

ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

ОНКОИММУНОЛОГИЯ И ГЕМОБЛАСТОЗЫ

ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ТЕЛА МАТКИ

Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Генинг С.О.,
Долгова Д.Р., Мясникова Д.Ф.

Ульяновский государственный университет, Ульяновск,
Россия

Нейтрофилы (Нф) являются классическими клетками воспаления. Рак-ассоциированное воспаление на сегодня признается одним из основных механизмов при ряде злокачественных новообразований [Brandau S. et al., 2011]. Считается, что Нф имеют высокую функциональную пластичность и могут проявлять как про-, так и противоопухолевую активность.

Считается установленным модифицирующее влияние неоплазмы на нейтрофилы периферической крови [Антонеева И.И. с соавт., 2007; Klink M. et al., 2008]. Конечный эффект при этом, в том числе возникновение проопухолевого фенотипа, зависит от типа опухоли, места локализации и стадии развития. Изучение механизмов изменения фенотипа Нф с про- на противоопухолевый путем соответствующей модуляции предоставит новые возможности для биологической терапии рака.

Целью исследования была оценка цитокинового статуса и функционального состояния Нф больных раком тела матки.

Материалом для исследования служили Нф периферической крови 123 первичных больных раком тела матки (РТМ) Iа стадии по FIGO, подвергавшихся обследованию и лечению в гинекологическом отделении Ульяновского областного клинического онкологического диспансера, и 18 доноров. Для приготовления лизата нейтрофилов клетки выделяли из 5 мл гепаринизированной крови на двойном градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho=1,117$ и $1,077$ г/мл). Взвесь нейтрофилов трижды отмывали физиологическим раствором. Чистота фракции нейтрофилов составляет 92-94%. Определяли абсолютное и относительное количество Нф. Цитохимически в Нф оценивали активность миелопероксидазы (МПО), уровень катионных белков (КБ), активность в спонтанном НСТ-тесте, фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ). Выделенные и отмывые нейтрофилы перемещали по 50 ± 5 тысяч клеток в 0,15 мл физиологического раствора, и путем замораживания-оттаивания из них получали лизаты. Спонтанную продукцию цитокинов (IL-2, IFN- γ , G-CSF и IL-1Ra, ЗАО «Вектор-Бест-Волга», Н.Новгород) определяли твердофазным иммуноферментным методом в лизате Нф. Лизаты Нф и сыворотка крови хранилась в течение месяца при -25°C . В качестве центральной характеристики применяли медиану, а при

сравнении использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Было установлено на фоне снижения абсолютного количества Нф значимое повышение в них активности МПО ($2,72 \pm 0,007$ СЦК против $1,56 \pm 0,16$ СЦК в контроле), уровня КБ ($1,74 \pm 0,09$ СЦК против $0,92 \pm 0,14$ СЦК в контроле), активность в НСТ-тесте ($2,02 \pm 0,21$ СЦК против $1,06 \pm 0,17$ СЦК), ФЧ ($2,29 \pm 0,32$ у.е. против $1,76 \pm 0,46$ у.е.) и ФИ ($45,6 \pm 9,03\%$ против $9,30 \pm 4,37\%$ в контроле). Выраженное усиление функциональной активности Нф сопровождалось изменением их секреторной активности. Резко снижалось количество индуктора цитотоксической активности IL-2 ($19,26 \pm 4,43$ ($5,17-36,45$) пг/мл против $81,32 \pm 17,31$ ($32,46-127,41$) пг/мл в контроле). При этом уровень G-CSF в лизате Нф составил $35,62 \pm 7,19$ ($22,86-63,74$) пг/мл против 0 пг/мл в контроле. Количество IFN- γ и IL-1Ra значимо не отличалось от контроля.

Таким образом, полученные результаты позволяют предполагать при РТМ на фоне снижения общего количества Нф усиление их функциональной активности и синтеза G-CSF при одновременном снижении продукции IL-2.

Работа выполнена при поддержке гос. задания МИ-НОБРНАУКИ России.

КРИТЕРИИ ОТБОРА ПАЦИЕНТОВ БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ АКТИВИРОВАННЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ НА ОСНОВЕ ИСХОДНОГО УРОВНЯ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛ МІСА

Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Пасова И.А.,
Козлов И.Г.¹, Каприн А.Д.

МРНЦ им. А.Ф. Цыба - филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, Обнинск, Россия
¹ ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Д. Рогачева Минздрава России, ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Стресс-индуцированные молекулы МІСА являются ранними маркерами для противоопухолевого иммунного ответа. Наличие МІСА-положительных опухолевых клеток в организме больного должно приводить к активации NKG2D-положительных цитотоксических лимфоцитов и элиминации опухоли. Однако злокачественные клетки способны сбрасывать эти молекулы со своей поверхности, что помогает им уйти от иммунного надзора. Растворимые формы молекул МІСА (sMICA) могут быть обнаружены в сыворотке крови онкологических больных на ранних стадиях заболевания. Адоптивная иммунотерапия активированными лимфоцитами мо-

жет повысить эффекторную функцию NK-клеток и привести к элиминации опухолевых клеток.

Целью исследования был мониторинг содержания Treg, NK-клеток и экспрессии на них активирующих рецепторов в крови больных меланомой до и после проведения иммунотерапии (ИТ) в зависимости от исходного уровня стресс-индуцированных молекул sMICA у больных.

Материалы и методы. В работе использовали периферическую кровь 29 больных меланомой. Контрольную группу составляли 60 здоровых добровольцев. С помощью иммуноферментного анализа в сыворотках крови пациентов оценивали содержание sMICA. Для иммунотерапии периферические мононуклеары выделяли из гепаринизированной крови и культивировали на протяжении 7-10 дней в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15. Иммунотерапию проводили в течение 1 месяца на фоне химиотерапии. Оценка поверхностной экспрессии CD4/25, CD16/56, CD38, CD69, HLA-DR, NKG2D (CD314) проводили до и через 3-4 месяца после ИТ с использованием флуоресцентномеченых антител на цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США).

Основные результаты. Показано, что у большинства больных меланомой уровень sMICA значительно повышен ($p < 0.001$) и более чем в 50 раз превышает контрольные значения. В зависимости от уровня sMICA больные были поделены на 3 группы: 1 гр. уровень sMICA < 1000 пг/мл, 2 гр. от 2000-3000 пг/мл, 3 гр. > 5000 пг/мл. Всем больным была проведена иммунотерапия активированными лимфоцитами и оценена экспрессия поверхностных маркеров. В первой группе через 3-4 месяца после ИТ наблюдалась тенденция к увеличению числа активированных лимфоцитов экспрессирующих CD314, CD25, HLA-DR и CD38 (таблица). Во второй и третьей группе наоборот, выявлено снижение количества активированных лимфоцитов несущих CD314 и увеличение Treg лимфоцитов, несмотря на проведенную адоптивную ИТ. Данное явление сопровождалось прогрессией основного заболевания у третьей группы больных.

Заключение. Показано, что у больных меланомой с исходно высоким уровнем растворимых форма молекул MICA после иммунотерапии активированными лимфоцитами не происходит активации лимфоцитов, а наблюдается ингибирование NKG2D на лимфоцитах и NK-клетках, а также возрастает количество иммуносупрессивных форм лимфоцитов – Treg. Оценка клинической эффективности лечения показала отсутствие эффекта от проводимой терапии у данной группы больных. Можно заключить, что уровень иммунорегуляторных молекул MICA в сыворотке крови больных меланомой может служить отправной точкой для отбора пациентов в протоколы лечения с использованием иммунотерапевтических подходов.

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ И МУТАЦИИ ГЕНОВ BRCA1/2 ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ОРГАНОВ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ У ЖИТЕЛЕЙ РЕСПУБЛИКИ АДЫГЕЯ

Анохина Е.Н., Тугуз А.Р.

Иммуногенетическая лаборатория, Адыгейский государственный университет, Майкоп, Россия

Введение. Злокачественные новообразования (ЗНО) женских репродуктивных органов преимущественно ассоциируются с генами BRCA1/2 (Breast cancer antigen), поддерживающих стабильность генетического аппарата клеток, репарации ДНК и обеспечивающих целостность генома. Мутации, снижающие супрессивный эффект продуктов генов BRCA1/2 на опухолевые клетки и обуславливающие развитие ЗНО молочной железы, желудка и др. локализаций, неравномерно распределены в мировых популяциях, чаще выявляются у евреек-Ашкенази с аденокарциномой молочной железы (до 22%), но для других этнических групп не имеют прогностической значимости. Актуальность исследования обусловлена поиском более информативных молекулярно-генетических маркеров неопластических процессов для этнических групп. В качестве ранних предикторов ЗНО могут быть использованы SNP (single nucleotide polymorphisms) промоторных регионов генов цитокинов, регулирующих интенсивность экспрессии, биологические эффекты медиаторов, включая вовлеченность в патогенез неоплазий.

Цель работы: исследование ассоциации полиморфизмов генов основных про- и противовоспалительных цитокинов со злокачественными новообразованиями органов женской репродуктивной системы на примере жителей Республики Адыгея (РА).

Задачи: 1. Анализ распределения мутаций генов-супрессоров BRCA1/2 (5382insC, 185delAG, 4153delA, Cys61Gly, 2080delA, 3819delGTA, 3875delGTCT, 6174delT) в норме и при онкопатологии. 2. Типирование полиморфизмов генов IL-17A (G197A), IL-17F (A7488G), IL-2 (T330G), IL-12B (A1188C), IL-10 (G1082A, C819T, C592A), IL-4 (C589T), ассоциированных со злокачественными новообразованиями органов женской репродуктивной системы. 3. Выявление SNP-маркеров опухолевой прогрессии и прогностически неблагоприятных гистотипов низкодифференцированной аденокарциномы молочной железы.

Материалы и методы. Обследовано 343 женщин двух этнических групп (адыгов и русских), проживающих в РА, в том числе 171 доноров, 172 онкологических больных с гистологически верифицированными диагнозами ЗНО (I-IV стадий) молочной железы (ПМЖ, n=126), тела матки (n=21), шейки матки (n=23), яичников (n=2). Качество геномной ДНК, выделенной из стабилизированной

ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ АБАКУШИНОЙ Е.В. И ДР.)

