛ диагностировался пре-пре-В иммуноподвариант (common). В качестве контроля обследовано 106 здоровых лиц аналогичного возраста. Фенотипический состав лимфоцитов крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. Концентрацию иммуноглобулинов класса А, М и G в сыворотке определяли иммуноферментным методом. Функциональное состояние В-лимфоцитов оценивали уровнем относительного синтеза IgA (IgA/CD72<sup>+</sup>), IgM (IgM/CD72<sup>+</sup>) и IgG (IgG/CD72<sup>+</sup>). Оценка клеточного и гуморального иммунитета проводилась при поступлении больных до начала патогенетического лечения. Определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови проводили биOLUMИнесцентным методом.

При первичной атаке ОЛЛ повышается процентное и абсолютное содержание лимфоцитов в периферической крови, но при снижении относительного количества CD3<sup>+</sup>-клеток. При этом, понижение количества CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов определяется снижением процентного содержания CD4<sup>+</sup>-клеток. Кроме того, у больных на стадии первичной атаки ОЛЛ выявляется повышение абсолютного количества CD8<sup>+</sup>- и CD72<sup>+</sup>-лимфоцитов, снижение абсолютного уровня CD16<sup>+</sup>- и понижение относительного и абсолютного содержания HLA-DR<sup>+</sup>-клеток. Также обнаружено повышение величины индекса активации Т-лимфоцитов и снижен уровень иммунорегуляторного индекса. На стадии ремиссии выявляется снижение большинства исследуемых показателей клеточного звена иммунной системы относительно контрольных величин. При рецидиве ОЛЛ выявляется выраженное повышение величин исследуемых показателей клеточного иммунитета относительно уровней, выявленных у больных на стадии ремиссии. Однако относительно контрольного уровня большинство показателей нормализуется. При первичной атаке ОЛЛ в лимфоцитах снижаются уровни активности всех исследуемых НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ. На стадии ремиссии повышаются уровни активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы, тогда как активность ГЗФДГ восстанавливается до контрольного уровня. При рецидиве ОЛЛ до конт-

рольного уровня повышается активность лактатдегидрогеназы и остаются сниженными уровни дегидрогеназ митохондриального компартмента.

Таким образом, при исследовании показателей иммунной системы и активности метаболических ферментов в лимфоцитах крови установлено, что у больных ОЛЛ независимо от стадии заболевания иммунный статус характеризуется снижением содержания Т-лимфоцитов в периферической крови при повышенном уровне активированных Т-клеток. На стадии первичной атаки ОЛЛ выявляется снижение содержания CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов и функциональной активности В-лимфоцитов, при повышенных уровнях концентрации IgM и IgG. При ремиссии заболевания не только не наблюдается восстановление иммунологических показателей до уровня нормы, но и выявляются наиболее низкие величины исследуемых параметров, что, по-видимому, определяется последствием проведенной цитостатической терапии. Характерными особенностями рецидива ОЛЛ является высокое содержание NK-клеток и дисбаланс уровней концентрации основных классов иммуноглобулинов, при снижении функциональной активности В-лимфоцитов. При исследовании метаболизма лимфоцитов у больных ОЛЛ обнаружено, что в лимфоцитах крови при первичной атаке и рецидиве заболевания снижена интенсивность анаэробного окисления глюкозы и уровень реакций макромолекулярного синтеза, зависящих от активности пентозофосфатного цикла. У больных на стадии ремиссии ОЛЛ данные метаболические процессы восстанавливаются до диапазона нормы. На всех стадиях ОЛЛ в лимфоцитах крови выявляется снижение активности глутатионредуктазы и аэробных процессов.

## ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ НХТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ РЕГИОНАРНОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

Стахеева М.Н., Чердынцева Н.В., Слонимская Е.М., Бабышкина Н.Н., Кухарев Я.В.

НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, Томск, Россия

Известно, что развивающаяся опухоль, важной характеристикой которой является стадия регионарного метастазирования, обладает выраженным влиянием на состояние иммунной системы. Одним из возможных механизмов иммуносупрессивного влияния опухоли может выступать индукция апоптоза в клетках иммунной системы (Р.И.Сепиашвили и соавт., 2000). С другой стороны, значительная часть применяемых в онкологии химиотерапевтических препаратов реализуют свой фармакологический эффект посредством запуска программируемой гибели клеток (М.Л.Гершанович и соавт., 1999). Однако вследствие низкой селективности мишенями действия цитостатиков оказываются не только злокачественные, но и нормальные клетки, в частности, клетки иммунной системы.

**Целью** работы явилось исследование показателей апоптоза мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) у больных раком молочной железы (РМЖ) при проведении неoadъювантной химиотерапии (НХТ) в зависимости от степени распространенности опухолевого процесса.

**Материал и методы.** В исследование были включены 70 больные РМЖ с T<sub>1-4</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub>. Пациентки были разделены на 3 группы: N<sub>0</sub>, N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>. Диагноз верифицирован морфологически. НХТ проводилась по схеме циклофосфан-адриамин-фторурацил стандартными дозами (2-3 курса).

Уровень апоптоза МКПК, выделенных стандартным методом, определяли с использованием ядерного красителя Hoechst 33342 (H.Stridh et. al., 2002). Наряду с этим оценивали количество CD95<sup>+</sup> клеток цитохимическим методом. Статистическую обработку материалов проводили с использованием программы Statistica.

**Результаты.** Уровень МКПК, имеющих морфологические признаки апоптоза, и количество CD95<sup>+</sup> клеток в периферической крови у больных раком молочной железы с вовлечением регионарных лимфатических узлов N<sub>0-1</sub> не имели статистически значимых отличий от уровня здорового контроля, в то время как у больных с N<sub>2</sub> число CD95<sup>+</sup> клеток в периферической крови достоверно превышало показатели здоровых лиц (33,40±5,17 и 17,13±2,95% соответственно). Следовательно, по мере вовлечения регионарных лимфатических узлов в опухолевый процесс увеличивается готовность клеток иммунной системы к апоптозу.

После проведения НХТ исследуемые показатели апоптоза у больных РМЖ с вовлечением лимфатических узлов N<sub>0</sub> остались на прежнем уровне. У больных РМЖ с N<sub>1</sub> и N<sub>2</sub> отмечено статистически значимое увеличение числа клеток периферической крови с морфологическими признаками апоптоза: с 23,52±1,92 % до 33,33±5,23 % для группы N<sub>1</sub> и с 23,80±3,34 % до 32,00±3,54 % для группы N<sub>2</sub>. Кроме того, при метастатическом поражении 4-х и более регионарных лимфатических узлов (N<sub>2</sub>) выявлено увеличение количества CD95<sup>+</sup> клеток (41,33±6,27 %). Увеличенная готовность МНПК к апоптозу при большей степени регионарного метастазирования и проведении цитостатического лечения реализуется в возрастании уровня погибших клеток. Таким образом, в данном случае наблюдается суммация апоптоз-индуцирующего влияния опухоли и химиотерапии на клетки периферической крови, что, очевидно, следует иметь в виду при проведении лечения с целью своевременной коррекции иммуносупрессивных состояний.

**Заключение.** Степень метастатического поражения регионарных лимфатических узлов у больных РМЖ оказывает влияние на показатели апоптоза мононуклеарных клеток периферической крови до лечения и после проведения НХТ. Чувствительность клеток периферической крови к действию цитостатиков при проведении НХТ у больных РМЖ увеличивается в зависимости от степени распространенности опухолевого процесса.

