

ОНКОИММУНОЛОГИЯ, ГЕМОБЛАСТОЗЫ

EVOLUTION OF STRESS PROTEINS AS SPECIALIZED AGENTS OF IMMUNE SURVEILLANCE AND ANTI-TUMOR IMMUNITY

Jacques Robert, Vadim Khaychik, Shauna Marr, Heidi Morales, and Ana Goyos

University of Rochester Medical Center, NY 14642, USA

The unique ability of stress or heat shock proteins (hsps) such as hsp70 and gp96 to evoke potent anti-tumor immunity appears to rely on two main properties: (1) a peptide-dependent capacity to chaperone and elicit adaptive CTL responses against anti-IgEnic peptides, and a (2) a peptide-independent capacity to stimulate pro-inflammatory innate immune responses. The relationship and relative biological relevance of these properties are unclear. To evaluate the importance of hsps in immune response, we have developed a comparative tumor-immunity model in the frog *Xenopus*, a species whose evolutionary distance from mammals permits distinguishing species-specific adaptation or specialization from more fundamental and conserved features. This model includes: MHC identical but minor histocompatibility (H) anti-IgEn-disparate cloned frogs; MHC class Ia-negative tumors transplantable in these different *Xenopus* clones; and a larval immune system that is naturally class I-deficient.

We have shown that like mammalian hsps, *Xenopus* hsp70 and gp96 generates MHC-restricted thymus-dependent immunity *in vivo*. In addition, gp96, at least in *Xenopus*, is also able to elicit potent and specific immunity against a tumor that does not express class I molecules. Further characterization by *in vitro* killing assays and adoptive cell transfers reveals that whereas gp96 generates typical class Ia-restricted CTL against chaperoned minor H-anti-IgEn, it generates, against tumors, potent NK cells and tumor-specific class Ia-unrestricted cytotoxic CD8 T cells that may interact with non-classical class Ib molecules. Finally, in class Ia-deficient larvae, gp96 immunization generates an innate-type of anti-tumor immunity that is anti-IgEn-independent.

Overall our studies suggest that the interaction of hsps with the immune system is evolutionarily ancient and has diversified to stimulate a complex network of effectors.

Research support: R25-GM64133, RO1-AI-4401, R24-AI-0598030-01 from the NIH, MCB-0136536 from the NSF.

ЭВОЛЮЦИЯ БЕЛКОВ СТРЕССА КАК СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ФАКТОРОВ ИММУННОГО НАДЗОРА И ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА

Ж. Роберт, В.Хайчук, Ш.Марр, Х.Марлес, А.Гойос

Медицинский Центр Университета Рочестер, Нью-Йорк, США

Уникальная способность белков стресса или теплового шока (hsps), таких как hsp 70 и gp96 вызывать эффективный противоопухолевый иммунитет, по-видимому, ос-

нована на двух главных свойствах: 1) пептид-зависимой (пептид-опосредованной) способности сопровождать и вызывать адаптивный ответ цитотоксических Т-лимфоцитов на антигенные пептиды и 2) пептид-независимой способности стимулировать провоспалительный ответ. Взаимоотношения и биологическое значение этих свойств остаются не ясными. С целью изучения роли hsps в иммунном ответе, мы разработали сравнительную модель взаимодействия опухоли и иммунной системы у лягушек *Xenopus*. Эволюционная дистанция, отделяющая данный вид от млекопитающих, позволяет отличить видоспецифическую адаптацию от более консервативных и фундаментальных свойств. Эту модель составляют: идентичные по МНС, но различные по антигену малого комплекса гистосовместимости (Н) клонированные лягушки; Ia-отрицательные опухоли, трансплантируемые различным клоном лягушек *Xenopus*; иммунная система зародыша, обладающая естественным дефицитом антигенов класса I.

Нами установлено, что также, как и hsps млекопитающих, hsp70 и gp96 лягушек *Xenopus* вызывают рестриктированный по антигенам главного комплекса гистосовместимости тимус-зависимый иммунитет *in vivo*. Кроме того, gp96, по крайней мере, у лягушек *Xenopus* также способен вызывать эффективный специфический иммунитет против опухоли, не экспрессирующей молекулы класса I. Дальнейшие исследования методом киллинга *in vitro* и адаптивного переноса показали, что, в то время как gp96 генерирует типичные рестриктированные по Ia-антигенам цитотоксические Т-лимфоциты, в ответ на малые Н-антигены, он также генерирует противоопухолевые НК клетки и не рестриктированные по Ia-антигенам опухоеспецифические цитотоксические CD8⁺ Т-клетки, которые могут взаимодействовать с неклассическими молекулами класса Ia. И, наконец, у зародышей с дефицитом антигенов класса Ia иммунизация gp96 вызывает врожденный противоопухолевый иммунитет, который является антигеннезависимым.

В целом наши исследования показали, что взаимодействие с иммунной системой является эволюционно древним механизмом, который индуцирует сложную сеть эффекторных механизмов.

СОСТОЯНИЕ КИСЛОРОДЗАВИСИМОГО МЕТАБОЛИЗМА И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В НЕЙТРОФИЛАХ У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Борисова Е.В., Кратнов А.Е.

Государственная медицинская академия, Ярославль, Россия

Цель исследования – изучить состояние кислородзависимого метаболизма и антиоксидантной защиты в нейтрофилах у детей с острым лимфобластным лейкозом.

Материалы и методы. Обследовано 9 детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) в стадии клинико-лабораторной ремиссии в возрасте от 4 до 16 лет (средний

возраст 11 лет). Все дети прошли полный курс полихимиотерапии по программе ВФМ-90. Ремиссия была достигнута в декретированные сроки. Помимо клинического обследования, общего и биохимического анализа крови использовали спонтанный и индуцированный фитогемагглютинином тест с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) с нейтрофилами, определение уровней миелопероксидазы, глутатионредуктазы, каталазы, пероксида водорода в нейтрофилах, циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови. Группу сравнения составили 18 детей с дезагрегационной тромбоцитопатией в возрасте от 5 до 15 лет (средний возраст 11 лет).

Результаты. У детей с ОЛЛ было обнаружено более высокое содержание моноцитов ($9 \pm 2,9\% > 6 \pm 3\%$, $p=0,04$), и меньшее содержание нейтрофилов ($49,5 \pm 18,1\% < 61,1 \pm 11,2\%$, $p=0,04$) в периферической крови. При изучении цитохимических показателей у детей с ОЛЛ было выявлено достоверное снижение уровня каталазы в нейтрофилах ($457,6 \pm 360,7 < 803,9 \pm 359,5$ мкатал, $p=0,04$) на фоне повышения содержания ЦИК в сыворотке крови ($203,2 \pm 104,5 > 123,3 \pm 104,6$ ед.опт.пл., $p=0,04$). Данные изменения сопровождались более низкими показателями спонтанного НСТ-теста ($153,3 \pm 37,8 < 273,2 \pm 197,9$ нмоль восстановленного НСТ), уровня пероксида водорода ($0,1 \pm 0,1 < 0,2 \pm 0,1$ ед.опт.пл.), активности миелопероксидазы ($4,1 \pm 2,8 < 5,9 \pm 3,9$ у.е.). Вышесказанное свидетельствует о более низкой активности NADPH и NADH в нейтрофилах при ОЛЛ, которые используются не только для образования супероксидного анион-радикала, но и восстановления антиоксидантных ферментов. Поскольку снижение внутриклеточной концентрации NADPH и NADH в нейтрофилах связано с их коагуляционным некрозом, можно предположить, что снижение антиоксидантной защиты в клетках (прежде всего каталазы), является отражением их генерализованной деструкции.

Выводы. У больных с ОЛЛ в период индукции ремиссии наблюдается коллапс антиоксидантной защиты нейтрофилов периферической крови.

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ КЛОНАЛЬНОСТИ У ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Бутлицкий Д.А., Сипол А.А., Воробьева Ю.К.

СПб Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Введение. В настоящее время для диагностики и мониторинга лимфопролиферативных заболеваний (ЛПЗ) в основном используются иммунологические методы. Однако с применением интенсивных химиотерапевтических схем, изменяющих экспрессию поверхностных клеточных структур данный подход имеет некоторые ограничения. Альтернативой могут служить молекулярно-генетические методы.

Цель исследования. Целью настоящего исследования явилось разработка простого, информативного и воспроизводимого метода выявления клональности В- и Т-клеточного рецептора для подтверждающей диагностики и определения минимальной остаточной болезни у онкогематологических больных.

Материалы и методы: 50 образцов геномной ДНК от 36 онкогематологических больных, находящихся на разных стадиях заболевания (16 пациентов с ММ, 1 пациент с ХЛЛ, 5 пациента с НХЛ, 7 пациентов с ОЛЛ, 2 пациента с ОМЛ, 1 пациент с ХМЛ) и 4 здоровых доноров

(отрицательный контроль), были отобраны для исследования. С помощью ПЦР амплифицировались следующие участки ДНК: для ТКР- VJ-фрагмент гена TCR-гамма, для ВКР- VHCeFr3-J-фрагмент тяжелой цепи иммуноглобулина. Клональность выявлялась гетеродуплексным анализом электрофорезом в полиакриламидном геле.

Результаты. Среди больных с ММ у пятерых до начала лечения и у одного после с помощью данного метода была зарегистрирована моноклональная природа заболевания, что коррелировало с клинической картиной рецидива ММ. У шестерых пациентов определялись поликлональные ответы в пробах, что соответствовало клиническому выздоровлению после проведенного химиотерапевтического лечения и/или аутологичной трансплантации костного мозга. Предложенный метод был также опробован для исследования клональности в пробах больных с ХЛЛ, ОЛЛ и НХЛ. Было показано, что присутствие специфического клонального сигнала в области исследуемого фрагмента ДНК не только коррелировало, а иногда опережало клинические проявления рецидива заболевания, в дальнейшем подтвержденные по результатам биопсии. У двух больных с ОМЛ и у одного больного с ХМЛ с использованием этой методики клональный сигнал на прогрессию заболевания зарегистрирован не был.

Заключение. Таким образом, разработанная методика позволяет специфично определить клональную природу опухолевых клеток при лимфопролиферативных заболеваниях, проводить мониторинг состояния пациента, что в свою очередь позволяет повысить эффективность прогноза и проводимой терапии.

РОЛЬ СОВРЕМЕННЫХ АНЕСТЕТИКОВ В ПЕРИОПЕРАТИВНОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ И ОНКОПРОГРЕССИИ

Гариб В.Ф.

*Институт иммунологии университета Виттен/Хердеке (Германия);
ТашиУВ, Ташкент, Узбекистан*

Представления о рациональном и безопасном применении препаратов анестезии и аналгезии у онкологических больных претерпели значительные изменения в связи с определением влияния анестетиков на периоперативную иммуносупрессию, с чем связывают развивающиеся пост-операционные осложнения, в частности, развитие метастазов. Важным шагом в динамическом процессе инвазии и метастазирования опухолей является перемещение клеток через биологические барьеры под влиянием митогенов, в качестве которых могут выступать лекарственные препараты. Миграция лимфоцитов необходима для осуществления иммунного надзора. Препараты современной анестезии обладают разной способностью модулировать миграцию клеток опухоли и иммунной системы. Пропофол увеличивает число вовлеченных в миграцию клеток аденокарциномы молочной железы линии MDA-MB-468 и глиобластомы астроцитомы линии U373, скорость и дистанцию их передвижения, а также изменяет траекторию пройденного пути. Этомидат ускоряет миграцию спонтанно передвигающихся клеток линии MDA-MB-468, не оказывает влияния на миграционные параметры аденокарциномы толстого кишечника SW480, замедляет движение и уменьшает число мигрирующих

натуральных киллеров. Лидокаин обладает стимулирующим действием на миграцию клеток аденокарциномы молочной железы и толстого кишечника, в концентрации 2,5 µg/ml способствует стимуляции миграции лимфоцитов с фенотипом CD8⁺, изолированных из крови здоровых доноров. Анальгетик ремифентанил угнетает миграционную активность клеток линии MDA-MB-468. Сигнальный путь для осуществления анестетик-индуцированной миграции включает активацию GABA-A рецептора, изменения внутриклеточной осцилляции кальция и реорганизацию F-актина. Инфлюкс кальция опосредован активацией вольтаж-чувствительного кальциевого канала L-типа и может быть угнетен блокатором верапамилом.

МЕСТНОЕ И СИСТЕМНОЕ ИММУНОБИОТИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКА ВИТАФЛОРА ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ MALT- ЛИМФОМАМИ

Гершанович М.Л., Петров Л.Н., Добрица В.П., Добролеж О.В.

ГУН НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова МЗСР,
ГосНИИ особо чистых биопрепаратов,
Санкт-Петербург, Россия

MALT-лимфома (Mucosal-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma или, ассоциированная со слизистой и лимфоидной тканью, лимфома) является злокачественной опухолью из группы неходжкинских лимфом, отличающихся медленным течением, но с потенцией перехода в более агрессивные формы типа диффузной В-крупноклеточной лимфомы и, соответственно, фатальным исходом. Чаще всего MALT-лимфома поражает слизистую желудка (до 90% больных) и гораздо реже другие органы и ткани – конъюнктиву, слезные и слюнные железы, молочную железу, легкие, щитовидную железу и тимус. Представляется важным доказанный факт этиопатогенетической связи MALT-лимфомы желудка с инфекцией *Helicobacter pylori* (Hr), обнаруживаемой в 72-98% случаев. Стандартизированным методам эрадикационной терапии не поддаются 20-30% больных MALT-лимфомой желудка, которым тогда показаны хирургическое вмешательство, лучевая терапия (если они выполнимы) или терапия цитостатиками. Даже при полной регрессии MALT-лимфомы желудка в результате эрадикационной терапии у 20% больных возникают рецидивы в течение последующих первых шести месяцев.

В собственных динамичных наблюдениях больных MALT-лимфомой желудка выбирали с верифицированной гистологически по данным биопсии при производстве фиброгастроскопии (ФГС) с использованием иммуногистохимических исследований, и в случае положительных тестов на Hr (уреазный тест, дыхательный тест, хелик-тест при ФГС, обнаружение Hr в биоптатах).

Проведены клинические исследования по определению эффективности собственного метода в двух группах 12 больных с MALT- лимфомами желудка. Все больные до начала лечения имели положительные тесты на Hr. В первой группе таких пациентов (6 человек); больные получали обычную стандартную анти-Hr – эрадикационную терапию с применением антибиотиков, омепразола, коллоидного висмута, метронидазола, а вторая группа больных получала только витафлор по оригинальной методике применения. В результате регрессия опухоли и только частично после трех – четырех циклов эрадикации по описанной 4-компонентной схеме была протоколно зарегистрирована в комплексном клинико-лабораторном обследовании у 4 человек из 6 (это 67%). Во второй группе больных при монотерапии витафлором по описанной методике полная регрессия опухоли была отмечена у всех больных (100% эффективность), в том числе и при сочетанных с язвами формами заболеваний с полным исчезновением дефекта слизистой (язвы желудка были диаметром от 1 до 4 см до начала лечения витафлором).

Указанную эффективность витафлора отмечали спустя 2-4 мес от начала лечения при мониторинге пациентов путем ФГДС и постановкой повторных тестов на Hr. Возбудитель Hr у больных с регрессией опухоли не был обнаружен в течение последующих 6 мес наблюдения за такими больными из второй группы (монотерапия витафлором), а у пациентов из первой группы спустя 2 мес после традиционной терапии вновь отмечали Hr.

Рецидивы Hr-инфекции в контрольной группе выявлены у 3 больных из 6 (50%), а в группе пациентов, получавших витафлор – у 1 больного из 6 (16,7%). Следует особо отметить, что побочных эффектов от проведенных курсов лечения витафлором не наблюдали, а в группе больных, леченных по стандартной традиционной схеме эрадикации Hr отмечали развитие дисбактериозов и сопряженных с ним симптомов у всех 6 из 6 наблюдавшихся пациентов (100%). Механизмы прямого и опосредованного терапевтического действия:

- выраженное прямое антагонистическое воздействие лактоцинов на рост и размножение Hr;
- непосредственное цитостатическое действие лактобактерий на опухоль;
- усиление цитостатического действия макрофагов и CD8⁺ Т-клеток;
- индукция неспецифической локальной воспалительной реакции и опосредованно усиленный иммунный ответ на опухоль;
- стимуляция синтеза цитокинов и инициация клеточного апоптоза;
- усиление специфического иммунного ответа на определенные опухолевые маркеры и подавление полиферации опухолевых клеток.

СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ТИПА ОПУХОЛИ

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

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

Доказано, что от гистологической структуры рака легких зависит скорость роста опухоли, переход на стадию метастазирования и, соответственно, прогноз заболевания. Рост опухоли сопровождается развитием иммунологической недостаточности. Причем, механизмы, определяющие иммунодефицит, до сих пор не определены. Предполагается, что поскольку мелкоклеточный рак развивается из нейроэктодермальных клеток, то нередко выявляется секреция ряда гормонов: адре-

нокортикотропного гормона, пролактина, вазопрессина, паратгормона и др. Целью исследования явилось изучение иммунного статуса и фенотипического состава лимфоцитов в лимфоузлах корня легкого у больных раком легкого в зависимости от гистологического типа опухоли.

На базе торакального отделения Красноярского краевого онкологического центра обследовано 127 больных мужского пола с раком легкого в возрасте 30 – 55 лет. Кровь на исследование забиралась на следующий день после поступления. Всем больным выполнены операции: расширенные лоб-, билоб- и пульмонэктомии. Лимфоузлы корня легкого забирались во время операции. В качестве контроля обследовано 106 здоровых мужчин аналогичного возраста. Фенотипический состав лимфоцитов крови и лимфоузлов оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. Концентрацию иммуноглобулинов класса А, М, G в сыворотке крови определяли методом иммунодиффузии.

При исследовании величин показателей клеточного иммунитета у больных мужчин в зависимости от гистологической структуры рака легкого обнаружено, что наиболее характерные особенности выявляются у больных мелкоклеточным раком легкого. Так, только у больных данной группы как относительно контрольного диапазона, так и параметров больных мелкоклеточным раком снижена относительная концентрация CD8⁺-лимфоцитов и повышен абсолютный уровень CD16⁺-клеток. Независимо от гистологии рака легкого у больных снижена процентная концентрация CD3⁺- и относительный и абсолютный уровень CD4⁺-клеток. У больных мелкоклеточным раком относительно контрольного диапазона и показателей больных с аденокарциномой легкого снижена абсолютная концентрация CD8⁺-клеток. В то же время, у больных ПКР относительно диапазона выявляемого у больных аденокарциномой также снижен абсолютный уровень CD8⁺-клеток. Особенность мелкоклеточного рака является повышение сывороточной концентрации IgA у больных ПКР и аденокарциномой. В то же время, уровень IgM в сыворотке крови у больных ПКР и аденокарциномы статистически достоверно повышен относительно контрольных величин (причем, у больных аденокарциномой более выраженное увеличение концентрации), тогда как у больных мелкоклеточным раком легкого выявляется выраженное снижение содержания данного класса иммуноглобулина относительно контрольного диапазона и значений показателя больных мелкоклеточным раком. Изучение фенотипического состава лимфоцитов в лимфоузлах корня легкого у больных мужчин позволило обнаружить статистически достоверное повышение содержания CD16⁺-лимфоцитов у больных аденокарциномой и увеличение величины иммунорегуляторного индекса у больных мелкоклеточным раком легкого.

Таким образом, у больных раком легкого выявляется иммунодефицитное состояние, характеризующееся недостаточностью Т-клеточной системы и гуморального иммунитета. При этом, в зависимости от гистологического типа рака легкого выявляются особенности иммунного статуса. У больных мелкоклеточным раком легкого в крови выявляется наиболее выраженная недостаточность популяционного и субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, но при повышении содержания NK-клеток. Кроме того, у больных данной группы более выражено по срав-

нению с показателями больных мелкоклеточным раком содержания В-лимфоцитов, но выявляется дисбаланс основных классов иммуноглобулинов. Особенностью в фенотипическом составе иммунокомпетентных клеток в лимфоузлах корня легкого является повышение величины иммунорегуляторного индекса, с проявлением зависимости его величины и концентрации Т-хелперов/индукторов от размера опухоли. Иммунный статус у больных мелкоклеточным раком в меньшей степени зависит от гистологии опухоли. В то же время, величины показателей иммунной системы у больных ПКР в большей степени, чем у больных аденокарциномой зависят от размера опухоли.

ИММУННЫЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ НЕКОТОРЫМИ ФОРМАМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОМ

Долгополова Е.В., Никитин В.Ю., Цыган В.Н.

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

Среди злокачественных лимфом (ЗЛ) в странах Европы наиболее распространенными являются такие виды лимфом, как фолликулярная (ФЛ), диффузная крупноклеточная В-клеточная (ДККЛ), хронический В-клеточный лимфоцитарный лейкоз (В-ХЛЛ), лимфома Ходжкина (ЛХ). Частота их встречаемости превышает 70% порог в общем количестве ЗЛ, а уровень смертности один из самых высоких среди онкологических больных молодого возраста.

Сложный характер реакций, разнородность исследований и методических подходов являются причинами отсутствия до настоящего времени достоверного банка данных о патогенезе заболевания, его динамике, общих закономерностях и особенностях каждой формы ЗЛ, что является необходимым условием для разработки адекватных методов терапии опухолей, в том числе и вышеуказанных. До сих пор не обоснованы наиболее информативные количественные показатели, характеризующие изменения иммунитета у онкологических пациентов, что не позволяет однозначно определить вклад нарушений иммунной системы в патогенез заболевания, осуществлять правильную диагностику и лечение.

В связи с указанными обстоятельствами проблема комплексной оценки иммунного статуса с помощью количественных критериев у больных с наиболее часто встречающимися в странах Европы видами ЗЛ является чрезвычайно актуальной.

Цель исследования. Установить наиболее типичные нарушения иммунного статуса у больных некоторыми формами злокачественных лимфом и определить их диагностическую значимость.

Материалы и методы. Обследовано 110 первичных больных с ЗЛ: 30 – с ЛХ II и III стадий, и 80 – с неходжкинскими лимфомами из зрелых В-клеток (В-НХЛ II и III стадий: 29 человек с ФЛ 1-2, 3 типов, 25 – с ДККЛ, 26 – с В-ХЛЛ 0, 1, 2 стадий). Контрольную группу составили 32 практически здоровых донора.

Комплексное иммунологическое исследование крови состояло из определения показателей Т-клеточного (CD3, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD16⁺56⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, PTМЛ-тест) и гуморального (CD19, CD3-CD25⁺, CD3-HLA-DR⁺, IgM, IgG, IgA, IgE, ЦИК) иммунитета, а также факторов неспецифической защиты организма (CD3-CD16⁺56⁺,

НСТ-тест, ЛКТ, С3, С4, С5, С3а, С5а, С1-инг, общий IFN, IFN α , IL1- β , IL-4, IL-6, TNF α).

Основные результаты и выводы. В ходе исследования были получены следующие результаты:

1. Иммунный статус больных злокачественными лимфомами характеризуется полиморфизмом показателей иммунной системы. Для первичных больных с В-НХЛ и ЛХ характерно низкое относительное содержание CD3 $^{+}$ -, CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ -, CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ -лимфоцитов в крови, за исключением ФЛ 1-2 типа. В-НХЛ характеризуются достоверно более высоким содержанием CD19 $^{+}$ -клеток, а также CD25 $^{+}$ - и HLA-DR $^{+}$ -лимфоцитов по сравнению с ЛХ.

2. Компенсаторной реакцией на недостаточность Т-клеточного звена иммунитета у первичных больных ДККЛ является активация гуморального звена, системы NK и нейтрофилов, а также повышенные уровни IL-1 β , IL-6, TNF α в сыворотке крови.

3. В отличие от ФЛ 1-2 типа для 3 типа характерно более высокое содержание CD19 $^{+}$ -, CD25 $^{+}$ -лимфоцитов, моноцитов, IL-1 β в крови на фоне низкого числа CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ -клеток.

4. Ранние стадии В-ХЛЛ характеризуются выраженным Т-клеточным иммунодефицитом на фоне нормального состояния гуморального звена иммунитета и функциональной активности нейтрофилов.

5. Для первичных больных ЛХ характерно наличие иммунодефицита смешанного типа, проявляющегося в изменении спектра показателей Т-клеточного (количественные и качественные изменения субпопуляций Т-клеток) и гуморального (пониженное содержание CD19 $^{+}$ -лимфоцитов, поликлональная стимуляция В-клеток) звеньев иммунитета, и факторов неспецифической резистентности; при наличии В-симптомов уменьшение количества Т-ЦТЛ и В-лимфоцитов в крови имеет более выраженный характер.

6. У больных ЛХ в ходе полихимиотерапии происходит временное усугубление имеющихся нарушений Т- и В-звеньев иммунитета. При этом показатели гуморального звена иммунитета и факторов неспецифической резистентности восстанавливаются в течение первого года после терапии, а признаки недостаточности Т-клеточного звена иммунитета сохраняются на протяжении двух лет.

РОЛЬ НЕКОТОРЫХ ОНКОБЕЛКОВ В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Заботина Т.Н.

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

Нормальная дифференцировка гемопоэтических клеток представляет собой перманентный процесс, в ходе которого некоторые этапы протекают очень быстро, а соответствующие типы клеток представлены в ничтожно малых количествах. Клетки лимфоидного ряда в незрелом состоянии покидают костный мозг и мигрируют в лимфатические узлы, селезенку (В-клетки) и тимус (Т-клетки), где осуществляется их дальнейшая дифференцировка и селекция, и лишь затем начинают циркуляцию в периферической крови. В норме высокая пролиферативная активность коммитированных предшественников гемопоэза перекрывается физиологической гибелью – апоптозом их избыточного и недифференцирующегося потомства, а возможно, и самих ро-

дональных клеток. Кроме того, в периферических лимфоидных органах на антигензависимой стадии дифференцировки В-лимфоцитов большинство клонов с низким аффинитетом к антигену погибают по механизму апоптоза. В процессе созревания большинство Т-клеток на тимическом (кортикальные и медулярные тимоциты) этапе дифференцировки лимфоидных клеток также элиминируются путем апоптоза.

Целью данной работы явилось изучение особенностей экспрессии белков, регулирующих апоптоз, Bcl-2, Bax, P53, Ki-67, рецепторов CD95 и CD243 на различных этапах дифференцировки лимфоидных клеток человека.

Материалы и методы. В качестве источника клеток использовали тимус детей (n=8), подвергшихся открытым операциям на сердце, лимфатические узлы (n=5), удаленные с профилактической целью и мононуклеары периферической крови (ПК) новорожденных детей (n=7) и взрослых доноров (n=30). Применялся многопараметровый проточно-цитофлуориметрический анализ поверхностных антигенов и внутриклеточных онкобелков на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

Результаты. Анализ экспрессии CD95 на CD45 $^{+}$ /CD14 $^{-}$ лимфоцитах (ПК) взрослых доноров показал, что антиген представлен в широком диапазоне – от 35 до 75% (M= 63,3 $\pm$ 12,6). Субпопуляционный анализ CD45 $^{+}$ лимфоцитов выявил, что 40-60% зрелых CD3 $^{+}$ Т-клеток несут на своей поверхности антиген CD95, в то время как все CD19 $^{+}$ В-лимфоциты коэкспрессируют CD95. Аналогичный анализ (ПК) новорожденных детей (от 2 дн. до 1 мес.) показал, что лимфоидные CD45 $^{+}$ /CD14 $^{-}$ клетки отрицательны по CD95. В то же время лимфоциты детей 4-5 лет экспрессируют антиген CD95 на уровне показателей взрослого человека. Экспрессия CD95 на тимоцитах варьировала от 8,7% до 35,2%, (M=28,7 $\pm$ 17,3%) AG $^{+}$ клеток. При изучении коэкспрессии CD95 на CD3 $^{+}$ timoцитах оказалось, что основной пул клеток является отрицательным, однако определялась минорная (около 3%) субпопуляция CD3 $^{+}$ timoцитов, несущих на своей поверхности антиген CD95. Уровень CD 243 на лимфоидных CD45 $^{+}$ /CD14 $^{-}$ клетках (ПК) составил 7,3 $\pm$ 2,1%. Субпопуляционный анализ выявил, что CD3 $^{+}$ /CD45 $^{+}$ /CD14 $^{-}$ Т-клетки являются негативными, в то время как все CD19 $^{+}$ /CD45 $^{+}$ /CD14 $^{-}$ В-лимфоциты экспрессируют на своей мембране функционально-неактивный CD243. От 10-30% Т-клеток тимуса слабо экспрессируют поверхностный белок CD243. Кроме того, до 98% тимоцитов с фенотипами CD4 $^{-}$ CD8 $^{+}$, CD4 $^{-}$ CD8 $^{-}$, CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ имели Bcl-2, в то время как клетки с фенотипом CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ в меньшей степени экспрессировали Bcl-2, а часть их оказалась отрицательной. Уровень экспрессии Bcl-2 в CD19 $^{+}$ Ki-67 $^{+}$ В-клетках лимфатических узлов составил от 12 до 28,3% и имел бимодальный характер гистограммы распределения окрашенных клеток. Митохондрии большинства Ki-67 $^{+}$ CD19 $^{+}$ В-клеток л/узлов экспрессировали Bcl-2 белок, а уровень его экспрессии составил 78-93%.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ И ОПУХОЛЕВЫЙ ИММУНИТЕТ

Кадагидзе З.Г., Славина Е.Г., Чертова А.И.

*ГУ Российский Онкологический Научный центр
им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия*

Иммунная система, обладающая способностью отвечать на антигенные стимулы, обладает в равной сте-

пени и мощными механизмами, регулируемыми форму, выраженность и продолжительность этого ответа. При этом ключевой проблемой иммунологии является понимание того, как иммунная система отличает «свое» от «чужого». Известно, что многие аутореактивные Т-клеточные клоны с низким или средним аффинитетом избегают внутрилимфатической гибели и попадают на периферию, где в ответ на аутоантигены могут подвергаться активации, пролиферации и дифференцировке в потенциально патогенные эффекторные клетки. Помимо прямой аутоиммунной атаки иммунная система может также в процессе ответа на чужеродные антигены или опухолевые клетки индуцировать, так называемое, «коллатеральное» (параллельное) поражение нормальных, неинфицированных соседних клеток. Для предупреждения этих иммунологически обусловленных патологических процессов в организме существует сложная сеть взаимодействующих регуляторных периферических механизмов. Эти механизмы включают в себя как внутренние, непосредственно связанные с антигенной активацией и дифференцировкой Т-клеток, так и обусловленные действием регуляторных (супрессорных) Т-клеток (Трег). К настоящему времени накоплен огромный материал о том, что различные субпопуляции Трег: CD4⁺, CD8⁺ а также NKT клетки, играют существенную роль в контроле аутоиммунных процессов, а также иммунных ответов на аллотрансплантаты, аллергены, инфекционные агенты и опухолевые клетки. Важно отметить, что различные субпопуляции Трег экспрессируют разные рецепторы, используют разные эффекторные механизмы и функционируют на разных стадиях иммунного ответа. Среди CD4⁺ Т-лимфоцитов существует, по крайней мере, 3 различных типа клеток, обладающих супрессорной активностью: естественные CD4⁺CD25⁺ Т клетки, Трег 1 типа (Tr1) и Th3 клетки. Естественные CD4⁺CD25⁺ Трег продуцируются тимусом как функционально зрелая Т-клеточная субпопуляция. Они постоянно экспрессируют на своей поверхности ряд молекул, которые обнаруживаются также на активированных клетках или клетках памяти: CD25, CD45RB^{low}, CD62L, CD103, CTLA-4, GITR. Обнаружение специфических маркеров, характерных только для естественных CD4⁺CD25⁺ Трег будет иметь огромное значение для прогресса в исследованиях этих клеток. Недавно было показано, что Neutropilin-1 постоянно экспрессируется на естественных Трег, в то же время его экспрессия снижена на активированных Т-клетках. В соответствии с современными данными, важнейшим регуляторным геном, необходимым для развития и функционирования естественных Трег, является транскрипционный фактор FOXP3, который не обнаруживается в активированных Т-клетках или ЕК-клетках. Другие типы Трег могут быть индуцированы из наивных Т-клеток в процессе антигенной стимуляции в определенных условиях. Супрессорная функция Трег может осуществляться как с помощью растворимых факторов, так и зависеть от непосредственного контакта с клетками-эффекторами.