Группы / CD маркеры	314	314/16	NK	Treg	25	3/DR	HLA-DR	38	3/38	69	16/69
1 группа – уровень sMICA < 1000 пг/мл											
до ИТ	48	16	17	6	7	12	19	39	19	23	7
через 3-4 мес. после ИТ	60	12	13	9	12	30	44	62	41	12	5
3 группа – уровень sMICA > 5000 пг/мл											
до ИТ	44	17	18	9	13	12	21	46	22	16	7
через 3-4 мес. после ИТ	32	10	16	19	21	16	25	52	31	13	7

ЭДТА цельной крови реагентами «ДНК-экспресс-кровь» (НПФ «Литех», Россия) и «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» (ООО «ДНК-Технология», Россия) тестировано на спектрофотометре «NanoDrop 2000c» (Termo Scientific, USA). Полиморфизмы генов цитокинов типированы SNP-методом с использованием двухпраймерных коммерческих тест-систем НПФ «Литех», ООО «ДНК-технология» с электрофоретической детекцией результатов и в режиме реального времени (PCR-Real Time). Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесия Харди-Вайнберга с помощью критерия χ^2 (хи-квадрат). Статистически значимые различия ($P \leq 0,05$) вычислены с использованием U-критерия Манна-Уитни и пакета программ SPSS Statistics 17.0.

Результаты исследования. Семь из восьми исследованных мутаций генов BRCA1/2 у больных РМЖ не выявлены, а 5382insC (BRCA1) типирована только в 1,8% случаев. Более значимые результаты получены для SNP промоторных регионов генов цитокинов. При ЗНО органов женской репродуктивной системы статистически значимо повышены частоты SNP четырех генов цитокинов: G197 аллель IL-17A ($p=0,04$), 7488G аллельный вариант IL-17F ($p=0,01$), 589T SNP IL-4 ($p=0,0009$), A1188 полиморфизм IL-12B ($p=0,05$). Этнические различия установлены по полиморфизмам гена IL-10: у русских женщин чаще выявляется 819T ($p=0,04$), а у адыгов - 592A аллель ($p=0,02$). С прогностически неблагоприятным гистотипом низкодифференцированной аденокарциномы ассоциированы SNP генов двух медиаторов: G1082 аллель IL-10 ($p=0,02$), G197 полиморфизм IL-17A ($p=0,031$). При метастазировании в регионарные лимфатические узлы достоверно повышены частоты SNP генов IL-2 (T330 аллель, $p=0,03$), IL-4 (589T, $p=0,03$) и IL-10 (819T, $p=0,05$), IL-12B (A1188, $p=0,04$).

Заключение. Полиморфизмы генов цитокинов IL-17A, 17F, IL-12, IL-4, IL-10, IL-2 по сравнению с мутациями генов BRCA1/2 ассоциированы со ЗНО органов женской репродуктивной системы и могут быть использованы в качестве информативных маркеров онкопатологии у жителей Республики Адыгея. Прогностически неблагоприятными факторами риска развития ЗНО женских репродуктивных органов является носительство G197 аллели гена IL-17A, 589T SNP гена IL-4 в гетерозиготном (C589T) и гомозиготном (T589T) состоянии. Опухолевая прогрессия у больных с РМЖ сопряжена с полиморфными вариантами генов трех исследованных цитокинов: T330 аллели IL-2, 819T полиморфизма IL-10, A1188 аллели IL-12B.

ТЕСТ СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ В МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШИ IN VITRO

Антипова Н.В., Аронов Д.А., Семушина С.Г., Моисеева Е.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Введение. Для селекции эффективных лекарственных препаратов, применяемых в терапии рака молочной железы (РМЖ), стандартно применяется двухступенчатая процедура: (1) тестирование цитотоксического эффекта препарата in vitro при краткосрочном (до 72 часов) культивировании стандартных опухолевых клеточных линий

с последующим определением жизнеспособности клеток и доли апоптоза/митоза; (2) выявление степени торможения роста опухоли in vivo на стандартных мышинных моделях РМЖ (преимущественно, SPF - specific pathogen free). В рамках ранее выдвинутой новой индивидуализированной 3С-парадигмы проведения биомедицинского исследования (Е. Моисеева, 2005) мы предположили, что общепринятая процедура испытания противоопухолевого препарата in vitro, недостаточна для тестирования эффективности иммуномодуляторов (ИМ). ИМ a priori не должны проявлять цитотоксический эффект in vitro, а возможность отдаленной стимуляции роста культуры в динамике при проведении стандартных тестов не оценивается. Ранее в различных мышинных моделях перевиваемого и спонтанного РМЖ in vivo мы неоднократно демонстрировали, что даже единственная инъекция ИМ (включая пролейкин, ронколейкин, иммунофан и др.) приводит не только к замедлению, но и к стимуляции роста опухоли в «успешных» и «неуспешных» пролеченных подгруппах мышей-опухоленосителей, соответственно.

Цель данного исследования: 1) протестировать в динамике активность Иммунофана® (ИмФ, «Бионокс») in vitro на индивидуальных краткосрочных культурах РМЖ и лимфоцитах из регионарных лимфоузлов мышей-опухоленосителей различных инбредных линий нашей коллекции; 2) сравнить полученные эффекты с воздействием ИмФ на рост стандартной клеточной линии РМЖ человека; 3) провести патоморфологический анализ (ПМА) для сравнения морфологии исходных опухолей молочной железы мыши и опухолей, полученных путем введения первичных адгезионных и суспензионных краткосрочных культур сингенным мышам in vivo.

Материалы и методы. У мышей-опухоленосителей линий BALB/cJMoise (далее BALB/c), CBRB-Rb(8.17)1em и BLRB-Rb(8.17)1em были стерильно взяты образцы опухоли и регионарных лимфатических узлов (ЛУ). Полученные суспензии культивировали на 24-луночных планшетах с одновременным добавлением в лунки ИмФ в широком диапазоне доз (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000), в контрольные лунки препарат не добавляли. Использовали дуплеты для каждой дозы, эксперимент повторяли дважды. Эффект оценивали в динамике на 1, 4, 7, 14 сутки культивирования путем визуального учета количества клеток в лунках (не менее 30 полей зрения на лунку, три исследователя независимо) под инвертированным фазово-контрастным микроскопом Nikon Diaphot 300 и рассчитывали среднее количество клеток на поле зрения. Клеточную линию HBL культивировали аналогичным образом с указанными дозировками ИмФ, эффект препарата оценивали аналогичным образом визуально на первые сутки после посева клеточной линии до образования конфлюэнтного слоя. Жизнеспособность лимфоцитов оценивали при окраске аликвот краткосрочной культуры трипановым синим. Для определения морфологии культивируемых клеток РМЖ мыши адгезионные культуры на пластиковой подложке окрашивали по Романовскому. Образцы суспензионной и адгезионной составляющих первичных культур РМЖ в указанные сроки сингенно перевивали самцам мышей вышеперечисленных линий. Самцы с развитыми опухолями были подвергнуты эвтаназии, образцы опухоли были взяты для проведения ПМА.

Результаты. В краткосрочных культурах лимфоцитов, полученных из ЛУ мыши-опухоленосителя линии BALB/c, среднее количество клеток на поле зрения на 7

день было больше в лунках с добавлением ИмФ в дозировках 1:10, 1:100, 1:1000 по сравнению с контрольными на 211% ($p < 0.01$), 100% ($p < 0.05$), 77% ($p < 0.05$), соответственно; лимфоциты в лунках с ИмФ сохраняли жизнеспособность дольше. Среднее количество клеток опухоли на поле зрения было на 15% и 53% больше в лунках с добавлением ИмФ по сравнению с контрольными (ИмФ 1:1000, 7-ой день, $p < 0.05$ и 14-ый день, $p < 0.01$, соответственно). Кроме опухолевых клеток в адгезионной составляющей культур были выявлены клетки опухолевого микроокружения, морфологически сходные с одно- и многоядерными макрофагами-гистиоцитами и фибробластами, изредка встречались дендритные клетки. Аналогичные результаты были получены для первичных культур клеток опухоли и лимфоцитов мышей всех трех линий. В стандартной клеточной линии HBL не наблюдалось различий в количестве клеток в обработанных ИмФ и контрольных лунках в течение первых суток после посева. В краткосрочных культурах РМЖ мыши были обнаружены спонтанно возникающие суспензионные колонии клеток (сфероиды), которые при посеве вновь образовывали и адгезионную, и суспензионную культуры. Сингенная перевивка самцам мыши образцов как суспензионной (сфероиды), так и адгезионной составляющих культур приводила к формированию опухолей *in vivo* во всех случаях. Проведение ПМА выявило сходство морфологии таких опухолей с исходными РМЖ, которые были использованы для культивирования *in vitro*.

Заключение. ИмФ *in vitro* повысил жизнеспособность первичных культур лимфоцитов, а также привел к стимуляции роста индивидуальных культур РМЖ мышей-опухоленосителей трех инбредных линий при отсутствии эффекта на стандартной клеточной линии РМЖ. Обнаруженный эффект был обусловлен влиянием микроокружения, выяснению механизмов взаимодействия клеток опухоли и микроокружения в культуре будут посвящены наши следующие исследования. Мы полагаем, что целесообразность применения индивидуальных краткосрочных клеточных линий в доклинической оценке противоопухолевой эффективности ИМ очевидна. Более того, стимуляция роста индивидуальных культур РМЖ *in vitro* и опухоли мыши *in vivo* под влиянием ИМ, по-видимому, является предостережением от бесконтрольного применения ИМ с целью повышения иммунного статуса и/или улучшения качества жизни пациентов в клинике РМЖ.