#### **ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРА CD30<sup>+</sup> У БОЛЬНЫХ С ГЛИОБЛАСТОМой ПРИ СИНДРОМЕ ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННОГО ВТОРИЧНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА (СОАВИД) И С ОПУХОЛЕВО-АССОЦИИРОВАННЫМ АУТОИММУННЫМ СИНДРОМОМ В СОЧЕТАНИИ СО ВТОРИЧНЫМ ИММУНОДЕФИЦИТОМ (ВИДОАС)**

Сучков С.В.<sup>3</sup>, Ананьева И.И.<sup>1</sup>, Захаров А.В.<sup>1</sup>, Кочережкин Б.А.<sup>1</sup>, Корсакова Н.А.<sup>1</sup>, Гнучев Н.В.<sup>2</sup>, Дорофеев А.Е.<sup>4</sup>, Пинегин Б.В.<sup>2</sup>, Качков И.А.<sup>1</sup>, Пронина О.А.<sup>4</sup>, Черепихина Н.Е.<sup>1</sup>, Бурдакова Ю.А.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>МОНИКИ, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Институт иммунологии Росздрава, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ММА им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

<sup>4</sup>Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

**Введение.** Интересной с точки зрения иммунофармаколога представляется субпопуляция, экспрессирующая

CD30<sup>+</sup> маркер. По данным литературы, сывороточный уровень данного маркера существенно повышается у больных Т-клеточной лимфомой и может служить важным маркером для оценки агрессивности данного заболевания.

**Цель.** Оценка тенденции изменений субпопуляции, экспрессирующей маркер CD30<sup>+</sup> у больных с глиобластомой при синдроме опухолевоассоциированного вторичного иммунодефицита (СОАВИД) и с опухолево-ассоциированным аутоиммунным синдромом в сочетании с вторичным иммунодефицитом (ВИДОАС).

**Материалы и методы.** Образцы крови 82 пациентов с диагнозом глиобластома, в предоперационном периоде, получены из нейрохирургического отделения МОНИКИ и нейроонкологического отделения НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН. Иммуносупрессивная терапия вышеуказанным больным не проводилась. Средняя продолжительность заболевания составила два месяца. Диагноз верифицирован гистологически в послеоперационном периоде. Исследование проводили в соответствии с разработанным ранее протоколом путем иммунофенотипирования субпопуляций CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD30<sup>+</sup> на проточных цитометрах моделей FACS CaliburTM и FC500 фирм Becton-Dickinson и Beckman-Coulter (США), а также Сун фирмы Dako Cytomation (Бельгия). Содержание дендритных клеток ДК оценивали с учетом рекомендаций, изложенных в работах Willmann K. с соавторами (2000) и Metelitsa L. с соавторами (2004).

**Результаты.** Отмечены две противоположные тенденции в динамике при СОАВИД и ВИДОАС – в первом случае численность этих клеток, экспрессирующих маркер CD30<sup>+</sup>, резко снижается, коррелируя с другими субпопуляционными параметрами ВИД; во втором – доля этих клеток, наоборот, заметно возрастает, обнаруживая прямую корреляцию с целым рядом показателей, иллюстрирующих активацию ДК и Т-звена иммунитета (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>).

**Заключение.** Принадлежащая к обширному семейству рецепторов TNF и обладающая выраженным плейотропическим эффектом в отношении Т-клеток, молекула CD30 участвует в дифференцировке Th1/Th2 лимфоцитов, обладая регуляторным влиянием на Т-звено иммунитета.

#### **ВНУТРИПОЛОСТНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕВЫХ СЕРОЗИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АЛЛОГЕННЫХ ЛИМФОКИН-АКТИВИРОВАННЫХ КИЛЛЕРОВ**

Титов К.С., Киселевский М.В., Демидов Л.В., Шубина И.Ж., Черемушкин Е.А.

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

Опухолевые (метастатические) серозиты являются частым осложнением при раке легкого (24-50%), раке молочной железы (до 48%) и раке яичников (80%). Серозиты нередко развиваются у химиорезистентных и ослабленных больных, которым невозможно применить стандартные методы лечения. Новые возможности лечения опухолевых плевритов появляются благодаря развитию методов внутриполостной иммунотерапии интерлейкином (IL-2) и лимфокинактивированными клетками (ЛАК). Суммарная эффективность этого лечения составляет 68-94,5%. Внутриплевральная IL-2-/ЛАК-терапия переносится без осложнений и эффективна при химиорезистентных опухолях. Вместе с тем, генерация ЛАК у этой группы больных

часто затруднена из-за отсутствия достаточного количества лимфоцитов в экссудате, и сниженной их функциональной активности в периферической крови, не всегда представляется возможным проведение адекватной иммунотерапии.

**Цель.** Изучение влияния аллогенных ЛАК на эффективность внутриполостной иммунотерапии у больных с опухолевыми серозитами.

**Материалы и методы.** В исследование включено 40 больных с экссудативными формами онкологических заболеваний. Из них 20 с плевритами только односторонние (рак легкого- 6, рак молочной железы-6, меланома-2, рак яичников-4 и рак почки-2), 10 с асцитами (рак Фатерова сосочка - 1, рак желудка - 2, рак яичников- 7) и 10 с перикардитами (рак легкого-4, рак почки-1, рак молочной железы-3, рак яичников-2). Во всех случаях диагноз был морфологически подтвержден. Все больные имели полную или частичную резистентность к химиотерапии. Объем экссудата при его первичной эвакуации составил при плеврите от 1,5 до 5,5 л, при асците от 3,0 до 10,0 л, а при перикардите от 100 до 600 мл. Полости дренировались по стандартным методикам с установкой в них дренажа на время проведения иммунотерапии. Курс внутриполостной ИЛ-2/ЛАК иммунотерапии (10 дней) начинался с ежедневных введений рекомбинантного ИЛ-2 (ронколейкин или пролейкин) по 1 млн МЕ (сумм.-10-12 млн МЕ), затем до получения положительного клинического результата дополнялся введением ЛАК (суммарная доза 600 млн - 1,7 млрд кл.). Перед каждым введением иммунотерапии производили осушение полостей от экссудата. ЛАК-клетки получали из мононуклеарных клеток (МНК) здоровых доноров. МНК инкубировались в полной культуральной среде с ИЛ-2 1000 МЕ/мл в течение 48 ч для генерации ЛАК. Проводили иммунофенотипическое и цитологическое исследование ЛАК.

