

ОНКОИММУНОЛОГИЯ, ГЕМОБЛАСТОЗЫ

ИЗМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С МЕТАСТАЗАМИ В ЛЕГКИЕ

Андреяшкина И.И., Плохов В.Н.

НУЗ «Дорожная клиническая больница», г. Саратов,
Россия

Состояние иммунной системы является одним из основных факторов, определяющих динамику злокачественного процесса. При этом определение иммунного статуса помогает более точно оценить состояние организма и позволяет выработать индивидуальную тактику ведения больной (Алимходжаева Л.Т., Зикийходжаев А.Д., 2010; Тотолян А.А., Фрейдлин И.С., 2000; Aita M., 2008). В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение особенностей клеточного звена иммунитета у больных раком молочной железы с метастазами в легкие.

Материал и методы. В связи с этим нами изучено состояние иммунитета у 120 пациенток раком молочной железы с метастазами в легкие и плевру. Для оценки иммунологического статуса исследовали венозную кровь до специального этапа лечения, после установления метастатического поражения легких и плевры. Для оценки состояния иммунологического статуса были использованы следующие тесты: количество лейкоцитов, количество лимфоцитов, бактерицидность нейтрофилов в спонтанном и активированном тесте (НСТ-тест), индекс активации, индекс соотношения $CD4^+/CD8^+$, фагоцитарная активность, количество Т-лимфоцитов ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, количество В-лимфоцитов ($CD19^+$);

Результаты исследования. При метастазировании рака молочной железы в легкие были изучены показатели клеточного звена иммунитета и выявлено, что по мере прогрессирования опухолевого процесса отмечаются определенные закономерности изменения ряда показателей. Как оказалось, содержание CD4-Т-лимфоцитов в крови пациенток раком молочной железы с метастазами в легкие снижалось по мере прогрессирования процесса и составило $18,56 \pm 1,53\%$ ($p < 0,01$). Установлено, что CD4-Т-лимфоциты представлены различными категориями Т-хелперов (Th0, Th1, Th2, Th3). Т-хелперы, характеризуются различной экспрессией генов, кодирующих образование лимфокинов с различными биологическими эффектами. Так, Th1 продуцируют IL-2, γ -интерферон, TNF α , Th2 – IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, Th3 – IL-4, IL-10, TGF- β . В связи с вышеизложенным очевидно, что выявленный нами факт снижения представительства CD4-

Т-лимфоцитов в периферической крови свидетельствует о нарушении межклеточного взаимодействия не только между отдельными субпопуляциями лимфоцитов, но и клетками мононуклеарной фагоцитирующей системы, костного мозга, что в свою очередь способствует метастазированию рака молочной железы в легкие. В ходе дальнейшего исследования субпопуляционной характеристики у больных трех групп сравнения отмечено, что повышение уровня CD8-Т-лимфоцитов отмечалось по мере прогрессирования рака молочной железы. У больных раком молочной железы с метастазами в легкие уровень CD8-Т-лимфоцитов составил $39,41 \pm 0,52\%$ ($p < 0,01$). Киллерный эффект CD8-Т-лимфоцитов на клетки опухоли, несущих онкоантигены, обеспечивается при участии антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса. Учитывая тот факт, что опухолевые клетки экспрессируют указанные антигены гистосовместимости в значительно меньших количествах, чем нормальные клетки, следует отметить ускользание малигнизированных клеток от цитотоксического воздействия CD8-Т-лимфоцитов. Последние, способны лишь к «двойному распознаванию» онкогенного антигена в соединении с белками I класса главного комплекса гистосовместимости. Одновременно с повышением уровня CD8-Т-лимфоцитов у больных с раком молочной железы с метастазами в легкие отмечалось снижение соотношения CD4/CD8-Т-лимфоцитов. Одним из ведущих механизмов элиминации малигнизированных клеток из организма является антителозависимая цитотоксичность натуральных киллеров (CD16-Т-лимфоцитов). Последние не несут на своей поверхности маркерных молекул Т- и В-лимфоцитов, но имеют низкоаффинные рецепторы к Fc-фрагменту IgG, что обеспечивает антителозависимый лизис опухолевых деградирующих клеток. У больных раком молочной железы с метастазами в легкие отмечается снижение CD16-Т-лимфоцитов ($12,96 \pm 0,51\%$), что способствует опухолевой прогрессии.

Заключение. Метастазирование рака молочной железы в легкие способствует развитию вторичного Т-зависимого иммунодефицита. Так по мере прогрессирования рака молочной железы отмечалось снижение CD4-Т-лимфоцитов, а также CD16-лимфоцитов. При этом уровень CD8-Т-лимфоцитов увеличивался, что не способствовало увеличению уровня клеточного иммунитета, учитывая снижение соотношения CD4/CD8-Т-лимфоцитов.

РАЗРАБОТКА ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ КОСТНОМОЗГОВЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК (ДК), СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ ФОТОМОДИФИЦИРОВАННОЙ ОПУХОЛЬЮ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ

Балдуева И.А.^{1,2}, Моисеенко В.М.², Гельфонд М.Л.^{1,2}, Новик А.В.¹, Нехаева Т.Л.^{1,2}, Фахрутдинова О.Л.¹, Данилова А.Б.¹, Данилов А.О.¹, Проценко С.А.¹

¹ ФГУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования, Санкт-Петербург, Россия

В эксперименте установлено, что вакцинация СЗН/HeN мышей слабоиммуногенной ФДТ обработанной культурой опухолевых клеток плоскоклеточного рака SCCVII в апоптозе приводит к активации цитотоксических лимфоцитов, регрессу опухоли и устойчивости к повторному заражению (Korbelik M. et al., 2007). Введение незрелых ДК в ФДТ леченую аденокарциному С-26, растущую в BALB/с мышцах, приводит к созреванию ДК, миграции в местные и отдаленные лимфатические узлы, активации NK и CD8⁺ Т-клеток, полному регрессу опухоли у большинства животных (Jalili A. et al., 2004).

Цель исследования: оценить клиническую и иммунологическую эффективность метода вакцинации CD1a⁺ ДК в сочетании с сеансом ФДТ у больных с диссеминированной меланомой кожи, резистентных к противоопухолевой терапии.

Материалы и методы. В исследование после подписания информированного согласия включено 8 пациентов (2 мужчин и 6 женщины, возраст от 30 до 59 лет, 49,8±) с гистологически верифицированным диагнозом диссеминированной меланомы кожи. Больным были проведены циторедуктивные операции и системное противоопухолевое лечение (иммунотерапия, химиотерапия, химиоиммунотерапия). Методика: приготовление вакцины на основе костномозговых ДК включает мобилизацию G-CSF аутологичных предшественников ДК в периферическую кровь, операцию афереза, выращивание CD1a⁺ наивных ДК в безсывороточной питательной среде для выращивания ДК «CellGenix» с GM-CSF (800 U/ml) и IL-4 (500 U/ml) в течение 5 дней, криоконсервацию и хранение при -180 °С до использования. В день вакцинации больные получали внутривенное введение фотосенсибилизатора (фотодитазин, 1 мкг/кг веса), интерстициальную ФДТ опухолевого очага (доза света 100-120 Дж, плотность мощности на торце световода 50-100 мВт/см²), внутриопухолевое введение CD1a⁺ ДК (3 × 10⁶/кг веса). ДК вводили в течение 5 дней ежедневно. Лечение проводили каждые 2-3 нед (2-6 пятидневных циклов).

Результаты. Пациенты получили от 10 до 25 введений вакцины. У 2-х больных был зарегистрирован минимальный регресс (MR/PR 4 и 5 мес), у 2-х пациентов – стабилизация заболевания (3 и 5 мес+). Прогрессирование заболевания отмечено у 3 пациентов: у двух больных с большой опухолевой массой и торпидным течением болезни и у одной пациентки на фоне полного регресса трех мягкотканых метастазов, частичного регресса 2-х пораженных лимфатических узлов, выявлено локальное поражение оболочек спинного мозга.

Токсичность лечения проявлялась умеренными местными реакциями в виде гиперемии, отека и болезненности в зоне непосредственного лечебного воздействия у всех пациентов (8/8). Системные реакции проявлялись в виде лихорадки 1 ст. у 37% больных (3/8), лихорадки 2 ст. у 50% (4/8), астении 1 ст. у 62% (5/8), реактивной гиперплазии регионарных лимфатических узлов у 62% пациентов (5/8).

Активация иммунного ответа зарегистрирована на 7-й и 21-й день после вакцинации в виде увеличения количества CD3⁺ (p = 0,893 и p = 0,686 соответственно), CD4⁺ (p = 0,893 и p = 0,686 соответственно) и CD8⁺Т-клеток (p = 1 и p = 0,893 соответственно) у 87% (7/8). Пик активации CD4⁺Т-клеток наблюдался на 7-й день, CD8⁺ ЦТЛ – на 21-й день, что наряду с реакцией ГЗТ на внутрикожное введение аутологичных зрелых CD83⁺ ДК у 62% (5/8) вакцинированных больных и облученных опухолевых клеток (опухолевого лизата) bystander's effect у 100% (2/2) больных, свидетельствует о несомненной иммунологической эффективности метода.

Системный эффект был подтвержден иммуногистохимическим исследованием эксцизионной биопсии отдаленных метастазов. Выявлена лимфогистиоцитарная инфильтрация, клетки в апоптозе и некрозе. Опухолевые клетки обнаружены не были.

Выводы. Вакциноterapia CD1a⁺ наивными ДК в сочетании с ФДТ сопровождается реакцией ГЗТ у 62% больных, активацией иммунного ответа в лабораторных тестах – у 87% пациентов, объективным клиническим ответом (MR/PR/SD) – у 40% вакцинированных лиц.

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ПРОДУКТА АФЕРЕЗА У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

Баранова Д.С., Крючкова И.В., Пронкина Н.В., Баторов Е.В., Тихонова М.А., Гилевич А.В., Сергеевичева В.В., Сизикова С.А., Ушакова Г.Ю., Черных Е.Р., Пospelова Т.И.

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Введение. На клиническую эффективность аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в лечении гемобластозов, в т.ч. на время восстановления количества лимфоцитов, оказывают влияние содержащиеся в продукте афереза мононуклеарные клетки (МНК). Значение их отдельных субпопуляций в настоящее время изучено недостаточно.

Цель и задачи: изучить субпопуляционный состав продукта сепарации больных гемобластомами и его влияние на раннее восстановление лимфоцитов.

Материалы и методы. Аутологичная ТГСК была проведена 31 больному: 23 пациентам с лимфомами и 8 – с острым лейкозом. Мобилизацию ГСК проводили по стандартным протоколам с использованием препаратов Г-КСФ. Лейкоцитарную формулу определяли на гематологическом анализаторе, субпопуляции Т-лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), Treg (CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25⁺CD127⁻, CD4⁺FoxP3⁺), NK-клеток (CD16⁺), В-лимфоцитов (CD19⁺) оценивали методом проточной цитометрии, используя FITC-, PE- и PerCP-меченные моноклональные антитела. Под сроком выхода из лимфопении понимали день после ТГСК, когда абсолютное число лимфоцитов было больше 0,5 × 10⁹/л. Статисти-

ческий анализ проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0.

Результаты. По сравнению с периферической кровью (ПК) продукт афереза характеризовался тенденцией к более высокому относительному содержанию CD3⁺T-лимфоцитов ($P_U = 0,06$) и низким количеством CD16⁺NK-клеток ($P_U = 0,011$) и CD19⁺B-лимфоцитов ($P_U = 0,029$). Также продукт сепарации отличался повышенным относительным содержанием CD4⁺ лимфоцитов ($P_U = 0,00024$) и сниженным – CD8⁺ лимфоцитов ($P_U = 0,042$). Индекс соотношения CD4⁺/CD8⁺ в сепарате более чем в 2 раза превышал таковой в ПК ($3,35 \pm 0,6$ и $1,37 \pm 0,16$, соответственно; $P_U = 0,00017$). Относительное содержание Treg (CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25⁺CD127⁺, CD4⁺FoxP3⁺) в продукте афереза и ПК не различалось. При исследовании взаимосвязей между относительным содержанием различных субпопуляций Treg и других субпопуляций лимфоцитов в продукте сепарации выявлена обратная корреляция CD4⁺FoxP3⁺ лимфоцитов с NK-клетками ($R = -0,4$; $p_s = 0,019$).

Время выхода из лимфопении обратно коррелировало с количеством трансплантируемых CD34⁺ ГСК ($R = -0,39$; $p_s = 0,039$), относительным содержанием гранулоцитов и CD4⁺FoxP3⁺ регуляторных Т-клеток в продукте сепарации ($R = -0,4$; $p_s = 0,049$ и $R = -0,4$; $p_s = 0,040$ соответственно).

Заключение. Показаны изменения субпопуляционного состава МНК в продукте афереза по сравнению с ПК. Зафиксирован возможный супрессорный дозозависимый эффект вводимых регуляторных Т-клеток на восстановление лимфоцитов.

ДОЛЯ ПЕРФОРИН-СОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК В СТРУКТУРЕ CD45⁺CD16⁺ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ ПРИ ВАКЦИНОТЕРАПИИ

Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г.
РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия

Введение. Перфорин – важная составляющая цитотоксической активности эффекторных лимфоцитов и его оценка у больных, получающих специфическую противоопухолевую биотерапию является важным иммунологическим критерием.

Цель данного исследования – изучить динамику субпопуляции перфорин-содержащих клеток в структуре CD16⁺ лимфоцитов периферической крови больных диссеминированной меланомой кожи на фоне вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками, нагруженными опухолевым лизатом.

Материалы и методы. Для субпопуляционного анализа экспрессии внутриклеточных белков использовали метод одновременного окрашивания поверхностных антигенов в сочетании с окрашиванием внутриклеточных маркеров. Иммунофенотип лимфоцитов периферической крови исследовали в реакции иммунофлуоресценции с коммерческими МКА к CD45-, CD16-антигенам, perforin и изотипическими контролями, конъюгированными FITC, PE и PE-Cy5, с последующим анализом на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson). В исследование были включены больные диссеминированной меланомой кожи ($n = 15$), получившие по 6 вакцинаций и доноры ($n = 15$). Исследуемые больные были раз-

делены на две группы – в первую вошли больные, которые на фоне вакцинотерапии оставались в стабилизации ($n = 6$), а во вторую – больные у которых в процессе вакцинотерапии было выявлено прогрессирование основного заболевания ($n = 9$).

Результаты. Исследование внутриклеточного содержания перфорина в лимфоцитах периферической крови исследуемых больных показало, что до начала вакцинотерапии у больных двух групп количество CD45⁺perforin⁺ клеток было на уровне верхней границы нормы (в 1 группе – $25,5 \pm 8,5\%$ и во 2-ой – $25,1 \pm 8,4\%$). На фоне лечения у больных первой группы эта популяция клеток увеличивалась, и после 6-ой вакцинации в 1,6 раза превышала донорские показатели ($p < 0,01$), а у больных второй группы, напротив, оставалась без динамики. Анализ перфорин-позитивных НК клеток у больных двух исследуемых групп показал, что количество CD45⁺CD16⁺Perforin⁺ лимфоцитов, как до начала лечения, так и на фоне проводимой вакцинотерапии оставалось в пределах нормы ($12,1 \pm 4,9\%$). Доля perforin⁺ лимфоцитов в структуре CD45⁺CD16⁺ клеток у больных первой группы, также оставалась на уровне донорских показателей ($75,5 \pm 9,5\%$) и до начала терапии, и в процессе лечения. Однако у больных с прогрессирующим течением заболевания (вторая группа) доля перфорин-позитивных НК-клеток до начала вакцинотерапии была нормальной, а на фоне лечения уменьшалась, и после 6-ти вакцинаций была в 1,4 раза меньше нормы ($55,4 \pm 8,3\%$). Таким образом, на момент прогрессирования у больных диссеминированной меланомой кожи только половина популяции естественных киллеров содержала перфорин.