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ IL-6, TNF И LT α В МОДЕЛИ СПОНТАННОЙ В-КЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ

Атретханы К.-С.Н.^{1,2}, Носенко М.А.^{1,2}, Зварцев Р.В.¹, Хозер Д.³, Вильямский Г.³, Бланкенштайн Т.³, Недоспасов С.А.^{1,2}, Друзцкая М.С.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Центр молекулярной медицины имени Макса Дельбрюка (MDC), Берлин, Германия

Хроническое воспаление может играть важную роль в процессах канцерогенеза. IL-6 является одним из глав-

ных цитокинов, медиаторов воспаления, экспрессия которого повышается во время инфекций, повреждения ткани, аутоиммунных патологий и развития опухолей. TNF - многофункциональный цитокин, главные физиологические функции которого связаны с защитой организма от инфекций, контроле воспаления и иммунорегуляцией. LT α - родственный TNF цитокин, ответственный за формирование вторичных лимфоидных органов и поддержание микроокружения лимфоидных ниш. Однако недавно была показана его проонкогенная роль в нескольких экспериментальных моделях канцерогенеза (рак простаты, гепатоклеточная карцинома) при передаче сигнала через LT β R. Основная цель настоящей работы - изучить экспрессию генов провоспалительных цитокинов IL-6, TNF и LT α опухолевыми клетками в модели В-клеточной лимфомы.

В качестве экспериментальной модели были выбраны генетически модифицированные мыши, у которых происходила активация онкогена Tag вируса SV40 в В-клетках (за счет вырезания ингибирующей транскрипцию Tag последовательности при активации Cre-рекомбиназы), что приводило к спонтанному возникновению В-клеточных лимфом у этих животных в возрасте 5-8 месяцев. Клетки первичной лимфомы от таких мышей пересаживали RAG-дефицитным мышам, которые развивали вторичные лимфомы в течение двух-трех недель. В полученных образцах лимфом экспрессию генов *il-6*, *tnf* и *lta* оценивали методом количественного ПЦР в реальном времени. При этом анализировали как исходный образец спленоцитов, так и обогащенную опухолевыми клетками фракцию В-лимфоцитов, полученную методом магнитной сепарации.

В ходе работы было проанализировано 18 образцов В-клеточных лимфом и показано, что уровень экспрессии *tnf* и *lta* в них более чем на порядок снижен по сравнению с контрольными образцами. В качестве контролей были выбраны активированные или неактивированные спленоциты и В-клетки из наивных мышей дикого типа. В контрольных образцах активированные ФМА (4-форбол-12-миристан-13-ацетат) клетки имели повышенный уровень экспрессии генов *tnf*, *lta*, *il-6*. Полученные данные показывают, что в клетках лимфомы происходит значительное снижение уровня экспрессии цитокинов TNF и LT α , при этом опухолевые образцы имеют дифференциальный профиль экспрессии IL-6. В некоторых образцах лимфом происходит повышение уровня экспрессии IL-6, тогда как другие образцы имеют неактивированный статус, и экспрессия IL-6 в этих образцах соответствует экспрессии в В-клетках и спленоцитах здоровых мышей. При этом известно, что IL-6 необходим для развития и пролиферации В-клеток. Кроме того, для него была показана проонкогенная роль в развитии различных видов лимфом как в мышинных моделях, так и в клинике, а также были начаты клинические испытания с применением блокаторов к IL-6 у людей с В-клеточной и неходжкинской лимфомами. Снижение уровня экспрессии TNF и LT α в опухолевых образцах свидетельствуют о том, что, несмотря на их значимую роль в формировании воспалительного микроокружения при развитии солидных опухолей, по-видимому, роль этих цитокинов в развитии опухолей гематологического происхождения незначительна.

Работа осуществлена при поддержке гранта Российского научного фонда 14-25-00160.

ВЛИЯНИЕ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА НЬЮКАСЛА НА ТЕЧЕНИЕ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА У МЫШЕЙ

Белгородцев С.Н.¹, Юрченко К.С.², Кащенко Э.А.¹

¹ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

² Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины, Новосибирск, Россия

Онколитические свойства некоторых вирусов, в том числе вируса птичьего гриппа Ньюкасла, изучаются более 50 лет. При этом рассматриваются два основных возможных механизма действия – непосредственное литическое влияние на опухолевые клетки, а также системное, опосредованное иммунной системой. Однако единого мнения о преимущественном механизме, благодаря которому вирус способен подавлять опухолевый процесс, нет. Это, а также нестабильность получаемых результатов, сдерживает практическое использование и научные изыскания для усиления онколитических свойств.

С целью предварительной оценки влияния внутривенного и интратуморального путей введения вируса Ньюкасла на течение опухолевого процесса у мышей мы провели экспериментальное исследование. Использованы мыши С57Bl/6 и опухоль LLC. Опухолевые клетки культивированы *in vitro* и вводились мышам подкожно по средней линии живота из расчета 200 тыс. клеток на мыш. Начиная с 10-х суток, когда опухолевый узел определялся визуально и пальпаторно, начиналось введение вируса Ньюкасла штаммов NDV/Altai/770/2011, МТН68/Н в количестве 0,1 мл ВСЖ. Мыши разделены на группы в зависимости от штамма вируса и пути введения: 1 – контроль, 2 – вирус NDV/Altai/770/2011 внутривенно, 3 – вирус NDV/Altai/770/2011 интратуморально, 4 – вирус МТН68/Н внутривенно, 5 – вирус МТН68/Н интратуморально. Кратность введения в каждой группе – 7 инъекций ежедневно. Результаты оценивались по выживаемости мышей-опухоленосителей.

В контрольной группе 100% животных умерло от опухолевого процесса, средняя продолжительность жизни после привития опухоли составила 39,2 дня. В группе с использованием внутривенного введения вируса NDV/Altai/770/2011 у 2-х животных (20%) наблюдалась регрессия опухоли и выздоровление. Средняя продолжительность жизни в этой группе была 37,2 дня. При интратуморальном введении вируса NDV/Altai/770/2011, регрессия опухоли и выздоровление было также у 2-х животных (20%), средняя продолжительность жизни оставшихся животных 37,2 дня. В группе с внутривенным введением вируса МТН68/Н отмечены лучшие результаты: регрессия опухоли и выздоровление у 4 мышей (40%), продолжительность жизни 41,3 дня, что достоверно выше, чем в контрольной группе. При использовании интратуморального пути введения вируса МТН68/Н, регрессия опухоли и выздоровление отмечено у 2-х животных (20%), средняя продолжительность жизни 38,75 дней.

Таким образом, регрессия опухолевого очага у части мышей во всех опытных группах свидетельствует о его онколитическом действии опухоль LLC вне зависимости от пути введения. Наилучший результат, как по количеству выживших животных, так и по продолжительности жизни отмечен в группе с использованием внутривенного введения вируса МТН68/Н, что говорит о преимущественно системном иммуноопосредованном онколитическом эффекте.

АНАЛИЗ НКТ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ДИСSEМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ ПРИ БИОТЕРАПИИ

Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Короткова О.В., Табаков Д.В., Михайлова И.Н., Кадагидзе З.Г.

ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия

Введение. НК клетки или естественные киллеры, впервые были описаны как ни Т- ни В-лимфоциты или нулевые клетки. Их определение и сегодня основано на принципе отрицания, так как не существует одного антигена, на основании экспрессии которого можно было бы причислить лимфоциты к популяции НК клеток. Стандартом является использование коктейля антител к CD16 и CD56 антигенам с обязательным негативным контролем экспрессии CD3 – маркера Т клеток. Такая сложность определения обусловлена тем, что ни CD56 ни CD16 маркеры не являются специфичными для НК клеток и могут быть так же представлены на Т лимфоцитах, нейтрофилах, моноцитах и др. Таким образом, НК клетки отличаются не только гетерогенностью самой популяции, но и наличием пограничных субпопуляций с одновременной экспрессией как Т клеточных, так и НК клеточных антигенов – НКТ лимфоцитов. Целью данной работы было оценить популяцию НКТ лимфоцитов у онкологических больных и здоровых доноров.

Материалы и методы: Исследован фенотип лимфоцитов периферической крови методом многоцветной проточной цитометрии у 30-ти онкологических больных диссеминированной меланомой кожи без клинических признаков заболевания (после хирургического удаления опухоли) до начала лечения и 30-ти здоровых доноров. Всем больным проводилась биотерапия аутологичными дендритными клетками, нагруженными опухолевым лизатом. Анализ клинико-иммунологических показателей больных проводился с 2004 по 2014 год.

Результаты: Тест-система – CD3FITC/CD16&CD56PE позволяет определять НК клетки, Т лимфоциты и субпопуляцию с одновременной экспрессией всех антигенов – НКТ клетки. В периферической крови здоровых доноров популяция НК клеток (CD3-CD16&CD56+) составляет 17,3±8,2%, а субпопуляция НКТ лимфоцитов (CD3+CD16&CD56+) – 7,9±3,5%. При анализе коэкспрессии CD16 и CD56 антигенов на поверхности CD3+Т клеток выявлено, что количество CD3+CD56+ клеток было аналогично популяции CD3+CD16&CD56+ лимфоцитов (8,1±3,6%), тогда как популяция CD3+CD16+ клеток составляет всего 2,3±2,0%.

В группе онкологических больных в 33% случаев популяция НКТ лимфоцитов в 2 раза превышала показатели доноров. При этом обе субпопуляции и CD3+CD56+ и CD3+CD16+ клетки превышали нормальные показатели, составляя 16,3±4,4% и 15,5±3,4% соответственно. У всех больных этой группы, на фоне проводимой биотерапии отмечалось прогрессирование основного заболевания. У 33% больных, несмотря то, что до начала лечения популяция НКТ лимфоцитов не превышала донорских показателей, проводимая терапия была не эффективна. Субпопуляция CD3+CD56+ клеток так же соответствовала норме (6,3±3,4%), а количество CD3+CD16+ лимфоцитов – превышало донорские показатели, составляя 5,6±3,2%. И только 33% пациентов с исходно нормальными показателями оставались в ремиссии на протяжении 10 лет.

Выводы: выявлена корреляция между повышенным содержанием в периферической крови больных диссеминированной меланомой кожи НКТ клеток с фенотипом CD3+CD16+ и прогрессированием основного заболевания.