**Результаты.** До начала иммунотерапии: у 75% больных в удаленном экссудате обнаруживалось много опухолевых клеток, у 25% - единичные; у больных имелись единичные лимфоидные клетки 1-3 в поле зрения, а также мезотелиоциты и гистиоидные клетки. При анализе иммунофенотипа МНК, выделенных из экссудата, определяется лишь небольшое количество CD3<sup>+</sup>Т-лимфоцитов. ЛАК, генерированные из аллогенных МНК, были представлены клетками типа иммунобластом или пролимфоцитов и по своему фенотипу характеризовались высоким уровнем экспрессии активационных антигенов (CD25, CD38, HLA-DR), маркеров НК (CD16, CD56) и молекул адгезии (CD58). По окончании иммунотерапии в подавляющем большинстве случаев опухолевые клетки отсутствовали, по-прежнему преобладали лимфоидные клетки типа различной степени зрелости. Лимфоциты экссудата на этом этапе лечения экспрессировали, главным образом, маркеры Т-клеток. Цитологические показатели (отсутствие опухолевых клеток и наличие лимфоцитов в экссудате) по окончании иммунотерапии прямо коррелировали с положительными клиническими эффектами. При плевритах общая эффективность составила 88,8%, полное прекращение экссудации у 77,7 % больных, торможение экссудации у 11,1 %. При асцитах общая эффективность составила 85,7%, полное прекращение экссудации у 50 % больных, торможение экссудации у 35,7 %. При перикардитах общая эффективность составила 95%.

**Заключение.** Внутриполостная ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапия с применением аллогенных ЛАК-клеток высокоэффективна у больных с опухолевыми серозитами и хорошо

ими переносима, практически не вызывая побочных эффектов.

### **КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИЛ-2/ЛАК-ИММУНОТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА ПОСЛЕ РАДИКАЛЬНЫХ ОПЕРАЦИЙ СО СПЛЕНЭКТОМИЕЙ**

**Титов К.С., Киселевский М.В., Демидов Л.В., Короткова О.В., Шубина И.Ж., Малахова Н.В.**

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

В последние годы опубликованы данные о клинической эффективности адьювантной иммунотерапии у больных мелкоклеточным раком легкого, яичников, иммунотерапии опухолевых плевритов и асцитов. Вполне очевидно, что больные РЖ после радикальных операций, сопровождающихся удалением значительной части лимфоидной ткани, в том числе и селезенки, нуждаются не только в заместительной, но и в дополнительной противоопухолевой терапии. Поэтому адъювантную иммунотерапию можно рассматривать как лечение, направленное на профилактику прогрессирования рака желудка после радикальных операций.

**Цель.** Оценка изменений показателей иммунитета и разработка адъювантной иммунотерапии у радикально оперированных больных раком желудка.

**Материалы и методы.** В исследование было включено 65 радикально оперированных больных раком желудка. Больные были разделены на 3 группы: лечебную - 23 больных со спленэктомией и 2 контрольные (больные со спленэктомией - 24 и без спленэктомии - 18). Всем больным до и после операции (в течение 3-х лет) проводилась оценка параметров иммунного статуса. Больным лечебной группы после операции в течение 1,5-2 лет проводилась адъювантная иммунотерапия ИЛ-2 и аутологичными ЛАК-клетками. Двухнедельный курс ИЛ-2/ЛАК иммунотерапии начинался через 2 месяца после операции, предусматривал 4 ежедневных внутривенных введения ИЛ-2 (Ронколейкин, «Биотех», С.-Петербург) (0,5-1 млн МЕ), а также по 1 внутривенному введению ЛАК-клеток (100-500 млн клеток) 1 раз в неделю, всего 8 курсов. Показатели иммунного статуса (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>) определялись проточной цитофлюориметрией. Уровень иммуноглобулинов (IgG, IgM, IgA) определялся методом радиальной иммунодиффузии по Манчини.

**Результаты.** Начиная с 4 курса ИЛ-2/ЛАК иммунотерапии у больных лечебной группы отмечена тенденция к восстановлению сниженных после операции показателей иммунного статуса и полная их нормализация к 6-8 курсу иммунотерапии. 3-летняя выживаемость в лечебной группе составила 69,5% (живы 16 больных), в контрольной группе со СЭ - 50,0% (живы 12 пациентов) и в контрольной группе без СЭ - 61,1% (живы 11 больных). При сравнении 2-х групп с удаленной селезенкой 3-летняя выживаемость выше на 19,5% в группе больных, получавших после операции иммунотерапию. Изучаемые показатели иммунного статуса у больных в лечебной группе после окончания иммунотерапии и в контрольной без СЭ оставались в пределах физиологической нормы, а ранее сниженные параметры иммунитета у больных контрольной группы со СЭ за весь 3-летний период наблюдения так и не достигли полного восстановления. Адъювантная

ная иммунотерапия хорошо переносима всеми пациентами. Побочные эффекты выражались лишь в умеренной гипертермии. Субфебрильная температура до 37,5°C была отмечена у 6 больных. Вместе с тем, гипертермию следует расценивать не только как побочную реакцию иммунотерапии, но и как проявление специфического действия ИЛ-2 и ЛАК-стимуляции системы иммунобиологического надзора, в том числе и его противоопухолевой составляющей.

**Заключение.** Адоптивная ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапия может быть рекомендована для применения в онкологической практике в плане коррекции иммунологических нарушений и после дальнейшего изучения может рассматриваться как адъювантное лечение у радикально оперированных больных раком желудка со спленэктомией.

### КОЭКСПРЕССИЯ МИЕЛОИДНЫХ АНТИГЕНОВ ПРИ ОСТРОМ В-ЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ

Хаматдинова З.Р., Хайруллина Р.М.,  
Хисамова Н.Ф., Красавцева Т.Н.

Детская Республиканская клиническая больница,  
г.Уфа, Россия

На современном этапе развития онкогематологии пристальное внимание уделяется проблемам, связанным с диагностикой острого лейкоза. Диагностическое иммунофенотипирование при лейкозах позволяет точно определить особенности «портрета» бластной клетки по композиции поверхностных дифференцировочных антигенов, установить иммунологический вариант заболевания. При типировании с использованием широкой панели моноклональных антител можно выявить особенности лейкозного клона, не определяемые обычными морфоцитохимическими методами. Помимо диагностического аспекта, необходимость изучения иммунофенотипа бластных клеток при острых лейкозах заключается в том, что наличие некоторых антигенных детерминант ассоциируется с агрессивностью течения и результатами проводимой химиотерапии.

**Цель работы** - проведение анализа коэкспрессии миелоидных антигенов при В-остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) с целью выяснения клинической значимости этого феномена.

**Результаты.** Исследование популяций клеток костного мозга проведено методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител и определением процента положительных клеток с помощью проточного цитофлуориметра FACSCalibur с программным обеспечением CellQuest.

У 36% детей с В-клеточным острым лейкозом нами было установлено наличие миелоидных маркеров CD13<sup>+</sup>(42,88±8,20), в 35,7% – CD33<sup>+</sup>(16,82±6,08) и в 14,2% – сytMPO(9,85±3,92). В 28,5% случаев на бластах одновременно присутствовали антигены CD33 и CD13. Ни в одном из описанных случаев цитохимическим методом миелопероксидаза не выявлялась.

Кроме того, для всех больных этой группы было характерно наличие маркера CD5<sup>+</sup>. При изучении патогенетических механизмов тех или иных заболеваний большое значение имеет изучение корреляционных взаимосвязей. При проведении анализа выявлены взаимосвязи CD5 с линейно-специфичными кластерами дифференцировки CD22(0,483) и CD19(0,43) и клетками миелоидного ряда - CD13(0,569) и CD33(0,559). Отличительной чертой иммунофенотипа бластных клеток данной группы явилось

обнаружение в 100% случаев антигена стволовой клетки CD34<sup>+</sup> (77,87±6,25%). На основании сопоставления данных клиники (срок выхода в ремиссию и отвечаемость на проводимую терапию) и показателей иммунофенотипирования, нами сделано заключение о том, что одновременная экспрессия клеточных маркеров миелоидной линии CD13<sup>+</sup> или CD33<sup>+</sup> и маркера стволовой клетки CD34<sup>+</sup> сочеталась с быстрой прогрессией заболевания и является неблагоприятным прогностическим признаком.

### ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ ПОЧЕЧНОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ (ПКР)

Хват Н.С., Шкапова Е.А., Савченко А.А.,  
Куртасова Л.М.

Красноярский государственный университет,  
ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН,  
Красноярский краевой онкологический центр,  
Красноярск, Россия

В системе противоопухолевой защиты большое значение имеют иммунный надзор и естественная резистентность. При онкологических заболеваниях изменяются параметры клеточного и гуморального звеньев иммунной системы, что следует учитывать в разработке иммунореабилитационных программ для данной категории пациентов.

**Целью** исследования явился сравнительный анализ изменений иммунологических характеристик у больных ПКР в до- и послеоперационный периоды.

На базе Краевого онкологического центра обследованы больные ПКР (T<sub>3</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>) до хирургического лечения (n=132), через 14 дней после радикальной нефрэктомии (n=119) и через 1 месяц после оперативного вмешательства (N=35) в возрасте 40-55 лет. Контрольную группу составили здоровые доноры (n=35). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили с помощью набора моноклональных антител с флуоресцентной меткой. Концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке определяли по методу Манчини. Проверка гипотезы о статистической достоверности выборок производилась с помощью критерия Манна-Уитни.

В ходе проведенных исследований в группе больных до хирургического лечения обнаружено понижение количества лейкоцитов и CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов относительно контроля. Также выявлено снижение иммунорегуляторного индекса (ИРИ) относительно контрольных показателей. Кроме того, повышено процентное содержание CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов и клеток, несущих на своей поверхности маркер HLA-DR, по сравнению с контрольными параметрами. Относительно контрольных показателей установлено повышение концентрации IgA и понижение концентрации IgM в сыворотке.

Через 14 дней после хирургического лечения наблюдается снижение количества лейкоцитов относительно показателей в контрольной группе. Количество общих лимфоцитов и CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов понижено как относительно контроля, так и относительно показателей группы больных до операции. Следует отметить, что через 14 дней после оперативного вмешательства увеличивается величина ИРИ по сравнению с соответствующим параметром больных ПКР до оперативного вмешательства. Абсолютное количество NK-клеток в крови оперированных пациентов снижено относительно показателей контрольной группы и группы неоперированных больных, однако относительное содержание данной

клеточной популяции повышается по сравнению с контрольными величинами. Выявлено повышение относительно контрольной группы процентного количества клеток, несущих на своей поверхности активационный маркер HLA-DR. Абсолютное содержание В-лимфоцитов снижено относительно контрольных значений и показателей у больных ПКР до оперативного вмешательства. В сыворотке крови больных ПКР через 14 дней после операции сохраняется повышенная концентрация IgA и пониженный уровень IgM.

Через 1 месяц после операции выявлено понижение количества лейкоцитов относительно контрольной группы, снижение общих лимфоцитов относительно группы контроля, но относительно группы больных до операции и больных через 14 дней после операции происходит повышение абсолютного числа лимфоцитов. Относительно соответствующих показателей больных через 14 дней после операции повышено абсолютное количество CD3<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>- лимфоцитов. Установлено, что процентное количество CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов, а также клеток, несущих на своей поверхности маркер активации HLA-DR, увеличивается по сравнению с показателями контрольной группы. Гуморальное звено характеризуется повышенной концентрацией IgA относительно уровня контрольной группы и увеличением содержания IgM в сыворотке крови по сравнению с соответствующим параметром в группе больных ПКР через 14 дней после хирургического лечения.

По результатам проведенных исследований у больных ПКР в период до хирургического лечения установлено существенное угнетение Т-клеточного звена иммунной системы, что, вероятно, обусловлено иммуносуппрессирующим действием опухоли. Через 14 дней после операции выявлена положительная динамика функционального состояния Т-клеточного звена, о чем свидетельствует повышение величины ИРИ, однако полного восстановления величины иммунологических параметров не происходит. Кроме того, уже через 1 месяц после хирургического лечения вновь наблюдаются нарушения дифференцировки Т-лимфоцитов, что на фоне повышенного количества HLA-DR<sup>+</sup>-клеток и остающихся высокими уровней IgA и IgM в сыворотке отражает напряжение иммунной системы пациентов. Полученные данные свидетельствуют о необходимости иммунореабилитационных мероприятий у больных ПКР.

## ХЕМОКИНЫ И ПРОГРЕССИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

**Чердынцева Н.В., Гервас П.А., Литвяков Н.В., Стахеева М.Н., Белявская В.А.<sup>1</sup>, Денисов Е.В., Бабышкина Н.Н., Слонимская Е.М., Кухарев Я.В., Тузиков С.А., Севостьянова Н.В., Воевода М.И.<sup>2</sup>**

*ГУ НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН, Томск;*

*<sup>1</sup>ФГУП ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирская обл., Кольцово;*

*<sup>2</sup>ГУ НИИ терапии СО РАМН, Новосибирск, Россия*

Цитокины как медиаторы межклеточных взаимодействий принимают участие в регуляции пролиферации, дифференцировки, программированной гибели клеток, регулируют как внутриклеточные процессы, так и внеклеточное микроокружение. Цитокины способны непосред-

ственно влиять на экспрессию онкогенов и генов-супрессоров, а нарушение функции этих генов сопровождается изменением цитокиновой продукции клетками (Gotlieb et al, 1994, Morand et al, 2005, Hidaka et al, 2005). Важно, что один и тот же цитокин может проявлять различные эффекты на разных стадиях опухолевого процесса (Huber et al, 2004). Показано участие хемокинов в лимфогенном метастазировании путем регуляции воспаления, клеточной миграции, пролиферации и инвазии опухолевых клеток, стимуляции роста лимфатических сосудов. Их важная роль подтверждается данными об ингибции лимфогенного метастазирования путем блокады хемокиновых рецепторов (Vom Dorp et al, 2005). Клетки опухоли наряду с клетками микроокружения продуцируют хемокины CCL2 (MCP-1) и CCL5 (RANTES) и экспрессируют соответствующие рецепторы. Эти хемокины способны усиливать ангиогенез прямым воздействием на клетки эндотелия либо опосредованно путем привлечения воспалительных клеток, продуцирующих факторы, способствующие инвазии и диссеминации (металлопротеиназы, ангиогенные молекулы, ростовые факторы, воспалительные цитокины IL-1, IL-6, TNF-альфа) (Ben-Baruch, 2002). У больных выявлена прямая корреляция высокого уровня RANTES и ряда других цитокинов в крови с более агрессивным течением РМЖ (Azenshtein et al., 2002; Walser, 2004). Manes с соавторами в 2003 году было установлено, что для осуществления эффективного апоптоза модифицированных клеток РМЖ необходимо согласованное взаимодействие белка-рецептора CCR5 и онкосупрессора p53. В клинико-эпидемиологических исследованиях показаны ассоциации полиморфизма генов цитокинов и их рецепторов с опухолевой прогрессией (Manes et al, 2003, Azmy et al, 2004, Shin et al, 2005, Knobloch et al, 2005).

