

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКТИВНОСТЬ И ДНК-ЦИТОМЕТРИЯ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У ДЕТЕЙ

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

ГУЗ Детская республиканская клиническая больница, лаборатория иммунологии с отделением
клинической иммунологии, г. Уфа

Резюме. В литературе практически отсутствуют сведения по ДНК-цитометрии клеток периферической крови, в том числе при онкопатологии. Одной из задач настоящей работы было изучение воздействия опухолевого процесса на функциональное состояние клеток периферической крови и определение взаимосвязей между плоидностью, кинетикой клеточного цикла клеток периферической крови и показателями системы иммунитета.

Ключевые слова: ДНК-цитометрия, периферическая кровь, острый лейкоз, опухоли головного мозга.

Khamatdinova Z.R., Khisamova N.F., Khajrullina R.M.

IMMUNOLOGICAL REACTIVITY AND PERIPHERAL BLOOD DNA-CYTOMETRY IN CHILDHOOD ONCOLOGICAL DISEASES

Abstract. Distinct data concerning DNA cytometry of peripheral blood populations are relatively scarce, including oncopathological conditions. Among tasks of present work, we evaluated effects of malignancies upon functional state of peripheral blood cells and determination of correlations between cell ploidy, cell cycle kinetics and parameters of immune system. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 1-2, pp 65-70)

Keywords: DNA cytometry, peripheral blood, acute leukemia, brain tumors.

Введение

Злокачественные новообразования являются важнейшей проблемой педиатрии. Несмотря на то что в настоящее время достигнут значительный прогресс в лечении онкологических заболеваний у детей и достижения в этой области особенно значимы в терапии гемобластозов [Балдуева И.А., 2001], в структуре детской смертности летальность от рака занимает второе место. Иммунология опухолей находится на пересечении двух больших и сложных дисциплин: онкологии и иммунологии. Цель настоящей

работы – обобщение собственных данных в области онкогематологии и иммунологии опухолей и определение перспективных направлений в этих областях.

Материалы и методы

Работа выполнена в отделении клинической иммунологии Республиканской детской клинической больницы (г. Уфа). В соответствии с поставленной целью и задачами проведено комплексное клиничко-лабораторное обследование 38 детей с различными нозологическими формами заболеваний:

– опухоли головного мозга: 10 больных с доброкачественными (краниофарингеома, зрелая тератома), 12 – со злокачественными новообразованиями головного мозга (опухоль лобной доли, III желудочка, медуллобластома, саркома, астроцитома, диффузная глиома ствола мозга). Клиничко-иммунологическое обследование проводили до удаления массива опухоли. Злокачественный характер

Адрес для переписки:

Хаматдинова Земфира Робертовна,
Детская республиканская клиническая больница,
лаборатория иммунологии с отделением клинической иммунологии
45106, Башкортостан, г. Уфа, ул. Кувыкина, 98.
Тел.: (347) 255-73-44.
E-mail: zemfira102@mail.ru

опухоли подтверждался результатами гистологических исследований;

– острые лейкозы: 16 больных с острым В-лимфобластным лейкозом (В-ОЛЛ), обследование проводили в день постановки диагноза до назначения соответствующей терапии.

Комплексное обследование больных включало сбор анамнеза, анализ клинических данных, проведение лабораторных исследований. Иммунологическое обследование проводилось с использованием комплекса стандартизированных тестов, включающих оценку:

– клеточного звена иммунитета на проточном цитофлуориметре FACSCalibur с программным обеспечением SimulSet с использованием моноклональных антител фирмы Becton Dickinson и определением относительного содержания основных популяций и субпопуляций иммунокомпетентных клеток (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺56⁺, CD19⁺, CD25⁺, CD95⁺, HLA-DR⁺);

– плоидности и кинетики клеточного цикла клеток периферической крови методом проточной ДНК – цитометрии, основанным на связывании ДНК с флуоресцентным зондом – пропиридиума йодидом, который позволяет определить долю клеток в различных фазах митотического цикла (G0/G1, S и G2⁺M). Образцы (не менее 20 000 клеток) анализировали на проточном цитофлуориметре, оборудованном модулем дискриминации дуплетов в программе ModFit. При этом учитывалось значение коэффициента вариации (CV%) пика G1/0, отражающего точность измерения;

– концентрации сывороточных иммуноглобулинов классов А, М, G (IgA, IgM, IgG) определяемых методом радиальной иммунодиффузии в геле [Manchini G. et al., 1965];

– уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) осаждением полиэтиленгликолем (мол. масса – 6000) [Имельбаева Э.А. и др., 2006].