СВЯЗЬ УРОВНЯ ИЛ-6 И ИЛ-10 С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ТРАНСФУЗИЙ ТРОМБОЦИТНОГО КОНЦЕНТРАТА У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

Глазанова Т.В., Павлова И.Е., Даваасамбуу Д., Грицаев С.В., Абдулкадыров С.В., Бубнова Л.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Трансфузии тромбоцитного концентрата (ТК) являются неотъемлемой частью терапии больных онкогематологическими заболеваниями, однако известно, что в ряде случаев они не всегда сопровождаются ожидаемым приростом уровня тромбоцитов. Одним из факторов, определяющих рефрактерность к ТК, является избыточная выработка организмом реципиента провоспалительных цитокинов, в частности, ФНО α . Роль других цитокинов в этом процессе изучена недостаточно.

Цель. Исследовать влияние ИЛ-6 и ИЛ-10 на эффективность трансфузий тромбоцитов у больных гемобластозами.

Материалы и методы. Обследовано 50 больных острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) в возрасте 27-76 лет и 44 больных множественной миеломой (ММ) в возрасте 32-63 лет. Все больные получали высокодозную химиотерапию (ВДХТ). Эффективность трансфузий ТК оценивали по скорректированному приросту тромбоцитов через 24 часа после окончания переливания ТК. Трансфузия считалась эффективной в том случае, если показатель прироста был более 4,5х10⁹/л. Уровень ИЛ-6 и ИЛ-10 в сыворотке крови определяли стандартным методом ИФА с использованием тест-систем «Цитокин» (Санкт-Петербург) в следующие периоды: до начала ВДХТ, после завершения ее курса, в период постцитостатической аплазии костного мозга (КМ) и в период восстановления гемопоэза.

Результаты. В группе больных ОМЛ эффективность $\geq 50\%$ трансфузий ТК отмечена у 30 больных, у остальных 20 больных эффективными были $< 50\%$ трансфузий. Сравнение показателей больных ОМЛ с разной эффективностью трансфузий ТК показало значимое различие в уровне ИЛ-6 еще до начала ВДХТ. В группе больных, у которых основная часть переливаний была неэффективной, уровень ИЛ-6 был выше значений больных с эффективностью $\geq 50\%$ трансфузий: 48,8 \pm 37,1 против 20,1 \pm 12,5 пг/мл; $p=0,036$. Возможно, данный феномен отчасти отражает активность лейкозного процесса: так, если в первой группе преобладали больные с избыточным содержанием бластных клеток в КМ (12 из 20; 60,0%), то в группе с эффективностью $\geq 50\%$ трансфузий активная стадия имела место только у 8 из 30 больных (26,7%); $p=0,045$. Значимое различие между группами сохраняется и непосредственно после окончания курса ВДХТ (49,2 \pm 32,8 против 24,2 \pm 22,7 пг/мл, $p=0,039$). Выявлена обратная корреляция между эффективностью трансфузий ТК и уровнем ИЛ-6 в период постцитостатической аплазии КМ: $r=-0,397$; $p<0,05$, отражающая большую частоту случаев с высоким уровнем ИЛ-6 среди больных с эффективностью $< 50\%$ трансфузий. При анализе ре-

зультатов изучения уровня ИЛ-10 в группах, выделенных по эффективности трансфузий ТК, значимых различий не выявлено. Отсутствие связи между уровнем ИЛ-10 и эффективностью трансфузий ТК подтверждено результатом корреляционного анализа в период постцитостатической аплазии КМ: $r=-0,278$; $p>0,05$.

В группе больных ММ эффективность $\geq 50\%$ и $< 50\%$ трансфузий ТК наблюдалась у 32 и 12 больных, соответственно. При этом уровень ИЛ-6 в этих группах достоверно различался лишь в постцитостатическом периоде: показатели ИЛ-6 у больных с эффективностью $< 50\%$ трансфузий значимо превышали показатели больных с эффективностью $\geq 50\%$ трансфузий: 24,0 \pm 8,8 пг/мл против 14,5 \pm 6,3 пг/мл; $p=0,039$. Обнаружена обратная корреляция между частотой неэффективных трансфузий ТК и уровнем ИЛ-6 в период постцитостатической аплазии КМ: $r=-0,576$; $p<0,05$. При анализе уровня ИЛ-10 также установлено динамическое изменение, но, в отличие от показателей ИЛ-6, в период аплазии КМ имели место минимальные значения: 5,3 \pm 2,7 против 10,2 \pm 4,3 пг/мл до начала ХТ. При сравнении показателей двух групп больных, выделенных по частоте эффективных переливаний ТК, значимого различия в уровне ИЛ-10 в разные периоды лечения не обнаружено.

Вывод. Снижение эффективности трансфузий тромбоцитного концентрата у больных ОМЛ и ММ на фоне высокодозной химиотерапии ассоциировано с повышенным уровнем ИЛ-6 в сыворотке крови и не имеет связи с уровнем ИЛ-10. Полученные результаты позволяют предположить преимущественный вклад ИЛ-6 в формирование резистентности к трансфузиям тромбоцитов у этой категории больных.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ ДНК И ГЕНОВ СИСТЕМЫ КОНТРОЛЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА У ПАЦИЕНТОВ С В-КЛЕТОЧНЫМ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Давыдова Н.В., Гумилевский Б.Ю., Капланов К.Д.

ГУЗ «Консультативно-диагностическая поликлиника №2», ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», ГБУЗ НИИГТП ФМБА РФ, Волгоград, Россия

Введение: В-клеточный хронический лимфолейкоз - наиболее часто встречающееся в европейской популяции лимфопролиферативное заболевание. При этом наблюдаются значительные различия в течении и клинических проявлениях заболевания, прогнозе при одинаковом диагнозе у разных людей. В данной работе обсуждаются результаты изучения ассоциации полиморфизмов генов репарации ДНК и генов контрольной точки клеточного цикла с прогнозом и тяжестью течения заболевания у больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом (В-ХЛЛ).

Цель и задачи: Определение аллельных вариантов генов системы репарации ДНК: XpD (мут 1 lys751gln), XRCC1 (мут 1 arg194Trp), XRCC1 (мут 2 arg 280his), XpC (lys939gln), XpG (мут 1 asp1104his) и генов системы контроля клеточного цикла CHEK2 (мут 1 1100 delC), CHEK2 (мут 2 IVS+1G>A) в группе больных В-зрелоклеточными опухолями жителей Волгограда и области.

Материалы и методы: В выборку включено 28 пациентов в возрасте от 46 до 83 лет, 13 женщин и 15 мужчин с впервые выявленной патологией. Критериями для отбора пациентов служили абсолютный лимфоцитоз

свыше 5000 клеток на мкл и подтвержденный диагноз В-зрелоклеточной опухоли. Пациентам проводилось иммунофенотипирование методом 4-х цветной проточной цитофлуориметрии, затем полиморфные варианты генов определялись методом ПЦР с аллель-специфичными праймерами с электрофоретической детекцией.

Основные результаты: Гены группы ХР участвуют в эксцизионной репарации ДНК путем удаления нуклеотидов (NER - nucleotide excision repair). Гены ХРА-ХРГ кодируют хеликазы, участвующие в NER. Наиболее часто встречались аллельные варианты гетерозигот в генах группы ХР системы репарации ДНК: ХрD (мут 1 lys751gln) rs13181 встречается в 48,15% (Chi-Square=5.21 df=1 p<0.05), ХрC (gln939lys) rs2228001 встречается в 59,25% (Chi-Square=4.69 df=1 p<0.05), ХрG (мут 1 asp1104his) rs17655 встречается в 28% (Chi-Square=0.02 df=1 p=0.52)

XRCC1 - белок является важным регулятором системы эксцизионной репарации ДНК возникших в результате ионизирующей радиации и воздействия алкилирующих агентов. Полиморфизмы гена XRCC1 (мут 1 arg194Trp) rs1799782 мутантный аллель встречается в 1,85% (Chi-Square=0.52, df=1, p=0,81), XRCC1 (мут 2 arg280his) rs25489 мутантный аллель встречается в 7,4% (Chi-Square=0.12, df=1, p=0,97), что достоверно не отличается от таковых, наблюдаемых в европейской популяции.

В нашем исследовании не было обнаружено мутантных аллелей гена Киназы Контрольной Точки Клеточного Цикла СНЕК2 у больных В-ХЛЛ (0%). В контрольной группе полиморфизм СНЕК2 (мут 2 IVS+1G>A) встречался в 0,4% случаев. Частота аллеля СНЕК2 1100delC составляет 1.1–1.4% среди групп здорового контроля в европейской популяции.

Заключение: В результате проведенных исследований нами доказана взаимосвязь заболевания В-ХЛЛ с наличием мутантного аллеля в генах группы ХР системы репарации ДНК: ХрD (мут 1 lys751gln) rs13181, ХрC (gln939lys) rs2228001, ХрG (мут 1 asp1104his) rs17655. В дальнейшей работе с увеличением выборки планируется сравнивать группы больных В-ХЛЛ по наличию данных полиморфизмов, отличающиеся по клиническому течению, особенностям иммунофенотипа и прогрессированию.

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

Данилова Е.Ю., Шабашова Н.В., Фролова Е.В.,
Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В.

ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Системные дефекты иммунитета у онкогематологических больных изначально обусловлены нарушением пропорциональности функции костного мозга, а в дальнейшем - вынужденными лечебными мероприятиями. По данным зарубежной и отечественной научной литературы у больных гемобластомами возрастает частота микотических осложнений, не смотря на современную этиотропную терапию и меры профилактики. Одним из осложнений, развивающихся на этом фоне, является орофарингеальный кандидоз (ОФК), хотя далеко не у всех больных. Так, нами установлено ранее, что кандидоз ротовой полости у онкогематологических больных развивается в 9,5 % случаев. По-видимому, такая частота этого осложнения может зависеть от особенностей локального иммунитета слизистой оболочки полости рта, а также от применяемой полихимиотерапии. Известно участие многих растворимых факторов в организации местной

защиты у здоровых людей, у ВИЧ-инфицированных, но практически не освещены эти механизмы у больных гемобластомами. Определение особенностей состояния локального иммунитета при гемобластозах может стать основой новых подходов к профилактике и лечению микотических осложнений у больных с иммунодефицитами разного происхождения.