Выводы. В результате проведенного исследования, было выявлено, что доля перфорин-позитивных НК клеток у онкологических больных значительно уменьшалось при прогрессировании основного заболевания, тогда как количество CD45⁺CD16⁺Perforin⁺ лимфоцитов у всех больных, вне зависимости от клинического течения заболевания, оставалось в пределах нормы. Данную закономерность можно считать маркером прогрессирования основного заболевания в процессе проводимой вакцинотерапии и использовать для исключения пациентов из протокола исследования и перевода на другой вид терапии.

ПРИНЦИПЫ МОДЕРНИЗАЦИИ РЕГИСТРА ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК РОССИИ

Бубнова Л.Н., Павлова И.Е., Беляева Е.В., Ерохина Л.В., Беркос А.С., Реутова Н.В.

ФГУ РосНИИ ГТФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является одним из наиболее эффективных методов лечения многих гематологических, онкологических, аутоиммунных и наследственных заболеваний у детей и взрослых. Ежегодно в мире выполняется примерно 30000-40000 трансплантаций, и это число продолжает увеличиваться на 10-20% каждый год.

Успешное приживление и функционирование трансплантата ГСК возможно только при высокой степени точности подбора пар донор-реципиент по генам системы HLA – человеческих лейкоцитарный антигенов, или главного комплекса гистосовместимости. Полиморфизм генетической системы HLA исключительно вы-

сок, поэтому поиск двух индивидуумов, обладающих идентичными генетическими характеристиками, связан со значительными трудностями. Только 10-20% больных при показаниях к аллогенной ТГСК имеют совместимого родственного донора. В связи с этим основным направлением в мире стало развитие Регистров неродственных доноров ГСК, которые объединились в общемировую базу – BMDW.

В России регистры неродственных доноров ГСК существуют с конца 80-х годов, однако приказы об их организации не были обеспечены достаточным финансированием, в связи с чем численность типированных доноров в регистрах России абсолютно недостаточна для обеспечения необходимого для нашей страны числа трансплантаций, которое, по мнению ведущих специалистов в этой области и по сопоставлению с аналогичными цифрами в Европе, должно составлять 2-3 тысячи в год.

В настоящее время Минздравсоцразвития принято решение о модернизации Национального регистра неродственных доноров костного мозга/гск. Стремление различных стран развивать собственные регистры, несмотря на внушительную общемировую базу данных – более 17 миллионов доноров – связано с тем, что распределение HLA-генотипов имеет расовые и национальные особенности, поэтому возможность нахождения совместимого донора СТГК для аллогенной трансплантации напрямую зависит от соответствия этнического состава потенциальных доноров и пациентов. Для многонационального состава Российской популяции особенно актуально включение в национальный Регистр представителей самых различных национальностей, а соответственно, и регионов страны.

По мере возрастания числа трансплантаций в мире, а также в связи с обменом донорскими клетками между разными странами для оптимизации подбора, возникла необходимость принятия общих правил, которые способствовали бы урегулированию сложных вопросов взаимодействия различных регистров, трансплантационных центров и защиты интересов доноров гемопоэтических клеток. Поскольку стратегической целью модернизации Российского регистра доноров ГСК является создание обширного, активного действующего и постоянно увеличивающегося регистра типированных доноров, функционирующего по международным стандартам, принципы модернизации национального регистра должны соответствовать как российским, так и международным требованиям в областях рекрутирования доноров, качества гистотипирования, взаимодействия с трансплантационными центрами и этических проблем, возникающих при выполнении трансплантаций.

Основные принципы, на которых должен базироваться Регистр: регистр должен быть единым для России и включать данные всех локальных регистров; локальные регистры должны покрывать всю территорию нашей страны для включения представителей всех национальностей, проживающих в России; в отличие от зарубежного подхода включения в Регистр добровольцев из самых различных групп населения, мы предлагаем прежде всего базироваться на службе крови: основным контингентом являются доноры крови или плазмы. Эти люди психологически готовы к донорству, они обследованы на наличие гемотрансмиссивных инфекций и не имеют противопоказаний для дачи гемопоэтических клеток, у учреждений службы крови с ними налажена надежная связь. В качестве вспомогательного контингента могут быть исполь-

зованы служащие милиции, пожарной охраны и т.д. Необходимо также разработать правовую и регламентирующую документацию в сфере донорства гемопоэтических стволовых клеток.

Решение этих задач позволит создать высокоэффективную, профессиональную структуру государственного значения, осуществляющую работу на уровне мировых стандартов современных высоких клеточных технологий и уже в ближайшем будущем обеспечивать трансплантации гемопоэтических стволовых клеток материалом, полученным от доноров из отечественного регистра.

РАЗЛИЧНЫЕ ПОДХОДЫ К КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ПЛАНИРОВАНИИ АФЕРЕЗА

Голубева В.И., Зуева Е.Е., Новикова Ю.И.

*СПбГМУ им. академика И.П. Павлова,
Санкт-Петербург, Россия
Городская клиническая больница № 31,
Санкт-Петербург, Россия*

Введение. Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – популяция мультипотентных стволовых клеток – в настоящее время охарактеризована достаточно полно. ГСК взрослого организма находятся в красном костном мозге. Фенотипическим «портретом» ГСК является присутствие на поверхности клетки маркеров CD34, CD133, c-kit (CD117), отсутствие CD38 и специфических маркеров комитированных клеток гликофорина A, CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD56 и CD66b (Lin-). Уже первые попытки культивирования гемопоэтических стволовых клеток показали необходимость присутствия фидерного слоя из клеток стромы костного мозга. Именно клетки стромы костного мозга являются ключевыми регуляторами популяции ГСК. Стромальные элементы определяют пролиферацию и дифференцировку ГСК в костном мозге. ГСК способны мигрировать не только в костный мозг, но и из костного мозга в кровотоки. Показано, что выход ГСК из костного мозга происходит в ответ на воздействие факторов мобилизации: гранулоцитарно-макрофагального и гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (ГМ-КСФ и Г-КСФ), выделяемыми клетками стромы. Воздействие ГМ-КСФ и Г-КСФ значительно увеличивает количество ГСК в периферической крови. Трансплантация стволовых клеток периферической крови является альтернативой пересадки костного мозга при многих заболеваниях. Для трансплантации стволовые клетки периферической крови собирают как мононуклеары при аферезе. Для определения дня начала проведения афереза проводят количественное определение ГСК в периферической крови методом проточной цитофлуориметрии. Если прибор находится не в месте забора крови, то вместе с транспортировкой и анализом времени до получения результата проходит много. Но, так как сбор необходимого количества ГСК при аферезе (идет несколько часов) проводят 2-3 дня подряд, то более позднее получение результатов не является критичным. Но при наличии прибора, позволяющего осуществлять сбор ГСК за один день, появляется необходимость применения более простого метода для определения дня сбора ГСК. Г-КСФ регулирует продукцию нейтрофилов и выход функционально активных нейтрофилов из костного мозга в кровь. В клинических испы-

таниях показано, что препарат дозозависимо увеличивает число циркулирующих в крови нейтрофилов с нормальной функциональной активностью и высокой гранулярностью. Исходя из фармакологического действия препарата, было сделано предположение о том, что изменения характеристик нейтрофилов под воздействием Г-КСФ могут быть предикторами правильного выбора времени проведения афереза.

Цель и задачи. Целью данной работы стал поиск параметров, определяемых при анализе периферической крови на гематологическом анализаторе UniCel DxH 800 Beckman Coulter, по которым косвенно можно было бы судить о количестве ГСК в периферической крови и в продукте афереза. В задачи входит определение сил и направлений связей между содержанием ГСК и искомыми параметрами, а также определение зависимости изменения одного параметра от изменения другого.

Материалы и методы. В исследование вошли данные по 7 пациентам с множественной миеломой ($n = 5$) и лимфомой Ходжкина ($n = 2$) при подготовке к забору клеток при планировании аутологичной трансплантации. Были исследованы образцы периферической крови ($n = 56$), полученные до начала введения Г-КСФ и в последующие дни, включая дни аферезов. Количество процедур афереза ($n = 17$) определено по количеству ГСК, достаточному для проведения трансплантации ГСК (2-3 процедуры афереза на больного). Абсолютное и относительное содержание ГСК в периферической крови и в продукте афереза оценивали на проточном цитофлюориметре: Cytomics FC 500 Beckman Coulter по протоколу ISHAGE (одноплатформенный метод). Пробоподготовку вели с использованием набора Stem-Kit™ Reagents Beckman Coulter. Абсолютное и относительное содержание нейтрофилов и объем нейтрофила в периферической крови оценивали на гематологическом анализаторе UniCel DxH 800 Beckman Coulter. Анализ данных осуществлялся в программе Microsoft Excel. Нормальность распределений полученных данных была оценена на гистограммах. Для того чтобы обнаружить связь между параметрами и оценить ее силу были вычислены коэффициенты корреляций Пирсона (r). Для пар параметров, имеющих самую сильную связь, были вычислены коэффициенты регрессии (R) для выявления зависимости изменения одного параметра от изменения другого.

Основные результаты. Относительное и абсолютное содержание ГСК в образцах периферической крови колебалось от 0,0008% и $0,0002 \times 10^9/\text{л}$ до 1,21% и $0,1075 \times 10^9/\text{л}$ соответственно. Эти изменения были сопоставимы с изменениями в относительном и абсолютном содержании нейтрофилов: для относительных содержаний $r = 0,61$ ($p = 0,001$), $R = 87,17 \pm 0,31$ и для абсолютных содержаний $r = 0,43$ ($p = 0,05$), $R = 84,34 \pm 0,15$. Также выявлены однонаправленные изменения содержания ГСК (абсолютного и относительного) в продуктах афереза и изменения среднего объема нейтрофила в образцах периферической крови: соответственно $r = 0,91$ ($p = 0,01$), $R = 29,70 \pm 0,29$ и $r = 0,78$ ($p = 0,1$), $R = 16,26 \pm 0,57$.

Заключение. Изменение среднего объема нейтрофила в периферической крови наилучшим образом отражает как относительное, так и абсолютное содержание ГСК в аферезном продукте. При увеличении среднего объема нейтрофила примерно на 30 условных единиц следует ожидать, что в аферезном продукте относительное содержание ГСК увеличится на 1% и абсолютное количество увеличится на $2 \times 10^9/\text{л}$. В периферической крови при уве-

личении абсолютного относительного содержания нейтрофилов примерно на $45 \times 10^9/\text{л}$ и на 45% соответственно абсолютное и относительное содержание ГСК увеличится примерно на $0,5 \times 10^9/\text{л}$ и на 0,5% соответственно. Таким образом, изменения характеристик нейтрофилов под воздействием Г-КСФ однонаправлены с изменением содержания ГСК и могут быть предикторами правильного выбора времени проведения афереза.

ОПТИМИЗАЦИЯ НЕЙРОЭНДОКРИННОИММУННОЙ ЗАЩИТЫ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ, ОСЛОЖНЕННЫМ ХИРУРГИЧЕСКИМ СЕПСИСОМ

Гребенюк В.В., Назаров А.А., Чумаченко И.В.

ГОУ ВПО «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Благовещенск, Россия

Цель исследования: снижение количества осложнений хирургического лечения больных с колоректальным раком на фоне хирургического сепсиса.

Материалы и методы. В настоящем исследовании применены клинические, иммунологические, бактериологические, биохимические, инструментальные и статистические методы исследования. Для обработки полученных данных использована программа StatSoft Statistica 6.0 for Windows. Оптимизация лечения больных основана на предложенном нами способе повышения нейроэндокринноиммунной защиты организма у больных с хирургическим сепсисом (патент на изобретение № 2400247 от 27.09.2010), путем сочетанного применения ронколейкина, сандостатина и гипербарической оксигенации в до- и послеоперационном периоде. Данный способ применяли следующим образом: больным с колоректальным раком в основной группе в течение двух дней до операции, трех дней после операции и через 1 и 2 недели послеоперационного периода подкожно вводили сандостатин по 100 мкг 5 раз в сутки с одновременным подкожным введением ронколейкина по 500000 МЕ 1 раз в сутки и гипербарической оксигенацией (при парциальном давлении кислорода 1,5–2,0 атмосферы в течение 1 часа).

Изучены результаты хирургического лечения 50 больных колоректальным раком, осложненным хирургическим сепсисом в 2 клинических группах: 1) 25 больных с применением способа нейроэндокринноиммунной защиты; 2) 25 больных контрольной группы без его применения. Следует отметить, что у 10 больных колоректальным раком (5 больных основной группы и 5 контрольной) послеоперационный период осложнился флегмоной мягких тканей в области послеоперационной раны с развитием тяжелого хирургического сепсиса и летального исхода.

Результаты. введение ронколейкина и сандостатина в сочетании с гипербарической оксигенацией на фоне всего комплекса консервативной терапии и хирургических пособий вызывает более быстрое восстановление баланса провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов по сравнению с больными без цитокиновой терапии (8 (32%) из 25 больных с тяжелым хирургическим сепсисом и септическим шоком умерли, в отличие от больных контрольной группы, в которой умерло 13 (52%) больных из 25).

Заключение. предложенный способ оптимизации лечения больных с хирургическим сепсисом способствовал

уменьшению частоты летальных исходов в послеоперационном периоде на 20%.

ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ПРОЦЕССЕ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРИ СОЗДАНИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВАКЦИН

Данилова А.Б., Данилов А.О., Новик А.В., Балдуева И.А.

ФГУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова»

Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург, Россия

При создании аутологичных и аллогенных клеточных вакцин в качестве источника опухолеассоциированных антигенов (ОАА) используют культивируемые *in vitro* клетки злокачественных опухолей. Клинические исследования протоколов вакцинотерапии различных злокачественных новообразований демонстрируют у больных, ответивших на лечение, присутствие цитотоксических Т-лимфоцитов, реактивных по отношению к ОАА. В тоже время в процессе опухолевой прогрессии из-за генетической нестабильности усиливается гетерогенность клеточной популяции, в том числе и по экспрессии специфических антигенов. Эта естественная селекция является механизмом, который позволяет опухолевым клоном «избегать» воздействия иммунной системы. Кроме того, у малигнизированных клеток появляется способность продуцировать растворимые факторы, создающие в собственном микроокружении условия локальной иммунодепрессии и оказывающие иммуносупрессирующее воздействие на системном уровне. Представлялось важным изучить эти свойства у злокачественных клеток, культивируемых для приготовления антираковых вакцин в том числе как параметры, которые могут определять эффективность вакцинного препарата.

Для приготовления культур клеток солидных опухолей был использован операционный материал 219 больных меланомой кожи (МК), раком почки (РП), предстательной железы (РПЖ), яичников, колоректальным раком. После процессов диссоциации адаптировались к росту *in vitro* клеточные культуры 139 пациентов (64,5%), неудачи в культивировании наблюдали в 80 случаях (36,5%). Опухолевые культуры, полученные от разных больных, проявляли вариабельность в морфологии, типе роста и пролиферативной активности. До 10 пассажа практически все клеточные линии сохраняли антигенный фенотип, присущий тканевым образцам опухоли. При длительном культивировании на 35-40 пассажах только 8 клеточных линий меланомы кожи из 97 не потеряли экспрессию восьми исследуемых ОАА (8,24%), и 8 из 34 — молекулы МНС I класса (23,5%).