Экспериментальные и клинические исследования показали, что CD4⁺ Трег играют важную роль в регулировании иммунологического ответа на опухоль. Они могут подавлять пролиферацию опухолеспецифических цитотоксических Т-клеток, используя оба механизма супрессии. Было обнаружено достоверное повышение количества Трег в периферической крови, а

также в опухолевой ткани, больных с различными вариантами опухолей: рак легкого, опухоль яичников, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак желудка, рак поджелудочной железы и т.д. Процентное содержание CD4⁺CD25⁺CD45RA⁻ Т-клеток в периферической крови онкологических больных в 2,5 раза выше, чем у здоровых доноров. Супрессорная активность этих клеток была подтверждена также и в функциональных тестах. Изучение механизмов функционирования Трег, взаимоотношения между регуляторными Т-клетками и их мишенями, определение специфических маркеров клеток-супрессоров имеет большое значение для развития эффективной иммунотерапии опухолей.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НК-КЛЕТОК С ОСНОВНЫМИ ПРОГНОСТИЧЕСКИМИ КРИТЕРИЯМИ РАКА ТЕЛА МАТКИ

**Калинина Н.М., Дмитриева И.Б.,
Давыдова Н.И., Бычкова Н.В.,
Чиненова Л.В., Новикова Е.Н.**

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

Актуальность. При раке тела матки (РТМ) особый интерес вызывают факторы естественной резистентности организма, в частности эффекторная функция естественных киллерных клеток (НК-клеток). Однако, данная функция рестриктирована многими другими параметрами, как самой НК-клетки, так и ее мишени. Особенностью эффекторной активности НК-клеток является отсутствие связи с распознаванием антигенных детерминант.

Основными классическими прогностическими критериями РТМ являются: степень дифференцировки ткани аденокарциномы, глубина инвазии новообразования в эндометрий и стадия процесса. По данным литературы выявлены и другие прогностически значимые критерии течения онкологических заболеваний, как-то уровень экспрессии про- и противоапоптотических белков в клетках опухоли, экспрессия CD95 антигенов, а также степень кариотипической гетерогенности опухолевых клеток. Исследования параметров врожденного иммунитета становятся все более актуальными ввиду доказанных механизмов взаимодействия иммунокомпетентных клеток с клетками опухоли.

Цель исследования — оценить взаимосвязь цитотоксической активности НК-клеток и их количественных характеристик с основными прогностическими критериями аденокарциномы эндометрия, степенью кариотипической гетерогенности, а также уровнем экспрессии клетками аденокарцином проапоптотических и противоапоптотических маркеров.

Материалы и методы. В исследование были включены 41 пациент с РТМ I стадии и 15 женщин группы сравнения, не отличавшихся по возрасту и соматической патологии. В группе пациентов средний возраст составил 66±6,9 лет, который достоверно не отличался от группы сравнения. Всем пациентам после проведения оперативного вмешательства диагноз был подтвержден гистологически. Предметом изучения явились лимфоциты периферической крови, супернатанты клеток периферической крови, свежий послеоперационный материал (ткань аденокарциномы).

Фенотипирование мононуклеаров и клеток аденокарцином осуществляли с применением проточной цитометрии, с использованием одно- и двухпараметрических флуоресцентных меток. Определение уровней цитокинов проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа с применением пероксидазы хрена в качестве индикаторного фермента. Спонтанная и индуцированная цитотоксическая активность, степень кариотипической гетерогенности определялись методом проточной ДНК-цитометрии. При исследовании индуцированной цитотоксической активности в качестве индуктора эффекторной функции НК-клеток использовался IL-2 (фармакопейный препарат Ронколейкин).

Основные результаты исследования. Выявлены высоко достоверные умеренные корреляционные взаимосвязи изученных параметров с классическими критериями прогноза РТМ. Из исследованных параметров обратно коррелировали с классическими прогностическими критериями РТМ спонтанная цитотоксическая активность НК клеток, количество лимфоцитов, инфильтрирующих аденокарциному, нормальное содержание ДНК в клетках аденокарциномы, уровень спонтанной продукции IL-2. Прямые корреляционные взаимосвязи были выявлены между классическими прогностическими признаками и уровнем экспрессии bcl-2, уровнем спонтанной продукции IL-8, анеуплоидным содержанием ДНК в клетках аденокарцином. Данные исследования спонтанной цитотоксической активности НК-клеток, уровней продукции IL-2, IL-8 и TNF α могут быть использованы в качестве критериев прогноза и течения РТМ еще в дооперационном обследовании. Индукция цитотоксической активности НК-клеток препаратом IL-2 позволяет оценить максимальную эффекторную способность НК клеток в момент исследования. Мониторинг этих показателей в послеоперационном периоде позволит оптимизировать комплексную терапию.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ДИНАМИКЕ У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ АЛЛОГЕННУЮ ТРАНСПЛАНТАЦИЮ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

Комарова Л.С., Куртова А.В.,
Зуева Е.Е., Витрищак А.А.,
Молчанова И.В., Зубаровская Л.С.,
Афанасьев Б.В., Тотолян Арег А.

Санкт-Петербургский Государственный
Медицинский Университет им. акад. И.П. Павлова,
Санкт-Петербург, Россия

Введение. При онкогематологических заболеваниях целью аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является восстановление нормального гемопоэза пациента нетрансформированными клетками донора. После проведения трансплантации в организме реципиента формируется гемопоэтическая химера, длительное существование которой должно привести к восстановлению иммунной и кроветворной систем реципиента за счет клеток трансплантата. После успешной ТГСК в тканях и органах реципиента функционируют популяции клеток крови донорского происхождения. Представленность различных популяций лимфоцитов в периферической крови и их активность позволяют получить представление о суммарном ответе иммунной системы на аллоантигены и инфекционную

нагрузку в посттрансплантационный период. В настоящее время существует очень ограниченное количество работ отечественных и зарубежных авторов, посвященных оценке состояния иммунной системы до и после проведения аллогенной трансплантации для прогнозирования и оценки приживления трансплантата, риска развития РТПХ и вероятности развития рецидива злокачественного заболевания.

Цель: определение функционального состояния иммунной системы в динамике у пациентов, перенесших аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток периферической крови (ПК) и/или костного мозга (КМ).

Материалы и методы. В исследование включены данные по 40 пациентам, которым была проведена аллогенная ТГСК ПК (31) или КМ (9) в связи с онкогематологическими заболеваниями: острый лимфобластный лейкоз (22), острый миелобластный лейкоз (8), хронический миелоидный лейкоз (6), неходжкинская лимфома (1), болезнь Ходжкина (2), гиперэозинофильный синдром (1). Подготовка к ТГСК была проведена по миелоаблативному (26) и немиелоаблативному (14) режимам кондиционирования. Родственная ТГСК выполнена 15 пациентам, неродственная – 25 пациентам. Мобилизация ГСК ПК доноров была реализована подкожным введением рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (Г-КСФ) 10 мкг на кг массы тела в течение 4-5 дней. Сбор ГСК периферической крови выполнен методом афереза мононуклеаров с помощью сепаратора Cobe Spectra 5.0. Содержание ГСК (CD34⁺CD45⁺) определено по протоколу ISHAGE на проточном цитометре DAKO Galaxy (Дания). Среднее количество ГСК, инфузировавшихся пациентам, составило $8,6 \pm 6,2 \times 10^6$ на кг массы тела реципиента. Определение концентрации основных классов иммуноглобулинов А, М, G осуществлено методом иммуноферментного анализа.

Периферическая кровь для иммунологического обследования была получена до проведения трансплантации и начала кондиционирования на день -7 (Д-7) и в посттрансплантационный период на дни +30, +50, +100 и +1 год. Обработка результатов была проведена с помощью программы STATISTICA 6.0. При проведении попарного сопоставления относительного содержания популяций лимфоцитов до проведения режима кондиционирования и трансплантации и после проведения трансплантации приведены данные при $p < 0,05$.

Результаты. Относительное содержание CD3⁺CD19⁻ Т-лимфоцитов после проведения режима кондиционирования и трансплантации снижается по сравнению с исходным, но восстанавливается до нормальных значений уже к 50 дню после ТГСК. Количество цитотоксических лимфоцитов CD4⁺CD8⁺ после проведения трансплантации снижается (на 30 день), а затем возрастает в 2 раза к 100 дню после ТГСК. Количество Т-лимфоцитов хелперов CD4⁺CD8⁻ после проведения трансплантации на Д +30, +50 и +100 снижается и не восстанавливается до значений, полученных до начала режима кондиционирования на день -7. Популяция натуральных киллеров CD3⁺(CD16⁺56⁺)⁺, наоборот, к 30 дню возрастает по сравнению с днем до начала режима кондиционирования и снижается только к 100 дню. Особое внимание обращает изменение содержания В-лимфоцитов CD3⁺CD19⁺. До проведения трансплантации уровень В-лимфоцитов у всех пациентов снижен по сравнению с популяционной нормой. Относительное содержание В-лимфоцитов CD3⁺CD19⁺

достоверно отличается при сравнении Д-7 и Д+30. В течение всего периода наблюдения не было выявлено достоверного изменения содержания основных классов иммуноглобулинов А, М и G.

При сравнении содержания лимфоцитов до проведения кондиционирования с Д+30 выявлены различия по Т-лимфоцитам и Т-хелперам. При сравнении данных Д-7 с Д+50 выявлены достоверные различия по натуральным киллерам и активированным Т-лимфоцитам. При сравнении содержания лимфоцитов до проведения режима кондиционирования с Д+100 выявлены различия только по цитотоксическим лимфоцитам и иммунорегуляторному индексу. При попарном сравнении содержания основных популяций лимфоцитов Д+30 с Д+50 после проведения трансплантации выявлены достоверные различия по цитотоксическим Т-лимфоцитам, неактивированным Т-лимфоцитам и иммунорегуляторному индексу. При сравнении Д+30 с Д+100 выявлены различия по цитотоксическим Т-лимфоцитам, Т-лимфоцитам с фенотипом CD3⁺(CD16⁺CD56)⁺ и иммунорегуляторному индексу.

Заключение: В динамике аллогенной ТГСК наблюдается изменение содержания основных популяций лимфоцитов. Суммарная представленность Т-лимфоцитов в динамике не является отражением сохранности (восстановления) Т-клеточного ростка, поскольку у пациентов преобладают цитотоксические Т-лимфоциты, в то время как относительное содержание Т-хелперов резко снижено. В результате сравнения содержания лимфоцитов до проведения режима кондиционирования с Д+30 выявлены различия по Т-лимфоцитам, в том числе, по Т-хелперам; содержание цитотоксических Т-лимфоцитов меняется постепенно, но только в сторону увеличения. В первые сто дней после ТГСК В-лимфоциты не были выявлены у подавляющего большинства пациентов. Успешность проведения ТГСК во многом зависит от режима кондиционирования и восстановления иммунной системы в посттрансплантационный период.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ ИММУННОГО СТАТУСА БОЛЬНЫХ ЛИМФОГРАНУЛЕМАТОЗОМ НА ЭТАПАХ ЛУЧЕВОЙ И ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ

Кузьмина Е.Г., Жиганова С.В., Шахтарина С.В.

*Медицинский радиологический научный центр
РАМН, Обнинск, Россия*

Введение. Для статистического анализа признаков, описывающих состояние иммунитета на этапах лечения лимфогранулематоза (первичные больные, после полихимиотерапии, ПХТ, после лучевого лечения, ЛТ, при ремиссии и рецидивах), был применен метод главных компонент. На основе построения корреляционной матрицы и анализа весовых нагрузок для двадцати двух показателей иммунитета для дальнейшего анализа были отобраны наиболее информативные из них, которыми оказались абсолютные количества ($\cdot 10^9$ кл/л): лейкоцитов, CD4⁺Т-хелперов/индукторов, CD8⁺Т-цитотоксических лимфоцитов, CD19⁺В-клеток, CD16⁺ естественных киллеров, CD3⁺HLADR⁺ активированных Т-клеток, а также уровни сывороточных иммуноглобулинов М, G, А-классов, функция фагоцитов. В качестве обобщенных показателей состояния иммунитета были выбраны четыре первые главные компоненты, полученные при обработке корреляционной матрицы десяти иммунологических парамет-

ров, описывающие около 70% информации. Были получены средние значения и стандартные отклонения для каждой группы больных для четырех главных компонент. Их сравнение по критерию Стьюдента выявило достоверное различие групп: доноры – первичные больные, ЛТ – первичные больные, ПХТ – первичные больные, ПХТ – ЛТ, ремиссия – рецидив, ремиссия – доноры, рецидив – доноры.

Целью настоящей работы явилось построение обобщенного показателя состояния иммунитета по четырем главным компонентам, используя множественный регрессионный анализ. Решаемая задача – сравнение действия ЛТ и ПХТ.

Материал и методы Материалом исследования послужили 111 карт иммунологического обследования больных лимфогранулематозом после ПХТ и 38 после ЛТ.

Для построения уравнения регрессии принимали значение зависимой переменной $Y=0$ для характеристики действия ПХТ, $Y=1$ для характеристики действия ЛТ. В качестве независимых переменных брались значения четырех главных компонент. Для нахождения уравнения использовалась программа «STATISTICA».

Результаты Полученное общее уравнение имело вид $Y = -0,07 - 0,85f_1 - 0,05f_2 - 0,01f_3 + 0,28f_4$, в котором первый и четвертый коэффициенты регрессии являются наиболее значимыми, а вторым и третьим можно пренебречь. Далее были сравнены средние значения обобщенных показателей групп больных после ПХТ и больных после ЛТ по критерию Стьюдента с надежностью вывода о наличии различия средних более 95% при t критическом больше 1,96. Полученное значение критерия Стьюдента (8,77) показало высокую степень достоверности различия средних обобщенных показателей. Эти результаты свидетельствуют, что ЛТ и ПХТ вызывают разную степень депрессии иммунитета.

Затем строили распределение обобщенного показателя с выбранным шагом, объединяющее две группы, и подсчитывали процентное содержание пациентов каждой группы в соответствующем интервале значений обобщенного показателя. Подсчитывали пороговые значения обобщенного показателя, разделяющего выборки, используя средние значения и дисперсии каждой группы. Оказалось, что в область со значением Y меньше порогового значения попадает 100% обобщенных показателей больных после ПХТ, а в область с величиной Y больше порогового значения попадает 74% обобщенных показателей больных после ЛТ.

Схема разделения пациентов на две группы: группа больных после ПХТ и группа после ЛТ заключается в следующем. Пациенту рассчитываются значения f_1 и f_4 . Если полученная по ним величина Y превышает пороговое значение, то с вероятностью 0,74 пациент завершил ЛТ, а если величина Y меньше пороговой, то с вероятностью равной 1, этот пациент подвергнулся ПХТ.

Заключение 1. Расчет обобщенных показателей и их пороговых значений с помощью множественного регрессионного анализа позволяет различать состояния иммунитета пациентов, подвергавшихся различным методам лечения, в частности, влияние на иммунитет ЛТ и ПХТ.

2. Существование порогового значения для распределения обобщенного показателя иммунитета для больных после ПХТ и больных после ЛТ и меньшая степень смещения распределения после ПХТ по сравнению с ЛТ относительно первичных больных, показывает, что цикл ПХТ оказывает меньшее депрессивное действие на иммунитет, чем проведенная ЛТ.

ПОКАЗАТЕЛИ ИНТЕРФЕРОНОВОГО СТАТУСА И КЛЕТОЧНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К РЕАФЕРОНУ *IN VITRO* У БОЛЬНЫХ ПОЧЕЧНОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ

Куртасова Л.М., Шкапова Е.А., Савченко А.А.

Красноярская государственная медицинская академия; Красноярский государственный университет, Россия

Актуальной проблемой современной онкоурологии является высокий уровень заболеваемости почечно-клеточным раком (ПКР), на долю которого приходится около 97% всех опухолей почек. В настоящее время перспективным методом иммунотерапии у больных ПКР является применение интерферонов (IFN). В то же время, не вызывает сомнения, что необоснованное или несвоевременное применение IFN может вызвать ряд нежелательных побочных явлений и снизить эффективность иммунотерапии. Поэтому клиническое использование данных препаратов наиболее целесообразно, если учитываются особенности IFN статуса пациента и, если заранее, до начала лечения, известна клеточная чувствительность к IFN.

Целью исследования явилось изучение параметров интерферонового статуса и клеточной чувствительности к реаферону *in vitro* у больных ПКР.

Под наблюдением находились 132 больных ПКР ($T_3N_0M_0$) в возрасте 40-60 лет до хирургического лечения, через 14 дней и 1,5 месяца после радикальной нефрэктомии. У всех наблюдаемых больных морфологически подтвержден ПКР. Уровень сывороточного IFN, а также спонтанную и индуцированную продукцию IFN α и IFN γ в супернатантах мононуклеаров периферической крови (МПК) определяли методом ИФА с помощью тест-систем «Pro-Соп» (ТОО «Протеиновый контур», С-Петербург). Влияние реаферона (рекомбинантный IFN α 2a) на реактивность лейкоцитов периферической крови *in vitro* определяли хемилюминесцентным (ХЛ) методом по De Sole et. al. (1988). Использовали реаферон производства ЗАО «Вектор-Фарм», Новосибирск. Контрольную группу составили 30 здоровых доноров.