Цель исследования – определить уровни цитокинов в ротовой жидкости у больных гемобластомами.

Материалы и методы. Материалом для исследования служила ротовая жидкость (РЖ) 16 здоровых людей с санированной ротовой полостью (контроль), 53 больных гемобластомами без осложнения и 20 – с осложнением в виде ОФК. В РЖ определяли уровни IFN γ , IL17, IL10, IL8, IL6, TNF α , G-CSF, MCP-1 в ИФА (реактивы «Цитокин», «Вектор-Бест», Россия). Результаты обрабатывали статистически (программная система STATISTICA for Windows, версия 6.0). Различия считали достоверными при уровне значимости p<0,05.

При первичном поступлении онкогематологических больных выявлено достоверное увеличение в РЖ концентрации IL6, участника раннего защитного инициативного противогрибкового воспаления, IL8, известного цитокина хронического воспаления, ответственного за привлечение нейтрофилов в участки инфекции, и MCP-1, обуславливающего хемотаксисную реакцию клеток моноцитарно-макрофагального ряда, по сравнению со здоровыми (p<0,05). При этом существенно не изменились уровни IL17, ключевого цитокина раннего инициативного противогрибкового воспаления, которое могло бы препятствовать инвазивному действию микроскопических организмов на слизистую оболочку ротовой полости. Вне зависимости от наличия или отсутствия орофарингеального кандидоза у больных гемобластомами установлена тенденция к снижению уровней спонтанно синтезируемых IFN γ и IL10, основных факторов для развития адекватной реакции как врожденного, так и адаптивного иммунитета против грибов. После применения полихимиотерапии в РЖ уменьшалось содержание IL6, TNF α , G-CSF, но возрастали уровни IL8 и IL10, что не зависело от наличия или отсутствия ОФК. Однако, нами установлено, что у больных с осложнением увеличение уровня MCP-1 было выражено слабее по сравнению с пациентами, у которых гемобластоз не сопровождался микотической инфекцией (123 \pm 21 vs 177 \pm 26 пг/мл, p<0,05).

Заключение. У больных гемобластомами выявлены изменения синтеза цитокинов, характерных для ослабления раннего инициативного воспаления и нарастания признаков хронического воспаления, на фоне ингибированного в результате основного заболевания и/или лечения Т-зависимого ответа, что может способствовать развитию орофарингеального кандидоза.

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

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

ФГБУН Институт биологии КарНЦ РАН,
Петрозаводск, Россия

Регуляторные Т-клетки (Tregs) играют существенную роль в формировании состояния иммунной супрессии при канцерогенезе и представляют перспективную мишень для противоопухолевой иммунотерапии. Микроокружение опухоли может способствовать активации

и экспансии Tregs, что, вероятно, оказывает влияние на их фенотипическую характеристику. В работе оценивались изменения в экспрессии некоторых молекул, важных для функционирования Tregs, такие как транскрипционный фактор FOXP3, регулирующий супрессорные свойства Tregs, а также CTLA-4, CD39, CCR4, ICOS. **Целью настоящей работы** являлось изучение фенотипических особенностей периферических Tregs у больных колоректальным раком (КРР).

Материалы и методы. Обследовано всего 42 образца периферической крови больных колоректальным раком (КРР, I-IV стадии) в возрасте от 37 до 83 лет. Контрольную группу составили 35 образцов крови здоровых доноров в возрасте от 25 до 81 года. Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 («Beckman Coulter», США). Для оценки экспрессии молекул использовали моноклональные антитела CD4-FITC, CD25-PC5, CD127-PC7, CTLA-4-PE, ICOS-PE, CD39-PE, CCR4-PE («Beckman Coulter», Франция), а также FOXP3-PE (eBioscience, США). Для оценки внутриклеточных маркеров выполняли пермеабиллизацию с использованием коммерческих наборов и согласно инструкции производителя. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «Statistica 6.0», достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна-Уитни, для выявления и оценки характера связи между признаками использовали коэффициент корреляции Спирмена. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

Результаты. Оценку изменений экспрессии ассоциированных с Tregs молекул проводили в популяции CD4+CD25+CD127^{lo/-} Т-клеток. В результате анализа экспрессии негативного ко-стимулятора CTLA-4 было показано, что у больных КРР ($n=32$) уровень экспрессии этой молекулы в CD4+CD25+CD127^{lo/-} Т-клетках составил $60,47 \pm 13,8\%$ и был выше ($p < 0,001$) по сравнению с контролем ($n=22$, $43,48 \pm 4,5\%$). Повышенный уровень экспрессии CTLA-4 был отмечен и для CD4+ Т-клеток больных КРР ($15,49 \pm 7,4\%$ и $7,68 \pm 1,8\%$, соответственно, $p < 0,001$). Также обнаружена высокая положительная корреляция экспрессии молекул CTLA-4 и FOXP3 в CD4+ Т-клетках больных КРР ($r=0,72$, $p < 0,001$). Другая важная функциональная молекула Tregs – эктонуклеотидаза CD39, которая совместно с CD73 участвует в генерации иммуносупрессорного внеклеточного аденозина. Уровень экспрессии этой молекулы также анализировали на CD4+ Т-клетках и на Tregs. В результате достоверные различия в экспрессии CD39 были обнаружены для фенотипа CD4+CD25+CD127^{lo/-}. На клетках больных КРР ($n=42$) наблюдали повышенный по сравнению с контролем ($n=35$) уровень этой молекулы ($64,94 \pm 15,7\%$ и $41,9 \pm 13,7\%$, соответственно, $p < 0,001$). При оценке связи экспрессии CD39 и FOXP3 лимфоцитами больных КРР была определена средняя положительная корреляция ($r=0,44$, $p < 0,01$). Tregs экспрессируют широкий спектр хоминговых рецепторов, в том числе и CCR4 – рецептор к лиганду CCL22, который в больших количествах продуцируется опухолевыми клетками и клетками ее микроокружения. Уровень экспрессии CCR4 на CD4+ и CD4+CD25+CD127^{lo/-} Т-клетках был выше у больных КРР ($n=29$), чем в контроле ($n=20$) и составил для CD4+: $47,66 \pm 11,4\%$ против $39,3 \pm 8,8\%$, $p < 0,01$ и для Tregs: $82,09 \pm 9,8\%$ и $64,41 \pm 10,7$, $p < 0,001$, соответственно. Причем уровень экспрессии CCR4 также имел среднюю положительную корреляцию с экспрессией

FOXP3 ($r=0,56$, $p < 0,01$). По результатам иммунофенотипирования по ICOS обнаружили, что у больных КРР уровень экспрессии этой молекулы на поверхности CD4+ и CD4+CD25+CD127^{lo/-} Т-клетках был увеличен по сравнению с контролем и для фенотипа CD4+CD25+CD127^{lo/-} он составил $70,89 \pm 10,3\%$ и $55,66 \pm 12,3\%$, соответственно, $p < 0,001$. Уровень экспрессии FOXP3 положительно коррелировал с уровнем экспрессии ICOS на CD4+ Т-клетках ($r=0,62$, $p < 0,003$).

Заключение. Таким образом, у больных КРР наблюдали значительные изменения в экспрессии некоторых Tregs молекул периферическими лимфоцитами с фенотипом CD4+CD25+CD127^{lo/-}. Выявлена положительная корреляция экспрессии FOXP3 с экспрессией всех исследованных молекул, причем наиболее сильная связь с FOXP3 была обнаружена для CTLA-4. Среди исследованных молекул более специфичной для CD4+CD25+CD127^{lo/-} Tregs больных КРР была экспрессия эктонуклеотидазы CD39.

Работа поддержана грантом РФФИ (№ проекта 13-04-98826) и грантом Президента РФ (№ МК-3680.2015.7).

ИММУНОФЕНОТИП ЛИМФОЦИТОВ ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ (ТИЛ) У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

**Заботина Т.Н., Короткова О.В., Борунова А.А.,
Табаков Д.В., Бокин И.И., Паниченко И.В.,
Савостикова М.В., Самойленко И.В., Циклаури В.Т.,
Хакимова Ш.Г., Кадагидзе З.Г.**

ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия

Цель исследования: провести изучение иммунологической структуры лимфоцитов инфильтрирующих опухоль у онкологических больных.

Материалы и методы: исследованы образцы опухолевой ткани больных раком яичников, меланомы, раком слизистой оболочки полости рта, раком молочной железы, полученные интраоперационно или путем сог-биопсии. С целью получения клеточных суспензий проводили фрагментацию ткани опухолей с использованием Medimachine (BD Biosciences). Все полученные образцы подвергались цитоморфологическому контролю. Структуру субпопуляций клеток оценивали по связыванию с коммерческими моноклональными антителами (Beckman Coulter) различной специфичности методом многопараметровой количественной проточной цитометрии. Накапливали $0,1-2 \times 10^6$ событий для каждого образца, анализировали не менее 500-5000 клеток в CD45+ гейте.

Результаты. Анализ цитограмм SSCvsCD45 образцов опухолевых клеток показал, что содержание лимфоидных клеток (ТИЛ) с фенотипом CD45+ в полученных суспензиях значительно варьировал от 0,4% до 14,4%, среднее значение составило $4,9 \pm 1,3\%$ ($M \pm m$). При сравнении уровня линейных (Т-В-НК) популяций лимфоцитов обнаружено, что в структуре ТИЛ значительно преобладают CD45+CD3+CD19- Т-клетки $91 \pm 1,3\%$, количество НК-клеток с фенотипом CD45+CD3-CD16+CD56+ среди лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, составило $0,7 \pm 0,2\%$, В-лимфоцитов – $2,0 \pm 0,6\%$. Пропорция CD4/CD8 клеток среди CD3 лимфоцитов оказалась практически равной – $1,1 \pm 0,1$, при этом популяция CD8 лимфоцитов на 96,4% была представлена CD45+CD3+CD8+ специфическими ЦТЛ, а уровень неспецифических CD8 эффекторных клеток с фенотипом CD45+CD3-CD8+ составил 3,6%.