**Цель.** Оценить взаимосвязь полиморфизма гена хемокинового рецептора CCR5, гена p53 и их сочетаний с клинико-морфологическими особенностями рака молочной железы и рака легкого.

**Материалы и методы.** В исследование включено 300 больных центральным раком легкого (РЛ) и 180 больных раком молочной железы (РМЖ). Полиморфизм гена CCR5 (CCR5del32) и p53 (кодон 72) оценивали ПЦР-ПДРФ методом, экспрессию маркеров в опухолевых клетках иммуногистохимическим методом с использованием первичных моАТ для p53 - (DO-7) NCL-p53-DO7, bcl-2 - (NCL-bcl-2). Статистический анализ осуществлен с использованием программы "Statistica, 6.0.

**Результаты.** В наших исследованиях среди больных РМЖ с благоприятным исходом заболевания (отсутствие рецидивов и метастазов при 2 и 5-летнем наблюдении) выявлен более высокий процент лиц с генотипом CCR5/CCR5del32 по сравнению с группой пациенток с неблагоприятным исходом (26,9 и 11,5% соответственно,  $p < 0,02$ ). У больных РМЖ с локализованным процессом в ткани молочной железы наблюдается увеличение частоты встречаемости вариантного генотипа CCR5/CCR5del32 по сравнению с популяционным контролем (25,7 и 12,5% соответственно,  $p < 0,01$ ), при этом такой закономерности для пациенток с метастазами в региональные лимфатические узлы не выявлено. Показано значимое увеличение частоты сочетания нормальных генотипов генов CCR5 и p53 и уменьшение частоты сочетания гетерозиготного генотипа CCR5 и дикого генотипа p53 у больных с метастазами в регионарные лимфоузлы (50,0%) по сравнению с N0 (25,0%). Эти данные указывают на защитное действие CCR5del32 аллеля в плане опухолевой прогрессии при РМЖ.

У больных раком легкого выявлена ассоциация CCR5del32 с более высоким риском лимфогенного метастазирования. В общей группе больных РЛ более высокая частота CCR5del32 определена у тех пациентов, в опухолях которых экспрессировался высокий уровень р53: 56% против 18% среди пациентов с отсутствием белка р53 в клетках опухоли (p=0,000). У больных с местнораспространенным процессом (N1-2) более 65% больных с р53 положительными опухолями являлись носителями CCR5del32 при 29% в группе сравнения (N0)(p=0,0014). При отсутствии метастазов в региональные лимфоузлы значимых различий в частоте встречаемости CCR5del32 не выявлено. Полученные результаты свидетельствуют о связи CCR5del32 с более тяжелым клиническим течением РЛ.

**Заключение.** Для анализа причин неоднозначности представленных данных необходимо исследование связи клиничко-морфологических особенностей опухолевого процесса и CCR5 со статусом гена р53 в клетках опухоли. В целом изучение роли хемокинов и их рецепторов в опухолевой прогрессии поможет найти новые мишени терапевтического воздействия для возможной регуляции опухолевого процесса. Будут выявлены новые прогностические маркеры, сопряженные с разными формами опухолевой прогрессии, которые позволят повысить эффективность прогноза течения заболевания и определения тактики лечения.

**ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ**

**Чубукина Ж.В., Бубнова Л.Н., Бессмельцев С.С.**

*ФГУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург, Россия*

**Введение.** Множественная миелома (ММ) - клональный В-лимфопротеративный процесс, обусловленный пролиферацией плазматических клеток (ПК) в костном мозге с последующим вытеснением нормального кроветворения и секрецией большого количества моноклональных иммуноглобулинов или их фрагментов.

**Цель** настоящей работы - выявление особенностей клеточного иммунитета больных разными иммунохимическими вариантами множественной миеломы.

**Материалы и методы.** Проведено обследование 69 больных ММ в возрасте от 40 до 75 лет, с длительностью заболевания от 6 до 60 месяцев, которые находились на лечении в гематологической клинике РосНИИГТ в 2001-2005 гг. В соответствии с международными критериями диагностики ММ G-вариант был установлен у 48 (69,6%),

A-вариант у 12 (17,4%), вариант - Бенс-Джонса у 9 (13 %) больных ММ. Все больные получили от 2 до 19 курсов химиотерапии. Для характеристики клеточного иммунитета были изучены основные фракции иммунокомпетентных клеток периферической крови: CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>. Группу контроля составили 47 практически здоровых лиц в возрасте от 22 до 39 лет. Результаты представлены в таблице.

Из представленных результатов видно, что у больных ММ имеются нарушения Т-клеточного звена иммунитета - снижение содержания CD4<sup>+</sup> клеток у больных всех групп ММ по сравнению с нормой, а в группе больных А-ММ снижено содержание еще и зрелых Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>). Содержание активированных клеток HLA-DR<sup>+</sup> повышено во всех группах больных ММ. Только в группе больных Бенс-Джонса-ММ выявлено повышенное содержание В-лимфоцитов (CD20<sup>+</sup>), также повышено количество CD95<sup>+</sup> клеток у больных всех групп, но у больных ММ-Бенс-Джонса в несколько большей степени. Таким образом, у больных различными вариантами ММ выявлены однонаправленные нарушения клеточного иммунитета, характеризующиеся дефицитом Т-клеточного звена за счет угнетения фракции Т-хелперов, а также увеличением активированных и преапоптотических лимфоцитов. У больных ММ-Бенс-Джонса выявленные нарушения выражены более значительно по сравнению с другими группами больных.

**ОСОБЕННОСТИ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕЙ У ДЕТЕЙ**

**Шатинина Н.Н.\* , Нажимов В.П.**

*ГУ Российская детская клиническая больница Росздрава, Москва, Россия*

Несмотря на то, что злокачественные опухоли у детей высокоагрессивны, при точном морфологическом диагнозе и адекватной терапии можно добиться хороших результатов в лечении. В настоящее время вырабатываются стандартизованные иммуногистохимические панели для диагностики и оптимизации последующей терапии по специальным протоколам для онкологических больных, причём в первую очередь это относится к детской онкологии. Благодаря быстрому развитию такого раздела как иммуноморфология в последние годы

\*Приносим глубокую благодарность за постоянную помощь в практической реализации детской программы «Сердце ребёнка» Совету Лютеранской Церкви и её прихожанам (г.Хиросима, Япония) и С.Д.Дегтярёвой за техническую помощь в проведении исследований.

**СУБПОПУЛЯЦИИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ММ**

| Кластер дифференцировки | Обследованные группы |              |              |                        |
|-------------------------|----------------------|--------------|--------------|------------------------|
|                         | Контрольная группа   | Больные G-ММ | Больные А-ММ | Больные Бенс-Джонса-ММ |
| CD3 <sup>+</sup>        | 61,4 ± 0,96          | 60,1 ± 1,9   | 53,5 ± 4,35* | 55,5 ± 6,7             |
| CD4 <sup>+</sup>        | 36,9 ± 0,98          | 25,3 ± 1,4*  | 24,5 ± 2,26* | 28,4 ± 4,4*            |
| CD8 <sup>+</sup>        | 24,9 ± 0,97          | 22,6 ± 1,5   | 22,6 ± 2,0   | 24,7 ± 2,0             |
| CD20 <sup>+</sup>       | 22,0 ± 1,02          | 24,4 ± 1,6   | 26,4 ± 4,1   | 30,9 ± 2,9*            |
| HLA-DR <sup>+</sup>     | 25,3 ± 0,98          | 32,6 ± 1,6*  | 30,4 ± 3,1   | 34,4 ± 3,7*            |
| CD16 <sup>+</sup>       | 24,0 ± 1,15          | 27,0 ± 1,6   | 25,4 ± 3,7   | 23,7 ± 2,4             |
| CD95 <sup>+</sup>       | 13,2 ± 0,79          | 28,2 ± 1,7*  | 27,1 ± 3,1*  | 33,5 ± 4,5*            |
| CD25 <sup>+</sup>       | 24,1 ± 1,11          | 27,4 ± 1,6   | 24,8 ± 2,8   | 25,2 ± 3,1             |

\*- различия статистически достоверны (p<0,05) по сравнению с контрольной группой.