С помощью иммуноферментного метода изучено содержание MICA, IL-10, TGF- β 1 и VEGF в крови больных и надосадочной жидкости культивируемых опухолевых клеток. Обнаружено, что в процессе длительного пассирования нарастает продукция иммуносупрессирующих факторов в культурах МК, РП, РПЖ. Среднее содержание MICA для первичных культур МК составило $274,41 \pm 47,09$ пг/мл, после 30 пассажа — $3195,98 \pm 335,41$ пг/мл. Культуры опухолевых клеток на первых пассажах были способны синтезировать и выделять в микроокружение значительные количества TGF- β 1 и IL-10. Длительно пассируемые культуры (МК, РП, РПЖ) не меняли интенсивность экспрессии IL-10.

34,6% анализируемых культур опухолевых клеток экспрессировали VEGF.

Мы полагаем, что целесообразно вводить тесты на присутствие иммуносупрессирующих факторов в супернатантах опухолевых клеток, культивируемых для приготовления вакцин, и вести отбор пациентов, которым показана вакцинотерапия, путем определения этих молекул в их кровотоке. Клеточные вакцины можно успешно приготавливать из короткоживущих культур опухолевых клеток.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ АКРОМЕГАЛИИ

Дудина М.А., Савченко А.А., Догадин С.А.

ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого», г. Красноярск, Россия

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск, Россия

Акромегалия относится к категории нейроэндокринных заболеваний, характеризующихся патологически высоким уровнем клеточной пролиферативной активности, приводящей не только к прогрессирующему развитию у больных множественных морфофункциональных и обменных изменений, но и к ускоренному истощению резервных возможностей организма. Доказано, что под воздействием соматотропного гормона (СТГ) существенно увеличивается созревание лимфоидных клеток и ускоряется их трансэндотелиальная миграция. В связи с чем, развивающиеся при акромегалии генерализованные гипертрофические и гиперпластические процессы оказывают негативное воздействие на состояние иммунной системы больных.

Целью исследования являлось изучение особенностей состояния клеточного звена иммунной системы и активности нейтрофилов у больных акромегалией.

Материалы и методы. В исследование включено 22 больных с активной акромегалией (8 мужчин и 14 женщин), в возрасте от 31 до 69 лет, состоящих в Красноярском краевом регистре эндокринологического центра Краевой клинической больницы. У всех больных изучен популяционный и субпопуляционный состав и уровень хемилюминесценции нейтрофилов. Методом непрямой иммунофлуоресценции, используя соответствующие FITC-меченые моноклональные антитела фирмы ТОО «Сорбент» (Москва) определяли CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD19⁺, CD25⁺ и CD95⁺ клетки. Исследование спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) гранулоцитов крови осуществляли по методу De Sole P., в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL3606M» (СКТБ «Наука», г. Красноярск).

Основные результаты. При исследовании состояния иммунного статуса у больных с активной акромегалией обнаружены значительные изменения в популяционном и субпопуляционном составе клеток иммунной системы. Обнаружено, что при акромегалии снижается количество лейкоцитов в периферической крови, но при повышении процентного уровня лимфоцитов. На этом фоне понижается процентный и абсолютный уровень CD3⁺ клеток, но при повышении относительного количества CD8⁺ лимфоцитов и процентного и абсолютного содержания CD16⁺ и CD19⁺ клеток. Также у больных акроме-

галией обнаружено повышение относительного количества CD25⁺ лимфоцитов и процентного и абсолютного содержания CD95⁺ клеток. Повышенное процентное количество CD8⁺ лимфоцитов у больных соответственно приводит к снижению величины иммунодифференцировочного индекса. При исследовании параметров хемилюминесцентного анализа нейтрофильных гранулоцитов крови не обнаружено статистически достоверных различий между показателями спонтанной ХЛ у больных с акромегалией и группой контроля. Однако обращает на себя внимание значительное увеличение площади кривой спонтанной хемилюминесценции при активной акромегалии. Повышение величины площади хемилюминесцентной кривой при данном заболевании выявляется также и при индукции опсонизированным зимозаном. В основе реактивной хемилюминесценции лежит прямое или опосредованное вовлечение кислорода в образование высоко реактогенных молекул, излучающих свет. Главное содержание таких реакций — мобилизация кислорода активированными клетками. В нашем исследовании при определении индуцированной хемилюминесценции наблюдалось достоверное увеличение максимального значения интенсивности, но не выявлены статистически значимые различия индекса активации и показателя времени выхода на максимум интенсивности относительно контрольных значений. Высокий уровень хемилюминесценции фагоцитирующих клеток в ответ на стимуляцию зимозаном свидетельствует о повышенной функциональной активации лейкоцитов, интенсивной генерации цитотоксических продуктов и активном выделении нейтрофильными гранулоцитами биологически активных веществ, влияющих на продукцию других эффекторов фагоцитоза при акромегалии.

Заключение. Таким образом, особенности функционирования иммунной системы в условиях гиперсекреции СТГ и ИФР-I заключаются в развитии состояния гиперреактивности иммунной системы, характеризующееся повышенной активацией клеточного звена иммунитета, усилением экспрессии ранних и поздних активационных маркеров лимфоцитов, ответственных за пролиферацию и апоптоз, а также ряда показателей индуцированной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов, отражающих высокую степень активности фагоцитарных реакций, что подтверждает существующие нарушения в системе иммунного ответа при акромегалии.

СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ АКТИВНОСТЬ ХРОМАТИНА ЯДРА И ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Евглевский А.А., Фомичева Е.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Коков Е.А., Нестерова И.В.

Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Россия

В настоящее время известна эффекторная роль нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в реализации противоопухолевой защиты. Исследована спонтанная и индуцированная активность цитотоксических кислородзависимых механизмов НГ, а также уровень активности ядер НГ — по способности к реструктуризации хроматина у больных, страдающих колоректальным раком (КРР). Показа-

но, что у лиц контрольной группы (20 человек обоего пола, в возрасте от 30 до 50) величина оптической анизотропии хроматина НГ в спонтанном тесте составила $2,3 \pm 0,06$ при коэффициенте вариации равном 10%. После индуцированной стимуляции в системе *in vitro* мутеинным штаммом *Staph. aureus*, данный показатель снизился на 30% и составил $1,6 \pm 0,06$ при коэффициенте вариации 13% ($P < 0,05$) и прямой корреляционной связи ($R = 0,51$), что свидетельствовало о выраженной реструктуризации хроматина и активации ядра НГ на фоне индукции (активность ядерного хроматина обратно пропорциональна величине анизотропии). У больных КРР (8 человек обоего пола, в возрасте от 38 до 60) величина спонтанной анизотропии хроматина до стимуляции составила $2,66 \pm 0,07$ при коэффициенте вариации 7%, т.е. на фоне активного опухолевого процесса активационные процессы в ядре НГ были достоверно менее выражены, чем у здоровых субъектов ($P < 0,05$). После индукции уровень анизотропии ядер НГ не изменился и был равен $2,69 \pm 0,09$ при коэффициенте вариации 9,8% ($P > 0,05$) и положительной корреляции ($R = 0,37$), что продемонстрировало блокаду ответа на индуцирующий стимул — отсутствие реструктуризации хроматина НГ после индукции.

Активность миелопероксидазы (МП) НГ у лиц контрольной группы в спонтанном тесте составила по СЦИ $2,48 \pm 0,10$ при коэффициенте вариации равном 11%. После индукции в системе *in vitro*, данный показатель снизился на 13% и составил $2,16 \pm 0,17$ при коэффициенте вариации 22% ($P > 0,05$) и наличии сильной прямой корреляционной связи ($R = 0,69$).

У больных КРР величина спонтанной активности МП до стимуляции составила $2,8 \pm 0,04$ при коэффициенте вариации 4%, что достоверно, но незначительно, было выше, чем у здоровых лиц ($P < 0,05$). После индукции в системе *in vitro* уровень активности МП НГ снизился на 11% и был равен $2,5 \pm 0,06$ при коэффициенте вариации 6,5% ($P < 0,01$), корреляционная зависимость между показателями практически отсутствовала ($R = -0,12$).

Следует отметить, что показатели уровня анизотропии хроматина ядер и активность МП НГ лиц контрольной группы до индуцированной стимуляции обнаруживали крайне слабую положительную корреляционную связь ($R = +0,04$), а после индукции на фоне снижения уровня анизотропии и, следовательно увеличения степени реструктуризации хроматина НГ значения положительной корреляции увеличились до умеренного ($R = +0,34$). В тоже время, у больных КРР показатели уровня анизотропии хроматина ядер и активность МП НГ до индуцированной стимуляции обнаруживали умеренную отрицательную корреляционную связь ($R = -0,27$), а после индукции, на фоне не изменившегося и более высокого, по сравнению с лицами контрольной группы, уровня анизотропии хроматина НГ, приобрели сильную положительную ($R = +0,78$).

Таким образом, характер корреляционной связи между топологическими свойствами хроматина НГ и активностью миелопероксидазы свидетельствуют о наличии дефекта индуцированной активации НГ у пациентов с КРР, связанного с нарушением естественного характера реструктуризации их ядерного хроматина возникшего, возможно, еще на стадии синтеза активных компонентов гранулярного аппарата цитоплазмы.

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КЛЕТОК ЭФФЕКТОРНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА

Заботина Т.Н., Очеева Н.Ю., Короткова О.В., Кадагидзе З.Г.

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

Ведущая роль в генерации специфического иммунного ответа принадлежит CD3-Т-лимфоцитам и их субпопуляциям CD4 и CD8. В норме все CD4⁺ лимфоциты *a priori* являются CD3-Т-клетками с фенотипом CD4⁺CD3⁺CD45⁺CD14⁻, однако, популяция CD8⁺ лимфоцитов является фенотипически гетерогенной и представлена как CD8⁺CD3⁺CD45⁺CD14⁻, так и CD8⁺CD3⁻CD45⁺CD14⁻ клетками, а по плотности экспрессии белка CD8 на поверхностной мембране различают CD8⁺CD45⁺ клетки как с высокой (high), так и со средней/слабой (medium/low) его экспрессией.

Целью работы явилось изучение фенотипической структуры CD8-лимфоцитов здоровых доноров.

Материалы и методы. В качестве клеток-мишеней использовали лимфоциты периферической крови 30 здоровых доноров. Изучали иммунофенотип с помощью МКА anti-CD45, anti-CD14, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, конъюгированных различными флуорохромами (Beckman Coulter, BD Biosciences). Многопараметровый проточно-цитометрический анализ проводили на приборе FACSCalibur с коммерческим пакетом программ сбора и анализа данных. Использовали гистограммный и DotPlot анализ. Определяли относительное количество антиген (белок) позитивных клеток (%), а также плотность антигенных детерминант (белка) на поверхности плазматической мембраны по среднему каналу интенсивности флуоресценции (MFI).

Результаты. Популяция лимфоидных CD8-клеток в периферической крови здоровых доноров составляет 34,8±1,9%. В структуре CD8 на долю клеток с фенотипом CD8⁺CD3⁺CD45⁺ приходится 78,4%, что составляет 27,3±2,4% антиген-положительных клеток, а клетки с фенотипом CD8⁺CD3⁻CD45⁺ в норме составляют 21,6% и определяются на 7,5±1,5% лимфоцитов. С помощью метода проточной цитометрии был проведен ана-

лиз гистограмм распределения клеток по интенсивности флуоресценции. Выявлено, что 67,6±2,1% CD8⁺ лимфоцитов являются клетками с высокой плотностью антигена, при этом 32,0±1,9% CD8⁺ лимфоцитов обладали средней/слабой степенью насыщения этим белком. DotPlot анализ позволил выявить, что именно CD8 high субпопуляция лимфоцитов является CD3⁺ цитотоксическими Т-клетками с фенотипом CD8⁺CD3⁺CD45⁺, в то время как субпопуляция CD8 med/low клеток не коэкспрессируют на своей поверхности CD3-антиген и, таким образом, не являются клетками, реализующими специфический иммунный ответ, опосредуемый Т-лимфоцитами.

Таким образом, по степени экспрессии поверхностного антигена CD8 (high/med/low) на мембране CD45⁺ лимфоцитов периферической крови возможно выявление различных субпопуляций Т-лимфоцитов, опосредующих функциональную активность клеток эффекторного звена иммунитета, в том числе специфических цитотоксических Т-клеток.

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ I И II КЛАССА У ДЕТЕЙ С СОЛИДНЫМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ

Златник Е.Ю., Козель Ю.Ю., Фадеева Т.В., Кудинова Э.Е., Арсамакова Х.Х., Кузнецов С.А.

ФГУ «РНИОИ Минздравсоцразвития России»,

г. Ростов-на-Дону, Россия

ГУЗ СПК Ростовской области, г. Ростов-на-Дону, Россия

Успехи иммуногенетических методов изучения главного комплекса гистосовместимости человека (МНС/HLA) способствовали не только новому взгляду на этиологию и патогенез многих заболеваний, но и возможности клинического прогнозирования ряда из них. Нам не удалось встретить в литературе данных об ассоциированности антигенных вариантов генов HLA со злокачественными солидными опухолями детей. Силидные злокачественные новообразования занимают второе ме-

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ ЗЛАТНИК Е.Ю., КОЗЕЛЬ Ю.Ю. И ДР.)

Показатели			Группы больных по нозологии				
			Саркома Юинга	Остеогенная саркома	Нейробластома	Нефробластома	Герминогенные опухоли
n			12	11	14	14	23
Пол (М/Ж)			9/3	7/4	8/6	9/5	10/13
Средний возраст (годы)			11,8	17,1	4,7	4,8	14,2
Антигены МНС	I	↑	A24, B51, B61	A24, B51, B61 B13, B56, B35	A24, A31, B8, B13, B27, B60	A26, A31, B51, B18, B35, B41	A24, A26, A11, B51, B18, B39, B50, B55
		↓	-	B7	B7, B18	B13	-
	II	↑	DRB1 14 DRB1 15	DRB1 03 DRB1 09	DRB1 04, DRB1 09, DRB1 12, DRB1 14	DRB1 04 DRB1 13	DRB1 08, DRB1 13, DRB1 15
		↓	-	-	-	-	-
Гомозиготы			7	5	7	5	-

Примечание. ↑ – повышение по сравнению с контролем; ↓ – снижение по сравнению с контролем; жирным шрифтом обозначены статистически достоверные отличия от контроля по χ^2 .

сто в структуре заболеваемости детей злокачественными опухолями (48,5–54% от всей детской онкопатологии). Нами проводилось определение антигенов I и II класса МНС/HLA у 74 пациентов отделения детской онкологии РНИОИ; контрольную группу составили 1215 доноров (для I класса) и 128 доноров (для II класса). HLA-типирование выполняли с помощью серологического метода и ПЦР. Характеристика пациентов по нозологии, полу, возрасту и результаты типирования представлены в таблице.