Исследование цитотоксического потенциала НК-клеток и Т-клеток, оцениваемого по содержанию внутриклеточного перфорина, показало, что в структуре ТИЛ только 46,8% клеток с фенотипом CD45+CD3-CD16+Perforin+ являются функционально-активными. Среди CD8 клеток-эффекторов только субпопуляция с низкой плотностью антигена содержала внутриклеточный белок Perforin и составила 3,6% положительных клеток.

Уровень регуляторных Т-лимфоцитов CD45+CD4+CD127+low/neg и CD45+CD8+ CD28-CD11b- составил 10,4±2,2% и 68,5±6,9% соответственно.

Особо следует отметить, что субпопуляционная структура лимфоцитов в исследуемых опухолях различных локализаций оказалась аналогичной, что позволило нам проводить анализ всей группы пациентов.

Таким образом, исследование фенотипа инфильтрирующих опухоль лимфоцитов выявило структурные особенности распределения субпопуляций лимфоидных клеток и позволяет заключить, что независимо от нозологической формы заболевания в генерации иммунных реакций на тканевом уровне у больных солидными новообразованиями преобладают регуляторные механизмы иммунологического ответа.

ОСОБЕННОСТИ ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЛОСТИ РТА И ЯЗЫКА С ОТСУТСТВИЕМ И НАЛИЧИЕМ РЕГИОНАРНЫХ МЕТАСТАЗОВ И РЕЦИДИВОВ

Златник Е.Ю., Новикова И.А., Светицкий П.В., Нистратов Г.П., Загора Г.И., Бахтин А.В., Селютин О.Н., Ульянова Е.П., Аединова И.В., Волкова В.Л., Баужадзе М.В.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ России, Ростов-на-Дону, Россия

Биологическое поведение злокачественной опухоли зависит от многих причин, связанных не только с ее особенностями, но и с реализацией локальных и системных иммунных механизмов.

Цель работы: сравнительная оценка факторов клеточного иммунитета в тканевых образцах опухоли и ее перитуморальной зоны (ПЗ) у больных раком языка и полости рта в зависимости от наличия у них регионарных метастазов и рецидивов.

Материалы и методы. 50 больных раком языка и полости рта были разделены на группы. 1-я – без метастазов; 2-я – с регионарными метастазами; 3-я – с рецидивами. В тканевых гомогенатах образцов опухоли и ПЗ (1-3 см

от опухоли) определяли уровни про- и противовоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- α , IFN- γ) в ИФА, вычисляли содержание на 1 г белка. На гистологических срезах оценивали состав основных субпопуляций Т-лимфоцитов и макрофагов иммуногистохимическим методом с антителами к рецепторам CD3, CD4, CD8, CD68.

Результаты представлены в таблице.

Как видно из таблицы, в опухолевой ткани по сравнению с ПЗ отмечено статистически значимо более высокое содержание провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8 у больных 1-й группы; при метастазах наблюдались сходные различия, а при рецидивах разница отмечена только по уровню IL-6, хотя и статистически недостоверная вследствие высокой индивидуальной вариабельности данных. У больных 3-й группы в тканевых образцах ПЗ содержание TNF- α и IL-1 β оказались выше, чем у больных 1-й и 2-й групп. У них же отмечена утрата различий по содержанию IL-1 β , IL-6 и IL-8 между тканью опухоли и ПЗ, выраженные в двух других группах, что говорит о приближении иммунологических характеристик визуально немалигнизированной ткани к опухолевой при рецидивных опухолях и может косвенно свидетельствовать об потере ею свойств, ограничивающих пролиферативный потенциал новообразования. Тканевые уровни интерферонов, IL-2 и IL-10 в опухоли и в ПЗ не имели статистически достоверных различий.

По результатам ИГХ-исследования, лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация опухолей формируется в основном за счет макрофагов и CD8+ Т-лимфоцитов. CD4+ Т-клетки представлены одиночными лимфоцитами, разрозненно расположенными в строме и в зонах сплошного опухолевого роста. Скопление иммунокомпетентных клеток отмечено преимущественно на границе опухоли и ПЗ, их количество у больных 1-й группы преобладает над 2-й и 3-й. У больных 2-й группы инфильтрация опухоли CD68+ макрофагами не превышала 10% против 10-20% в паренхиме и 20-40% на границе опухоли-ПЗ в 1-й группе; в 3-й группе отмечена обильная диффузная инфильтрация макрофагами и в строме и в паренхиме (до 40% клеток инфильтрата). Можно предположить, что основной вклад в формирование высокого тканевого содержания провоспалительных цитокинов вносят опухолевые клетки, т.к. количество макрофагов в опухоли меньше, а уровни монокинов выше, чем в ПЗ.

Заключение. Высокий уровень провоспалительных цитокинов в ткани опухоли полости рта и языка, могущий вносить вклад в прогрессию и диссеминацию опухоли, является вероятным следствием их продукции опухолевыми клетками; уровни этих цитокинов в ткани опу-

ТАБЛИЦА. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В ОБРАЗЦАХ ТКАНЕЙ БОЛЬНЫХ (ПГ/МЛ/Г БЕЛКА) (К ТЕЗИСАМ ЗЛАТНИК Е.Ю. И ДР.)

Цитокины	Группы больных, образцы тканей					
	1-я (n=22)		2-я (n=15)		3-я (n=13)	
	Опухоль	ПЗ	Опухоль	ПЗ	Опухоль	ПЗ
TNF- α	2,32±1,16	1,47±0,24	2,83±0,91	3,1±0,96	2,82±0,78	2,32±0,357**
IL-8	16,3±3,5*	5,5±2,33	26,7±7,2*	7,3±2,78	17,0±7,4	12,7±7,2
IL-6	7,1±3,2*	0,71±0,158	5,95±2,03*	1,23±0,49	13,3±7,3	1,4±0,56
IL-10	2,5±0,33	2,42±0,33	2,92±1,1	3,64±1,69	1,23±0,4	1,84±0,5
IL-1 β	14,4±3,8*	4,7±0,71	19,0±4,2*	6,7±2,1	17,5±8,2	26,5±5,7**

* - отличия от показателей ПЗ (P<0,05); ** - отличия от показателей больных 1-й группы

холи превышают их содержание в ПЗ. Преобладающей Т-лимфоцитарной субпопуляцией в опухоли являются CD3+CD8+ клетки, найденные в наиболее высоком количестве в опухолях больных без метастазов и в минимальном — у больных с регионарными метастазами.

ПОРАЖЕНИЕ КОСТНОГО МОЗГА ГЕРПЕСВИРУСАМИ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Зотова В.В., Селезнева О.С., Бортникова О.Г., Плужникова Г.Э., Раецкая С.А., Асланян К.С., Михайленко В.М.

ГБУ РО «Областная детская больница», Ростов-на-Дону, Россия

В настоящее время большое внимание уделяется изучению патогенетической роли вирусов герпеса в развитии лимфопролиферативных процессов. В литературе представлены противоречивые результаты о возможной связи герпесвирусов (ГВ) и развитии острого лейкоза (ОЛ) у детей. Опубликованы данные о корреляции выявления ГВ и развитии острых лейкозов и лимфом (Hermetet S. a. all., 2003; Morrisette G. a. all., 2010 и др.). Было обследовано 29 детей с первично диагностированным В- ОЛЛ в возрасте от 1 года до 15 лет. Методом проточной цитометрии (с использованием моноклональных антител VD) определяли иммунофенотип ОЛ и исследовали коэкспрессию маркеров CD21 (EBV ресептор (Moore, 1987; Kief et al., 1992) и CD46 (HNВ-6 ресептор (Mori, 2009)). Методом ПЦР в образцах костного мозга, крови и соскоба из ротоглотки определяли ДНК герпесвирусов: ВГЧ-6, ЦМВ, ВПГ, ВЭБ. Методом ИФА определяли антитела к ГВ. Все больные были разделены на 2 группы. В первую группу вошли 32% больных ОЛЛ, у которых ДНК ГВ зарегистрированы в образцах костного мозга. При этом у 75% больных обнаружен геном ВГЧ-6. У 62,5% больных обнаружена ДНК ВЭБ. Сочетанная инфекция (ВГЧ-6+ВЭБ) выявлена у 37,5% больных ОЛЛ (В2 и В3 ОЛЛ с коэкспрессией миелоидных маркеров). ДНК ЦМВ была выявлена у одного больного с внутриутробной ЦМВИ (у этого больного также определяли ДНК ВЭБ и ВГЧ-6). У 75% больных В-ОЛЛ ДНК ГВ обнаружена в образцах крови и у 25% пациентов в соскобах из ротоглотки. Следует отметить, что при изучении в крови уровня антител к ГВ было установлено, что у всех больных помимо антител к ВЭБ определяли высокий уровень антител к ЦМВ (IgG, IgM) и ВПГ, однако поражения костного мозга этими вирусами не обнаружено. У больных второй группы ДНК ГВ определялась преимущественно в соскобе из ротоглотки (35,3%) и у 11% в крови. В костном мозге ДНК ГВ не выявлялась. Антитела к ГВ (ЦМВ, ВПГ, ВЭБ) также определялись в высоком титре у всех больных.

При сравнении клинической картины заболевания у больных 1 и 2 групп было отмечено, что у пациентов с поражением костного мозга ГВ отмечался более высокий процент лиц, находящихся на лечении по программе высокого и промежуточного риска. У этих больных в большем числе случаев развивались осложнения при проведении химиотерапии (панцитопения, сепсис, поражение внутренних органов, рецидив герпетической инфекции и др.).