диагноз «недифференцированная злокачественная мелкоклеточная опухоль» уходит в прошлое благодаря его уточнению путём определения гистогенеза новообразования. Однако существующее различие в структуре частоты встречаемости различных новообразований у детей и взрослых вносит свои коррективы в использование общепринятых панелей для первичной и последующей уточнённой диагностики.

**Цель исследования:** формирование первичной иммуногистохимической панели для иммунофенотипирования новообразований у детей на парафиновых срезах.

**Материалы и методы.** Образцы опухолевой ткани от 80 детей (средний возраст 8 лет, 28 девочек и 52 мальчика) были исследованы для уточнённой иммуноморфологической диагностики в соответствии со специальными иммуногистохимическими панелями в зависимости от каждого клинического случая. Спектр использованных антител был достаточно широк (CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD15, CD20, CD21, CD23, CD30, CD34, CD43, CD45LCA, CD45Ro, CD56, CD57, CD68, CD79a, CD99, Bcl-2, Bcl-6, Ki-67, PCNA, p53, Cyclin D1, FYIII, ALK, DBA44, κ, λ, TdT, Fascin, EMA, panCK, MyoD1, Pgp9,5, Myogenin, Myoglobin, Myf-3, Myf-4, S100, Vimentin, Desmin, NSE, Chromogranin, Synaptophysin, PLAP, GFAP и другие) и представлен различными клонами. В качестве системы визуализации использовали систему фирмы DAKO (Kit No K5001).

**Результаты.** Анализ результатов по исследованным новообразованиям, которые потребовали иммунофенотипирования, показал, что большая часть из них была представлена группой, включающей лейкемии и лимфомы в 31% случаев. Причём лимфомы из В- и Т-предшественников были у 6 детей; лимфомы из более зрелых клеток были у 10 и лимфомы Ходжкина у 9 детей. Новообразования костей были представлены в 19% случаев. Опухоли мягких тканей в 15% случаев, а опухоли ЦНС и опухоли из симпатической нервной системы составили 7,5%. Другие диагнозы были поставлены у 27,5% больных детей.

Использование нижеприводимой панели оказалось достаточным для первичного иммунофенотипирования большинства новообразований у детей на парафиновых срезах: CD34, CD45LCA, CD56, CD57, CD99, Desmin, Myogenin, MyoD1, Myf-4, NSE, panCK, Pgp9,5 и Vimentin.

Использование последующего иммунофенотипирования с соответствующими панелями для каждого клинического случая в дальнейшем, как правило, подтверждало и уточняло диагноз.

Затруднения вызывали редкие случаи опухолей с дивергентным типом дифференцировки, при котором не всегда удавалось точно отдифференцировать природу новообразования при последующем иммунофенотипировании с использованием соответствующих панелей для каждого клинического случая.

В настоящее время мы продолжаем исследования в этом направлении по уточнению значимости различных антител в формировании более информативных панелей с привлечением кариотипирования и молекулярно-биологического анализа.

**Заключение.** Представленная иммуногистохимическая панель CD34, CD45LCA, CD56, CD57, CD99, Desmin, Myogenin, MyoD1, Myf-4, NSE, panCK, Pgp9,5 и Vimentin может быть полезна для первичного иммунофенотипирования новообразований у детей на парафиновых срезах.

## КОМПЛЕКСНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Шелепова В.М.

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

**Введение.** Комплексное использование опухолевых маркеров (ОМ) может оказать реальную помощь в диагностике первично-множественных опухолей (ПМО). Благодаря тому, что каждый ОМ ассоциирован с опухолями определенного гистотипа, измерение уровней одновременно нескольких ОМ позволит не пропустить, как бы «увидеть в лицо» соответствующие опухоли при синхронном типе их развития, а регулярное определение ОМ у больных, леченных по поводу гормонозависимых злокачественных новообразований (рак молочной железы (РМЖ), тела и шейки матки, яичников (РЯ), рак толстой кишки (РТК)) и имеющих высокий риск развития второй (метахронной) опухоли, может способствовать выявлению этих опухолей в относительно более ранних стадиях развития и тем самым определять улучшение прогноза.

**Целью работы** было изучение целесообразности использования ОМ в диагностике ПМО, одной из которых являлся РЯ.

**Материалы и методы.** Ретроспективно анализировали исходные (до лечения) уровни ОМ – СА125, СА15.3 и РЭА в сыворотке крови 58 больных РЯ и сопутствующими злокачественными новообразованиями, находившихся на лечении в Российском онкологическом научном центре (г.Москва) в период с 1994 по 2005 гг. Для определения ОМ использовали диагностические ИФА-тест-системы производства Hoffmann La Roche. В качестве дискриминационных уровней (ДУ) были приняты 35Е/мл, 27Е/мл и 5,6 нг/мл для СА125, СА15.3 и РЭА соответственно.

**Результаты.** Синхронные ПМО были диагностированы у 39 человек: РМЖ+РЯ (n=32), РТК+РЯ (n=4), РЖ+РЯ (n=3). Уровни определяющих маркеров были диагностически значимыми у 95% больных (37/39), в среднем: СА125 - 2600 Е/мл (от 110 до 13140), СА153 – 205 Е/мл (от 27,1 до 1724), РЭА – 205 нг/мл (от 135 до 486). Лишь у двух пациентов с ПМО РЖ+РЯ РЭА при диагнозе был отрицательным.

Метахронный тип развития ПМО наблюдали у 19 больных: РМЖ+РЯ (n=17), РТК+РЯ (n=1), рак шейки матки+РЯ (n=1). Второй опухолью в одном случае был РМЖ, в остальных 18 случаях - РЯ. При диагнозе первой опухоли диагностически значимые уровни определяющих маркеров регистрировались при РЯ (СА125 – 990,0 Е/мл), РТК (РЭА – 369 нг/мл), у 5/16 больных РМЖ. Появление второй опухоли (РЯ) наблюдалось в разные сроки - от 1года до 10 лет после диагностирования первой опухоли – и во всех случаях ассоциировалось с патологически высокими значениями СА125. Регрессионный анализ показал наличие прямой отрицательной корреляции ( $r=-0,67$ ) между уровнем СА125 (а, следовательно, и стадией заболевания) и длительностью жизни больных. Высокий уровень СА125 в момент клинического диагностирования РЯ и связанный с ним плохой прогноз имели место по вине больных в 11 из 18 случаев (61%), когда после успешного лечения первой опухоли пациентки не проходили контрольного обследования в течение 6-10 лет; по вине врача в 39% случаев, когда у больных, находящихся под наблюдением после лечения первой опухоли, не проводилось определение СА125 или игнорирова-

лись его высокие и нарастающие в течение длительного времени (8-12 мес.) значения.