При саркоме Юинга по сравнению с контрольной группой повышена частота антигенов A24, B51, B61, при остеогенной саркоме повышена частота тех же антигенов и B13, B56, B35 при снижении частоты антигена B7. Различия недостоверны из-за небольшого числа наблюдений. У больных с нейробластомой выявлено повышение частоты ряда антигенов HLA I класса, достоверное только для B13 ($\chi^2 - 6,02$; $p < 0,05$); снижена частота антигенов B7 и B18. При нефробластоме повышена частота встречаемости ряда антигенов локусов A и B, достоверно только для A26 ($\chi^2 - 6,85$; $p < 0,05$); снижена частота выявления антигена B13. При герминогенных опухолях достоверное повышение частоты встречаемости отмечены также только по антигену A26 ($\chi^2 - 3,98$; $p < 0,05$). Проведение типирования генов HLA II класса выявило повышение частоты специфичностей: DRB1 4, DRB1 15 при саркоме Юинга, DRB1 03 и DRB1 09 при остеогенной саркоме, DRB1 04, DRB1 09, DRB1 12, DRB1 14 при нейробластоме, DRB1 04 и DRB1 13 при нефробластоме, DRB1 08, DRB1 13, DRB1 15 при герминогенных опухолях. Статистически достоверно по сравнению с контролем повышена только частота DRB1 13 при нефробластоме ($\chi^2 - 4,45$; $p < 0,05$). Снижения частоты выявляемости изученных антигенов II класса не обнаружено. Таким образом, проведение типирования антигенов HLA I и II класса у детей с солидными злокачественными опухолями продемонстрировало достоверное увеличение частоты антигенов HLA A26 при нефробластоме и герминогенных опухолях, повышение частоты антигена B13 при нейробластоме и HLA DRB1 13 при нефробластоме. Таких детей можно отнести к группам риска возникновения данных злокачественных опухолей.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ЛИМФОЦИТОВ В ТКАНИ И В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Златник Е.Ю., Шапошников А.В., Никипелова Е.А., Новикова И.А., Аверкин М.А.

ФГУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Россия

Цель. Провести сравнительный анализ содержания различных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови и в ткани различных участках кишечника у больных раком толстой кишки.

Материалы и методы. У 52 больных с аденокарциномами толстого кишечника (Т3N0M0) определяли субпопуляционный состав Т- (Т-общие – CD3⁺, хелперно-индукторные – CD4⁺, цитотоксические – CD8⁺) и В- (CD19⁺) лимфоцитов, а также натуральных киллеров NK (CD16⁺CD56⁺) в периферической крови, в ткани опухоли, в перитуморальной зоне (1–3 см от опухоли) и по линии резекции (на расстоянии 10 см от края опухоли). Иммунофенотипирование лимфоцитов из крови и образцов ткани кишки, полученных в ходе оперативных вмешательств, проводили методом проточной цитофлуориметрии. Статистическую обработку результатов осуществляли по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты. Результаты исследования представлены в таблице.

Как видно из таблицы, во всех исследуемых тканевых образцах по сравнению с периферической кровью количество NK-клеток было статистически достоверно ниже при более высоком уровне В-лимфоцитов. В визуально неизмененных участках ткани, удаленных от опухоли на различное расстояние (1–3 и 7–10 см), состав лимфоцитов не различался. Эти образцы содержали высокие количества В-лимфоцитов, а содержание Т-лимфоцитов было ниже, чем в крови, за счет CD4⁺, но не CD8⁺ клеток, что соответствует составу нормальной ткани кишечника. В ткани опухоли по сравнению с неизмененной тканью происходит накопление Т-лимфоцитов, включая субпопуляцию CD4⁺ клеток, при этом в ней формируется более низкий уровень В-клеток.

Заключение. Полученные данные могут свидетельствовать о локальном ответе на опухолевый антиген по клеточному типу, хотя его неэффективность очевидна. Значительное снижение содержания В-лимфоцитов в ткани опухоли требует дополнительной оценки.

ТАБЛИЦА. СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И В ОБРАЗЦАХ ТКАНИ КИШЕЧНИКА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ, n = 52 (К ТЕЗИСАМ ЗЛАТНИК Е.Ю., ШАПОШНИКОВА А.В И ДР.)

Субпопуляции лимфоцитов, %	Периферическая кровь	Опухоль	Перитуморальная зона (1-3 см)	Линия резекции (7-10 см)
CD3 ⁺	63,6±3,02	64,2±3,6●	51,9±3,6*	54,9±4,0
CD4 ⁺	36,9±1,9	35,5±2,3● ▲	24,3±2,1*	24,6±1,6*
CD8 ⁺	27,9±1,5	29,1±2,1	30,1±2,6	33,5±3,0
CD16 ⁺ CD56 ⁺	17,8±1,4	12,6±2,3*	12,8±2,3*	11,2±1,8*
CD19 ⁺	10,9±1,02	18,0±2,8*●	30,1±3,7*	24,7±3,1*

Примечание. * – отличия достоверны относительно периферической крови, $p < 0,05$; ● – отличия достоверны относительно перитуморальной зоны, $p < 0,05$; ▲ – отличия достоверны относительно линии резекции, $p < 0,05$.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ДИАГНОСТИКИ MRD ПРИ ОСТРОМ ЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ**Зотова В.В., Бортникова О.Г., Плужникова Г.Э., Дитор М.П., Богущ Ж.А., Раецкая С.А.***ГУЗ Областная детская больница, г. Ростов-на-Дону, Россия*

В настоящее время существуют программы лечения острого лейкоза (ОЛ), позволяющие добиться выхода в ремиссию у 75-85% пациентов. Важное значение для прогноза заболевания имеет иммунологический фенотип и кариотип бластных клеток. На определенных этапах лечения у больных верифицируют остаточную популяцию лейкоэмических клеток (MRD), наличие которой в большинстве случаев приводит к развитию рецидива заболевания. Среди острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ) выделяют В- и Т-линейные. Согласно уровню дифференцировки Т- и В-лимфоцитов различают по 4 подварианта В- и Т-ОЛЛ. Использование мультипараметрического анализа показало, что у большинства пациентов с ОЛ фенотип бластных клеток является аберрантным. Эта аномальная экспрессия отражает генетические изменения, лежащие в основе опухолевого перерождения лейкозной клетки. В связи с этим большое внимание уделяется цитогенетическим характеристикам бластных клеток и специфическим молекулярным маркерам, появляющимся в результате транслокаций. В настоящем исследовании был изучен иммунологический фенотип бластов у 145 детей, страдающих ОЛЛ. Всем больным при поступлении и на 36-й день от начала терапии проводилась стерильная пункция с последующим иммунофенотипированием, кариотипированием, а также морфологическим и цитологическим исследованием пунктата. При первичном обследовании у пациентов выявлялся преимущественно ОЛЛ (78%). При этом В-клеточные варианты (87,6%) встречались гораздо чаще Т-клеточных (13%). Из В-ОЛЛ наиболее часто встречались Common (В-II) вариант — 84%, В-I выявлен у 13%, а В-III у 3% больных. У В-ОЛЛ показатель бластоза в дебюте заболевания составил от 31 до 98%. Фенотип был представлен следующими маркерами: CD10 (88,6%), CD19 (91,4%), CD22 (97,1%). Кроме маркеров линейной принадлежности, у больных с В-лейкозами выявлялась коэкспрессия антигенов поздней пролиферации HLA-DR (94,3%), стволовых клеток (CD34-42,9% и CD133-14,3%) и миелоидных (CD13-28,6%; CD33-14,3%) маркеров. У 44% больных была обнаружена хромосомная патология: транслокации t(9;22)(q34;q11), t(4;11)(q21;q23), t(11;19), делеции — del(6)(q23), del(9)(p21), комплексные нарушения 46, XY, t(7;8), t(8;9), del(7). В 44,8% случаях отмечена гипердиплоидность. Т-ОЛЛ в нашем исследовании в основном были представлены Т-I вариантом (60%), Т-II выявлен у 30%, а Т-III — у 10% пациентов. Бластоз составил 81,7%. Иммунофенотип представлен преимущественно CD3 (58,9%), CD5 (80,5%), CD7 (85,2%) антигенами. Коэкспрессия CD13 выявлялась у 37,5% больных и составила 34,6%. CD33 обнаружился лишь у одного больного. В фенотипе данной группы отсутствовала экспрессия маркера поздней активации — HLA-DR. Хромосомной патологии ни у одного ребенка не было выявлено. При отслеживании MRD у больных В-ОЛЛ было установлено, что на 36 день терапии повышенная экспрессия дифференцировочных маркеров (CD10, CD19, CD22) от-

мечалась у 42,6% пациентов. У 34,3% детей выявлялась экспрессия маркера поздней активации HLA-DR. Экспрессии стволовых маркеров (CD34, CD133) выявлено не было ни в одном случае. CD20 экспрессировался у 11,4%. Отмечался рост процента выявления маркера готовности клеток к апоптозу (CD95) от 8,6% в дебюте заболевания до 20% на 36 день терапии. Миелоидные маркеры (CD33, CD13) выявлялись в 11,4% случаев каждый. В последствии у 30,6% больных В-ОЛЛ с MRD развился рецидив заболевания. В то же время у 11,1% больных, не имевших MRD, также развился рецидив. В общем объеме пациентов с рецидивом заболевания больные, имевшие MRD, занимали 73,3%. Хуже всего ответ на терапию был у пациентов с нарушениями кариотипа, затрагивающими 11q23, — 100% детей дали рецидив. 80% пациентов с Ph хромосомой также дали рецидив. 83% больных с нормальным кариотипом находятся в стойкой ремиссии, такие же результаты лечения получены и у больных с гипердиплоидным кариотипом. У 75% больных Т-ОЛЛ на 36 день полихимиотерапии регистрировалась повышенная экспрессия линейно ассоциированных антигенов: CD7 (75%), CD5 (37,6%). HLA-DR выявлялся у 50% больных. Миелоидные маркеры (CD13 и CD33) выявились у 25%. CD34 был обнаружен лишь у одного больного, оказавшегося нон-респондером с Т-I вариантом ОЛЛ. Причем выявлялся CD34 в высоком проценте (74,3%) и на уровне сохраняющегося высокого бластоза — 73% бластов в пунктате костного мозга. У остальных детей в этой группе в среднем бластоз составил 1,4%. У 44,4% больных Т-ОЛЛ выявлялась MRD. Впоследствии у 22,2% развился рецидив, 75% детей умерли в первом и втором рецидивах. Общая смертность в группе Т-ОЛЛ составила 62%. Таким образом, повышенная экспрессия дифференцировочных и аберрантных антигенов на 36 день при незначительном бластозе ($\geq 0,1\%$) является неблагоприятным прогностическим признаком.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ В НАДОСАДКАХ И ЭКСТРАКТАХ ГРИБОВ**Зубков Д.А., Зубарева Е.С.¹, Мухина В.С.², Ефремов М.А., Сизова С.В., Дементьева Д.В., Громоных Т.И.¹, Шнырева А.В.², Смирцевская Е.В.***ИБХ РАН, Москва, Россия*¹ *МГУПБ, Москва, Россия*² *МГУ, Москва, Россия*

Поиск, тестирование и отбор новых эффективных противоопухолевых препаратов с незначительным количеством побочных эффектов является одной из основных задач биологов и онкологов. В нашей лаборатории проводится скрининг культуральных фильтратов и экстрактов грибов на способность подавлять рост клеток опухолевых линий *in vitro* и *in vivo*. Для анализа противоопухолевого действия использовали тест с тетразолим синим (МТТ-тест). Для тех препаратов, которые оказывали выраженное токсическое действие, проводили анализ механизма действия, для чего определяли влияние на клеточный цикл и на способность вызывать апоптоз. Анализ клеточного цикла и апоптоз проводили с помощью проточной цитометрии. Апоптоз подтверждали также с помощью конфокальной микроскопии. Препараты с выраженным механизмом действия делили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на фракции и определяли активность в различных фракциях. При на-

личии выраженной активности проводили идентификацию молекулы с помощью масс-спектрометрии и ИК-спектрометрии. Для ряда препаратов проводили тестирование противоопухолевого действия в модели мышинного рака молочных желез *in vivo*. В работе использовали штаммы грибов из следующих родов: *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Trichophyton*, *Agaricus*, *Phellinus*, *Ganoderma*, *Lentinus*, *Fomitopsis*, *Fomes*, *Phellinus* и *Piptoporus*. Изучали культуральную среду этих грибов и/или экстракты. Методом МТТ на клеточных линиях рака молочных желез BT-474 и HBL-100 определили высокую противоопухолевую активность в культуральной среде грибов *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fomitopsis* и *Ganoderma*, а также в экстракте грибов *Phellinus*. Для грибов *Aspergillus* показали, что активность содержалась в гидрофобной фракции, полученной метанольной экстракцией. Для грибов *Trichoderma* выявили наиболее высокую активность в культуральной жидкости штаммов TV4-1 и M99/5, полученных при 10-дневном смешанном культивировании, а также в штамме № 30, полученном при глубинном культивировании также в течение 10 суток. Анализ механизма действия культуральных фильтратов и экстрактов указанных грибов показал, что в составе фильтрата грибов *Aspergillus* содержится ингибитор клеточного цикла, а в составе фильтрата грибов *Trichoderma* — индуктор апоптоза. Механизм токсического действия препаратов грибов *Fomitopsis*, *Ganoderma* и *Phellinus* выявить не удалось. Фильтраты грибов *Aspergillus* и *Trichoderma* фракционировали и показали, что активность содержалась в каждом случае в единственной фракции. Для грибов *Aspergillus* провели идентификацию молекулы методом масс- и ИК-спектрометрии. Активность культурального фильтрата грибов *Aspergillus* также подтвердили *in vivo* на мышах с перевиваемыми Wnt-1 опухолями молочных желез. Таким образом, грибы являются источником возможных препаратов с противоопухолевой активностью. Предпочтительно работать с культуральными фильтратами грибов, поскольку при этом сохраняется нативная структура молекул.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы», Госконтракт № 14.740.11.0731.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И УРОВНЕЙ ОНКОМАРКЕРОВ У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ СИНДРОМАМИ ИММУНОПАТОЛОГИИ.

Зуева Е.Б., Тиунова Т.А., Зурочка В.А., Зурочка А.В.

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,
г. Екатеринбург, Россия

Изучение уровней онкомаркеров и состояния иммунной системы у лиц с различными заболеваниями, связанными с нарушением функционирования последней, является одной из актуальных проблем современной медицины. В последние годы многие ученые изучают диагностическое значение уровней онкомаркеров в клинической практике, в том числе и для формирования групп риска по онкологической заболеваемости у иммунокомпromентированных больных. Важное значение отводят также и изучению роли иммунной системы при развитии предраковых состояний, к которым относят и хронические воспалительные инфекционные, аллергические и аутоиммунные заболевания.

Цель исследования: выявить основные закономерности изменения уровней онкомаркеров и параметров иммунной системы у лиц с инфекционным, аллергическим и аутоиммунным синдромами иммунопатологии.

В данной работе мы остановились на оценке иммунологической части комплексной системы иммунологического мониторинга.

Иммунологические методы исследования включали специализированный осмотр врача аллерголога-иммунолога и лабораторную диагностику: подсчет лейкоцитов и лейкоформулы на автоматическом гематологическом анализаторе, определение фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов, тест восстановления нитросинего тетразолия для оценки метаболической функции нейтрофилов, определение количества популяций и субпопуляций лимфоцитов путем идентификации CD-молекул, экспрессированных на мембране лимфоцитов, методом проточной цитометрии к CD3, CD4, CD8, CD16⁺CD56, CD19, CD25, CD45, HLA-DR), определение концентрации иммуноглобулинов А, М, G, методом ИФА, определение уровня C1q, C3a, C5a компонентов комплемента методом ИФА, определение уровней онкомаркеров (РЭА, СА 15-3, СА 19-9, СА 242, НСЭ, β2-микроглобулин, β-ХГЧ, ПСА общий и свободный, АФП, тиреоглобулин, кальцитонин, СА-125, ферритин) методом ИФА.

У жителей Челябинской области произведена оценка не только состояния иммунной системы и уровней онкомаркеров, но и оценен уровень и характер иммунопатологии.