Результаты исследования обнаружили повышенное содержание сывороточного IFN у больных ПКР как до, так и через 14 дней после хирургического лечения относительно уровня контрольных значений. Установили у больных ПКР в период до оперативного вмешательства достоверное повышение спонтанной продукции IFN γ и снижение спонтанной и индуцированной выработки IFN α МПК. Через 14 дней после хирургического лечения отмечается положительная динамика изменений IFNстатуса. Однако сохраняется выраженная направленность к понижению уровня спонтанной и индуцированной продукции IFN α МПК.

Изучение клеточной чувствительности к реаферону *in vitro* показало, что у больных ПКР лейкоциты крови реагируют на присутствие реаферона в реакционной среде изменением ХЛ ответа. Выявлено резкое снижение клеточной чувствительности к реаферону у больных ПКР в период до хирургического лечения, что, вероятно, обусловлено иммуносупрессирующим действием опухоли. Установлено восстановление клеточной чувствительности к реаферону *in vitro* после удаления опухоли. Кроме того, обнаружено расширение диапазона клеточной чувствительности к реаферону в период через 1,5 месяца по сравнению с ранним послеоперационным периодом. Так, через 1,5 месяца после хирургического лечения у больных ПКР лейкоциты крови реагируют изменением пара-

метров ХЛ ответа при воздействии реаферона не только в высоких и средних дозах, но и при наличии в реакционной среде минимальной исследуемой концентрации реаферона (2000 МЕ).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об изменениях параметров IFN статуса и клеточной чувствительности к реаферону *in vitro* у больных ПКР. При этом максимальное восстановление клеточной чувствительности к реаферону наблюдается через 1,5 месяца после хирургического лечения, что позволяет рекомендовать включение реаферонотерапии в программу комбинированного лечения больных ПКР именно в этот период.

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА MUC1 МУЦИН И ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫЕ ГЛИКОТОПЫ (T, α Gal) У БОЛЬНЫХ РАКОМ И НЕОПУХОЛЕВЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЖЕЛУДКА: СВЯЗЬ С ТИПОМ БОЛЕЗНИ, СТАДИЕЙ И МОРФОЛОГИЕЙ ОПУХОЛИ, И ВЫЖИВАЕМОСТЬЮ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Куртенов О., Клаамас К., Шляпкинова Л., Милохина Л.

Институт Развития Здоровья, Таллин, Эстония

Экспрессия пептидного MUC1 и углеводного Томсен-Фриденрейх (Т) антигена (Gal β 1-3GalNAc) в разных опухолях хорошо документированный факт. Показана аутоиммуногенность этих антигенов и связь иммунного ответа с прогнозом при некоторых локализациях рака. Рак желудка в этом отношении мало исследован. Представляют интерес взаимоотношения между иммунными ответами на эти антигены, ввиду возможности антигенной мимикрии между пептидными и углеводными эпитопами (1).

Цель. Параллельное исследование уровня антител к MUC1 и двум углеводным опухолеассоциированным антигенам (Т антиген и α Gal эпитоп – Gal α 1-3Gal) при раке и неопухолевых заболеваниях желудка; исследование связи между этими ответами и оценка возможного влияния уровня антител на выживаемость больных раком желудка.

Материал и методы. Исследована сыворотка крови 245 больных раком и 151 больного неопухолевыми заболеваниями желудка, а также 100 доноров крови. Диагноз рака подтвержден гистологически, пептическая язва – эндоскопически. Определение IgG и IgM антител к MUC1 и гликотопам проведено иммуноферментным методом с использованием в качестве антигенов конъюгата MUC1-бычий альбумин (60-mer tandem repeat, любезно предоставлен S. von Mensdorf-Pouilly, Vrije University, Amsterdam) и синтетических полиакриламид-углеводных (Т, α Gal) конъюгатов (Synthesom, Germany) (2,3). Показатели кумулятивной выживаемости (метод Kaplan-Meier“a) сравнивались в группах с высокими и низкими уровнями антител.

Основные результаты. В сравнении с группой доноров, уровень анти-MUC1 IgG антител был достоверно повышен у больных раком независимо от стадии процесса. При диффузном типе роста опухоли уровень антител нарастал на поздних стадиях рака; при интестинальном раке отмечена обратная зависимость. Достоверно более низкий уровень анти-MUC1 IgG антител ($P<0,001$) отмечен у больных дуоденальной язвой. Выявлена положительная корреляция между уровнем анти-MUC1 IgM и IgG иммунным ответом на Т антиген у доноров крови и больных хроническим гастритом, но не у больных раком

и пептической язвой. Напротив, при ранних стадиях рака желудка позитивная корреляция ($P < 0,01$) отмечена между уровнями анти-Т IgG и анти-MUC1 IgG, что предполагает приобретенный иммунный ответ к обоим эпитолам. Высокий уровень анти-Т IgG антител был ассоциирован с лучшими показателями выживаемости больных первой стадией рака желудка ($P < 0,001$). Похожая тенденция отмечена и для анти-MUC1 IgM антител у больных с 1-2 стадией рака желудка. Уровень антител к α Gal эпитопа не обнаруживал таких связей.

Заключение: Данные свидетельствуют о стимуляции IgG, но не IgM иммунного ответа на MUC1 пептидный антиген у больных раком желудка, что связано, по-видимому, с известной экспрессией этого антигена в опухолях. Высокий уровень анти-Т и анти-MUC1 антител может служить хорошим прогностическим признаком у радикально оперированных больных раком желудка. Тот факт, что связь уровня антител с выживаемостью более выражена для анти-Т антител свидетельствует о том, что экспрессия Т антигена на муцинах (в том числе на MUC1) в результате их гипогликозилирования является более важным фактором, а экспрессия MUC1 – эпифеномен нарушенного гликозилирования. Полученные результаты подтверждают идею о перспективности использования вакцин муцинового типа в иммунотерапии рака.

Литература:

1. Glinsky V.V. et al. Cancer Res., 2000;60:2584-2588.
2. Von Mensdorff-Pouilly S. et al. Tumor Biol., 1998;19:186-195.
3. Klaamas et al. Immunol. Invest., 2002;31:191-204.

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА СОХРАННОСТЬ CD34⁺ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ПРОДУКТЕ ЛЕЙКАФЕРЕЗА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ПУПОВИННОЙ КРОВИ

Куртова А.В., Зуева Е.Е., Молчанова И.В., Бабенко Е.В., Эстрина М.А., Фрегатова Л.М., Афанасьев Б.В., Тотолян Арег А.

Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

HLA-совместимая трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) успешно используется для лечения многих гематологических и негематологических заболеваний. Источниками ГСК для трансплантаций являются костный мозг, мобилизованная периферическая кровь (аферезный продукт) и пуповинная кровь. Криоконсервация дает возможность длительного хранения ГСК. Успешность трансплантации связана с количеством CD34⁺ ГСК на килограмм массы тела реципиента, однако криоконсервация может приводить к потерям стволовых клеток в трансплантате.

Для выявления влияния криоконсервации на сохранность ГСК различного биологического происхождения мы исследовали образцы продуктов лейкофереза ($n=6$) и пуповинной крови ($n=6$) до и после замораживания. Аферезный продукт был получен на клеточном фракционаторе COBE Spectra после мобилизации выхода ГСК введением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора. Средний объем аферезного продукта составил 307 ± 6 мл. Пуповинную кровь сепарировали перед криоконсервацией с использованием гидроксиэтиленкрахмала. Начальный объем образцов составил 88 ± 6 мл, а объем после сепарации – 38 ± 6 мл. Криоконсервацию

всех образцов проводили по единой методике: $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -40°C и $4^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -80°C с использованием диметилсульфоксида в конечной концентрации 10% в качестве криопротектора. Средний период хранения в жидком азоте (-196°C) составил 208 дней (25-517) для продукта афереза и 394 дня (380-401) для пуповинной крови. Размораживание проводили по стандартной методике. Количественный учет CD34⁺ ГСК был проведен методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител CD45, CD14 и CD34 (Becton Dickinson) до и после криоконсервации по модифицированному двухплатформенному протоколу ISHAGE. Содержание CD34⁺ ГСК до криоконсервации составило $0,68 \pm 0,40\%$ (0,10-2,67) в аферезном продукте и $0,51 \pm 0,04\%$ (0,35-0,68) в пуповинной крови. Сохранность CD34⁺ ГСК после криоконсервации составила $60,4 \pm 8,2\%$ (33,3-80,0) для продукта афереза и $52,7 \pm 4,3\%$ (40,0-66,0) для пуповинной крови. Достоверных различий по сохранности ГСК после криоконсервации между образцами пуповинной крови и аферезного продукта выявлено не было. Снижение содержания ГСК после криоконсервации характерно как для пуповинной крови, так и для продукта афереза. При данных методах сепарации и криоконсервации биологическое происхождение не оказывает влияния на сохранность CD34⁺ ГСК.

ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА И АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ В ЛИМФОУЗЛЫ

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

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

Наличие метастазов в региональных лимфоузлах обладает прогностической значимостью исхода онкологического заболевания, ухудшая общую выживаемость. Метастазирование развивается не только на поздних стадиях развития опухоли, но в ряде случаев уже на ранних стадиях заболевания метастазы обнаруживаются в региональных лимфоузлах. Между тем доказано, что уровень иммунореактивности определяется не только морфологическим составом иммунокомпетентных клеток и концентрацией иммуноглобулинов в сыворотке крови, но и уровнем метаболических процессов в иммунокомпетентных клетках, которые в значительной степени определяют функциональную активность лимфоцитов.

Целью исследования явилось изучение зависимости состояния иммунного статуса и активности метаболических ферментов лимфоцитов крови у больных раком легкого от метастазирования в региональные лимфоузлы.

На базе торакального отделения Красноярского краевого онкологического центра обследовано 126 больных мужского пола с раком легкого в возрасте 30 – 55 лет. Кровь на исследование забиралась на следующий день после поступления. Всем больным выполнены операции: расширенные лоб-, билоб- и пульмонэктомии. Лимфоузлы корня легкого забирались во время операции. Наличие или отсутствие метастазов в лимфоузлах корня легкого определяли гистологическим методом. В качестве

контроля обследовано 106 здоровых мужчин аналогичного возраста. Фенотипический состав лимфоцитов крови и лимфоузлов оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. Концентрацию иммуноглобулинов класса А, М, G в сыворотке крови определяли методом иммунодиффузии по Манчини. Определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови легкого проводили биolumинесцентным методом.

Обнаружено, что состояние иммунного статуса у больных раком легкого незначительно зависит от метастазирования в лимфоузлы. Особенностью в исследуемых параметрах системы иммунитета у больных с метастазированием в лимфоузлы корня легкого является снижение концентрации цитотоксических Т-лимфоцитов и повышение уровня IgM. Однако, в зависимости от метастазирования выявляются особенности во взаимосвязях между размером опухоли и показателями иммунного статуса. Состояние метаболизма иммунокомпетентных клеток крови у больных раком легкого характеризуется как общими особенностями, которые определяются патогенезом заболевания, так и специфическими – в зависимости от отсутствия или наличия метастазов в лимфоузлах корня легкого. Так, общие особенности метаболизма лимфоцитов крови определяются ингибированием реакций липидного катаболизма и анаболизма и, как следствие, – снижением активности терминальных стадий гликолиза. При этом, обменные процессы митохондриального компартмента характеризуются разнонаправленными изменениями активности дегидрогеназ цикла трикарбоновых кислот и снижением активности компенсаторного притока интермедиатов на цикл Кребса с реакцией аминокислотного обмена. В то же время, у больных раком легкого с наличием метастазов в лимфоузлах корня легкого более выражено ингибирование аэробной реакции лактат-дегидрогеназы, что совместно с повышенным НАДФН-зависимым оттоком субстратов на реакции аминокислотного обмена могло бы привести к снижению интенсивности реакций цикла трикарбоновых кислот. Однако, у больных данной группы относительно показателей больных с отсутствием метастазов повышены уровни вспомогательных дегидрогеназных реакций цикла Кребса. Наиболее характерными особенностями метаболизма лимфоцитов у больных без метастазов является изменение активности прежде всего ферментов цитоплазматического компартмента: снижение реакций, определяющих интенсивность пластического обмена, и повышение активности глутатион-зависимой антиоксидантной системы.

Таким образом, состояние иммунного статуса у больных раком легкого определяется как иммунодефицитное и практически не зависит от отсутствия или наличия метастазов в лимфоузлах корня легкого. В то же время, с помощью корреляционного анализа обнаружены различия во взаимосвязях между размером опухоли и показателями иммунного статуса в зависимости от метастазирования опухоли. Анализ выявленных взаимосвязей позволяет заключить, что с появлением метастазов в лимфоузлах при раке легкого происходит разбалансировка регуляторных взаимосвязей опухоли и иммунной системы. Различия в метаболических реакциях иммунокомпетентных клеток у больных при отсутствии и наличии метастазирования опухоли определяются уровнем пластических и антиоксидантных реакций.

СРАВНЕНИЕ ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА КЛЕТКАМИ КРОВИ И ЕЕ РЕГУЛЯЦИИ В ГРУППАХ ПАЦИЕНТОВ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Мальцева В.Н.¹, Сафронова В.Г.¹, Арапов Н.А.²

¹Институт биофизики клетки Российской Академии Наук, Пущино, Россия;

²Больница Отрадинского ТМК, Ступинский район, Московская область, Россия

Введение. Полиморфноядерные лейкоциты (ПМЯЛ) продуцируют активные формы кислорода (АФК). Однако АФК являются возможными канцерогенами. Поэтому важно поддерживать баланс между противоположными эффектами АФК, что обеспечивается координированным взаимодействием внутриклеточных сигнальных систем. Онкологические заболевания могут сопровождаться нарушением нормальной регуляции оксидантной активности периферических, по отношению к опухоли, нейтрофилов. Такие возможные нарушения на фоне опухолевого процесса в организме практически не изучены, а имеющиеся данные весьма неоднозначны.

Задача работы. Выявить особенности продукции АФК клетками периферической крови и изолированными ПМЯЛ в группах больных раком пищеварительного тракта, легких, почек, молочной железы.

Материалы и методы. Работа проведена на клетках периферической крови пациентов с онкологическими заболеваниями в 3 и 4 клинических стадиях. Спонтанную и индуцированную опсонизированным зимозаном (0,25 мг/мл) продукцию АФК определяли по люминол-зависимой хемилюминесценции. ПМЯЛ изолировали центрифугированием в градиенте фиколл-верографин. Клетки инкубировали с ингибиторами в течение 30 мин при 37°С и затем активировали 10 мкМ хемотаксическим пептидом N-формил-Мет-Лей-Фен (ФМЛФ).

Основные результаты. Выявлен повышенный уровень спонтанной хемилюминесценции периферической крови у больных раком пищеварительного тракта, почек, легких, в то время как у больных раком молочной железы наблюдается снижение. Определены различия по уровню активности респираторного взрыва опсонизированным зимозаном в крови указанных групп пациентов. Показаны различия в активности изолированных ПМЯЛ в ответ на 10 мкМ ФМЛФ. Обнаружены различия в эффектах ингибиторов тирозиновых протеинкиназ и протеинфосфатаз, P13K и протеинкиназы C. SB 203580, ингибитор митоген-активируемой протеинкиназы p38 MAPK, сильнее подавлял ответ ПМЯЛ в группах больных с раком почки, легкого и молочной железы по сравнению с клетками здоровых доноров. Ортованадат, ингибитор тирозиновых протеинфосфатаз, ингибировал продукцию АФК лейкоцитами, выделенными из крови здоровых доноров, и усиливал – в лейкоцитах пациентов больных раком пищеварительного тракта и раком почки. Ингибитор протеинкиназы C – GF 109203X не оказывал существенного влияния на продукцию АФК лейкоцитами пациентов исследуемых групп.

Заключение. Продукция АФК клетками крови больных с онкологическими заболеваниями зависит от локализации опухоли в организме и имеет особенности в исследуемых группах больных. На фоне опухолевого процесса наблюдается модификация систем регуляции оксидантной активности периферических нейтрофилов с участием p38 MAPK, тирозиновых протеинкиназ и протеинфосфатаз.

**ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ПРИ ИЗУЧЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВЕЩЕСТВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ****Миркамалова Л.И., Еникеева З.М., Киреев Г.В.,
Меметов Ф.Ю.***Республиканский онкологический научный центр
МЗРУз, Ташкент, Узбекистан*

Одним из разделов экспериментальных исследований в онкологии является изучение действия новых биологически активных веществ животного и растительного происхождения на рост и развитие опухолей *in vitro* и *in vivo*. Учитывая роль иммунной системы в противоопухолевой защите, эти исследования проводятся под контролем иммунного статуса животных-опухоленосителей. В оценке состояния иммунной системы изучаются количественные и функциональные показатели. Первые с помощью мкАТ по экспрессии дифференцировочных антигенов CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 и CD95, функциональные с помощью РТМЛ с определением спонтанных и КонА-индуцированных цитокинов, влияющих на миграцию лейкоцитов (ФУМ-Л и ФСМ-Л), сенсибилизации лимфоцитов к специфическим и диагностическим антигенам из тканей органов, опухолей и активности спонтанных сФУМ и сФСМ.

Определение *in vitro* биологической активности препаратов трополюнового ряда К-18, К-42, К-48, синтезированных в группе д.м.н. З.М.Еникеевой, белка бобов сои (д.м.н. Г.В. Киреев) и Лакто ФЛОР (д.м.н. Ф.Ю.Меметов) были выявлены их иммуностимулирующее действия на рецепторы Т-лимфоцитов в нагрузочных тестах. Индексы стимуляции оказались равными для Лакто ФЛОР – 221%, для К-42 – 143%, К-48 – 158%, соевого белка – 190%, тактивина – 232% и иммуномодулина – 226%. В опытах *in vivo* получены интересные результаты. Так, у белых беспородных мышей при лечении саркомы-180 препаратом фторурацилом (5ФУ), белки бобов сои (ББС) оказывали защитное действие на показатели иммунного статуса (CD3⁺, CD4⁺ клетки, ФАН, КонА-индуцированную продукцию ФУМ-Л). Выявлено дозозависимое действие К-48 в эксперименте на мышах линии BALB с опухолью Акатон. Помимо противоопухолевого эффекта К-48 оказывал иммуностимулирующее действие и в дозе 1 мг/кг способствовал повышению количества и функциональной активности Т-лимфоцитов, ИРИ. Препарат К-18 в дозе 30-50 мг/кг у мышей BLACK с перивитой меланомой В-16 усиливал сенсибилизацию к специфическому антигену из штамма опухоли В-16, что совпадало с усилением процента апоптоза (CD95⁺ клеток) и уменьшением размера опухоли.

Иммунологические исследования по влиянию новых биологически активных противоопухолевых препаратов в эксперименте способствуют более полному изучению их свойств и механизма действия.

**ОЦЕНКА КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИН
НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
С ИММУНОЛОГИЧЕСКИМ АДЬЮВАНТОМ
ИНТЕРЛЕЙКИН-1β У БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ
И РАКОМ ПОЧКИ****Моисеенко В.М., Балдуева И.А., Данилова А.Б.,
Данилов А.О., Тюкавина Н.В., Орлова Р.В.,
Туркевич Е.А., Анисимов В.В., Гафтон Г.И.,
Кочнев В.А., Барчук А.С., Канаев С.В., Хансон К.П.***НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова МЗ,
Санкт-Петербург, Россия*

Введение. Большинство опухолей человека обладают крайне слабой иммуногенностью, поэтому при разработке методов вакцинотерапии, основанных на применении немодифицированных опухолевых клеток, необходимо использовать дополнительную стимуляцию. В настоящее время проводится поиск более надежных адъювантов в контексте развития иммунотерапевтических подходов, нацеленных на усиление реактивности иммунной системы организма. На модели опухоли легкого мыши было показано, что IL-1β высокоэффективен при использовании в качестве адъюванта в процессе вакцинации облученными опухолевыми клетками. Адъювантное действие этого цитокина связано со стимуляцией первичного и вторичного иммунного ответа, пролиферации Т-клеток, продукции ими IL-2. Таким образом, IL-1β может быть использован в качестве адъюванта при создании вакцин на основе аутологичных цельных опухолевых клеток для лечения больных злокачественными новообразованиями.

Материалы и методы. В исследование включено 57 больных с гистологически верифицированным диагнозом меланомы кожи (36 больных) и раком почки (21 больной), получавших лечение в НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова за период с 2000 по 2004 год. Технология приготовления противоопухолевой вакцины с адъювантом предполагает дезагрегацию образцов опухоли, культивирование клеток, блокаду их пролиферативных способностей облучением. В день вакцинации облученные клетки (1х10⁷) смешивали с IL-1β в количестве 60 нг и сразу вводили больному смесь в равных дозах внутривенно паравerteбрально в 3 точки. В четвертую точку вводили опухолевые клетки без адъюванта. Одновременно вводили IL-1β в дозе 470 нг на физиологическом растворе подкожно в переднюю брюшную стенку. Инъекцию адъюванта повторяли на следующий день после вакцинации. Полный курс вакцинотерапии состоял из 4-6 введений (в зависимости от количества полученного опухолевого материала) с интервалом 21 день.

Результаты. Паллиативную вакцинотерапию после циторедуктивных операций получали 23 пациента и адъювантную терапию – 34 пациента с высоким риском развития рецидива заболевания после хирургического лечения (10 больных раком почки и 24 пациента с меланомой кожи). Больные получили от 1 до 6 введений вакцины (в среднем 5). У 19 больных (33%) основным осложнением в ходе лечения была лихорадка, которая наблюдалась в дни введения IL-1β. Лихорадка II ст. зарегистрирована у 16 пациентов (84%), I ст. – у 3 пациентов (16%). Осложнения III-IV ст. не наблюдались. У 1 больной отмечался зуд кожи в месте введения IL-1β. В группе паллиативного лечения полный регресс не зарегистрирован. Частичный регресс метастазов в легких (>50%) выявлен у 1 больного раком почки (4,3%), продолжительностью 11 мес.+. Стабилизация процесса наблюдалась у 10 из 23 больных (43%) (3 больных раком почки, 7 больных меланомой кожи). Средняя продолжительность эффекта составила 7 мес. (от 2 до 14 месяцев). В группе пациентов, получавших адъювантную вакцинотерапию, у 21 больного (61,8%) из 34 средняя продолжительность безрецидивного периода составила в среднем 23 мес. (от 4,5 до 59 месяцев).

Анализ иммунологических показателей периферической крови больных меланомой кожи выявил динамику абсолютного содержания основных популяций и субпопуляций лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD20⁺), которая в большинстве случаев коррелировала с резуль-

татами лечения. Для больных раком почки таких закономерностей обнаружено не было.

Выводы. Установлено, что изучаемый вакцинный препарат безвреден для больного, его применение не сопровождается клинически значимыми побочными эффектами. Иммунологический мониторинг вакцинотерапии выявил тенденцию к увеличению содержания Т- и В-клеток в периферической крови и усилению их функциональной активности, коррелировавшую с результатами лечения у больных меланомой кожи.

ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ НИЗКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВАКЦИН

Мушенкова Н.В., Моисеева Е.В., Чаадаева А.В., Свирицкая Е.В.

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

Создание эффективной вакцины против рака является одной из насущных задач иммунологии. Имеющиеся на настоящий момент вакцины недостаточно эффективны как в экспериментальных моделях, так и в клинических исследованиях. Целью данной работы была проверка гипотезы: причиной низкой эффективности противоопухолевой вакцинации является неспособность опухолеспецифичных Т лимфоцитов преодолеть эндотелиальный барьер и попасть в ткани, где формируется опухоль. При ответе на патоген эндотелиальный барьер открывается для доступа Т клеток за счет экспрессии на клетках эндотелия молекул адгезии, таких как селектины. Различие между патогенами и опухолевыми клетками состоит в отсутствии на опухолевых клетках антигенов, способных активировать клетки врожденной системы иммунитета. Активация клеток врожденного иммунитета, в первую очередь резидентных макрофагов и дендритных клеток, приводит к синтезу ими хемокинов и вазоактивных молекул. Последние стимулируют экспрессию молекул адгезии на клетках эндотелия сосудов, открывая доступ в ткани нейтрофилам и Т лимфоцитам. Для проверки гипотезы мышам линии СBRV иммунизированным вакциной, созданной на основе ДНК и белка муцина I, перевивали сингенные опухолевые клетки, полученные из спонтанной карциномы молочной железы. В опытной группе опухолевые клетки перевивали в

смеси с бактериями *Micrococcus sp.*, способными эффективно активировать эндотелий и открывать доступ цитотоксическим лимфоцитам в место инокуляции опухолевых клеток. Контролем служили неиммунизированные мыши, которым также перевивали опухолевые клетки в смеси с бактериями. В результате добавления бактерий к перевиваемым опухолевым клеткам наблюдали значительное повышение эффективности вакцинации. Так у всех мышей, иммунизированных вакциной на основе муцина I и получивших только опухолевые клетки, возникли опухоли. Из 12 мышей, иммунизированных муцином I и получивших опухолевые клетки в смеси с бактериями, у 25% мышей опухоли не появились. К 2,5 месяцам после введения клеток карциномы в контрольной группе выжило 25% мышей, в опытной - 50%. Таким образом, можно предположить, что одной из причин низкой эффективности противоопухолевой вакцинации является недоступность опухоли для цитотоксических клеток.

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ, ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ И ПЕРИФОКАЛЬНУЮ ТКАНЬ, У БОЛЬНЫХ С МЕТАСТАТИЧЕСКИМИ ПОРАЖЕНИЯМИ ПЕЧЕНИ

Никипелова Е.А., Златник Е.Ю., Шапошников А.В.

Научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия

Лимфоцитарная инфильтрация первичных и метастатических злокачественных опухолей установлена давно, но до настоящего времени не получила однозначной оценки, а в отношении опухолевых поражений печени такие данные единичны и противоречивы. В связи с этим, нами было проведено изучение содержания цитотоксических лимфоцитов (CD8⁺, CD16⁺, CD56⁺) в ткани опухоли (tumor-infiltrating lymphocytes – TIL) и перифокальной зоны (tumor-associating lymphocytes – TAL) у больных, прооперированных по поводу метастатических поражений печени, по сравнению с содержанием этих клеток в их периферической крови (см. табл.).

Исследование проводили у 16 больных раком толстого кишечника, поджелудочной железы и желчного пузыря с метастазами в печень. Лимфоциты периферической

ТАБЛИЦА. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ В БИОПТАХ ПЕЧЕНИ ПО СРАВНЕНИЮ С ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВЬЮ У БОЛЬНЫХ С МЕТАСТАТИЧЕСКИМИ ОПУХОЛЯМИ

Лимф-ты	TAL		Лимф-ты	TIL	
	Кол-во больных	% изменения		Кол-во больных	% изменения
CD8 ⁺ (n=13)	5↑ 5↓	49,0±3,3 50,0±10,8	CD8 ⁺ (n=12)	9↑ 1↓	36,9±5,5 40,0±13,3
CD16 ⁺ (n=10)	5↑ 0↓	43,6±6,1 -	CD16 ⁺ (n=10)	1↑ 1↓	66,0 29,0
CD56 ⁺ (n=10)	6↑ 1↓	66,3±7,7 54,0	CD56 ⁺ (n=8)	3↑ 0↓	65,0±27,8 -

↑ – повышение по сравнению с содержанием в крови;
↓ – снижение по сравнению с содержанием в крови.

крови выделяли в градиенте фиккол-верографина ($\rho=1,077-1,078$) с последующим центрифугированием в среде 199. После выполнения операции получали участки метастатической и непораженной перифокальной ткани печени. Образцы тканей гомогенизировали в растворе Версена на магнитной мешалке, фильтровали, лимфоциты выделяли аналогичным образом; их жизнеспособность составляла 98-99%.

Результаты представлены в таблице, из которой видно, что в 5 из 13 случаев содержание $CD8^+$ клеток в перифокальной зоне было на 49% выше, чем в крови; отмечена сходная тенденция к накоплению цитотоксических клеток с маркерами $CD16^+$ и $CD56^+$. Снижение содержания лимфоцитов с маркерами NK-клеток среди TAL наблюдалось только в одном случае.

В опухолевой ткани уровень $CD8^+$ клеток возрастает в 9 из 12 случаев, $CD56^+$ клеток – увеличивается в 3 случаях из 8, а количество $CD16^+$ в одном случае возрастает и в одном – снижается по сравнению с периферической кровью.

Таким образом, отмечается накопление различных цитотоксических лимфоцитов в перифокальной зоне и в ткани метастаза (в меньшей степени), которое, видимо, происходит вследствие их миграции из периферической крови. Это создает возможность их стимуляции с помощью местного (интрапортального) введения цитокиновых препаратов, например, ронколейкина, что может служить одним из этапов комплексного лечения метастатических поражений печени.

DEPLETION OF ALLOANTIGEN-PRIMED LYMPHOCYTES OVERCOMES RESISTANCE TO ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANTATION

Tatyana Prigozhina, Gregory Elkin, Shimon Slavin

Department of Bone Marrow Transplantation and Cancer Immunotherapy, Hadassah University Hospital, Jerusalem, Israel

Engraftment of allogeneic bone marrow cells (BMC) after reduced-intensity conditioning would allow to compensate for the inadequate supply of compatible grafts and to reduce mortality of graft-versus-host disease (GVHD). We proposed to facilitate engraftment of mismatched BMC by conditioning for depletion of alloantigen-primed lymphocytes with cyclophosphamide (CY). Here we summarize the experimental results obtained by this approach. Naive or mildly irradiated

BALB/c mice were primed with C57BL/6 BMC (day 0), treated with CY (day 1) to deplete alloantigen-primed host lymphocytes, and given a second C57BL/6 BM transplant (day 2) for engraftment. Depletion of alloantigen-primed host lymphocytes by 200 mg/kg CY provided engraftment of allogeneic BM from the same donor strain in non-irradiated recipients. Engraftment of C57BL/6 BMC converted recipients to complete chimeras. Mice treated with CY alone rejected allogeneic BMC. All chimeras accepted permanently donor heart and skin grafts but rejected organs transplanted from the third party strains of mice. Transplantation of donor-type hematopoietic stromal progenitors under kidney capsule of chimeras caused formation of donor-type bone supporting donor hematopoiesis. Eighty percent chimeras remained GVHD-free more 250 days. Engrafted donor BMC had a strong therapeutic potential in BALB/c mice harboring malignant cells. Application of a similar protocol for BMC transplantation in NOD mice converted recipients to GVHD-free chimeras and prevented development of diabetes.

Mild irradiation (100 cGy) prior to the first BMC injection allowed reducing tolerance-inducing CY dose to 100 mg/kg. However, when priming with donor BMC was excluded from the protocol and all the C57BL/6 BMC were given after CY, engraftment of allogeneic BMC could be achieved after significantly stronger radiation (400 cGy). These results demonstrate that conditioning protocol that focuses on depletion of donor-reactive host lymphocytes has a definite advantage over general immunosuppressive conditioning protocols.

Conclusion. Our results demonstrate that depletion of donor-reactive host lymphocytes has a definite advantage over general immunosuppression with CY and radiation therapy.

ЭЛИМИНАЦИЯ ПРИМИРОВАННЫХ АЛЛОАНТИГЕНАМИ ЛИМФОЦИТОВ ПРИВОДИТ К ПРЕОДОЛЕНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ К ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННОГО КОСТНОГО МОЗГА

Пригожина Татьяна, Елкин Григорий, Славин Шимон

Отдел трансплантации костного мозга и противораковой иммунотерапии, Госпиталь университета Хадасса, Иерусалим, Израиль

Приживление аллогенных клеток костного мозга (ККМ) после соответствующего воздействия позволит скомпенсировать осложнения, возникающие при использовании совместимого трансплантата и уменьшить гибель от реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Мы предложили специфическую иммунотерапию, способствующую приживлению чужеродных ККМ, создавая условия для элиминации примированных аллоантигенами лимфоцитов с помощью циклофосфида (ЦФ). В данной работе мы просуммировали экспериментальные данные, полученные с использованием этого подхода.

Для этого мышам BALB/c, интактным или облученным в низкой дозе, вводили ККМ мышей C57BL/6 (день 0), ЦФ (день +1), чтобы элиминировать активированные аллоантигенами лимфоциты реципиента. В день +2 мышам повторно вводили ККМ мышей C57BL/6 и исследовали их приживление.