Проведенное исследование показывает, что у больных ОЛЛ детей в высоком проценте случаев выявляется ВГЧ-6 и ВЭБ. При исследовании экспрессии CD21+, CD46+ (маркеров ВЭБ и ВГЧ-6) не было обнаружено их коэк-

спрессии на бластных клетках. Выявлялась экспрессия исследуемых маркеров на стволовых клетках с фенотипом CD34+ и В-лимфоцитах (CD21+, CD19+). Полученные данные согласуются с исследованиями Andre-Garnier E. et al. (2013), показавших, что HNВ-6 может инфицировать незрелые (CD34+) клетки и лимфоциты (CD3+), но не лимфобласты. Эти исследования подтверждают Faten et all. (2013), отметившие более частое выявление ДНК ГВ у больных лейкемией в период ремиссии по сравнению с дебютом заболевания. Необходимы дальнейшие детальные исследования коэкспрессии маркеров ГВ при различных вариантах ОЛ в зависимости от стадии дифференцировки лимфоидных и миелоидных клеток.

ВЗАИМОСВЯЗЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ С КЛИНИЧЕСКИМ ТЕЧЕНИЕМ И ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ХИМИО- И ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Кадагидзе З.Г., Славина Е.Г., Заботина Т.Н., Черткова А.И., Короткова О.В., Борунова А.А.

ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия

Введение. Иммунная система играет решающую роль в защите организма от опухолевого роста. К настоящему времени накоплен огромный материал, свидетельствующий о том, что различные субпопуляции регуляторных Т-клеток: CD4+, CD8+, а также НКТ-клетки, участвуют в модуляции противоопухолевого иммунитета. Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей количественных изменений иммунологических показателей у больных раком молочной железы (РМЖ) на разных этапах опухолевого роста и в процессе противоопухолевой терапии.

Характеристика пациентов и методы исследования. В исследование были включены больные первично-операбельным (ПО) (n=73) и местно-распространенным, первично-неоперабельным РМЖ с гиперэкспрессией HER-2/neu (HER2+РМЖ) (n=24). Больные с ПО РМЖ получали оперативное лечение, а пациенткам с HER2+РМЖ проводилась неоадъювантная терапия трастузумабом и лапатинибом совместно с химиотерапией (х/т) или без х/т, в дальнейшем пациентки также подвергались хирургическому лечению. Определялась степень лечебного патоморфоза опухоли. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводили методом многопараметрового цитометрического анализа с использованием коммерческих наборов моноклональных антител к поверхностным и внутриклеточным маркерам лимфоцитов. Контролем служили здоровые доноры (n=35) соответствующего возраста и пола.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты показали четкую взаимосвязь между количественными изменениями некоторых клеточных популяций в периферической крови пациенток с ПО РМЖ и стадией заболевания. Сравнение процентного содержания CD8+CD28- Т-клеток до и после операции показало, что количество этих клеток было повышено у 78% обследованных больных по сравнению с донорами. До операции у пациенток с I и II стадиями заболевания отмечалось статистически значимое повышение количества этих клеток в составе CD45+CD8+ лимфоцитов по сравнению с донорами (83,2±1,3%; 75,3±1,7% и 56,4±2,3%, соответственно). У пациенток с III стадией их количество не от-

личалось от контроля. Подобное соотношение наблюдалось и после оперативного лечения. Характер зависимости количества CD45+CD3+CD16+CD56+ NKT-клеток от стадии заболевания был таким же, как для CD8+CD28-Т-лимфоцитов. У пациенток с I и II стадиями заболевания до операции отмечалось статистически значимое повышение количество этих клеток по сравнению с донорами и больными с III стадией ($17,7 \pm 1,3\%$; $14,5 \pm 1,2\%$ и $8,7 \pm 0,8\%$, соответственно). У пациенток с III стадией их количество, практически не отличалось от нормального уровня ($9,5 \pm 1,6\%$ и $8,7 \pm 0,8\%$, соответственно). Подобное соотношение наблюдалось и после оперативного лечения. Подобная динамика количественных изменений была характерна и для основных популяций клеток-эффекторов противоопухолевого иммунитета: повышенное по сравнению с контролем количество NK-клеток и CD8+ цитотоксических Т-клеток и их цитотоксического потенциала отмечалось только на ранних стадиях заболевания, а у пациенток с III стадией было в пределах нормы. У больных HER2+PMЖ изучалась взаимосвязь количества регуляторных CD4+CD25+FOXP3+ Т-клеток (Трег) и соотношения CD8+CD28+/CD8+CD28- Т-клеток со степенью лечебного патоморфоза. У пациенток с 3-4 степенью лечебного патоморфоза до лечения среднее количество Трег было в 3,3 раза выше, чем у пациенток с 0-2 степенью и в 2,96 выше, чем в контроле. У эффективно леченных больных HER2+PMЖ, после 2-4 курсов химио-и/или таргетной терапии отмечалось значительно более выраженное снижение количества Трег по сравнению с пациентками с низкой степенью патоморфоза. При различных патологических состояниях большое значение имеет баланс между CD8+CD28+ и CD8+CD28- Т-клетками. У больных HER2+PMЖ с высокой степенью лечебного патоморфоза опухоли мы обнаружили до лечения уменьшение величины соотношения CD8+CD28+/CD8+CD28-Т-клеток (за счет уменьшения количества лимфоцитов, экспрессирующих CD28) по сравнению с группой с низким патоморфозом и контролем.

Заключение. Обнаруженное повышение CD8+CD28-Т- и NKT-клеток на ранних стадиях ПО PMЖ и повышенное количество CD4+CD25+FOXP3+ Трег до лечения у эффективно леченных больных HER2+ PMЖ может в определенных ситуациях указывать на их благоприятное прогностическое значение при PMЖ.

ЛОКАЛЬНЫЙ СИНТЕЗ ЦИТОКИНОВ У ЖЕНЩИН С ЦЕРВИКАЛЬНОЙ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ НЕОПЛАЗИЕЙ НА ФОНЕ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Каландарова А.Н., Атаниязова О.А.,
Мусаходжаева Д.А.

Институт Иммунологии АН РУз, Скрининг Центр,
Нукус, Ташкент, Узбекистан

Известно, что патология шейки матки ассоциирована с формированием иммунологической толерантности к вирусам различной природы. Значимость Th1-ответа в элиминации папилломавирусной инфекции (ПВИ) или отсутствие такого ответа, ассоциировано с персистенцией инфекции или с развитием ВПЧ-связанных неоплазий. **Целью исследования** явилось изучение уровня цитокинов в цервикальной слизи у женщин в зависимости от степени тяжести цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN). Были обследованы 36 женщин репро-

дуктивного возраста с различной степенью CIN. Обследование включало изучение клинико-лабораторных данных: клинические, кольпоскопические, цитологические и иммунологические методы выявления патологии. Иммунологические исследования проводились изучением уровня цитокинов в цервикальной слизи методом ИФА (тест-система ООО «Цитокин», СПб, Россия). Анализ результатов показал, что повышение уровня TNF- среди женщин с CIN I выявлено в 63% случаях, IL-1 β – в 38%, а IL-8 – лишь в 5%, в то время как INF- γ – определялся с высокой частотой (92%) и его концентрация не превышала показатели женщин без ВПЧ ($P > 0,05$). У женщин с CIN II-III степени уровни изученных цитокинов были значительно выше, чем у пациенток без ВПЧ и с CIN I. В цервикальной слизи женщин с CIN II-III достаточно часто определяются IL-8 (22%), а его концентрация была в 3 раза больше ($P < 0,001$), чем в группе без ВПЧ и с CIN I ($P < 0,05$). IL-1 β определялся у 56% женщин с CIN II-III и его концентрация в 2-3 раза превышала аналогичные показатели в сравниваемых группах ($P < 0,05$). Кроме того, уровень IL-8 прямо коррелировал с содержанием INF γ и INF α ($r = 0,56$ и $0,62$, $P < 0,05$), а также с TNF- α ($r = 0,66$, $P < 0,05$), что свидетельствует о локальном длительном воспалительном процессе. В группе женщин без ВПЧ выявлено более благополучное состояние иммунореактивности. Следовательно, у женщин с CIN выявленные изменения, сопровождающиеся выраженным дисбалансом местной продукции ключевых цитокинов, связаны именно с наличием ВПЧ.

Таким образом, во всех группах женщин с CIN выявляли дисбаланс синтеза цитокинов, но характер и степень этого дисбаланса зависели от степени поражения шейки матки. Именно эта неспособность к сбалансированной выработке провоспалительных цитокинов, по-видимому, играет значительную роль в поддержании или прогрессировании CIN и обуславливает особенности состава микроорганизмов, поддерживающих воспалительный процесс.

ПОВЫШЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА В ЛИМФОЦИТАХ ПРИ В-КЛЕТОЧНЫХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Косарева Е.В.¹, Толстолицкая Т.О.¹, Сергеев В.Г.²

¹ Гематологическая лаборатория БУЗ УР «Первая республиканская клиническая больница» МЗ УР, Ижевск, Россия

² ФБГОУ ВПО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия

Первоначально обнаруженный в нейронах белок альфа-синуклеин, экспрессируется в высоких концентрациях в клетках ряда солидных злокачественных новообразований, таких как меланома, аденокарцинома, колоректальный рак, рак молочной железы. Экспериментальные исследования продемонстрировали способность гиперэкспрессированного альфа-синуклеина стимулировать пролиферацию и метастазирование раковых клеток молочной железы. На основании вышеизложенных наблюдений было высказано предположение, что альфа-синуклеин может быть вовлечен в механизм реактивации клеточного цикла, лежащий в основе опухолевого роста.

Остается невыясненным вопрос о том, является ли этот молекулярный механизм универсальным для других видов злокачественных опухолей, в том числе и для

лимфопротеративных заболеваний. Для проверки гипотезы о вовлеченности альфа-синуклеина в патогенез лимфопротеративных заболеваний мы исследовали экспрессию альфа-синуклеина в лимфоцитах периферической крови пациентов с подтвержденным и неподтвержденным онкогематологическим диагнозом (В-хронический лимфолейкоз, лимфома из клеток мантийной зоны, волосато-клеточный лимфолейкоз).