Так, иммунопатология в Челябинской области соответствовала 4 основным синдромам: аллергическому, аутоиммунному, инфекционному и лимфопролиферативному. При этом важно отметить, что спектр иммунопатологии в этих городах оказался идентичным у женщин и несколько отличался у мужчин, у которых % аутоиммунных заболеваний был выше, а хронических оппортунистических инфекций выявлялось меньше. Оценка иммунного статуса выявила четкие различия в состоянии иммунной системы обследуемых лиц в этих городах. Наибольшее число отличий регистрировалось у лиц с аллергической заболеваемостью и комбинированными формами иммунопатологии, наименьшее — у лиц с лимфопролиферативным синдромом иммунопатологии. Очень важно отметить, что при всех изучаемых патологиях были выявлены достоверные отклонения в различных компонентах иммунной системы, включая как основные субпопуляции лимфоцитов и их активационные маркеры, так и фагоцитарное и гуморальное звенья иммунитета.

Одной из причин проведения иммунологического обследования явилась высокая онкологическая заболеваемость, она неуклонно растет и среди причин смертности вышла на второе место.

Нами было высказано предположение о том, что онкологическая заболеваемость может быть связана с нарушениями в иммунной системе. Для подтверждения данного предположения было проведено лабораторное обследование с целью выявления уровней онкомаркеров у иммунокомпromентированных лиц (12 параметров у мужчин и 12 параметров у женщин).

Исследование показало, что у иммунологически скомпроментированных лиц, как правило, в 30% случаев выявлялся хотя бы 1 повышенный онкомаркер. В то же время лица с 2-мя и более выявленными онкомаркерами

рами составили более 10% обследованных лиц с иммунопатологией.

Наибольшая частота выявленных онкомаркеров пришла на РЭА, СА 15-3, СА 19-9, СА 125, СА 242, НСЕ и ферритин. При этом важно подчеркнуть, что по спектру выявленных органов «мишеней» онкомаркеров полностью совпадал со структурой онкопатологии по данным статистических отчетов отделов здравоохранения Челябинской области.

Полученные данные свидетельствуют о правильности разработанного клиничко-иммунологического подхода к выявлению группы риска с иммунологической заболеваемостью с одной стороны, и онкологической — с другой.

Результаты исследования, послужили основой для разработки системы иммунологического мониторинга населения Южно-Уральского региона и формирования компьютерной базы клиничко-лабораторного регистра.

СРАВНЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У БОЛЬНЫХ С РЕЦИДИВАМИ РАКА И УЗЛОВЫМИ ОБРАЗОВАНИЯМИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Катеруша Е.И., Павлова И.Н., Конопацкова О.М., Мальчикова Т.Н., Воропаева С.А.

*НУЗ «Дорожная клиническая больница» ОАО «РЖД»
Саратова, г. Саратов, Россия*

Одним из способов лечения заболеваний щитовидной железы является хирургический. Однако он не гарантирует от возникновения рецидивов как при раке, так и при доброкачественных образованиях.

Цель исследования: сравнить показатели иммунологического статуса и уровня интерлейкинов при рецидивах рака и узловых образований щитовидной железы.

Материалы и методы. Обследован 41 человек с рецидивом рака щитовидной железы и узлового зоба. Преобладали женщины (61%). Пациентов разделили на две группы: первая — 20 человек, оперированных по поводу рака (преобладал папиллярный рак — 71%). Вторая — больные, оперированные по поводу узлового зоба (21 человек). Изучали иммунологический статус. Клеточный иммунитет ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD20^+$ клетки) определяли с использованием моноклональных антител; рассчитывали ИРИ. Гуморальное звено иммунитета оценивали по IgG, IgA, IgM. Изучали IL-1, IL-6, TNF.

Результаты исследования. У пациентов, имевших рецидив рака, отмечено снижение параметров клеточного иммунитета. В частности, $CD3^+$ клетки до 46,8%. При рецидиве узлового зоба $CD3^+$ клетки были снижены до 54,3%. Констатируется дисбаланс $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток в обеих группах, причем более выражен он был в первой группе. IgG, IgA, IgM колебались в пределах референтных значений. Тенденция к их снижению отмечалась в первой группе, что особо отражалось на уровне IgG. Количество IL-1 при рецидиве рака было несколько выше — 4,17, при узловом зобе — 3,96. Уровень IL-6 в первой группе достоверно ниже, чем во второй (соответственно, 2,56 и 4,44). Отчетливо прослеживается и снижение TNF при раке (0,16 против 1,30 при узловом зобе).

Таким образом, проведенный анализ дает возможность высказать обоснованное утверждение, что при рецидивах заболеваний щитовидной железы имеются нару-

шения иммунологических показателей, которые наиболее отчетливы при рецидиве рака. Данные исследования дают возможность врачу, при диспансерном наблюдении за оперированными больными, своевременно назначать иммунологическое исследование и, при необходимости, проводить корректирующие мероприятия.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРОТИВООПУХОЛЕВОМ ИММУНИТЕТЕ

Киселева Е.П.

*НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН,
Санкт-Петербург, Россия*

Более полувека в научных исследованиях в области онкологии доминирует гипотеза иммунного надзора Бернета. Однако и в настоящее время она остается недоказанной, поскольку не выявлен иммунологический механизм, с помощью которого должны элиминироваться трансформированные клетки в организме. В настоящее время основная защитная роль все в большей степени переносится с Т-лимфоцитов на клетки врожденного иммунитета. Между тем, появился новый большой раздел науки — сосудистая биология, который изменил наши представления о новообразовании сосудов. Изучение механизмов регуляции ангиогенеза выявило новую роль воспалительной инфильтрации, которая всегда сопровождает опухолевый рост. Оказалось, что клетки врожденного иммунитета, включая макрофаги, дендритные клетки, полиморфноядерные лейкоциты и естественные киллеры, активно способствуют новообразованию опухолевых сосудов. Как это ни парадоксально, но эти данные указывают на то, что во многих ситуациях клетки врожденного иммунитета не защищают организм, а способствуют опухолевому росту. Так была сформирована точка зрения о том, что клетки врожденного иммунитета играют двойственную роль в организме и могут как способствовать, так и препятствовать опухолевому росту.

В последнее время в научной литературе также обсуждается вопрос о потенциальной иммуногенности мертвых клеток. Считается, что поврежденные клетки выделяют вещества, называемые молекулярными паттернами повреждения (DAMPs), которые способны вызывать воспалительную реакцию в организме. Эти данные имеют существенное значение, поскольку известно, что в результате нарушений кровоснабжения в солидных опухолях спонтанно возникают ишемизированные, а затем и некротизированные области. Кроме того, гибель опухолевых клеток сопровождается также применением цитостатической и лучевой терапии. Таким образом, иммунный ответ организма на рост опухолей состоит из двух слагаемых — ответа на опухолевые антигены и продукты живых опухолевых клеток, с одной стороны, а также реакций на факторы, выделяемые умирающими клетками опухоли, с другой стороны.

В наших исследованиях, проведенных на модели сингенной перевиваемой солидной гепатомы 22a у мышей, было показано прогрессивное увеличение зоны некроза, которая достигала 70% объема опухолевого узла на поздних фазах роста. Параллельно этому развивались инволюция тимуса, спленомегалия и гранулоцитоз. В то же время, рост жизнеспособной части опухоли имел волнообразную динамику с разной скоростью роста и коли-

чеством митозов. Воспалительный фенотип перитонеальных макрофагов также носил волнообразный характер с подъемами, которые отчасти совпадали с активностью опухолевой ткани. Воздействие опухоли на иммунную систему представляет собой комплексный процесс, состоящий из большого числа факторов, выделяемых как живыми, так и мертвыми клетками.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00429.

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ В ПРОЦЕССЕ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ

Короткова О.В., Заботина Т.Н., Самойленко И.В., Демидов Л.В., Кадагидзе З. Г.

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

Цель работы: изучить взаимосвязь иммунологического фенотипа лимфоцитов больных диссеминированной меланомой с эффективностью проводимой химиотерапии.

Материалы и методы. Исследовали иммунофенотип лимфоцитов периферической крови 41 больного диссеминированной меланомой кожи до и после 2-х курсов ПХТ по схеме CVD (цисплатин 20 мг/м² в 1-4 дни, винбластин 2,0 мг/м² в 1-4 дни и дакарбазин 800 мг/м² в 1 день, цикл 28 дней). Использовали МКА CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19, CD25, CD127, CD45, конъюгированные FITC, PE, PE-Cy5, PC5, Per-CP (Beckman Coulter, BD Biosciences). Многопараметровый количественный проточно-цитометрический анализ проводили с применением стратегии последовательного «гейтирования» на цитометре FACSCalibur (BD Biosciences).

Результаты. Исследовали популяционную структуру лимфоцитов больных до ПХТ. Через 2 недели после лечения оценили клиническую эффективность проводимого лечения. Полный ответ/стабилизация были выявлены у 43,3% (1 группа), а у 56,7% больных зарегистрирована прогрессия заболевания (2 группа). Анализ пула CD45⁺ лимфоцитов (T⁺B⁺NK-клетки) не выявил линейных нарушений в исследуемых группах больных. Однако у больных с прогрессией заболевания (2 группа) уровень CD8⁺CD45⁺ лимфоцитов оказался выше еще до начала лечения и возрастал на фоне проводимой ПХТ (1-ая группа: до лечения 28,7±2,0%, после – 28±1,8%; 2-ая группа: до лечения 35,6±4,6%, после – 40,6±3,4%). Также выявлено, что у прогрессирующих больных доля цитотоксических CD3⁺CD8⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов в структуре CD8⁺CD45⁺ Т-клеток составляла до лечения 78%, после 77%, в то время как среди пациентов с положительной динамикой болезни 69% и 68% соотв.

Структурный анализ CD16⁺CD56⁺CD45⁺ лимфоцитов показал, что при сопоставимых показателях общего пула эффекторных клеток в исследуемых группах, доля истинных NK-клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD45⁺) составила у больных с положительной динамикой 77,7% до лечения и 75,3% после лечения, а в группе с прогрессией 53,1% и 52% соотв (p < 0,02). При этом нами было обнаружено, что у больных 2-ой группы популяция NK-лимфоцитов с коэкспрессией CD3 антигена (NK Т-клетки) превыша-

ла в 2 раза показатели больных с клиническим ответом (11,2±3,0%; 4,9±0,5%).

Показана информативная значимость структурного анализа иммунокомпетентных клеток больных диссеминированной меланомой в процессе ПХТ.

Количество перфорин-позитивных CD8⁺CD45⁺ и CD16⁺CD56⁺CD45⁺ клеток до и после ПХТ оставалось без динамики в обеих группах больных. Однако было обнаружено, что у пациентов с прогрессированием заболевания исходный уровень CD8⁺CD45⁺Perforin⁺ лимфоцитов был более чем в 2 раза выше по сравнению с группой больных с положительной динамикой болезни. Для пациентов 2 группы оказалось характерным также наличие функционально активных CD8-лимфоцитов, в то время как больные 1 группы имели показатели на уровне доноров (1 группа: 32,6±3,3, 36,4±2,8; 2 группа: 45,2±1,9, 46,8±3,0; доноры 36,4±3,1). При этом количество CD16⁺CD56⁺CD45⁺Perforin⁺ клеток в исследуемых группах не имело различий.

Также выявлено, что у больных 1 группы число CD4⁺ активированных лимфоцитов с коэкспрессией CD25 было выше по сравнению со 2 группой больных, однако по содержанию Т-регуляторных клеток с фенотипом CD45⁺CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} различий нами не обнаружено – 1 группа: до ПХТ 9,95±3,4%, после – 9,0±1,58%±; 2 группа: до ПХТ 9,85±4,86%, после – 8,4±2,7%.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ЗРЕЛОКЛЕТОЧНЫХ В-НХЛ/ХЛЛ ПО ДИНАМИКЕ ЭЛИМИНАЦИИ КЛОНОВЫХ КЛЕТОК В КОСТНОМ МОЗГЕ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Кузьмина Е.Г., Неприна Г.С., Рогова Н.М., Константинова Т.В., Павлов В.В., Шахтарина С.В.

ФГБУ Медицинский радиологический научный центр Минздрава России, г. Обнинск, Россия

Оценка эффективности лечения злокачественных лимфом традиционно проводится по клиническим показателям выживаемости, состояния ремиссии (полной и частичной), стабилизации процесса, рецидива и прогрессирования заболевания. Разработка новых методов диагностики и таргетной терапии предполагает использовать в качестве методов контроля динамику элиминации опухолевых клеток на проводимое лечение.

Основная цель исследования: оценить эффективность элиминации аберрантных лимфоцитов на проводимое лечение В-клеточных НХЛ/ХЛЛ.

Материалы и методы. Обследованы 135 больных НХЛ: до лечения без клона, до лечения с проявлением клоновой пролиферации, при ремиссии без проявления клональности, при рецидиве без проявления клональности и рецидиве с выявлением клона; 130 больных ХЛЛ до и после 1-6 циклов полихимиотерапии вне зависимости от схемы лечения (СНОР, R-СНОР и др.). Контроль – практически здоровые люди (100 чел).

Иммунофенотипирование образцов периферической крови, ПК, и костного мозга, КМ, выполнено на проточном цитофлуориметре FACScan с 3-х цветовой меткой панели моноклональных антител. Признаками клона в КМ считали увеличение доли лимфоидных клеток в пунктате КМ > 30% и усиление экспрессии маркеров

В-лимфоцитов более 30%, в ПК — абсолютный и относительный лимфоцитоз, Лф $> 5,0 \cdot 10^9/\text{л}$ и $> 50\%$ от числа клеток, усиление экспрессии маркеров В-лимфоцитов выше 30%, наличие клона специфического иммунофенотипа.

Основные результаты. При В-ХЛЛ и В-НХЛ из малых лимфоцитов aberrантные лимфоциты КМ и ПК, как правило, имеют иммунофенотип: $\text{CD}19^+\text{CD}20^+/\text{CD}5^+\text{CD}22^+\text{CD}23^+\text{HLA-DR}^+$ с преобладанием κ или λ типа легких цепей иммуноглобулинов. Иногда слабо экспрессируются $\text{CD}5$ и/или $\text{CD}23$ маркеры. Экспрессия $\text{CD}5^+$ на В-клетках и повышенное соотношение $\kappa/\lambda > 2,5$ считаются признаками клональной пролиферации.

Aberrантные лимфоциты выявляются в КМ чаще, чем в ПК: 67,5% в КМ, в ПК только у 47,5% (из 40 парных исследований КМ и ПК). Таким образом, клетки периферических зрелоклеточных НХЛ из малых лимфоцитов раньше поражают костный мозг и позже выходят в циркуляцию крови.

Выявляется 3 типа индивидуальной динамики aberrантных лимфоцитов на 1-2 цикл ПХТ: хороший ответ (снижение процента aberrантных лимфоцитов на 30-50% и более); умеренный ответ (снижение на 30%) и отсутствие ответа. При высоком ответе на лечение следует учитывать исходную величину пролиферации (лимфоцитоз ПК $> 150 \cdot 10^9/\text{л}$ и клеточность КМ $> 200 \cdot 10^9$), т.к. быстрый лизис большого числа приводит к проявлениям выраженной интоксикации. Отсутствие реакции клоновых лимфоцитов на 1-2 цикл ПХТ свидетельствует о химиорезистентности. Более эффективно клон элиминируется из ПК, чем из КМ, в случае успешного лечения уже после 1-2 курсов ПХТ лейкокемия начинается быстро снижаться, и при завершении лечения объем клоновых клеток в крови в 15-300 раз меньше исходного. Однако достижение показателей нормы наблюдается не всегда. При клинической ремиссии часто наблюдаются повышенный процент В-лимфоцитов с признаками aberrантной пролиферации: $\text{CD}5^+\text{CD}20^+$, с преобладанием клеток κ или λ типа легких цепей иммуноглобулинов выше нормальных значений, повышение процента клеток с маркерами $\text{CD}19$, $\text{CD}20$, $\text{CD}22$, $\text{CD}23$, а часто и повышение их количества. При рецидиве без клоновой пролиферации признаки присутствия aberrантных клеток более выражены, чем при ремиссии. Эти данные важны для изучения проявлений минимальной остаточной болезни, которая наблюдается при клинической ремиссии. При лейкокемии до начала лечения и при рецидиве НХЛ с выявляемым клоном резко повышается число циркулирующих клеток, значительная часть которых — aberrантные клетки.