Показано, что введение 200 мг/кг ЦФ приводило к деляции сенсibilизированных аллоантигенами лимфоцитов реципиента, что обеспечивало приживление ККМ донорской линии мышей у необлученных реципиентов и индукции полного химеризма лимфоидной ткани. Мыши BALB/c, которым вводили только ЦФ, отторгали ККМ донорского происхождения (C57BL/6). У всех химер длительно приживался трансплантат сердца и кожного лоскута, но при этом отторгался трансплантат третьей линии. Трансплантация стромальных гемопоетических предшественников под капсулу почки химер приводила к индукции гемопоэза донорского типа. У 80% мышей-химер РТПХ отсутствовала более 250 дней. Трансплантированные донорские клетки КМ мышей C57BL/6 обладали сильным терапевтическим потенциалом в отношении опухолевых клеток у несущих опухоль мышей BALB/c.

Использование в данной экспериментальной схеме в качестве реципиентов мышей NOD приводило к тому, что у них возникал химеризм и отсутствовала РТПХ. Такое воздействие препятствовало развитию диабета у мышей NOD.

Предварительное облучение мышей перед первой инъекцией ККМ позволило снизить дозу ЦФ до 100 мг\кг. Однако когда предварительное ведение ККМ было исключено из экспериментальной схемы, приживление ККМ, введенных после ЦФ, достигалось только в том случае, если была значительно увеличена доза облучения. Эти результаты показали, что данная схема эксперимента, основанная на элиминации активированных аллоантигенами клеток реципиента, имеет преимущества по сравнению с общей иммуносупрессией организма для последующей трансплантации.

Заключение. Наши результаты показали, что разработанная нами схема элиминации реактивных в отношении донорских клеток лимфоцитов реципиента, имеет существенное преимущество над схемой общей иммуносупрессии, вызванной применением только ЦФ или радиотерапии.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-4, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Романова Н.А., Холоденко И.В., Молотковская И.М.

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

Иммуносупрессия является частой причиной онкологических заболеваний. В настоящее время одним из наиболее распространенных методов коррекции иммуносупрессии является терапия с использованием рекомбинантных форм цитокинов IL-2 и IL-4. Однако применение традиционной цитокинотерапии имеет множество негативных побочных эффектов, таких как повышение артериального давления, увеличение проницаемости стенок сосудов и другие. Известно, что одним из механизмов иммуносупрессии является перехват свободными формами ганглиозидов крови цитокинов IL-2 и IL-4. Целью настоящей работы был поиск пептидов, способных связывать опухлеассоциированные ганглиозиды GM2 и GD3. Перспективным подходом могло стать использование пептидов, синтезированных на основе структуры участка молекулы интерлейкина, ответственного за связывание с ганглиозидами. Используя теоретический конформационный анализ, мы предположили, что на первом этапе взаимодействия ганглиозидов с цитокином происходит связывание заряженной головы гликолипида с несущими заряд петлевыми участками цитокина. Для проверки этого предположения был произведен твердофазный синтез пептидов, соответствующих петлевым участкам аминокислотной последовательности IL-4: IL-4 SP 22-37: TLCTELTVTDIFAASK; IL-4 SP 55-68: FYSHNEKDTRELGA; IL-4 SP 95-109: GLNSCPVKEANQSTL; IL-482 полноразмерный IL-4, лишенный последовательности 22-37.

Был проведен функциональный анализ этих структур на IL-2 –и IL-4– зависимых клеточных линиях, CTLL-2 и CT.4R, соответственно. Была исследована способность пептидов восстанавливать пролиферацию клеток, ингибированную ганглиозидами GM2 и GD3, ассоциированными с опухолевым процессом.

Результаты исследования показали, что два из изученных пептида, IL-4 SP 22-37 и IL-482, обладают значительной ганглиозид-связывающей активностью: они способны частично (до одной трети) отменять ингибирующую пролиферацию Т-лимфоцитов активность ганглиозидов GD3 и GM2. Поскольку IL-4 SP 22-37 является заряженным пептидом, а IL-

482 – белок, лишенный данной последовательности, можно сделать вывод о том, что во взаимодействии цитокина с ганглиозидом участвуют два участка молекулы интерлейкина: заряженная петля, связывающаяся с полярной головой ганглиозидов, и гидрофобный участок молекулы цитокина, взаимодействующий с керамидной составляющей ганглиозидов.

Работа поддержана грантом ISTC, проект №2185.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ХРОНИЧЕСКИХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Сергеев В.С., Никитин В.Ю., Шинкарева О.Г.

*Военно-медицинская академия,
Санкт-Петербург, Россия*

Введение. Определение варианта лимфопролиферативного заболевания методом проточной цитометрии основывается на установлении иммунофенотипа опухолевых клеток, находящихся в периферической крови или костном мозге. Подходы к выбору панели моноклональных антител, алгоритмам иммунофенотипирования и оценке полученных результатов были предложены и обобщены сравнительно недавно. В связи с этим точность диагностики данной группы заболеваний методом проточной цитометрии продолжает уточняться.

Цель и задачи. Определить характер экспрессии исследуемых антигенов на поверхности лейкоэмических клеток, установить иммунофенотипический диагноз и сравнить результаты иммунофенотипирования с клинической картиной и данными морфологических методов исследования.

Материалы и методы. В работу включены 18 пациентов, проходивших обследование и лечение в клинике гематологии и клинической иммунологии Военно-Медицинской Академии и имеющих предварительный диагноз хронический лейкоз/лимфома в фазе лейкоэмизации. Иммунофенотипирование лимфоидных элементов проводили на проточном цитометре FACScan (программа CellQuest) фирмы Becton Dickinson. Использовали следующие комбинации моноклональных антител: CD3/CD19/CD45, CD10/CD20/CD19, CD4/CD8/CD3, CD3/CD16.56, CD5/CD23/CD19, CD103/CD11c/CD19, FMC7/CD79a, CD24, CD22, CD25/CD19, SmIgκ/SmIgλ/CD19, CD7/CD2/CD3, TCRαβ/TCRγδ/CD3, CD8/HLA-DR, CD57/CD8/CD3, CD25/CD2, CD5/CD1a (фирм Becton Dickinson и Beckman Coulter). Данные клинической картины заболевания и результатов морфологических методов исследования взяты из историй болезни.

Основные результаты: В 10 случаях показано наличие выраженной экспрессии антигенов CD19, CD24, слабой экспрессии антигенов CD20 и CD22, при отсутствии позитивного окрашивания с маркерами CD103, FMC7 и CD11c, что позволило поставить иммунофенотипический диагноз В-ХЛЛ. У всех пациентов была обнаружена коэкспрессия активационных антигенов CD5 и CD23 на CD19⁺-позитивных лимфоцитах. Во всех случаях В-ХЛЛ была выявлена низкая плотность экспрессии моноклональной легкой к-цепи Ig на поверхности В-лимфоцитов.

У 1 пациента был поставлен диагноз В-пролимфоцитарного лейкоза на основании обнаружения в костном мозге моноклональной В-клеточной популяции, с высокой плотностью поверхностной легкой к-цепи Ig, сильной эк-

спрессией антигенов CD20, CD22 и CD24, а также позитивной по антигенам CD19, FMC7, CD11c, CD5 и CD38.

В 2 случаях поставлен иммунофенотипический диагноз В-клеточной неходжкинской лимфомы – лимфомы селезенки с ворсинчатыми лимфоцитами. Они характеризовались экспрессией CD19, CD22, FMC7, при отсутствии CD23 и CD5. В отличие от В-ХЛЛ клетки костного мозга данных пациентов характеризовались наличием сильной мембранной экспрессии моноклональной легкой к-цепи Ig.

В 1 случае выявлена выраженная коэкспрессия основных В-клеточных антигенов с CD5 при отсутствии CD23 и CD11c. Поставлен иммунофенотипический диагноз лимфомы из клеток мантийной зоны. Тем не менее, согласно данных клинической картины (выраженная спленомегалия) и морфологических методов исследования поставлен диагноз лимфомы селезенки с ворсинчатыми лимфоцитами.

2 случая характеризовались наличием в костном мозге популяции CD19⁺-лимфоцитов с выраженной экспрессией CD11c, CD25, CD20, CD22 и CD103, при отсутствии экспрессии CD5 и CD23, что позволило поставить иммунофенотипический диагноз – волосато-клеточный лейкоз.

В 2 случаях были обнаружены клетки с характерным для лимфомы из больших гранулярных лимфоцитов иммунофенотипом: CD3⁺CD8⁺CD57⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺. Тем не менее, из-за неопределенности клинической картины (только невыраженный абсолютный лимфоцитоз и плохое самочувствие пациентов) не было установлено окончательного диагноза. У обоих больных были выявлены выраженные абберантные соотношения TCR $\alpha\beta$ /TCR $\gamma\delta$ (93,1%/0,5% и 94,3%/1,6%) и CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ (0,2 и 0,12, соответственно).

Результаты иммунофенотипирования совпали с данными морфологических методов исследования в 83,3% (15 из 18) случаев.

Заключение: проточная цитометрия является высокоинформативным методом диагностики различных вариантов хронических лейкозов и неходжкинских лимфом в фазе лейкоемизации. Тем не менее, возможность абберантной экспрессии антигенов с важной дифференциальной значимостью не исключает получение неверных результатов. Требуется поиск дополнительных диагностических маркеров и комбинаций моноклональных антител.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРИ ОСТРОМ НЕЛИМФОБЛАСТНОМ И ОСТРОМ ЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗАХ

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

ГУ НИИ Медицинских проблем Севера СО РАМН, Краевая клиническая больница № 1, Красноярск, Россия

Острые лейкозы представляют собой гетерогенную группу опухолевых заболеваний крови. В настоящее время, недостаточно исследованы иммунологические механизмы в патогенезе развития острого нелимфобластного (ОНЛЛ) и острого лимфобластного (ОЛЛ) лейкозов. Целью исследования явилось изучение особенностей состояния клеточного и гуморального иммунитета у больных на разных стадиях ОНЛЛ и ОЛЛ.

Обследовано 122 пациента, поступивших в гематологическое отделение Краевой клинической больницы № 1

г. Красноярск. Из них у 68 – диагностировался ОНЛЛ и у 54 больных – ОЛЛ. Из 68 больных ОНЛЛ у 24 была первая атака, 34 пациента были в стадии ремиссии после проведенного лечения, и у 10 больных наблюдался повторный рецидив. Из 54 пациентов ОЛЛ у 24 диагностировалась первая атака, у 26 больных наблюдалась ремиссия, после проведенного лечения, и у 6 больных регистрировался повторный рецидив. В качестве контроля обследовано 106 здоровых лиц аналогичного возраста. Фенотипический состав лимфоцитов крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. Концентрация иммуноглобулинов класса А, М и G в сыворотке определяли иммуноферментным методом.

Особенностью клеточного иммунитета при первичной атаке ОНЛЛ является повышение относительного содержания лимфоцитов в крови, снижение количества В-лимфоцитов с соответствующим увеличением величины лейко-В-клеточного коэффициента и понижением величины лейко-Т-клеточного коэффициента. Сниженное количество В-лимфоцитов также характеризуется изменением их функциональной активности: увеличением уровня относительного синтеза IgA и снижением уровня относительного синтеза IgM. Особенностью состояния клеточного звена иммунной системы при первичной атаке ОЛЛ является увеличение величины лейко-Т-клеточного коэффициента, снижение относительного содержания Т-лимфоцитов и величины иммунорегуляторного индекса за счет пониженного уровня фракции CD4⁺-клеток и повышения количества CD8⁺-клеток. Со стороны гуморального иммунитета у больных данной группы выявляется повышенный синтез IgG В-лимфоцитами и, соответственно, увеличение концентрации данного класса иммуноглобулина в сыворотке крови. На стадии ремиссии состояния клеточного звена иммунной системы практически не различается у больных ОНЛЛ и ОЛЛ и характеризуется снижением содержания всех исследуемых популяций и субпопуляций лимфоцитов крови. У больных ОНЛЛ выявляется снижение концентрации IgG и уровня относительного синтеза IgA. В то же время у больных ОЛЛ при снижении содержания В-лимфоцитов в крови повышается их функциональная активность, что характеризуется значительным повышением уровней относительного синтеза IgA, IgM и IgG. Подобное состояние иммунного статуса определяется цитостатической терапией, которая в наибольшей степени вызывает угнетение клеточного звена иммунитета. Значительно различается состояние иммунного статуса при повторном рецидиве ОНЛЛ и ОЛЛ. У больных ОНЛЛ величина параметров клеточного звена иммунитета при повторном рецидиве практически не отличается от состояния клеточного иммунитета на стадии ремиссии заболевания и также характеризуется снижением содержания всех исследуемых популяций и субпопуляций лимфоцитов. При рецидиве ОНЛЛ выявляются выраженные изменения в состоянии гуморального иммунитета, что определяется снижением концентрации трех основных фракций иммуноглобулинов. В то же время, на фоне снижения содержания В-лимфоцитов в крови повышается их функциональная активность, что характеризуется повышенным уровнем синтеза иммуноглобулинов. При рецидиве ОЛЛ выявляется снижение содержания Т-, НК- и В-лимфоцитов при повышении величин лейко-Т-клеточного и лейко-В-клеточного индексов, а также индекса активации Т-лимфоцитов. Состояние гуморального иммунитета характеризуется снижением концентрации IgA и IgG в сыворотке, но при повышении уровня относительного синтеза IgM.

Таким образом, у больных ОНЛЛ и ОЛЛ на всех стадиях заболевания выявляются нарушения иммунного статуса, характеризующиеся изменением содержания популяций и субпопуляций лимфоцитов крови и концентрации иммуноглобулинов в сыворотке. Наиболее выраженные нарушения иммунного статуса у больных ОНЛЛ выявляются на стадиях ремиссии и рецидива заболевания, тогда как у больных ОЛЛ – только при ремиссии заболевания. Независимо от стадии острых лейкозов выявляется снижение содержания в крови NK-клеток, однако их минимальное количество обнаруживается при повторном рецидиве. Восстановление параметров клеточного иммунитета в ремиссии ОЛЛ происходит быстрее, чем при ОНЛЛ.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАТИПИЧЕСКОГО РАКА И ЯЗВЕННОЙ ФОРМЫ БАЗАЛЬНОКЛЕТОЧНОГО РАКА КОЖИ

Снарская Е.С.

ФППО ММА им. И.М. Сеченова, кафедра кожных и венерических болезней, Москва, Россия

Иммуногистохимические особенности метатипического рака (МТР) и язвенной формы базальноклеточного рака кожи (БКР), представляющих большие трудности для дифференциальной диагностики, а следовательно для выбора адекватного метода лечения, практически не изучены. **Целью** нашего исследования явилось изучение опухолевых комплексов при данной патологии, с помощью онкомаркеров, отражающих степень агрессивности опухоли и влияние опухоли на окружающие ткани.

Для исследования матриксных металлопротеиназ MMP-1 и MMP-9, их эндогенных ингибиторов TIMP-1 и TIMP-2, пролиферативного ядерного антигена PCNA, супрессора малигнизации P53, использован биопсийный материал 20 опухолей кожи больных (10 случаев МТР и 10 – язвенно-нодулярных БКР в стадии $T_2N_0M_0$ III степени изъязвления). Выявлено, что опухолевые клетки язвенной БКР и МТР активно продуцируют матриксные металлопротеиназы MMP-1 и MMP-9, что проявляется их интенсивной экспрессией (диффузное коричневое окрашивание) в цитоплазме клеток опухолевых комплексов при БКР. Во всех опухолях МТР отмечена интенсивная экспрессия MMP-1 и MMP-9 не только в клетках опухолевых комплексов, но и за их пределами в строме опухоли в виде мелких рассеянных участков, что свидетельствует о проникновении клеток опухоли (реакция на цитокератин в них положительная) в окружающий стромальный каркас. Не исключено, что этому способствует дисбаланс с эндогенными ингибиторами металлопротеиназ TIMP-1 и TIMP-2, выявленный при МТР, где экспрессия TIMP-1 в клетках опухоли выражена слабо, а TIMP-2 практически не выявляется. Таким образом эффекты металлопротеиназ при МТР выражены сильнее, что проявляется отмеченной выше инвазией опухолевых клеток в окружающую ткань, усилением процессов пролиферации: PCNA выявлен в $28,0 \pm 4,1\%$ клеток при БКР, в то время как МТР он выявлен в $87,5 \pm 2,5\%$ опухолевых клеток ($p < 0,01$), мутантный P53 лишенный свойств супрессора малигнизации был выявлен в $62,7 \pm 11,0\%$ опухолевых клеток МТР, в то время как в опухолях БКР он выявлялся лишь в $24,4 \pm 4,5\%$ клеток ($p < 0,05$). Таким образом, большая пролиферативная активность и инвазивность опухоли при МТР происходит на фоне значительной потери функций контроля апоптоза опухолевых кле-

ток, что обеспечивает приобретение опухолью агрессивных свойств и устойчивости к терапии.