**Заключение.** Можно надеяться, что определение одновременно нескольких ОМ повысит эффективность выявления ПМО. Для этого пациенток, лечившихся по поводу гормонозависимых опухолей следует ориентировать на длительное, возможно, до конца жизни, и регулярное (с частотой 1 раз в 3 – 4 месяца) определение комплекса ОМ. Повышение уровней одного или нескольких маркеров должно быть основанием для проведения быстрого и тщательного обследования на предмет обнаружения второй опухоли.

### ОПЫТ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ АКТИВИРОВАННЫХ ДИКАРБАМИНОМ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЕВЫМИ ПЛЕВРИТАМИ

**Шубина И.Ж., Титов К.С., Михайлова И.Н., Огородникова Е.В., Вешнякова Л.Ю., Небольсин В.Е., Демидов Л.В., Киселевский М.В.**

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

Развитие метастатических плевритов у онкологических больных часто является ведущим, а иногда и единственным проявлением злокачественного заболевания и это значительно ухудшает качество жизни больных. Проведение химиотерапии не всегда бывает эффективным при экссудативных формах рака. Дикарбамин (ДИК), новый отечественный синтетический препарат (разработан ООО «Фарминтерпрайвез», Москва), представляющий собой 2-(имидазол-4-ил)-этанамид пентандиовой 1,5 кислоты, является неспецифическим индуктором дифференцировки гемопоэтических клеток. В настоящее время ДИК рекомендован в качестве адъювантного препарата при химиотерапии онкологических больных. В последние годы для стимуляции противоопухолевого иммунитета интенсивно исследуются возможности адоптивной иммунотерапии, которая использует клетки-эффекторы иммунитета, экстракорпорально активированные стимулирующими препаратами, как например, интерлейкином-2. Ранее нами была показана эффективность применения ИЛ-2/ЛАК (лимфокин-активированные киллеры) иммунотерапии при лечении опухолевых плевритов.

**Цель** данного исследования оценить эффективность применения активированных дикарбамином мононуклеарных лимфоцитов (МНЛ) для клеточной иммунотерапии больных с опухолевыми плевритами.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 10 больных раком молочной железы, легкого, почки с опухолевым плевритом. Объем эвакуируемой экссудативной жидкости составлял 1,1-3,5 л/сутки. МНЛ периферической крови здоровых доноров выделяли по стандартной методике на градиенте плотности фиколла-урографина и затем культивировали в полной среде RPMI 1640 в присутствии дикарбамина (5 мкг/мл). Определяли иммунофенотип и цитотоксическую активность дикарбамин-активированных МНЛ (ДАК). Плевральную полость пациентов дренировали и устанавливали катетер. Ежедневно плевральный выпот эвакуировали и в осушенную полость вводили ДИК (1 мг) и активированные *ex vivo* аллогенные ДАК (150-180 млн кл.) в течение 10 суток. Контроль экссудативной жидкости осуществляли рентгенологически и цитологически. За полный клинический эффект принимали прекращение экссудации в течение месяца

после завершения лечения, частичный эффект - наличие осумкованной жидкости, не требующей удаления.

**Результаты.** Перед началом лечения в экссудате цитологически наблюдали большое количество опухолевых клеток и незначительное число лимфоцитов.

В середине курса в экссудате отмечались лишь единичные опухолевые клетки и появлялись активированные МНЛ типа иммунобластов и пролимфоцитов. По своему иммунофенотипу ДАК-клетки отличались от ЛАК-клеток. В частности, наряду с активационными антигенами и молекулами адгезии ДАК экспрессировали маркеры зрелых Т-клеток (CD3). Эти данные свидетельствуют об особенностях механизма действия дикарбамина по сравнению с классическим индуктором киллерной активности лимфоцитов ИЛ-2.

По окончании курса ДАК/дикарбамин иммунотерапии у всех больных регистрировали прекращение экссудации, а в последних эвакуируемых пробах экссудата обнаруживалось значительное количество зрелых лимфоцитов и отсутствие опухолевых клеток. Таким образом, применение дикарбамина для активации клеток-эффекторов и последующее использование ДАК для иммунотерапии с одновременным введением дикарбамина представляет перспективный метод лечения метастатических плевритов.

### КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА ПРОФЕТАЛЬ® В МОНОТЕРАПИИ И В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ С ХИМИОПРЕПАРАТАМИ У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ

**Шур Н.Н., Тараненко Л.А., Черешнев В.А.<sup>1</sup>, Родионов С.Ю.<sup>1</sup>**

*ГОУ ВПО Пермская государственная медицинская академия Росздрава, Пермь;*

*<sup>1</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия*

В настоящее время в исследованиях препарата Профеталь® (альфа-фетопротейн (АФП)) в лечении рака установлена его эффективность у больных с высоко- и умереннодифференцированными опухолями через снятие феномена иммунологического усиления роста опухоли, запуск механизма апоптоза через каспазу-3 и трансплантационного иммунитета с последующим некрозом опухоли, а также, поскольку лигандами АФП являются эмбриональные рецепторы опухолевых клеток, весьма успешно были предприняты попытки целенаправленной доставки к злокачественным клеткам цитостатиков.

Проведено сравнительное изучение объективных ответов у больных со злокачественными опухолями при монотерапии препаратом Профеталь® (75-375 мкг/сут., курс 2-8 недель) и в сочетании с полихимиотерапией (ПХТ) (доза Профетала на одно введение химиопрепарата 375 мкг). Пациенты имели IV стадию заболевания (солидные опухоли и гранулематозы), по гистологической характеристике высоко- и умереннодифференцированные опухоли, в группы включались пациенты с измеряемыми опухолями. Критериями удаления из исследования были онкопатология головного мозга или метастазы в головной мозг, дыхательная, сердечная, печеночная или почечная недостаточность выше I стадии, прорастание опухоли в стенку крупного сосуда. Группы сопоставимы по возрасту, полу, соматической патологии.

Объективный эффект оценивался на основании данных исследований (УЗИ, КТ, МРТ, рентгеновских исследований) через 1 месяц после лечения по сравнению с данными до лечения. Размер опухоли рассчитывался как сум-

## КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОМ ПРОФЕТАЛЬ В МОНОТЕРАПИИ И В СОЧЕТАНИИ С ПХТ

|                             | Полный эффект, чел. | Частичный эффект, чел. | Стабилизация процесса, чел. | Прогрессирование, чел. | Летальный исход, чел. | Объективный эффект, % (M±SD) |
|-----------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------|
| Группа Профеталь®, n=11     | 1                   | 1                      | 8                           | 0                      | 1                     | -49,25±31,01                 |
| Группа ПХТ+Профеталь®, n=23 | 1                   | 10                     | 11                          | 0                      | 1                     | -58,08±29,1                  |

ма произведений двух максимальных взаимноперпендикулярных диаметров для каждого опухолевого очага. Полный эффект диагностировался при подтвержденном отсутствии опухолевого процесса или стойкой ремиссии при лимфопролиферативных заболеваниях. Частичный эффект определялся при уменьшении опухоли более чем на 50%.