Статистическую обработку результатов исследования проводили в операционной среде Windows XP с использованием современных пакетов прикладных программ Statistica 6.0. Для показателей, имеющих нормальное распределение признака, вычислялись среднее арифметическое значение (M) и стандартная ошибка среднего значения (m). Для показателей, не имеющих нормального распределения, вычислялись медиана и интерквартильный размах (25-75 перцентили). Достоверность различий оценивалась по критерию Манна–Уитни. Корреляционный анализ выполнялся по методу Спирмена с определением коэффициента ранговой корреляции (rs). Значения $p < 0,05$ приняты статистически значимыми [Гланц С., 1999].

Результаты и обсуждение

В структуре летальности от новообразований у детей одно из ведущих мест занимают лейкомии и опухоли головного мозга. Внедрение современных методов исследований диктует необходимость объединения уже имеющихся представлений об иммунной системе с новыми данными. Широкое использование в изучении функционального состояния клеток получают методы проточной цитометрии с использованием флуоресцентных ДНК-зондов. Полученные таким образом гистограммы характеризуют распределение клеток по содержанию ДНК (плоидность) и кинетику клеточного цикла [Шмаров Д.А., Козинец Г.И., 2004].

Для характеристики иммунологической реактивности и функционального состояния клеток периферической крови в условиях опухолевой трансформации нами проведено комплексное клиничко-иммунологическое обследование

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПО ПЛОИДНОСТИ И ФАЗАМ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА У ДЕТЕЙ С ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Плоидность и фазы клеточного цикла	Контрольная группа, (n = 30) Me	Группа со злокачественными опухолями, (n = 12) Me	Группа с доброкачественными опухолями, (n = 10) Me
Диплоид, %	100	100	100
G1, %	99,89 (99,83-99,90)	99,51* (99,38-99,85)	99,75* (99,50-99,87)
G2, %	0,02 (0,00-0,04)	0,05 (0,00-0,43)	0,05 (0,03-0,10)
S, %	0,10 (0,09-0,11)	0,16* (0,13-0,20)	0,20* (0,12-0,39)
CV	2,57 (2,29-2,83)	2,65 (2,44-2,67)	2,63 (2,11-2,73)

Примечание. * – различие с контролем статистически значимо ($p < 0,05$).

детей с острыми лейкозами, доброкачественными и злокачественными новообразованиями головного мозга. Группы были подобраны с учетом прямого и опосредованного воздействия опухолевого процесса на клетки периферической крови.

Современными исследованиями показано, что различные иммунокомпетентные клетки проникают через гематоэнцефалический барьер и инфильтрируют ткань головного мозга, на основе этих данных пересмотрена существовавшее ранее представление об «иммунологической привилегированности» клеток головного мозга [Поляков В.Е. и др., 2001; Хонина Н.А., Центнер М.И., 2002; Тимершин А.Г. и др., 2003].

По данным ДНК-цитометрии у детей со злокачественными и доброкачественными опухолями головного мозга клетки периферической крови имели диплоидный набор хромосом. Во всех группах наблюдений количество клеток в G1-фазе клеточного цикла было достоверно ниже, чем в контроле. Доля клеток в фазе синтеза ДНК, характеризующей пролиферативную

активность, превышала данные контрольной группы и составила 0,16 и 0,20% (табл. 1). Коэффициент вариации пика G1/0 был таким же, как в контрольной группе, и не превышал 2,6%.

Имунофенотипирование лимфоцитов методом проточной цитометрии выявило достоверное повышение содержания В-лимфоцитов (CD19⁺) и высокий уровень клеток с маркером ранней активации (CD25⁺) у детей обеих групп. Показатели гуморального звена иммунитета в группе детей с доброкачественными опухолями головного мозга не имели достоверных различий с контролем. У детей со злокачественными новообразованиями отмечалось достоверное в сравнении с контрольной группой снижение уровня IgG (табл. 2).

Диагноз острого лейкоза устанавливался на основании клинической картины заболевания, цитоморфологических исследований и иммунофенотипирования бластных клеток костного мозга.