УРОВЕНЬ АПОПТОЗА МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

**Стахеева М.Н., Чердынцева Н.В.,
Слонимская Е.М., Бабышкина Н.Н.**

НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, Томск, Россия

Состояние иммунной системы больных злокачественными новообразованиями является важным компонентом общего клинического статуса пациента и влияет на характер течения заболевания, переносимость и эффективность противоопухолевого лечения. Апоптоз как механизм регуляции количественного гомеостаза клеток организма [J.Bowen et al., 1998] может в значительной степени определить морфо-функциональное состояние иммунной системы у больных раком [Р.И.Сепиашвили и соавт., 2000]. Известно, что развивающаяся неоплазма способна индуцировать апоптоз иммуноцитов, что является одним из вероятных механизмов опухолевой иммуносупрессии [Е.Б.Владимирская, 2002]. Проводимое противоопухолевое лечение, прежде всего, химио- и радиотерапия, вследствие низкого уровня селективности действия также может способствовать включению апоптоза в клетках иммунной системы [М.Л.Гершанович и соавт., 1999].

Целью работы явилось изучение уровня апоптоза мононуклеарных клеток периферической крови во взаимосвязи с иммунологическим статусом у больных раком молочной железы (РМЖ) до и после проведения неоадьювантной химиотерапии (НХТ).

Материал и методы. В исследование были включены 53 больные РМЖ с $T_{1-4}N_{0-2}M_0$. Диагноз верифицирован морфологически. НХТ проводилась по схеме CMF стандартными дозами (2-3 курса). Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли стандартным методом градиентного центрифугирования. Уровень апоптоза МКПК определяли с использованием ядерного красителя Hoechst 33342 [H.Stridh et al., 2002]. Наряду с этим оценивали количество CD95⁺ клеток цитохимическим методом. Показатели иммунного статуса исследовали в соответствии с методическими рекомендациями [Р.В.Петров и соавт., 1992]. Статистическую обработку материалов проводили с использованием программы Statistica.

Результаты. До начала лечения процентное количество CD95⁺ клеток составляло $21,81 \pm 2,36\%$, а четкие признаки фрагментации ядерного материала выявлялись у $26,96 \pm 1,81\%$ МКПК. Уровень морфологически выраженного апоптоза клеток периферической крови не был статистически значимо связан ни с одним из исследованных показателей иммунной системы. Количество МКПК, несущих на мембране CD95-антиген, коррелировало только с числом CD25⁺ клеток ($r=0,56$), что соответствует современным представлениям о взаимосвязи процессов активации и гибели клеток [А.Н.Чередеев, Л.В.Ковальчук, 1997]. Между количеством CD95⁺ клеток и уровнем клеток с признаками апоптоза выявлена положительная корреляция ($r=0,37$).

После проведения НХТ CD95-антиген экспрессировали $15,73 \pm 2,64\%$ клеток, морфологические признаки апоптоза наблюдались у $30,83 \pm 3,58\%$ МКПК, а эти два параметра между собой находились в отрицательной кор-

реляционной связи ($r = -0,36$). По-видимому, реализация механизмов клеточной гибели снижает популяцию клеток, потенциально готовых к вступлению в апоптоз. Кроме того, после проведения НХТ число CD95⁺ клеток периферической крови находилось в отрицательной корреляционной связи ($r = -0,9$; $p < 0,05$) с количеством CD3⁺ и CD56⁺ клеток, выполняющих функцию киллинга, но не было взаимосвязано с маркером активации CD25 ($r = 0,01$). Вероятно, при проведении НХТ процесс активации лимфоцитов уступает ведущее место в индукции апоптоза иммунокомпетентных клеток иным механизмам.

Заключение. Проведение неоадьювантной химиотерапии у больных РМЖ сопровождается изменением структуры корреляционных связей показателей апоптоза клеток периферической крови с другими параметрами системы иммунитета. В основе этого, вероятно, лежит включение в действие дополнительных механизмов, влияющих на уровень клеточной гибели МКПК в результате НХТ и не играющих существенной роли до начала противоопухолевого лечения.

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИ p53 ИММУНОГЛОБУЛИНА

Тендлер Е.В.¹, Панышин А.Г.², Зусман И.³, Зиндер О.¹, Фрейдлин И.С.⁴

¹Медицинский центр «Рамбам», отдел клинической биохимии, Медицинский факультет Техниона, Хайфа, Израиль; ²Ветеринарный институт им. Кимрона, Отдел болезней птиц, Бэйт-Даган, Израиль; ³Еврейский университет, ветеринарный факультет, Реховот, Израиль;

⁴ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Было установлено, что введение поликлональных антител, направленных против белка p53, предотвращает развитие индуцируемых канцерогеном злокачественных опухолей кишечника и кожи, а также угнетает прогрессирование уже развившихся опухолей у крыс и мышей (Zusman и др., 1996; Ben-Nur и др., 1997).

В четырех сериях экспериментов, выполненных на крысах и трансгенных мышях, были изучены некоторые возможные механизмы противоопухолевого действия анти-p53 иммуноглобулинов. Было установлено, что ключевым моментом в противоопухолевом действии анти-p53 антител является увеличение внутриклеточной концентрации белка p53. Это увеличение связано не только с появлением более стабильных мутантных форм p53 белка, но и с резким усилением активности промотора гена p53, которым сопровождается введение анти-p53 иммуноглобулина, как показали опыты на трансгенных мышях.

Хотя p53 не относится к поверхностным антигенам клетки, олигопептидные фрагменты этого белка в комплексе с антигеном гистосовместимости первого типа, презентуются на клеточной поверхности и становятся мишенью для атаки Т-лимфоцитов. В нормальных условиях концентрация белка p53 в тканях ничтожна и его распад по убиквитинового пути приводит к полной элиминации. При малигнизации происходит нарастание уровня p53 за счет большей устойчивости мутантного p53, при этом его синтез снижается. Ситуация резко меняется при введении антител к p53. Возрастает экспрессия промотора, что является показателем усиления транскрипции специфической м-РНК с последующим ускорением

трансляции белка p53. Это в свою очередь, приводит к образованию избыточного количества олигопептидов и их презентации в комплексе с МНС-1.

Обнаруженное нами наличие массивных лимфоидных инфильтратов, содержащих большое количество CD25⁺ клеток в опухолях животных, получивших антитела к p53, является косвенным подтверждением развития клеточных противоопухолевых иммунных реакций.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ОНКОСУПРЕССОРНОГО БЕЛКА P53 И ХЕМОКИНОВОГО РЕЦЕПТОРА CCR5 У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО И БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Флеминг М.В.^{*}, Гервас П.А., Чердынцева Н.В., Климов В.В.^{*}, Гердт Л.В., Севостьянова Н.В., Белявская В.А.^{}**

ГУ НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН;

^{*}СибГМУ, Томск;

^{**}ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск, Россия

Введение. Накопленные в настоящее время сведения о взаимосвязи аллергии и рака свидетельствуют о необходимости исследования генетической основы снижения в ряде случаев частоты злокачественных новообразований у больных аллергическими заболеваниями. Рак легкого и атопическая бронхиальная астма относятся к достаточно широко распространенным заболеваниям с различным патогенезом, вовлекающим иммунные механизмы. Многие исследователи указывают на наличие отрицательной связи между этими заболеваниями. Атопическая бронхиальная астма и рак легкого по своей природе являются мультифакториальными заболеваниями, в их патогенез вовлекается много разных функционально-взаимосвязанных генов (генные сети), в том числе участвующие в функционировании иммунной системы. Ген p53 играет роль в поддержании стабильности генома за счет апоптоза клеток с поврежденной ДНК. Многочисленными исследованиями показана взаимосвязь полиморфизма гена онкосупрессорного белка p53 с риском возникновения рака легкого. При бронхиальной астме имеет место дефект апоптоза лимфоцитов и эозинофилов, роль p53 в этиологии этого заболевания не исследована. Показано, что ген хемокинового рецептора CCR5 регулирует транскрипцию гена p53 и наличие его делеционного аллеля CCR5del32 ассоциировано с повышением риска неблагоприятного исхода заболевания у больных раком молочной железы (Manes et al., 2004). Есть сведения о пониженном риске заболевания бронхиальной астмой у носителей CCR5del32 (Debouck et al., 2002).

Цель: провести сравнительный анализ полиморфизма генов CCR5 и p53 у больных раком легкого и атопической бронхиальной астмой и оценить ассоциацию аллельных вариантов генов с клинико-морфологическими особенностями заболеваний.

Материалы и методы. Обследовано 150 больных первичным плоскоклеточным раком легкого (РЛ) и 79 больных атопической бронхиальной астмой (БА). Генотипирование CCR5 и p53 осуществляли ПЦР. Показатели иммунного статуса оценивали стандартными методами.

Результаты исследования. Частота носительства делеционного аллеля CCR5del32 в группе больных РЛ составила 0,186, что достоверно выше регионального популяционного контроля ($\chi^2 = 5,42$, $p = 0,020$). По данным Юдина Н.С. и соавторов (1998 г.) частота делеционного аллеля в смешан-

ной популяции западносибирского региона составила 0,111. У больных БА частота делеционного аллеля CCR5del32 составила 0,025 и была ниже показателей группы РЛ ($\chi^2=23,67$, $p=0,000$) и здоровых лиц ($\chi^2=9,55$, $p=0,002$). Выявлено снижение уровня сегментоядерных нейтрофилов периферической крови в группе БА по сравнению с показателем группы РЛ ($52,6\pm 1,7\%$ и $63,0\pm 2,0\%$, соответственно, $p=0,001$). Получены различия относительного содержания лимфоцитов периферической крови: $25,8\pm 1,8\%$ при РЛ против $32,9\pm 2,1\%$ при БА ($p=0,011$). В то же время уровень CD95⁺ клеток у больных БА ниже нормы и показателя группы больных РЛ ($8,8\pm 1,0\%$ и $11,7\pm 1,0\%$, соответственно, $p=0,032$), что свидетельствует о низкой готовности лимфоцитов к активационному апоптозу. Исследование полиморфизма гена p53 выявило особенности распределения его аллельных вариантов у больных РЛ и БА. В работе проведен анализ ассоциации сочетаний различных аллелей изучаемых генов с клинико-морфологическими особенностями заболеваний.

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ У ДЕТЕЙ

**Хайруллина Р.М.¹, Хаматдинова З.Р.,
Гильманов А.Ж., Чувилина Е.В., Хисамова Н.Ф.**

*Детская Республиканская клиническая больница,
Уфа, Россия*

Иммунофенотипирование клеток крови и костного мозга методом проточной цитометрии в настоящее время является одним из основных методов в диагностике и оценке прогноза заболевания при острых лейкозах.

В Республике Башкортостан в 2004 году заболеваемость гемобластозами составила 5,0 на 100 000 детского населения.

Основная цель работы – характеристика стандартных и атипичных иммунологических вариантов острого лейкоза у детей Башкортостана, и определение прогностических критериев тяжести течения заболевания по данным ДНК цитометрии.

Результаты и обсуждение. За период с 1999 по 2004 г. было обследовано 75 детей с острым первичным лейкозом, проходивших стационарное лечение в гематологическом отделении Республиканской детской клинической больницы (г. Уфа). Возраст обследованных больных был в пределах от 2 мес до 17 лет. 31% составили дети до 5 лет. Острым лейкозом чаще страдали мальчики – 56%, девочки – 44%.

У 78,7% детей были диагностированы различные варианты острого лимфолейкоза (ОЛЛ), у 21,3% – острого миелолейкоза (ОМЛ). У 66% детей с ОЛЛ бластные клетки имели В-клеточное происхождение, у 34% – Т-клеточную природу. У пациентов с острым лимфобластным лейкозом Т-линии были определены следующие иммунологические варианты: про-Т-ОЛЛ(Т I) у 3 детей, пре-Т-ОЛЛ(Т II) у 7 детей, кортикальный Т-ОЛЛ(Т III) у 5 детей, Т-зрелый ОЛЛ(Т IV) у 5 детей. У пациентов с острым лимфобластным лейкозом В-линии фенотипы бластных клеток распределились следующим образом: В (common)ОЛЛ (В II) имеют 23 детей, пре-В-ОЛЛ (В III) имеют – 8 детей, В-зрелый ОЛЛ (В IV) имеют – 2 детей, пре-пре В-ОЛЛ(В I)-6.

На данном этапе работы выявлено, что наличие экспрессии маркеров CD34 и CD5 более чем на 50% бластных клетках при ОЛЛ у детей ухудшает прогноз заболевания. Полученные данные имеют большое практическое значение, так как позволяют осуществлять разделение больных на группы риска и в зависимости от прогноза заболевания проводить дифференцированную, адекватную терапию.

Экспрессия двух и более миелоидных антигенов имеет важное прогностическое значение для Pre-pre-B и Common В вариантов острого лимфобластного лейкоза, что необходимо учитывать при выборе правильной тактики лечения.

Был проведен анализ клинико-гематологических особенностей между группами детей ОЛЛ с отсутствием экспрессии (Му-), с наличием одного (Му+), а также двух (Му++>) миелоидных антигенов в каждом стандартном иммунологическом варианте среди В-линейных вариантов: Pre-pre-B, Common-B и Pre-B частота встречаемости (Му-) при Pre-pre-B составила 30%, (Му++>) Pre-pre-B – 40%; при (Му-) Common 50%, (Му+) Common 50%.

Одной из наиболее важных черт лейкозных клеток является высокая пролиферативная активность. Нами проведена сравнительная характеристика параметров клеточного цикла бластных клеток у 22 детей с различными типами острых лейкозов (В-острые лимфобластные лейкозы – ОЛЛ, острые миелолейкозы – ОМЛ). Распределение бластных клеток по фазам клеточного цикла оценивали по содержанию ДНК методом проточной цитофлуориметрии.

Проведение ДНК-цитометрии костного мозга больных острым лейкозом позволило выявить различные типы гистограмм:

– В-ОЛЛ характеризуется преобладанием диплоидного типа гистограмм, клетки находятся в фазе G1-35% S-фазе-65%

– ОМЛ (1-2)гистограммы диплоидного типа, клетки находятся в фазе G1-65% S-фазе-35%

Таким образом, проведенные исследования характеризуют особенности митотического цикла бластных клеток у больных острым лейкозом. Установлено, что ОМЛ отличается более низким содержанием бластных клеток в S и G2+M фазах.

Многофакторный анализ результатов проведенных исследований является основанием для разработки дифференциальных подходов к лечению детей с острым лейкозом и дает возможность индивидуализировать химиотерапию. Кроме того, результаты могут быть использованы для разработки дифференцированных критериев тяжести заболевания и формирования групп риска.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИМФОЦИТОВ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ПОЧЕЧНОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ В ДО И ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫЙ ПЕРИОДЫ

Хват Н.С., Шкапова Е.А., Савченко А.А.

*Красноярский государственный университет,
ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН,
Красноярск, Россия*

Почечноклеточный рак (ПКР) составляет около 3% всех злокачественных новообразований и 97% всех опухолей почек. Присутствие опухоли в организме сопровождается выраженной иммуносупрессией. Скорость восстановления реактивности звеньев иммунной системы после удаления иммуносупрессирующего очага имеет большое значение для адекватного иммунного ответа организма на антигены различной природы, в том числе и на опухольтрансформированные клетки, которые могут образоваться при метастазировании.

Целью данного исследования явилось изучение фенотипических особенностей популяций лимфоцитов у больных почечноклеточным раком до и после хирургического лечения.

На базе Красноярского краевого онкологического центра были обследованы больные ПКР (III стадия заболевания) в возрасте 30–50 лет до хирургического лечения ($n=94$), а также через 14 дней ($n=72$) после оперативного вмешательства. Фенотипический состав лимфоцитов крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. Исследование функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов проводилось с помощью люминолзависимой хемилюминесцентной реакции на 36-канальном ХЛ анализаторе «CL3604» (СКТБ «Наука» г. Красноярск). В качестве индуктора «дыхательного взрыва» использовали опсонизированный зимозан в концентрации 2 мг/мл («SiGMa», USA).