Заключение. Выраженность реакции клоновых лимфоцитов на лечение (в т.ч. проведение таргетной терапии) и проявления минимальной резидуальной болезни при ХЛЛ — важный прогностический критерий эффективности терапии. Для оценки эффективности лечения при генерализованном процессе НХЛ/ХЛЛ необходимо учитывать динамику количества aberrантных клеток. Это позволяет выявлять химиорезистентные формы, менять тактику лечения. Сравнительный анализ величины остаточного клона при разных формах ремиссии (полная или частичная) в сопоставлении со сроками наступления рецидива позволит прогнозировать их наступление.

СРАВНЕНИЕ ИНФОРМАТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ГАММАПАТИЙ

Мазинг А.В., Суркова Е.А., Дегиль Е.В., Лапин С.В.

ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Росздрава, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Имеется ряд заболеваний и состояний, при которых может быть обнаружена моноклональная гаммапатия. К ним относятся моноклональная гаммапатия неясного генеза, множественная миелома, макроглобулинемия Вандельстрема, солитарная плазмоцитома, системный AL-амилоидоз и POEMS синдром. Иммунофиксация парапротеина и измерение концентрации легких цепей входит в стандарт лабораторного обследования пациентов с данной патологией наряду с исследованием периферической крови, биохимических показателей, иммунофенотипирования, цитогенетического и иммунофлюоресцентного исследования аспирата и биопсии костного мозга.

Целью нашего исследования было определить информативность сочетанного применения двух методов, применяющихся для диагностики моноклональных гаммапатий: выявление свободных легких цепей методом иммуноферментного анализа и иммунофиксации парапротеина. Для решения поставленной цели нами были сформулированы следующие задачи: определить взаимосвязь обнаружения свободных легких цепей с выявлением парапротеина, определить частоту сочетанной встречаемости парапротеина и белка Бенс-Джонса и рассчитать внутрилабораторную норму определения свободных легких цепей в сыворотке крови.

Материалы и методы. Содержание парапротеина методом иммунофиксации (Helena Biosciences, UK) и концентрация свободных легких цепей методом иммуноферментного анализа (ООО «Полигност», Россия) определялась в 132 парных образцах сыворотки и мочи пациентов с подозрением на наличие моноклональной гаммапатии. Для расчета внутрилабораторной нормы определения концентрации легких цепей были исследованы 87 сывороток доноров крови.

Основные результаты. При иммунофиксации образцов сыворотки крови 132 пациентов с подозрением на наличие моноклональной гаммапатии, парапротеин был обнаружен в 47,7% случаев (63/132). Преимущественно парапротеин был представлен: в 23,4% (31/132) IgG/свободной легкой цепью каппа, 13,6% (18/132) IgG/свободной легкой цепью лямбда, в 5,3% (7/132) свободной легкой цепью лямбда. При этом в 20,4% (27/132) образцов парапротеин был обнаружен и в сыворотке и в моче. Концентрация свободных легких цепей была повышена в 53,9% (34/63) образцов. Зависимости повышения концентрации свободных легких цепей и выявления парапротеина обнаружено не было. При расчете нормы, концентрация свободной легкой цепи каппа составила 4,9-28,6 мг/л, свободной легкой цепи лямбда — 1,4-10,1 мг/л.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что как определение концентрации свободных легких цепей, так и измерение объема парапротеина вносит важный вклад в диагностику моноклональных гаммапатий.

ИММУНОФЕНОТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АТИПИЧНЫХ ВАРИАНТОВ В-КЛЕТОЧНОГО ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

Никитин В.Ю., Сухина И.А., Колюбаева С.Н., Никитин Ю.В., Мешкова М.Е., Ширина И.В.

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

Введение. В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ) из всех форм лейкозов встречается наиболее часто. Типичный В-ХЛЛ ассоциирован с лучшим прогнозом, в отличие от нетипичных форм. Идентификация атипичных вариантов В-ХЛЛ представляет собой сложную диагностическую задачу.

Цель: выявить особенности иммунофенотипа атипичных форм В-ХЛЛ.

Материалы и методы. Обследован костный мозг 49 пациентов с В-ХЛЛ. Иммунофенотипирование выполнено на проточном цитометре «Cytomics FC500» («Beckman Coulter» с применением моноклональных антител (США): CD3/CD19/CD45, SmIgk/SmIgλ/CD19, CD5/CD23/CD19, FMC7/CD38/CD19, CD22/CD79b/CD19, CD10/CD20/CD19.

Результаты. Опухолевые клетки у всех больных с В-ХЛЛ располагались гомогенно в той же области, что и нормальные лимфоциты. Сорок семь/49 (96% В-ХЛЛ) пациентов имели типичные для В-ХЛЛ иммунофенотипические характеристики — слабую (dim) степень экспрессии легких цепей иммуноглобулинов, позитивность по антигенам CD5 и CD23 (SmIg^{dim+}/CD5⁺/CD23⁺). У 44/47 пациентов интенсивность экспрессии антигена CD20 была слабой (dim), а у 3/47 — отсутствовала. Экспрессия антигена CD38, ассоциированного с неблагоприятным прогнозом, была зафиксирована у 15/47 (32,6%) пациентов. У 1/49 больного был выявлен вариант В-ХЛЛ негативный по CD5 антигену (CD5⁻В-ХЛЛ). Другие иммунофенотипические черты совпадали с «классическим» фенотипом В-ХЛЛ. Почти все aberrантные В-лимфоциты экспрессировали SmIgk, CD23, CD20. Интенсивность экспрессии SmIgk и CD20 была слабой (dim), а экспрессия антигенов CD79b, CD22, FMC7 отсутствовала, что свойственно В-ХЛЛ. Экспрессия CD38 не обнаружена. Сложную диагностическую задачу представлял собой единственный случай В-ХЛЛ негативный по CD23 антигену (CD5⁺CD23⁻В-ХЛЛ). Трансформированные клетки при этом иммунофенотипическом варианте В-ХЛЛ характеризовались умеренной (mod) степенью экспрессии антигена CD20 и SmIgk. Аномальные лимфоциты в этом случае также показывали более высокую интенсивность экспрессии CD45 антигена, чем у типичного В-ХЛЛ. По другим признакам этот иммунофенотипический вариант соответствовал В-ХЛЛ, т.е. опухолевые клетки были негативны по FMC7, CD22 и слабопозитивны по CD79b. Экспрессия CD38 на популяции лейкозных клеток отсутствовала. Цитогенетические исследования обнаружили у этого пациента трисомию 12 хромосомы, характерную для В-ХЛЛ.

Заключение. Общими иммунофенотипическими чертами типичного и атипичных вариантов В-ХЛЛ является отсутствие экспрессии (или слабая экспрессия) антигенов FMC7, CD22 и CD79b. Иммунофенотипическими особенностями CD5⁺CD23⁻В-ХЛЛ являются: более высокая интенсивность экспрессии антигенов CD20,

SmIgk и CD45. Лейкозные клетки CD5⁺CD23⁻В-ХЛЛ имели следующий иммунофенотип: CD19^{mod}CD5⁺CD23⁻SmIgk^{mod}CD20^{mod}FMC7⁻CD79b^{dim}CD22⁻.

АКТИВАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ Treg у ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Олейник Е.К., Олейник В.М., Чуров А.В., Шибаев М.И., Жулай Г.А., Кравченко П.Н.

Учреждение РАН Институт биологии КарНЦ РАН, г. Петрозаводск, Россия

Исследования последних лет показали, что регуляторные клетки Treg играют важную роль не только в защите хозяина от аутоиммунизации, но также активно участвуют в супрессии противоопухолевого иммунитета. Пул этих регуляторных клеток неоднороден и представлен различными линиями лимфоцитов. Имеются данные о том, что активация и аккумуляция Treg коррелирует с прогрессированием опухолевого роста. Опухоли могут активно индуцировать *de novo* генерацию Treg, специфичных к опухолевым антигенам. Индуцированные Treg не только подавляют функцию эффекторных клеток, но также формируют иммуносупрессивную сеть через взаимодействие с различными антигенпрезентирующими клетками в опухолевом микроокружении, что приводит к установлению локальной и системной иммунной супрессии. Для ее устранения нужно разрабатывать специальные стратегии подавления активности Treg, в частности, блокирование вновь образующихся генераций опухоль-специфичных Treg. В связи с этим представляется понятной необходимость изучения происхождения Treg, их функциональных и фенотипических особенностей, механизмов конверсии для дальнейшего успешного терапевтического использования регуляторных клеток.

Целью настоящей работы было изучение экспрессии молекулярных маркеров активации, ассоциированных с Treg, у онкологических больных. В лимфоцитах периферической крови у онкологических больных с разными локализациями опухоли и у здоровых доноров определяли уровень экспрессии мембранных молекул CD4, CD25, CD45RO, CD45RA, а также уровень экспрессии транскрипционного фактора FoxP3.

Экспрессия молекулярных маркеров иммунной супрессии была изучена у 47 больных с разными онкологическими заболеваниями (РЛ — рак легкого, КРР — колоректальный рак, РМЖ — рак молочной железы, РЖ — рак желудка) в возрасте от 29 до 74 лет. Контрольную группу составили 26 практически здоровых лиц в возрасте от 31 года до 68 лет.

Фенотипирование лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии (FC500, «Beckman Coulter», США). Были использованы моноклональные антитела CD4-PC7, CD45RO-FITC, CD45RA-ECD, CD25-PC5 («Beckman Coulter», США). Уровень экспрессии транскрипционного фактора FoxP3 определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией (Real-Time RT-PCR). Относительный уровень экспрессии гена FoxP3 определяли по уровню мРНК референсного гена GAPDH.

Содержание Трег-клеток с фенотипом $CD4^+CD25^{high}$ у здоровых лиц было равно $2,4 \pm 0,1\%$ от общего числа лимфоцитов, в то время как у онкологических больных количество таких клеток было выше и составило $3,2 \pm 0,3\%$. Наиболее высокое число $CD4^+CD25^{high}$ клеток было выявлено у больных с РЛ и РМЖ.

Внутри популяции $CD4^+$ количество Трег с фенотипом $CD4^+CD25^{high}$ в контроле составило $5,0 \pm 0,3\%$, тогда как у больных с опухолями — $7,2 \pm 0,5\%$ ($p < 0,05$). Повышенное число $CD4^+CD25^{high}$ Трег-клеток среди $CD4^+$ клеток отмечено при РЛ, РМЖ, КРР, в то время как при РЖ число $CD4^+CD25^{high}$ клеток не отличалось от контроля.

Было изучено содержание $CD4^+CD25^{high}$ клеток, имеющих маркер клеток-памяти $CD45RO$, в популяции $CD4^+$. Оказалось, что количество $CD4^+CD25^{high}CD45RO^+$ Трег-клеток у онкологических больных было существенно выше ($10,2 \pm 1,0$), чем в контрольной группе ($6,4 \pm 0,3$) ($p < 0,05$). В то же время следует отметить, что наиболее значительные изменения численности Трег-клеток имели место при РЛ ($12,9 \pm 2,8$) и КРР ($10,4 \pm 1,8$).

При изучении содержания мРНК транскрипционного фактора FoxP3 в лимфоцитах периферической крови онкологических больных оказалось, что уровень экспрессии гена FoxP3 у больных с опухолями оказался существенно выше ($1,45 \pm 0,10$; $p < 0,05$), чем в контрольной группе. Необходимо также отметить, что по мере развития опухоли наблюдалось усиление уровня экспрессии FoxP3. Если в группе больных с III стадией заболевания относительный уровень экспрессии FoxP3 был равен $1,50 \pm 0,09$, то у больных с IV стадией он становился еще выше и составлял $1,76 \pm 0,12$. Сравнение групп больных с разными локализациями показало, что наиболее высокий уровень экспрессии FoxP3 был характерен для КРР и РЛ.

Таким образом, полученные данные об уровне экспрессии молекулярных маркеров, ассоциированных с регуляторными клетками—супрессорами при онкологических заболеваниях свидетельствуют о том, что развитие опухоли сопровождается ростом числа клеток с фенотипом $CD4^+CD25^{high}CD45RO^+$. Активация лимфоцитов Трег в наибольшей степени выражена у больных с РЛ и КРР.

Работа поддержана грантом РФФИ — № проекта 08-04-98838.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ НА ИММУННЫЙ СТАТУС У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С МЕТАСТАЗАМИ В ЛЕГКИЕ

Плохов В.Н., Андреяшкина И.И.

НУЗ «Дорожная клиническая больница», г. Саратов, Россия

При проведении полихимиотерапии (ПХТ) у больных раком молочной железы с метастазами в легкие отмечаются изменения в иммунной системе организма. Учитывая иммуносупрессирующий характер проводимого лечения, благодаря показателям иммунного статуса возможно назначение иммуностимулирующей терапии (Плохов В.Н., 2001; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2001; Y. Kang et al., 2003). В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение динамики иммунитета у больных раком молочной железы с метастазами в легкие на фоне проводимой ПХТ.

Материал и методы. В связи с этим нами изучено состояние иммунитета у пациенток раком молочной железы с метастазами в легкие и плевру на фоне проведения полихимиотерапии. Для оценки показателей иммунитета исследовали венозную кровь до специального этапа лечения, спустя 1 сутки после проведения ПХТ и спустя 14 суток после ПХТ.

Результаты исследования. При динамическом наблюдении были получены следующие данные. Количество лейкоцитов у больных раком молочной железы с метастазами в легкие и плевру до проведения специфического лечения было в пределах нормы, единичные проявления лейкопении не рассматривались. После окончания I курса полихимиотерапии у больных было отмечено снижение общего количества лейкоцитов в 1,8 раз по сравнению с исходным уровнем ($p < 0,01$). Лейкопения при этом сопровождалась как относительной, так и абсолютной лимфоцитопенией. Число лимфоцитов при этом снижалось в 1,9 раз по сравнению с исходными показателями, различия статистически достоверны. В последующих исследованиях иммунологического статуса у больных раком молочной железы с метастазами в легкие представлялось целесообразным установить изменение уровня клеточного иммунитета при проведении полихимиотерапии. Спустя сутки после ПХТ отмечалось усугубление Т-зависимого иммунодефицита: уровень CD3- и CD4-Т-лимфоцитов, а также CD16-лимфоцитов заметно снижался по сравнению с таковыми показателями до лечения, оставаясь значительно ниже нормы. Уровень CD16-лимфоцитов, как и до ПХТ, оставался предельно высоким. При оцен-

ТАБЛИЦА. ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С МЕТАСТАЗАМИ В ЛЕГКИЕ В ДИНАМИКЕ ЛЕЧЕНИЯ (К ТЕЗИСАМ ПЛОХОВА В.Н., АНДРЕЯШКИНОЙ И.И.)