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЕТЕЙ С ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Показатели	Контрольная группа, (n = 30) Ме	Группа со злокачественными опухолями, (n = 12) Ме	Группа с доброкачественными опухолями, (n = 10) Ме
IgA, г/л	0,86 (0,75-1,09)	0,83 (0,57-0,97)	1,02 (0,94-1,04)
IgM, г/л	0,91 (0,70-1,44)	1,45 (0,96-1,63)	0,97 (0,85-1,35)
IgG, г/л	10,00 (9,00-12,50)	8,30* (5,90-8,60)	11,40 (10,60-13,00)
ЦИК, у. е.	31,00 (25,00-35,00)	26,50 (21,50-37,00)	21,00 (20,00-49,00)
CD3 ⁺ , %	62,00 (58,00-67,00)	62,00 (53,00-67,00)	65,00 (51,00-74,00)
CD4 ⁺ , %	38,00 (33,00-39,00)	33,00 (30,00-40,00)	38,00 (33,00-41,00)
CD8 ⁺ , %	37,00 (31,00-41,00)	35,00 (31,00-43,00)	37,00 (32,00-46,00)
CD19 ⁺ , %	15,00 (12,00-17,00)	26,00** (24,00-30,00)	21,00* (19,00-24,00)
CD16 ⁺ 56 ⁺ , %	22,00 (18,00-28,00)	12,00 (7,00-30,00)	16,00 (12,00-17,00)
HLA-DR ⁺ , %	9,00 (7,00-12,00)	7,00 (6,00-9,00)	5,00 (5,00-11,00)
CD25 ⁺ , %	17,00 (15,00-20,00)	28,00* (22,00-36,00)	27,00* (21,50-29,00)
CD95 ⁺ , %	32,50 (13,00-38,00)	21,00 (19,00-36,00)	13,00 (11,00-21,50)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,00 (0,85-1,20)	1,03 (0,85-1,17)	0,85 (0,81-1,24)

Примечание. * – различие с контролем статистически значимо ($p < 0,05$), ** – различие с контролем статистически значимо ($p < 0,005$).

ТАБЛИЦА 3. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПО ПЛОИДНОСТИ И ФАЗАМ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ В-ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Плоидность и фазы клеточного цикла	Контрольная группа, (n = 30) Me	Группа с В-ОЛЛ диплоидный, (n = 10) Me (%)	Группа с В-ОЛЛ анеуплоидный, (n = 6) Me (%)
Диплоидные, %	100	100	80,00** (63,60-93,00)
G1, %	99,89 (99,83-99,90)	99,00** (95,6 -99,40)	99,90 (99,80-100,0)
G2, %	0,02 (0,00-0,04)	0,10 (0,00-0,20)	0,10 (0,01-0,02)
S, %	0,10 (0,09-0,11)	0,90** (0,50-4,50)	0,00 (0,00-0,00)
CV	2,57 (2,29-2,83)	3,70* (2,60-4,40)	2,80 (2,70-3,5)
Анеуплоидные, %	0	0	20,00 (7,00-36,40)
G1, %	0	0	96,75 (95,80-98,50)
G2, %	0	0	0,00 (0,00-0,00)
S, %	0	0	3,80 (0,00-4,90)
CV	0	0	3,30 (2,60-3,80)

Примечание. * – различие с контролем статистически значимо ($p < 0,05$), ** – различие с контролем статистически значимо ($p < 0,001$).

В зависимости от плоидности клеток периферической крови больные с В-ОЛЛ были разделены на две группы: с диплоидным и анеуплоидным типом гистограмм.

Результаты ДНК-цитометрии у детей с В-ОЛЛ отражены в таблице 3. При диплоидном типе гистограмм были выявлены достоверные различия по количеству клеток в G1- и S-фазах клеточного цикла. Так, в фазе G1 находилось 99,00% клеток (в контрольной группе – 99,89%). Доля клеток в S-фазе составила 0,90%, в контроле – 0,10%. При анеуплоидии различия касались лишь количества диплоидных клеток, что составило 80,0%.

В группе с диплоидным типом гистограмм отмечалось снижение уровня IgG, во 2 группе достоверных различий с контролем по показателям гуморального звена не выявлено (табл. 4).

Показатели клеточного иммунитета в 1 группе характеризовались низким уровнем содержания общих Т-лимфоцитов (CD3⁺), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺), ЕКК (CD16⁺56⁺) и В-лимфоцитозом (CD19⁺). При анеуплоидии (2 группа) наряду с высоким уровнем В-лимфоцитов отмечался дефицит естественных киллерных клеток.