У больных ПКР до операции наблюдается снижение абсолютного количества лейкоцитов и лимфоцитов по сравнению с контрольной группой. В группе у неоперированных больных отмечено снижение относительного и абсолютного количества $CD3^+$ - и $CD4^+$ -лимфоцитов. Помимо этого, повышается относительное содержание $CD16^+$ - и $HLA-DR^+$ -клеток, но абсолютное количество клеток данных популяций у больных до хирургического вмешательства снижено. У больных ПКР до хирургического лечения повышено относительное содержание В-лимфоцитов.

В группе больных через 14 дней после операции обнаружен рост абсолютного числа лейкоцитов по сравнению с больными до хирургического вмешательства. На фоне понижения абсолютного числа лимфоцитов наблюдается снижение относительного и абсолютного уровня $CD3^+$ -лимфоцитов относительно группы контроля. Отмечено понижение относительного и абсолютного количества $CD4^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов. Абсолютное количество клеток, несущих на своей поверхности маркер $CD16^+$ и $HLA-DR^+$ понижается по сравнению со здоровыми донорами, как следствие понижения абсолютного числа лимфоцитов, но их относительное количество повышается по отношению к той же группе контроля. Установлено повышение относительного числа В-лимфоцитов по сравнению со здоровыми донорами. В группе больных до оперативного вмешательства при индуцированном хемилюминесцентном ответе отмечается повышение площади хемилюминесцентной кривой по сравнению с таковой у здоровых людей, что свидетельствует о более интенсивной выработке активных форм кислорода. Кроме того, у больных до хирургического вмешательства выявлено понижение индекса активации по сравнению со здоровыми донорами. У больных ПКР после оперативного вмешательства при спонтанном хемилюминесцентном ответе по сравнению с неоперированными больными выявлено повышение времени выхода на максимум хемилюминесцентной кривой. Помимо этого, в данной группе по сравнению с контролем отмечено повышение интенсивности спонтанной хемилюминесценции. При исследовании в этой же группе индуцированного хемилюминесцентного ответа обнаружено повышение максимума и площади хемилюминесцентной кривой по сравнению с таковыми у здоровых доноров и больных до операции. Индекс активации в данной группе выше, чем у больных до хирургического вмешательства.

Таким образом, изучение фенотипического состава лимфоцитов и функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в крови позволило установить, что у больных ПКР в дооперационный период выявляется иммунная недостаточность, характеризующаяся снижением величин показателей клеточного звена иммунной системы и снижением функционального ответа гранулоцитов на зимозан. Через 14 дней после операции у больных выявляется отсутствие восстановления популяционного и

субпопуляционного состава лимфоцитов крови, но наличие тенденции к восстановлению функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов.

ОПТИМИЗАЦИЯ ИНДУКЦИИ ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ С ПОМОЩЬЮ $gHSP70$ *M. TUBERCULOSIS*

Хомякова А.В.², Гукасова Н.В.¹, Москалева Е.Ю.^{1,2},
Киселев С.М.³, Позднякова Л.П.³, Свешников П.Г.³,
Корженевский Д.А.¹, Луценко С.В.³, Северин
С.Е.^{1,2}, Северин Е.С.^{2,3}

Московский НИИ медицинской экологии, Москва,
Россия¹; Московская медицинская академия им.
И.М.Сеченова², Москва, Россия;
Всероссийский научный центр молекулярной
диагностики и лечения³, Москва, Россия

Введение. Белки теплового шока (HSP), и $HSP70$ в том числе, играют важную роль в осуществлении ряда иммунных процессов. Экзогенные пептиды в составе комплексов HSP -пепид эндцитируются дендритными клетками (ДК) и затем могут быть представлены лимфоцитам в комплексе с молекулами МНС I. Кроме того, HSP активируют ДК, что приводит к стимуляции секреции провоспалительных цитокинов и усилению экспрессии костимулирующих молекул. Семейство $HSP70$ относится к высоко консервативным белкам и $HSP70$ *M. tuberculosis* взаимодействует с АПК человека. В то же время, являясь бактериальным иммуногенным белком он может оказывать дополнительное стимулирующее воздействие и оптимизировать цитокиновое микроокружение ДК и Т-лимфоцитов. Это позволило предположить, что $gHSP70$ *M. tuberculosis* может быть использован в качестве адьюванта при нагрузке ДК опухолеспецифическими антигенами (ОСА) для приготовления ДК-вакцин и иммунотерапии онкологических заболеваний.

Целью работы явилось сравнение уровня продукции $IFN\gamma$ и активности ЦТЛ, индуцированных ДК, нагруженных ОСА (белком или пептидом), и ДК, нагруженных комплексами этих ОСА с $gHSP70$ *M. tuberculosis*.

Материалы и методы. В работе использовали простатаспецифический антиген (ПСА) и $HLA-A2$ -рестриктированный пептид простатаспецифического мембранного антигена $PCMA_{27}$ (VLAGGFLL). ДК готовили из моноцитов периферической крови здоровых доноров. Незрелые (нзДК) и зрелые (зДК) ДК нагружали ОСА или специально приготовленным комплексом $ОСА+gHSP70$ *M. tuberculosis*. К нзДК после этого добавляли факторы созревания. Образование комплекса контролировали с помощью ВЭЖХ при использовании ФИТЦ-меченого пептида. Для индукции ЦТЛ ДК отмывали и инкубировали с сингенными лимфоцитами в соотношении 1:10. Через 24 ч в культуральной среде определяли концентрацию $IFN\gamma$ с помощью ИФА. Стимуляцию лимфоцитов ДК повторяли 1 раз в неделю. ЦТА лимфоцитов исследовали в отношении $HLA-A2^+$ клеток аденокарциномы предстательной железы линии LNCaP, экспрессирующей ПСА и $PCMA$.

Результаты. Продукция $IFN\gamma$ при взаимодействии наивных лимфоцитов с ДК, нагруженными ОСА, была в 3-8 раз выше при нагрузке ДК комплексами ОСА с $gHSP70$.

Более высокая ЦТА также наблюдалась для тех лимфоцитов, которые индуцировали ДК, нагруженными комплексами ОСА с $gHSP70$ (табл.).

ТАБЛИЦА. ПРОДУКЦИЯ IFN γ И ЦТА ЛИМФОЦИТОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ЗРЕЛЫМИ ДК, НАГРУЖЕННЫМИ ОСА И КОМПЛЕКСАМИ ОСА С rHSP70 *M. tuberculosis* В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК ЛИНИИ LNCaP

Условия инкубации	Незрелые ДК → нагрузка созревание				Зрелые ДК → нагрузка			
	ПСА	ПСА+Hsp	ПСАМА 27	ПСАМА27+HSP	ПСА	ПСА+Hsp	ПСАМА 27	ПСАМА27+HSP
	Продукция IFN γ , пг/мл							
ДК+лимфоциты (1:10) 24 часа	65±2	420±60	133±8	473±63	152±3	670±60	100±20	775±25
Мишень: эффектор	ЦТА, %							
1: 5	32	34	34	47	28	30	15	19
1:10	34	44	41	48	25	39	17	47
1:20	39	56	51	61	46	52	24	51
1:40	56	61	56	72	66	70	57	56

Заключение. Использование rHSP70 *M. tuberculosis* для приготовления комплексов белковых и пептидных ОСА для нагрузки ДК обеспечивает более высокий уровень продукции IFN γ и позволяет индуцировать более высокий специфический клеточный иммунный ответ в отношении опухолевых клеток, что позволяет рекомендовать этот белок для использования в качестве адьюванта при приготовлении ДК-вакцин.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ

Чкадуа Г.З., Борунова А.А., Носов Д.А., Заботина Т.Н., Арустамян Л.Ю., Огородникова Е.В., Кадагидзе З.Г., Барышников А.Ю.

ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва

Вакциноterapia дендритными клетками (ДК) – одно из бурно развивающихся направлений биотерапии опухолей. ДК – наиболее мощные антиген-презентирующие клетки, которые способны вызывать иммунный ответ против антигенов, представленных на их поверхности. В ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН проводится первая фаза клинических исследований вакцины на основе аутологичных ДК, нагруженных опухолевыми антигенами. В исследование включены больные с прогрессирующим заболеванием и исчерпавшие доступные методы лечения.

ДК культивировали из моноцитов крови. Для этого мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли из лейкоконцентрата, полученного после лейкофереза 3000 мл крови больного. Из небольшого количества МПК сразу культивировали ДК, тогда как большую часть клеток подвергали криоконсервации для их последующего использования. Источником антигенов служил опухолевый материал самого больного, забираемый во время паллиативной нефрэктомии. Из суспензии опухолевых клеток получали лизат, которым нагружали ДК. Нагруженные дендритные клетки имели зрелый иммунофенотип, что выражалось в экспрессии CD83 более, чем у 70% популяции клеток. Интервал между введениями вакцины составлял 2 недели. При каждой вакцинации вводили от 3 до 10 млн ДК в несколько точек внутрикожно. Перед каждым введением ДК производили забор крови для определения иммунологических показателей.

Вакцинацию больные переносили удовлетворительно, во время и после введения ДК никаких токсических явлений не наблюдали. После проведения нескольких вакцинаций в местах введения нагруженных ДК на следующий день наблюдали реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), что выражалось в гиперемии, которая постепенно уменьшалась в последующие несколько суток. Диаметр гиперемизированных участков варьировал от 10 до 30 мм. Реакция ГЗТ обусловлена взаимодействием Т-клеточного рецептора специфических Т-лимфоцитов с пептидами, представленными на главном комплексе гистосовместимости на поверхности дендритных клеток. ГЗТ свидетельствует о развитии иммунитета на антигены, которыми нагружены ДК. Для доказательства того, что иммунная реакция идет на опухолевые антигены, рядом с нагруженными ДК вводили ненагруженные ДК. В этом случае ГЗТ наблюдали только в тех местах, куда вводили нагруженные дендритные клетки.

Таким образом, была показана безопасность и перспективность применения ДК у больных по поводу рака почки.

СУФРА 21.1 В КЛИНИКЕ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Шелепова В.М.

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

Введение. Несмотря на прогресс в развитии медицинских технологий, диагностика рака мочевого пузыря (РМП) остается непростой задачей. Лишь у 40% больных диагноз устанавливается в течение месяца после обращения к врачу. Основным методом диагностики является цистоскопия, но у 9 – 20% больных ее проведение невозможно. Цитологическое исследование осадка мочи отличается недостаточной чувствительностью и специфичностью. Особенностью РМП является то, что более половины пациентов страдают от рецидивов и от повторных рецидивов, и им показано длительное наблюдение, иногда до конца жизни. Частые обследования, включающие цистоскопию, биопсию, и, в некоторых случаях, повторные оперативные вмешательства относятся к дорогостоящим и болезненным процедурам. В этой связи опухолевые маркеры являются новым многообещающим методом в диагностике и лечении РМП.

Цель исследования. Изучение целесообразности определения CYFRA21.1 в моче для диагностики РМП и его рецидивов.

Материалы и методы. Для определения диагностической значимости CYFRA21.1 концентрацию маркера измеряли в образцах мочи, полученных от 52 человек, которые были подразделены на 2 группы: 1-ая – контрольная, общей численностью 31 человек, включала 19 здоровых лиц и 12 пациентов с доброкачественными заболеваниями мочевого пузыря; 2-ая – первичные больные РМП – 21 человек.

Значение маркера в диагностике рецидивов РМП изучали посредством его серийных измерений в моче 36 пациентов, находящихся в ремиссии в течение 0,5 – 8 лет после трансуретральной резекции мочевого пузыря (ТУР) по поводу рака. На каждого пациента приходилось 3 – 4 измерения CYFRA 21.1.

CYFRA 21.1 определяли в образцах утренней мочи электрохемилюминесцентным методом с использованием диагностических тест-систем производства Hoffmann – la Roche. Анализы проводились на автоматическом анализаторе ELECSYS 1010 той же фирмы. Результаты нормировались на креатинин мочи.

Результаты. У здоровых доноров среднее значение CYFRA 21.1 составляло 0,159 нг/мкМ креатинина (от 0,034 до 0,328 нг/мкМ креатинина); у лиц с доброкачественными заболеваниями мочевого пузыря – 0,241 (0,035 – 0,608); у больных РМП – 2,226 (0,172 – 210,75). По сравнению с контрольной группой онкологические больные отличались существенно более высокой концентрацией CYFRA 21.1. Анализ полученных результатов позволил рассчитать диагностические характеристики этого маркера: при дискриминационном уровне 0,280 нг/мкМ креатинина диагностическая специфичность составила 87,1% (27/31), диагностическая чувствительность – 76% (16/21); положительный прогноз – 80% (16/20), отрицательный прогноз – 84% (27/32).

Результаты мониторинга пациентов с использованием CYFRA 21.1 приведены в таблице.

На основании полученных результатов, чувствительность CYFRA 21.1 в отношении рецидива составила 75% (12/16), специфичность – 82% (18/22), положительный прогноз – 85,7% (12/14), отрицательный прогноз – 90% (18/20).

Заключение. CYFRA 21.1 является высокоинформативным маркером в клинике РМП. CYFRA 21.1 не может использоваться в самостоятельном варианте для диагностики рака, но, имея положительную прогностическую значимость около 80%, может быть полезен в отборе пациентов с симптомами на цистоскопию. С другой стороны, устойчиво стабильный уровень маркера в серийных измерениях позволяет снизить число цистоскопий.

ТАБЛИЦА. ЗНАЧЕНИЕ CYFRA 21.1 В ДИАГНОСТИКЕ РЕЦИДИВОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

	Рецидива не установлено, n=22	Клинически установленный рецидив, n=14
CYFRA 21.1 без изменения	18	2
Повышение уровня CYFRA 21.1	4	12
Принято, что повышение уровня CYFRA 21.1 имеет место, если его концентрация превышает исходное значение на 50 и более процентов		

ВОЗМОЖНЫЕ ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВАКЦИН

Шубина И.Ж., Лебединская О.В., Ахматова Н.К., Киселевский М.В.

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

Важная роль дендритных клеток (ДК) в иммунном ответе основана на их свойствах профессиональных антигенпредставляющих клеток. Клинические испытания по разработке и внедрению противоопухолевых вакцин на основе ДК находятся еще в начальной стадии. Перспективность иммунотерапии с использованием ДК-вакцин была показана в некоторых исследованиях при меланоме, аденокарциноме предстательной железы, множественной миеломе, В-клеточной лимфоме и некоторых других видах рака. Однако остаются открытыми вопросы о выработке оптимальных параметров иммунотерапии с использованием ДК, в частности, наиболее подходящих источниках генерации ДК, условиях их культивирования. В настоящее время основным источником для создания противоопухолевых вакцин служат ДК, полученные из моноцитов периферической крови человека.

Целью данной работы было исследование возможности использования различных источников для генерирования ДК с целью создания противоопухолевых вакцин.

Материалы и методы. В качестве источников генерации ДК использовали МНЛ (моноклеарные лейкоциты из периферической крови здоровых доноров), ЛАК (лимфокин-активированные киллеры), клетки-предшественники из костного мозга онкологических больных (КП), клетки-предшественники из периферической крови донора, предварительно подготовленного стимуляцией нейпогеном (КПН). Костномозговые КП выделяли из костного мозга больных РМЖ и ОМЛ, полученного интраоперационно. МНЛ выделяли по стандартной методике на градиенте плотности. ЛАК получали культивированием МНЛ в присутствии IL-2. Для генерации ДК полученные клетки-источники культивировали в полной среде RPMI 1640 в присутствии GM-CSF и IL-4 6 суток, затем добавляли TNF α на 1-2 дня. Анализировали иммунофенотип ДК на проточном цитофлуориметре, проводили оценку морфологических изменений, продукции цитокинов, фагоцитарной активности.

Результаты. Полученные из разных источников ДК имеют типичную морфологическую характеристику крупных клеток звездчатой формы, с сильно вакуолизированной цитоплазмой, эксцентрично расположенным ядром и множеством цитоплазматических отростков.

Окрашивание по Браше выявило высокое содержание пиронинофильного компонента, отражающего значительное содержание РНК. Иммунофенотип зрелых ДК представлен, в частности, экспрессией антигенов CD83, CD80, CD86, МНС I и МНС II, и отсутствием экспрессии маркера макрофагов CD14. При сравнении популяций ДК из МНЛ и ЛАК, больший выход ДК получается из ЛАК клеток. Зрелые ДК, генерированные из blasts костного мозга больных ОМЛ составляют 30% всей полученной популяции, в то время как из костного мозга больных острым лимфоидным лейкозом генерировать ДК не удастся.

Выводы. Для создания вакцин на основе ДК могут быть использованы различные источники: моноциты периферической крови, ЛАК, клетки-предшественники из костного мозга, миелобласты.