Изучаемые показатели	До лечения			1 сутки после ПХТ			14 суток после ПХТ		
	n	M±m	P	n	M±m	P	n	M±m	P
CD3 (%)	30	43,11±1,22	< 0,001	30	41,26±1,34	< 0,001	30	43,47±1,42	< 0,001
CD4 (%)	30	18,56±1,53	< 0,001	30	18,59±1,57	< 0,001	30	19,41±1,95	< 0,001
CD8 (%)	30	39,41±0,52	< 0,001	30	32,71±0,76	< 0,001	30	30,45±0,98	< 0,001
CD16 (%)	30	12,96±0,51	< 0,001	30	11,21±0,47	< 0,001	30	11,21±0,47	< 0,001
CD4/CD16	30	0,61±0,033	< 0,001	30	0,57±0,028	< 0,001	30	0,64±0,036	< 0,001

ке иммунного статуса у пациенток на 14-е сутки после ПХТ в исследуемой группе больных процентное содержание CD3-Т-лимфоцитов, CD4-лимфоцитов в периферической крови увеличивалось относительно показателей обследуемой группы больных до лечения (табл.). При проведении полихимиотерапии у больных раком молочной железы с метастазами в легкие отмечалось изменение уровня гуморального звена иммунитета. Спустя сутки после ПХТ возникало снижение содержания в крови всех классов иммуноглобулинов. Спустя 14 суток после ПХТ на фоне иммуностимуляции уровень иммуноглобулинов классов G, A, M не достигал таковых показателей данной группы больных.

Таким образом, результаты проведенных исследований убедительно свидетельствуют о прогрессирующем развитии вторичного иммунодефицита на фоне проведения ПХТ. Использование адекватной ПХТ обеспечивает не только элиминацию опухолевых клеток в периоды проведения терапевтических мероприятий, но при подавлении иммунной системы возникает развитие промоции и метастазирование малигнизированных клеток, не подвергшихся эрадикации.

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКТИВНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Пролыгина Д.Д., Хисамова Н.Ф., Давлетбаева Г.А.

ГУЗ Республиканская детская клиническая больница, г. Уфа, Россия

В структуре злокачественных новообразований у детей в России опухоли головного мозга составляют около 18% и занимают 2-ое место по летальности после лейкемии. Из 100 тыс. детей, 3-4 ребенка страдают опухолями головного мозга. Существовавшее ранее представление об «иммунологической привилегированности» клеток головного мозга и относительной ограниченности взаимодействий между центральной нервной и иммунной системами претерпело в настоящее время эволюцию. Современными исследованиями показано, что различные иммунокомпетентные клетки проникают через гематоэнцефалический барьер и инфильтрируют ткань головного мозга. В литературе много данных о плоидности и кинетике клеточного цикла ткани опухоли при различных новообразованиях, но практически отсутствуют сведения по ДНК-цитометрии клеток периферической крови, в том числе при онкопатологии.

Цель исследования: определение особенностей иммунологической реактивности и функционального состояния клеток периферической крови у детей с опухолями головного мозга.

Материалы и методы. Проведено клиничко-иммунологическое обследование 22 детей с различными нозологическими формами опухолей головного мозга, поступивших в нейрохирургическое отделение РДКБ. Первую группу составили 12 пациентов со злокачественными новообразованиями головного мозга (медуллобластома, саркома, астроцитомы, диффузная глиома ствола), вторую — 10 пациентов с доброкачественными опухолями (краниофарингеома, зрелая тератома). Сравнение иммунологических показателей осуществлялось с параметрами практически здоровых детей контрольной груп-

пы ($n = 30$). Оценивались клиничко-лабораторные данные: анамнез, клиника, исследование капиллярной крови. Иммунологическое обследование включало: определение иммуноглобулинов классов A, M, G и циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови; иммунофенотипирование лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии; ДНК-цитометрию клеток периферической крови.

Результаты исследований. Клиничко-иммунологическое обследование пациентов проводилось до удаления массива опухоли. Злокачественный характер новообразования впоследствии подтверждался результатами гистологических исследований. При анализе гематологических показателей у детей обеих групп выявлено высокое содержание лейкоцитов, кроме того, у детей с доброкачественными опухолями — повышенная СОЭ. Остальные параметры не отличались от значений контрольной группы. Показатели гуморального звена системы иммунитета у детей первой группы, по сравнению с контрольной, характеризовались достоверным снижением уровня IgG. В группе детей с доброкачественными опухолями статистически значимых различий с контролем не было. Иммунофенотипирование лимфоцитов методом проточной цитометрии выявило достоверное повышение количества В-лимфоцитов (CD19⁺ клеток) и высокий уровень маркера ранней активации (CD25⁺) у детей обеих групп. Показатели плоидности и содержания клеток периферической крови в различных фазах клеточного цикла у детей с опухолями головного мозга и контрольной группы статистически значимо не отличались. Клетки периферической крови в 100% случаев имели диплоидный набор хромосом. Достоверные различия с контрольной группой установлены по показателям G0/1-фазы клеточного цикла и фазы синтеза ДНК (S-фаза). Так, в группе детей со злокачественными и доброкачественными опухолями головного мозга в G0/1-фазе находилось 99,51% и 99,75% клеток соответственно, в контрольной группе — 99,89%. Статистически значимым было различие по содержанию клеток в S-фазе, при злокачественных опухолях оно составило 0,16%, доброкачественных — 0,20% против 0,10% в контроле. Коэффициент вариации пика G0/1/0 как и в контрольной группе не превышал 2,7%. Таким образом, клиничко-иммунологическое обследование детей показало: у пациентов с доброкачественными и злокачественными опухолями головного мозга, по сравнению с контрольной группой, отмечается лейкоцитоз, ускорение СОЭ, В-лимфоцитоз и высокий уровень клеток с маркером ранней активации (CD25⁺) что, очевидно, свидетельствует о наличии воспалительного компонента; отсутствуют достоверные различия с контрольной группой в показателях плоидности исследованных клеток. Различия касаются лишь кинетики клеточного цикла у детей со злокачественными и доброкачественными новообразованиями.

ВЛИЯНИЕ АВТОМАТИЧЕСКОГО ТРОМБОЦИТАФЕРЕЗА НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ДОНОРОВ

Семелев В.Н., Четкин А.В., Касьянов А.Д.
Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Проведение автоматического тромбоцитафереза (АТА) связано с потенциальным риском небла-

гоприятного воздействия на организм донора и развития патологических реакций и осложнений, в частности со стороны иммунной системы. Этому способствуют значительный объем крови, контактирующий с чужеродной поверхностью экстракорпорального контура, высокий темп проведения процедур афереза, гипотермия, использование антикоагулянтов.

Целью работы явилось исследование динамики показателей иммунной системы у активных доноров после проведения автоматического афереза тромбоцитов с изъятием не менее 600×10^9 клеток.

Материалы и методы. Были обследованы 184 донора, у которых АТА проводили на сепараторе клеток крови Amicus («Fenwal-Baxter», США) с использованием расходного набора закрытого типа с одноигольным доступом. От доноров за одну операцию получали $683 \pm 14 \times 10^9$ тромбоцитов, взвешенных в $394,8 \pm 3,5$ мл плазмы. Для оценки состояния иммунной системы донора определяли концентрацию интерлейкина-1 β (IL-1 β) и интерлейкина-2 (IL-2) в образцах плазмы иммуноферментным методом. Функциональное состояние нейтрофилов крови доноров исследовали с помощью теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) с расчетом индекса активации нейтрофилов (ИАН), используя в качестве стимулятора взвесь зимозана.

Основные результаты. После проведения АТА — через 2 часа и на 1 сутки — наблюдалось достоверное уменьшение базального уровня активации нейтрофилов, определяемого по показателям ИАН, на 60% с восстановлением до исходного уровня на 3 сутки. Наряду с этим после операции АТА отмечали достоверное уменьшение ИАН после стимуляции зимозаном с восстановлением на 7 сутки. Через 2 часа после АТА стимулированный уровень ИАН уменьшался на 22,8%, к 1 суткам — на 19,8%, а к 3 суткам — на 25,7% от исходного уровня. На 7 сутки исследования ИАН после проведения стимуляции зимозаном достоверно не отличался от первоначального уровня.

При проведении исследования не выявлено достоверных изменений концентрации цитокинов IL-1 β и IL-2 после АТА. Показатели концентрации цитокинов на всех этапах исследования не выходили за пределы физиологических колебаний.

Заключение. Заготовка тромбоцитов автоматическим методом приводит к изменению показателя ИАН, как базального так и стимулированного, в сторону уменьшения с восстановлением до исходного уровня базального на 3 сутки, а стимулированного — на 7 сутки. Наряду с этим не выявлено достоверного влияния операции на показатели концентрации цитокинов IL-1 β и IL-2.

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПРИ ОСТРОМ НЕЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ

Смирнова О.В.

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

Введение. Острые нелимфобластные лейкозы (ОНЛЛ) — одни из наиболее частых заболеваний среди острых лейкозов. В настоящее время доказано, что особенности течения заболевания зависят от возможности реагирования клеток иммунной системы больного на возникшую патологию. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение особенностей со-

стояния клеточного и гуморального звеньев иммунитета у больных ОНЛЛ в зависимости от стадии заболевания.

Материалы и методы. Всего в исследование были включены 100 больных ОНЛЛ, с иммуновариантом М4. Средний возраст заболевших составил $42,7 \pm 1,5$ лет. У 30 больных лейкоз диагностирован в стадии первичной атаки, у 49 — в стадии полной ремиссии после проведенного лечения, и у 21 — в стадии повторного рецидива. В качестве контроля обследовано 125 здоровых лиц аналогичного возраста и пола.

Оценку клеточного состава лимфоцитов крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, HLA-DR. Дополнительно вычисляли иммунорегуляторный индекс. Содержание иммуноглобулинов класса А, М и G в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом. Оценка иммунологического состояния проводилась при поступлении больных до начала патогенетического лечения. Описание выборки производили с помощью оценки непараметрических параметров, определяя медиану и интерквартильный размах в виде 25 и 75 перцентилей. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 7.0.

Основные результаты. При исследовании состояния клеточного звена иммунитета у лиц контрольной группы и больных ОНЛЛ установлено, что на стадии первичной атаки у больных снижается относительное количество CD3⁺ и CD4⁺ клеток. На стадии полной ремиссии относительно контроля снижены абсолютное количество лейкоцитов, абсолютный и относительный уровни лимфоцитов, CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ клеток. Снижение абсолютного количества клеток выявляется относительно показателей контроля и у больных на стадии первичной атаки. На стадии повторного рецидива у больных относительно контроля и больных на стадии первичной атаки установлено снижение абсолютного количества лимфоцитов и CD8⁺ клеток. Только относительно показателей больных на стадии полной ремиссии, при рецидиве повышается относительный уровень лимфоцитов крови. Содержание CD16⁺, CD19⁺ и HLA-DR⁺ лимфоцитов у больных на стадии первичной атаки не изменяется относительно контроля. На стадии полной ремиссии относительно показателей контроля и атаки снижены процентное и абсолютное содержание CD16⁺ клеток и абсолютные уровни CD19⁺ и HLA-DR⁺ лимфоцитов. При повторном рецидиве обнаружено снижение относительного и абсолютного содержания CD16⁺ лимфоцитов и абсолютного уровня HLA-DR⁺ клеток.

При исследовании показателей гуморального звена иммунитета установлено, что при первичной атаке концентрация иммуноглобулинов основных классов не отличается от контроля, при полной ремиссии снижена концентрация IgG относительно контроля и показателей при первичной атаке. При повторном рецидиве снижены концентрации всех основных классов иммуноглобулинов. Снижение концентрации IgG установлено относительно контроля и больных при первичной атаке.

Заключение. На всех стадиях ОНЛЛ обнаружены выраженные изменения состояния иммунного статуса, наиболее выраженные — у больных с повторным рецидивом. Так, на стадии первичной атаки выявлены изменения, в виде снижения относительного уровня Т-лимфоцитов

и CD4⁺ клеток, при этом состояние гуморального звена иммунной системы соответствует параметрам контроля. На стадии полной ремиссии заболевания выявлены нарушения, в виде снижения всех параметров клеточного звена иммунитета и содержания IgG в крови. На стадии повторного рецидива сохраняются сниженные параметры клеточного звена иммунитета, и наблюдается гипогаммаглобулинемия по всем классам.

На стадии первичной атаки и полной ремиссии ОНЛЛ развивается Т-иммунодефицит, на стадии повторного рецидива — комбинированный иммунодефицит с поражением Т- и В-систем иммунитета. Резкое снижение количества NK-клеток вероятно способствует прогрессированию заболевания и развитию рецидива.

ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ

Смирнова О.В., Манчук В.Т.

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

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

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

Материалы и методы. Всего под наблюдением находилось 44 больных ХМ. Средний возраст заболевших составил 55,2±2,4 года. У 20 больных ХМ заболевание диагностировалось в развернутую стадию, а у 24 больных — в терминальную стадию. В качестве контроля обследовано 125 здоровых лиц аналогичного возраста.

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

Основные результаты. При исследовании состояния клеточного звена иммунитета у больных ХМ установлено, что у больных в развернутую стадию снижаются относительные уровни CD3⁺, CD4⁺ клеток, повышается процентный уровень CD19⁺ лимфоцитов, относительно показателей контроля. У больных в терминальной стадии снижаются абсолютные концентрации CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD19⁺ лимфоцитов и лимфоцитов, экс-

прессирующих HLA-DR⁺ антиген, относительно контроля, показатели абсолютного содержания CD8⁺, CD19⁺, HLA-DR⁺ лимфоцитов достоверно ниже, чем у больных в развернутой стадии. У больных в развернутой стадии абсолютные показатели CD72⁺ и HLA-DR⁺ лимфоцитов достоверно выше, чем у больных в терминальной стадии и контрольной группы. У больных в развернутой стадии снижен иммунорегуляторный индекс, по сравнению с контролем.

При исследовании состояния гуморального звена иммунитета установлено, что только у больных в терминальной стадии снижены концентрации IgA и IgM в крови, относительно контроля.

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

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ РЕДКИХ ФОРМ ОПУХОЛЕЙ ИЗ ЗРЕЛЫХ В-КЛЕТОК

Сухина И.А., Никитин В.Ю., Колюбаева С.Н.,
Никитин Ю.В., Малахова С.Н., Мешкова М.Е.,
Елисеева М.И.

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

Введение. Разнообразие форм опухолей из зрелых В-клеток продолжает пополняться и в настоящее время. Изучение иммунофенотипических характеристик редко встречающихся вариантов хронических В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний с использованием возможностей проточной цитометрии необходимо для совершенствования их дифференциальной диагностики.

Цель: оценить диагностическую значимость характера экспрессии CD-рецепторов редких форм опухолей из зрелых В-клеток методом проточной цитометрии.

Материалы и методы. Обследован костный мозг (КМ) пациентов с редкими формами опухолей из зрелых В-клеток: CD23-позитивной лимфомой из клеток мантийной зоны (CD23⁺ЛКМЗ) в фазе лейкемизации, лимфопротоплазматической лимфомой (ЛПЛ) в фазе лейкемизации и вариантом волосатоклеточного лейкоза (ВКЛв). Иммунофенотипирование выполнено на проточном цитометре «Cytomics FC500» «Beckman Coulter»

с применением моноклональных антител (США): CD3/CD19/CD45, CD10/CD20/CD19, SmIgk/SmIgλ/CD19, CD5/CD23/CD19, FMC7/CD38/CD19, CD22/CD79b/CD19, CD103/CD24/CD19, CD25/CD11c/CD19.

Результаты. Проточно-цитометрический анализ показал, что опухолевые клетки пациента с редким вариантом CD23⁺ЛКМ3, как и при «классическом» В-клеточном хроническом лимфолейкозе (В-ХЛЛ), экспрессировали CD19, CD20, CD5, CD23 антигены, но имели и характерные отличия. Интенсивность экспрессии CD20 при данной форме ЛКМ3 была умеренной (mod) против слабой (dim) при В-ХЛЛ. Кроме того трансформированные лимфоциты при ЛКМ3 экспрессировали FMC7, CD79b, CD22 антигены, которые при В-ХЛЛ, как правило, отсутствуют или слабопозитивны только по некоторым из них. Таким образом, лимфомные клетки имели иммунофенотип: CD19⁺CD5⁺CD23⁺SmIgk⁺CD20^{mod}FMC7⁺CD79b⁺CD22⁺CD25⁺CD10⁺CD11c^{dim}. Подтверждением диагноза стало обнаружение специфичной для ЛКМ3 транслокации t(11;14).