Корреляционные взаимосвязи между показателями иммунного статуса и ДНК-цитометрией клеток периферической крови.

Для изучения взаимосвязей между различными звеньями системы иммунитета и данными ДНК-цитометрии проведен корреляционный анализ (рис. 1).

В контрольной группе прямые взаимосвязи высокой степени интенсивности установлены между количеством диплоидных клеток, находящихся в G1-фазе, и количеством CD4⁺, CD25⁺ клеток, что, по-нашему мнению, отражает нормальное содержание ДНК в клетках-индукторах.

Исследованиями в области онкологии доказано, что цитотоксические Т-лимфоциты (CD8⁺), проникая через гематоэнцефалический барьер, вступают в непосредственный контакт с опухолевыми клетками, и течение злокачественного процесса зависит, наряду с прочими факторами, от уровня цитотоксической активности иммунокомпетентных клеток [Giometto B. et al., 1996; Perrini G. et al., 1999]. Корреляционная матрица в группе больных с опухолями головного мозга, отражающая обратную связь между цитотоксическими Т-лимфоцитами и способностью клеток к пролиферации, по нашему мнению,

ТАБЛИЦА 4. ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ В-ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Показатели	Контрольная группа (n = 30)	Группа с В-ОЛЛ диплоидный (n = 10)	Группа с В-ОЛЛ анеуплоидный (n = 6)
IgA, г/л	0,86 (0,75-1,09)	0,70 (0,60-0,70)	0,80 (0,70-0,80)
IgM, г/л	0,91 (0,70-1,44)	0,60 (0,50-0,60)	0,60 (0,60-1,10)
IgG, г/л	10,00 (9,00-12,50)	7,80* (6,00-8,40)	8,80 (7,40-9,20)
ЦИК, у. е.	31,00 (25,00-35,00)	34,00 (28,00-37,00)	35,00 (21,00-38,00)
CD3+, %	62,00** (58,00-67,00)	25,50** (9,00-54,00)	51,50 (37,00+73,00)
CD4+, %	38,00 (33,00-39,00)	25,50 (10,00-40,00)	41,00 (27,00-41,00)
CD8+, %	37,00* (31,00-41,00)	14,00** (10,00-27,00)	22,00 (18,00-35,00)
CD19+, %	15,00 (12,00-17,00)	61,00** (45,00-75,00)	63,00** (26,00-67,00)
CD16+56+, %	22,00* (18,00-28,00)	6,00* (3,00-7,50)	14,00** (8,00-15,00)
HLA-DR+, %	9,00 (7,00-12,00)	7,00 (3,00-65,00)	7,00 (6,00-10,00)
CD25+, %	17,00 (15,00-20,00)	22,00* (20,00-50,00)	15,50 (12,00-19,50)
CD95+, %	32,50 (13,00-38,00)	16,50 (9,00-25,50)	15,00 (14,00-20,00)

Примечание. * – различие с контролем статистически значимо (p < 0,05); ** – различие с контролем статистически значимо (p < 0,001).