Представляем предварительные результаты исследования. «Площадь» опухоли в группе Профеталь® до лечения в среднем составляла 21,68 см<sup>2</sup>, после лечения – 11,96 см<sup>2</sup>. В группе ПХТ+Профеталь® размеры опухолевой массы снизились с 78,36 до 30,15 см<sup>2</sup>.

Таким образом, использование препарата Профеталь® в лечении злокачественных новообразований IV стадии у данных групп пациентов показало одинаковую высокую эффективность лечения как в монотерапии, так и в комплексном лечении с ПХТ.

## СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ И СМЕРТНОСТЬ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ

Шутко А.Н., Карамуллин М.А., Екимова Л.П., Юркова Л.Е., Мус В.Ф., Шумский И.А., Лыткина И.Ю., Бочкарева Т.Н., Чинова Н.А.

Центральный НИ рентгенорадиологический институт Росздрава, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Возрастной максимум заболеваемости по большинству классов неонкологических болезней к 40-50 годам совпадает с возрастным понижением среднестатистического содержания в крови CD4<sup>+</sup>Leu8<sup>+</sup> субпопуляции лимфоцитов, находящейся на промежуточной стадии дифференцировки. Этот феномен объяснен наличием морфообразовательной функции у незрелых лимфоцитов (Karumullin M. et al, 2005). При злокачественной патологии человека обнаружено наличие относительно быстрых, с периодом 8-9 месяцев, изменений содержания этих клеток в крови (Shoutko A. et al, 2002).

**Целью** работы явилось изучение связи смертности онкологических пациентов с различным среднестатистическим содержанием CD4<sup>+</sup>Leu8<sup>+</sup> лимфоцитов в крови, а также влияния быстрых (T≈8-9 мес.) периодических флуктуаций содержания этих клеток в циркуляции на темп смертности.

**Методы.** Продолжительность жизни и темп смертности (за 2-х или 3-месячные промежутки от начала лечения) были рассчитаны для первичных пациентов с распространенным раком яичников (РЯ, III и IV ТЗс стадии), распространенным раком почки (РП, IV стадия) и местно распространенным раком легкого (РЛ), получавших комбинированное лечение в ЦНИРРИ.

Данные были сопоставлены с результатами анализа субпопуляционного состава мононуклеаров крови (CD2<sup>+</sup>,

CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Leu8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>11b<sup>+</sup>, CD35<sup>+</sup>, CD2<sup>+</sup>,35<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>), полученными непосредственно перед началом лечения прямым методом иммунофлуоресценции с АТ “ДАКО” и “ВД” на флуоресцентном микроскопе “Ortop”, снабженном цифровой камерой и компьютером для анализа видимого и флуоресцентного изображений.

**Результаты.** 1. Усредненное содержание клеток фенотипа CD4<sup>+</sup>Leu8<sup>+</sup> понижается по мере сокращения индивидуальной продолжительности жизни при РЯ, РЛ и РП с 20% до 7% (r=+0,45±0,17, p=0,014), с 22% до 0% (r=+0,35±0,12, p<0,007) и с 16% до 4% (r=+0,4±0,19, p=0,05) в диапазонах 52-3, 36-4, 16-0 месяцев жизни соответственно.

2. На фоне постепенного снижения среднего значения по п.1 происходят относительно быстрые периодические (T≈8-9 месяцев) изменения содержания клеток CD4<sup>+</sup>Leu8<sup>+</sup>, величина которых прямо коррелирует с величинами темпа смертности, регистрируемыми в ближайшие 1-2 месяца после начала лечения.

Коэффициенты этой линейной корреляции при РЯ, РЛ и РП равны соответственно: r=+0,53±0,73, p=0,004; r=+0,91±0,1, p=0,01; r=+0,84±0,11, p<0,001.

3. Для остальных показателей, включая РБТ суммарной фракции лимфоцитов и уровни спонтанного синтеза ДНК в ней по включению <sup>3</sup>H-тимидина (радиометрический метод), обнаружить аналогичные статистически подтвержденные связи лабораторных характеристик с параметрами смертности не удалось.

**Заключение.** Согласно полученным данным, долгосрочная перспектива продолжительности жизни определяется средним “запасом” CD4<sup>+</sup>Leu8<sup>+</sup> клеток в циркуляции к началу лечения, но быстрый процесс (темп смертности в течение нескольких месяцев) переменен. Переменная агрессивность онкологического процесса количественно зависит от величины текущего максимума (или минимума) содержания этих клеток в крови. С учетом (Karumullin M. et al, 2005), констатированное противоречие наиболее просто разрешается принятием гипотезы о распространении морфообразовательной функции ранних лимфоцитов в отношении опухолевой ткани.

## БАРНАЗА – НОВЫЙ АГЕНТ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ СЕЛЕКТИВНОЙ СУПРЕССИИ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ РАКОВЫХ КЛЕТОК

Эдельвейс Э.Ф., Баландин Т.Г., Луценко Г.В., Сапожников А.М., Деев С.М.

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

Барназа – щелочная гуанил-специфичная рибонуклеаза, синтезируемая *Bacillus amyloliquefaciens*. Для защиты

собственной РНК этой бактерией синтезируется специфический ингибитор барназы – барстар. Барназа – маленький (110 а.о.) однопечечный белок, не требующий кофакторов и посттрансляционных модификаций для своего функционирования, не содержащий дисульфидных связей и небелковых компонентов, поэтому продукция рекомбинантной барназы высокотехнологична. Свойство барназы расщеплять РНК – жизненно важный компонент РНК-вирусов, клеток прокариот и эукариот, нашло применение в различных биоприложениях. Однако цитотоксический потенциал барназы для раковых клеток еще не был определен. Мы впервые оценили токсическое действие рекомбинантной барназы, наработанной в штамм-продуценте *Escherichia coli* и очищенной ионообменной хроматографией, на человеческие раковые клетки различного происхождения и на нормальные лимфоциты человека. Влияние барназы на жизнеспособность клеток оценивали в МТТ-анализе. Барназа оказалась токсичной для клеток человеческих аденокарцином ( $IC_{50}$ , концентрация белка, снижающая жизнеспособность клеток на 50%, в диапазоне 1-10 мкМ) и для клеток человеческих лейкоцитов ( $IC_{50}$  в диапазоне 3-100 мкМ).

Таким образом, цитотоксичность барназы сильно зависит от типа раковых клеток, так же, как цитотоксичность онконазы – высокотоксичной РНКазы, хорошо известной в противораковых исследованиях. Цитотоксичность барназы ингибировалась барстаром, что указывает на обусловленность токсического действия каталитической активностью барназы. Важно отметить, что барназа, обладая специфической дозозависимой токсичностью для раковых клеток, не влияла на жизнеспособность нормальных лимфоцитов даже при концентрации 60 мкМ. Кроме того, в наших опытах ни рибонуклеазная активность, ни цитотоксическое действие барназы не ингибировались человеческим рибонуклеазным ингибитором (hRI), который присутствует практически во всех тканях человека и блокирует активность РНКаз различного происхождения. Можно заключить, что невосприимчивость к hRI, высокая цитотоксичность и специфичность действия на раковые клетки позволяют рассматривать барназу как новый перспективный противоопухолевый агент.

Работа поддержана программой РАН «Молекулярная и клеточная биология», ФЦНТП ИИ -112/001/282 и грантом РФФИ № 04-04-49024-а.