У больного с ЛПЛ в фазе лейкоемизации трансформированные лимфоциты экспрессировали антигены CD19, Smk, SmIgM, CD25, CD20, CD22, CD79b, CD23^{dim} и были негативны по экспрессии CD5, FMC7, CD10. В сыворотке крови было обнаружено сильное повышение IgM (> 15 г/л). При исследовании фракции белков плазмы крови выявлено существенное повышение гамма-протеина (парапротеин) – 32,0% (норма: 11,5%-18,6%). Цитогенетические исследования КМ обнаружили большое количество повреждений, не носящих клональный характер. Поражение КМ лимфоцитоплазматической лимфомой доказывало исследование трепанобиоптата, в котором плазматические клетки образовывали многочисленные скопления и имели моноклональную природу.

Морфологические исследования костного мозга пациентки с подозрением на ВКЛ выявили наличие 5,6% волосатоклеточных лимфоцитов. Проточно-цитометрический анализ показал, что в отличие от «классической» формы ВКЛ лейкозные клетки почти не экспрессировали CD103 (10,8% ВКЛ-лимфоцитов), а экспрессия CD25 полностью отсутствовала. Лейкозные клетки показывали очень яркую (bright) интенсивность экспрессии антигенов CD45, CD19, CD20, SmIgk, CD11c, CD22 и были слабопозитивны (dim) по FMC7 и CD79b. Данный иммунофенотип соответствовал ВКЛ-варианту. Таким образом, лейкозные клетки при ВКЛ имели иммунофенотип: CD19^{bright}SmIgk^{bright}CD20^{bright}CD11c^{bright}CD22^{bright}FMC7^{dim}CD79b^{dim}CD23^{dim}CD5^{dim}CD25^{dim}CD10^{dim}.

ОЦЕНКА УРОВНЕЙ ОНКОМАРКЕРОВ И СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У УСЛОВНО-ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН, У БОЛЬНЫХ МАСТОПАТИЕЙ И РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Тиунова Т.А., Зурочка В.А., Зуева Е.Б., Зурочка А.В.

*Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,
г. Екатеринбург, Россия*

Изучение уровней онкомаркеров и состояния иммунной системы у женщин с предраковыми и онкологическими заболеваниями является одной из актуальных проблем современной медицины. Одним из наиболее часто встречающихся заболеваний являются такие как мастопатия, которую многие врачи относят к предраковым

заболеваниям и рак молочных желез. В последние годы многие ученые изучают диагностическое значение уровней онкомаркеров в клинической практике, в том числе и для формирования групп риска по онкологической заболеваемости. Важную роль отводят также и изучению иммунной системы при развитии предраковых и онкологических состояний.

Цель исследования: выявить основные закономерности изменения уровней онкомаркеров и параметров иммунной системы у женщин, не имеющих заболеваний молочных желез, с мастопатией и раком молочной железы.

Было обследовано 126 женщин, из них 56 условно-здоровые (без острых и хронических воспалительных заболеваний, аллергических и аутоиммунных процессов), 55 больных мастопатией, 15 раком молочной железы (впервые выявленном, без применения хирургического или терапевтического лечения). Изучали уровни онкомаркеров РЭА, СА-125, СА 15-3, β-ХГЧ, СА 19-9, АФП, НСЕ. Иммунный статус оценивали по уровню CD3, CD4, CD8, CD16⁺CD56, CD19, CD25, HLA-DR, методом проточной цитометрии, фагоцитарным функциям нейтрофилов, уровням иммуноглобулинов М, G, А (метод ИФА).

Исследования показали, что при развитии мастопатии у женщин наблюдается рост ряда онкомаркеров по сравнению со здоровыми женщинами, таких как СА-125, СА 19-9, сопровождающийся изменением параметров иммунной системы: в лимфоцитарном звене увеличением уровней Т-хелперов (CD4), цитотоксических (CD8), CD25 и HLA-DR; фагоцитов: при снижении активности и интенсивности фагоцитоза, повышение спонтанной НСТ-реакции и снижение индуцированной реакции нейтрофилов. Развитие рака молочной железы сопровождается более значительным ростом не только выявленных онкомаркеров при мастопатии, но и РЭА, СА 153, β-ХГЧ, АФП, НСЕ, при этом цифры роста значительно превышают уровни не только здоровых женщин, но женщин с мастопатией. Важно отметить, что у женщин с раком молочной железы сохраняется те же изменения иммунной системы, что у женщин с мастопатией, и дополнительно увеличивается количество NK-клеток и снижается уровень IgG. Важно отметить, что развитие опухолевого процесса, хотя и приводит к активации клеток иммунной системы, но степень выраженности ее меньше чем у больных с мастопатией, особенно по таким показателям как CD25 и HLA-DR. По-видимому, при развитии рака молочной железы, несмотря на активацию иммунной системы, ее компенсаторных механизмов не хватает для ликвидации онкологического процесса, о чем свидетельствует, помимо клинической картины, значительное повышение уровней онкомаркеров. Полученные данные могут служить дополнительными критериями для дифференциальной диагностики мастопатии и рака молочной железы.

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМ У ДЕТЕЙ

Хаматдинова З.Р.

*ГУЗ Республиканская детская клиническая больница,
г. Уфа, Россия*

Введение. Главным диагностическим критерием для проведения программной терапии злокачественных лимфом у детей является морфологическая верификация

процесса с иммунофенотипированием. Иммунофенотип клеток неходжкинской лимфомы (НХЛ) во многом определяет выбор протокола лечения. Одной из характеристик лейкозной клетки является ее способность избегать уничтожения за счет увеличения пролиферативного потенциала. При диагностике острых лейкозов и неходжкинских лимфом у детей в отделении онкогематологии и лаборатории иммунологии с отделением клинической иммунологии ГУЗ РДКБ, мы используем схему, предложенную в 1995 году Европейской группой по иммунологическому изучению лейкозов

Цель настоящего исследования: определить диагностическое и прогностическое значение пролиферативной активности, плоидности и выявления маркеров иммунофенотипирования Т- и В-клеточных лимфом.

Материал и методы исследования. За период с 2002 по 2009 гг., было проанализировано 33 случая заболевания НХЛ и лимфомой Беркитта у детей и подростков до 19 лет которым было выполнено иммунофенотипирование клеток биопсийного материала методом прямой иммунофлюоресценции на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. Все больные получили лечение по модифицированному протоколу NHL-BFM 90m. Для характеристики пролиферативной активности клеток использовался метод, основанный на связывании ДНК с флуоресцентным зондом-пропидиум иодидом, который позволяет определить долю клеток в различных фазах митотического цикла: G0/G1, S и G2+M.

Результаты. На основании проведенных исследований, были диагностированы в 64% случаев В-клеточные лимфомы, в 36% – Т-клеточные. Как В-, так и Т-клеточные лимфомы чаще регистрировались среди мальчиков. В 38% случаев В-лимфома выявлялась в возрасте от 10 до 17 лет, Т-клеточная лимфома в 50% от 5 до 10 лет. Из 12 больных с Т-лимфобластной лимфомой установлен иммунофенотип: про-Т – 1, пре-Т – 4, Т-3 – 4, зрелый Т-клеточный – 3, в 21 случае была диагностирована В-лимфома (про-В – 1, common В – 7, пре-В – 10, В-1). Поскольку лимфома у детей отличается высоким потенциалом пролиферации, нами проведено изучение плоидности клеток и кинетики клеточного цикла биопсийного материала. При этом в 19 случаях при В-клеточной лимфоме, клетки биоптатов имели диплоидный набор хромосом, в 2-х случаях была обнаружена анеуплоидия. При Т-лимфоидном варианте лимфомы, в 100% случаев опухоли имели диплоидный тип гистограмм. При изучении кинетики клеточного цикла в группе детей с диплоидным содержанием ДНК при В-лимфоме, было установлено, что основная масса опухолевых клеток находится в G0/G1 (91,15%) фазе клеточного цикла, S-фаза (фаза синтеза ДНК) составила – 8,32%, при Т-клеточной лимфоме S-фаза – 11,35%, G0/G1 – 86,81%. Для раскрытия механизмов взаимодействия и степени взаимосвязи кластеров дифференцировки опухолевых клеток и данных ДНК-цитометрии был проведен корреляционный анализ, в ходе которого установлено что у детей с лимфомой – опухолевые клетки находятся в фазе постмитотического отдыха G1. Это положение подтверждается взаимосвязями CD19km & G1km; CD22 & G1km; CD79a & G1km. Сравнительный анализ между группами больных с В- и Т-клеточными лимфомами не выявил достоверных различий в бессобытийной выживаемости больных. Прогностическое значение, по нашему мнению, имеют отдельные маркеры при Т-клеточной лимфоме: у 2-х больных (всего было 4 случая) в дальнейшем развился рецидив

и лимфобласты имели фенотип кортикального тимоида (CD1a⁺), что очевидно указывает на его значение в качестве высокого риска развития рецидива. Выявленная анеуплоидия у больных с В-клеточной лимфомой, также имела прогностическое значение, поскольку именно у этих больных развился ранний рецидив.

Обсуждение. Признанным лидером в лабораторной диагностике является метод проточной цитофлуориметрии. Определение фенотипа каждой клетки в сочетании с анализом большого количества событий дают максимально полную информацию в кратчайшие сроки (Шмаров Д.А. и др., 1999; 2004). Многопараметровая проточная цитометрия позволяет не только поставить диагноз, но и оценить прогноз заболевания (Mora J., 2000; Gascoyne R.D., 2003; Gerrard M., 2004; Gesk S., 2005; Isimbaldi G., 2006; Bubala H., 2006; Laver J., 2005). В ходе наших исследований установлено, что выявление кортикальных тимоцитов (CD1a⁺) при Т-лимфобластной лимфоме, а также выявленная анеуплоидия при В-клеточной лимфоме имеют неблагоприятное прогностическое значение в плане высокого риска развития рецидива.

ДВА ТИПА РЕАКЦИИ ЛИМФОЦИТОПОЭЗА НА ПОВРЕЖДЕНИЕ

Шутко А.Н., Екимова Л.П., Сокуренок В.П., Матюрин К.С., Карамуллин М.А.

ФГУ «Российский Научный Центр Радиологии и Хирургических Технологий» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

В последние месяцы жизни онкологических больных компенсированный режим кроветворения переходит в состояние декомпенсации (т. н. «турбулентный» гематопоз), что выражается в смене максимумов и минимумов количества стволовых и ранних клеточных форм в циркуляции (Шутко А.Н. и др., 2008; Shoutko A. et al., 2010). В предшествующий, компенсированный период состояние гематопоза характеризуется различными уровнями гомеостазирования с постепенно снижающейся продукцией зрелых циркулирующих клеток. Однако выявление количественных различий между компенсированными уровнями с помощью общепринятых иммунологических показателей затруднительно, хотя весьма актуально для прогнозирования продолжительности жизни. Поскольку изменения количества циркулирующих иммуноцитов определяются фазами репродукции /дифференцировки в костном мозге с преобладанием генерации либо зрелых форм, либо предшественников, целью работы явился поиск комбинированного критерия разделения уровней компенсированного лимоцитопоза с привлечением недифференцированных циркулирующих клеток.

Методы. Объектом исследования служила кровь 11 больных неоперабельным орофарингеальным раком, получавших ежедневную локо – региональную лучевую терапию фракциями по 3 Гр до 39 Гр. Субпопуляционный состав мононуклеаров анализировали до и после начала лечения в течение 35-ти дней на проточном цитометре FACScan (BD) с маркерами: CD3, CD4, CD8, CD11, CD19, CD31, CD34, CD45, CD62, CD133, TdT, VEGF. Используя программы «Vernier», «Excel» вычисляли средние $M \pm m$, дисперсии, взаимозависимости показателей, соотношения маркеров в лимфоцитарной и моноцитарной фракциях. Кинетику количественных изменений ап-

проксимировали различными функциями с определением коэффициентов их корреляции $R \pm m_r$. Результаты: Из изученных критериев разделения наиболее универсальным оказалось отношение (X) концентрации общей фракции лимфоцитов в мкл к процентному содержанию той или иной из субпопуляций во фракции мононуклеаров. Исходные величины отношения (X) для каждой субпопуляции для удобства сравнения принимали за единицу, 35-дневные изменения отношения прослеживали, выражая их в относительных величинах (Хотн.).

Результаты. По кинетике Хотн. все обследованные больные оказались качественно разделенными. Ко 2-3 неделям у пяти из них зарегистрировано 2-х кратное снижение отношений Хотн. с маркерами CD34, CD133, TdT, VEGF (полином 2-й степени; $R = 0,995 \pm 0,072$; $p = 0,005$), у шести — 3÷4 кратное увеличение с теми же маркерами (полином 3-й степени; $R = 1$; $p = 0,001$). Описанная динамика X отн. (подъем либо падение) наблюдается как при использовании для расчета Хотн. — параметра концентрации общей фракции CD34⁺ клеток, так и ее составляющих — лимфоцитарной и моноцитарной. С маркерами CD3, CD4, CD8 и CD31 получены аналогичные результаты (у тех же больных с той же направленностью), но менее выраженные. Снижение было всего в 1,4 раза (полином 2-й степени; $R = 0,975 \pm 0,112$; $p = 0,013$) и увеличение в 1,6 раза (полином 3-й степени; $R = 1$; $p = 0,001$). После 3 недели происходило постепенное возвращение Хотн. к исходному значению (Хотн. = 1) во всех вариантах, кроме варианта снижения отношений для маркеров CD34, CD133, TdT, VEGF. Для них отношения Хотн. продолжали уменьшаться, достигая величины 0,3 к концу 5-ой недели мониторинга. Кинетика составляющих об-

щий пул CD34⁺ клеток моноцитарной и лимфоцитарной фракций была однотипной. Важно отметить, что в группе больных со снижающимся X исходная концентрация общих CD34⁺ клеток ($0,32 \pm 0,07\%$) достоверно превышала ($p = 0,03$) нормальную исходную концентрацию их в группе с подъемом отношения X ($0,012 \pm 0,014\%$). У этой части больных с исходно форсированной продукцией CD34⁺ клеток имеет место относительный дефицит более зрелых клеточных форм. Радиационное воздействие, произведенное на таком фоне, однако, не препятствует последующему процессу нормализации соотношения указанных пулов. В то же время, радиационное воздействие при исходно нормальном соотношении пулов сопровождается динамическим нарастанием ранних клеток и убылью зрелых. Таким образом, наиболее надежное выявление скрытой неоднородности лимфоцитопоза у изученных пациентов признан расчет отношения (X) концентрации общей фракции лимфоцитов в мкл к процентному содержанию субпопуляций с CD34⁺, CD133⁺, VEGF⁺ или TdT⁺. Среди них наибольший контраст между двумя группами больных обеспечивают, CD133⁺ и VEGF⁺ клетки. Согласно данным литературы они имеют отношение к процессу ангиогенеза. Заключение: Не вдаваясь в детали функции названных клеток можно констатировать существование, по крайней мере, двух подвидов компенсированного лимфоцитопоза у онкологических больных — с нормальным уровнем циркулирующих CD34⁺ предшественников и повышенным. Критерий X отражает соотношение репродуктивной и дифференцировочной фаз в лимфоцитопозе и позволяет разделять его альтернативные состояния даже на фоне одинаковой лучевой нагрузки на организм опухоленосителя.