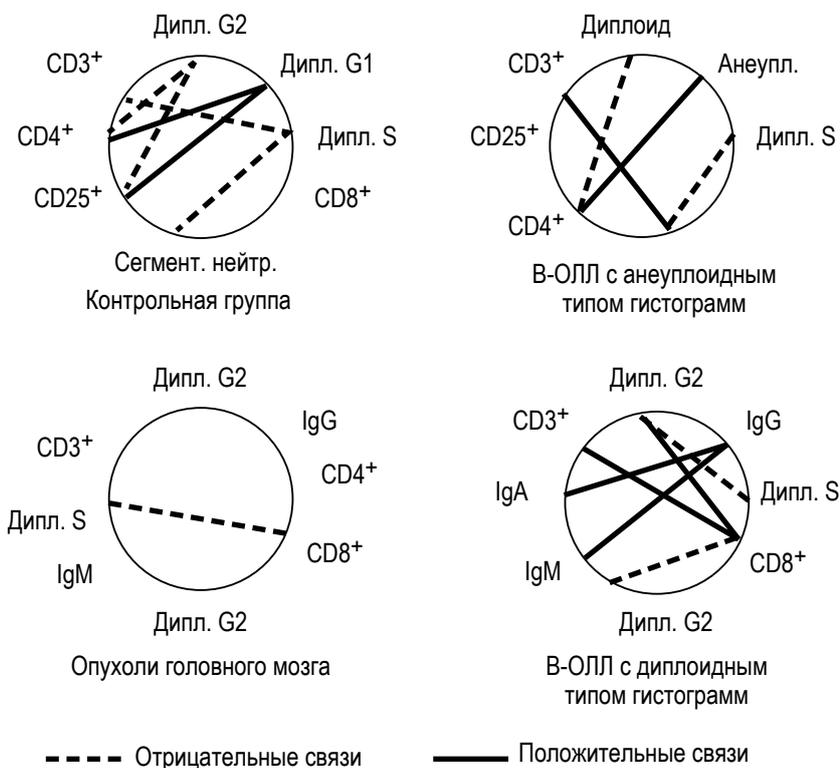


Рисунок 1. Корреляционные портреты обследованных групп

свидетельствует о неэффективности противоопухолевой защиты.

Анализ корреляционных взаимосвязей у больных с острыми лейкозами выявил различные типы межклеточной кооперации в зависимости от ploидности клеток. При диплоидном типе гистограмм наиболее выраженной ($r_s = 0,70$) была взаимосвязь между количеством клеток в G1-фазе и цитотоксическими Т-лимфоцитами (CD8⁺). Высокий уровень сопряженности между В-лимфоцитами и количеством клеток с анеуплоидией ($r_s = 0,81$) установлен во второй группе, что вполне логично, так как именно эта популяция подвержена неконтролируемой пролиферации при В-ОЛЛ.

Таким образом, прикладное значение проведенных комплексных исследований заключается в определении диагностических и прогностических возможностей ДНК – цитометрии клеток периферической крови и установлении взаимосвязей между иммунологическими показателями и функциональными характеристиками клеток у детей с онкологическими заболеваниями.

Изучение процессов, протекающих в иммунокомпетентных клетках, включающих определение ploидности и кинетики клеточного цикла, способствует оптимизации диагностики и лечения детей с различными заболеваниями. Результаты проведенных исследований, особенности ДНК-цитометрии периферической крови внесут свой вклад в формирование лабораторного перечня для характеристики функционального состояния клеток.

Список литературы

1. Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Хансон К.П. Иммунология опухолей: достижения и перспективы // Мед. иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 263.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М., 1999. – 495 с.
3. Имельбаева Э.А., Хайруллина Р.М., Медведев Ю.А. Методические указания к занятиям по иммунологии и серологии: учебно-методическое пособие для специалистов по кли-

нической лабораторной диагностике. – Уфа, 2004. – 87 с.

4. Поляков В.Е., Смирнова Т.Н., Цвильева М.В. Опухоли головного мозга у детей // Рос. мед. журнал. – 2001. – № 2. – С. 48-49.

5. Хаматдинова, З.Р. Иммунофенотипические варианты острых лейкозов в Республике Башкортостан // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Уфа, 2005. – 21с.

6. Хонина Н.А., Центнер М.И., Леплина О.Ю. Характеристика и механизмы иммунных нарушений у больных со злокачественными опухолями головного мозга // Вопросы онкологии. – 2002. – Т. 48, № 2. – С. 196-201.

7. Чернов В.М. Острый лимфобластный лейкоз у детей: конспект врача. – М., 2004. (Приложение к «Медицинской газете» от 08.09.04.) // www.kid.ru/pregnancy/index69.

8. Шмаров Д.А., Козинец Д.И. Протоочно-цитометрический анализ пролиферации гемопоэтических клеток. Методологические вопросы // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 8. – С. 16-18.

9. Perrini G., Schnuridger V., Quiguerel A.-L., Saas P. Astrocytoma infiltrating lymphocytes include major T cell clonal expansions confined to CD8 subset // Int. Immunol. – 1999. – Vol. 7. – P. 13-50.

10. Fabry Z., Raine C.S., Hart M.N. Nervous tissue as an immune compartment: the dialectic of the immune response in the CNS // Immunol. Today. – 1994. – Vol. 15. – P. 218-224.

11. Giometto B., Bozza F., Faresin F. Immune infiltrates and cytokines in gliomas // Acta Neurochir. (Wien). – 1996. – Vol. 138. – P. 50-56.

12. Manchini G. Immunological quantitation of antigens by single radial immunodiffusion / G. Manchini, A. Garbanaza, G. Heremans // Immunochemistry. – 1965. – Vol. 2, N 3. – P. 235-254.

поступила в редакцию 25.06.2009

отправлена на доработку 22.08.2009

принята к печати 30.09.2009