Исследование выполнено на 15 пациентах, проходящих лечение в гематологическом отделении «Первой республиканской клинической больницы МЗ УР». Диагноз верифицировали по результатам лабораторного анализа методами проточной цитофлуориметрии и цитологического анализа. Клеточную взвесь, полученную из периферической крови, метили основной панелью антител в комбинации с антителами к альфа-синуклеину и исследовали методом проточной цитофлуориметрии. Анализ результатов проводился при помощи проточного цитофлуориметра BD FACS CantoII. Результаты обрабатывались в программе и «FDCSDiva Version 6.1.3».

Исследование экспрессии альфа-синуклеина в клеточных взвесах, полученных из периферической крови пациентов с В-клеточным лимфолейкозом и контрольной группы (пациенты той же возрастной группы, не имеющие лимфопротеративных заболеваний) показало, что основную популяцию лимфоцитов с высокой экспрессией альфа-синуклеина в контрольной группе составляют Т-клетки (94%), в то время как количество В-клеток с высокой экспрессией альфа-синуклеина не превышало 1,3%. При В-хроническом лимфолейкозе достоверно увеличилось число Т- и В-лимфоцитов с высокой экспрессией альфа-синуклеина (на $60,8 \pm 5,6\%$; $P < 0,01$ и $78 \pm 7,2\%$; $P < 0,001$, соответственно). В ходе исследования других заболеваний значительного изменения количества лимфоцитов с высокой экспрессией альфа-синуклеина обнаружено не было.

Таким образом, альфа-синуклеин может рассматриваться в качестве нового специфического маркера В-клеточного лимфолейкоза. Вероятно, гиперэкспрессируемый альфа-синуклеин, может быть вовлечен в механизмы реактивации клеточного цикла и пролиферации лимфоцитов, ведущих к манифестации этого лимфопротеративного заболевания.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ И НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК В КРОВИ ПАЦИЕНТОК С ПРЕИНВАЗИВНЫМ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ

Курмышкина О.В., Ковчур П.И., Волкова Т.О.

ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия

Введение. Формирование иммуносупрессорного микроокружения — ключевая характеристика развития онкопатологии. Наиболее ярко она проявляется в случае ВПЧ-индуцированного канцерогенеза, поскольку служит необходимой предпосылкой для персистенции вируса и повышения пролиферации инфицированных клеток. В отношении рака шейки матки известно, что интраэпителиальные неоплазии 1/2 степени с высокой частотой подвергаются регрессии благодаря эффективному распознаванию и элиминированию клетками иммунной системы. В этом процессе участвует как врожденное (НК-клетки), так и адаптивное (Т-хелперы 1 типа, формирующие провоспалительное микроокружение, и цитотоксические Т-клетки) звено иммунитета, а также НКТ клет-

ки. Прогрессирование интраэпителиальных неоплазий приводит к формированию преинвазивного рака шейки матки, который можно рассматривать как результат завершеного иммуноредактирования опухолевого очага, далее происходит переход от преинвазивной формы к инвазивному и метастазирующему раку.

Цель и задачи. Исследовать численность функционально различных субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток в крови пациенток с преинвазивным раком в сравнении с группой здоровых женщин.

Материалы и методы. Образцы крови получены от 35 пациенток ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер». Позитивный ВПЧ-статус подтвержден с помощью ПЦР-диагностики. Первоначальный диагноз (рак in situ) верифицирован методом гистологического анализа. Контрольную группу составили 30 здоровых женщин без ВПЧ-инфекции и патологий шейки матки. Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили методом проточной цитофлуориметрии (MACSQuant, Германия) с использованием флуорофор-меченных моноклональных антител. Анализировали содержание лимфоцитов со следующими фенотипами: CD3+ (Т-лимфоциты), CD3+CD95+/high (Т-эффektorы), CD3+CD4+, CD3+CD4+CD95+/high (Т-хелперы), CD3+CD8+, CD3+CD8+CD95+/high (Т-киллеры), CD4+CD25+, CD4+CD25high, CD4+CD25+CD127dim/neg, CD4+CD25+FoxP3+ (регуляторные CD4 Т-клетки, Tregs), CD8+CD25+, CD8+CD25+CD127dim/neg, CD8+CD25+FoxP3+ (CD8 Tregs), CD3-CD16+, CD3-CD56+, CD3-(CD16+/-)CD56bright, CD3-CD16+CD56+, CD3-CD16low/negCD56+, CD3-CD16+CD56- (субпопуляции ЕК-клеток), CD3+CD56+, CD3+CD16+CD56+ (ЕК Т-лимфоциты). Статистическая достоверность оценивалась согласно критерию Манна-Уитни.

Основные результаты. В группе больных было обнаружено увеличение численности CD4+ Tregs клеток, а именно клеток с фенотипом CD4+CD25high, CD4+CD25+CD127dim/neg и CD4+CD25+FoxP3+. В то же время, доля CD4+FoxP3+ лимфоцитов достоверно не различалась между группами. Также отмечена тенденция к повышению численности CD8+ Tregs (CD8+CD25+CD127dim/negFoxP3+) в группе больных преинвазивным раком. Анализ субпопуляции НК-клеток, осуществляющей цитотоксические реакции, не выявил достоверных различий между испытуемыми группами. Аналогичный результат получен в отношении других функциональных групп НК-клеток: CD3-CD16+/-CD56bright (цитокин-продуцирующие НК со сниженной цитотоксичностью), CD3-CD16dim/-CD56+ (НК с потенциальной противоопухолевой активностью), CD3-CD16+CD56- (НК, ассоциированные с вирусной инфекцией или предшественники НК). В то же время, установлено увеличение численности НКТ-лимфоцитов, что может свидетельствовать как об активации противоопухолевого ответа, так и о его подавлении, в виду функционального полиморфизма данной клеточной популяции. Такое же двойственное значение может иметь зафиксированное нами повышение экспрессии CD95 в суммарной фракции лимфоцитов больных, а также увеличение численности CD3+CD95+/high и CD3+CD4+CD95+/high Т-клеток (CD95/APO-1/Fas представляет ключевой рецептор смерти Т-лимфоцитов). Общая численность CD3+CD4+ Т-хелперов и CD3+CD8+ Т-киллеров была в целом сопоставима между анализируемыми группами.

Заключение. Процессы формирования иммуносупрессорного и опухоль-ассоциированного микроокружения начинаются на ранних этапах развития рака шейки мат-

ки. Наблюдаемое увеличение численности иммунорегуляторных клеток (CD4/8 Tregs, НКТ) и усиление экспрессии апоптоз-ассоциированных Т-клеточных маркеров может отражать смещение равновесия между процессами активации иммунного ответа и процессами его подавления в сторону последних, что составляет суть процесса иммуноредактирования. Работа выполнена при поддержке грантов НК-1404-32098 (РФФИ), 11.G34.31.0052 (Постановление 220), Программой стратегического развития ПетрГУ на 2012-2016 гг.

ЭКСПРЕССИЯ ГАЛЕКТИНОВ ТАНДЕМНОГО ТИПА НА СПОНТАННЫХ ОПУХОЛЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ IN VIVO

Мальчевская М.А., Рапопорт Е.М., Аронов Д.А., Семушина С.Г., Бовин Н.В., Моисеева Е.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Введение: Неоангиогенез при онкотрансформации - одна из причин метастазирования опухоли. Галектины (бета-галактозидсвязывающие белки), экспрессия которых на клетках рака молочной железы (РМЖ) повышена, могут связываться с комплементарными лигандами на эндотелии, что может привести как к инициации, так и к замедлению процесса экстравазации клеток опухоли, таким образом, индуцируя или препятствуя метастазированию, соответственно. Участие галектинов -1 и -3 в этом процессе достаточно хорошо исследовано, тогда как о роли галектинов тандемного типа (-4, -8 и -9) известно мало. Более того, данные по прогностической ценности уровня экспрессии галектинов -4, -8 и -9 при хирургии в клинике РМЖ отрывочны и противоречивы. Ранее мы разработали индивидуализированную 3С-парадигму биомедицинского исследования, в соответствии с которой каждая мышь рассматривается как отдельный пациент, и продемонстрировали адекватность мышинной модели BLRB раку молочной железы человека.

Целью данной работы было: 1) исследовать уровень экспрессии галектинов-4, -8 и -9 на полученных хирургическим путем образцах спонтанного РМЖ самок мышей BLRB, в том числе на эндотелии сосудов; 2) проверить, влиял ли уровень экспрессии галектинов на продолжительность жизни самок-реципиентов после удаления РМЖ.

Методы. Образцы спонтанного РМЖ самок мышей BLRB получали путем хирургической экстирпации опухоли, за мышами наблюдали в течение 20 недель после операции, отмечая появление вторичных опухолей (рецидивов). Срезы опухолевой ткани готовили на криотоме, галектины выявляли с помощью соответствующих антител, а сосуды - с помощью антител к CD31. Результаты оценивали методом конфокальной микроскопии. Параллельно был проведен патоморфологический анализ образцов тканей с помощью стандартной окраски гематоксилин-эозином.

Результаты: Галектины были обнаружены на высокодифференцированных аденокарциномах молочной железы мышей BLRB ранних стадий прогрессии; на участках со значительной васкуляризацией галектин-9 выявлялся на эндотелии сосудов. На кистозных геморрагических участках опухолей, где не было сосудов, экспрессия галектинов -4, -8, -9 не обнаруживалась. В более агрессивных солидных опухолях поздних стадий прогрессии с ми-

нимально выраженной стромой и отсутствием сосудов галектины практически не выявлялись. У двух (из семи исследованных самок) с наиболее долгой продолжительностью жизни (17 и 22 недели после операции) наблюдался высокий уровень галектина-9 (в том числе и на эндотелии сосудов), при этом уровень экспрессии галектинов -4 и -8 был заметно ниже.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что: 1) экспрессия галектинов тандемного типа характерна для ранних стадий прогрессии РМЖ самок мышей BLRB с выраженной васкуляризацией; 2) высокий уровень экспрессии галектина-9 при одновременной низкой экспрессии галектинов -4 и -8 в опухоли коррелирует с продолжительностью жизни самок мышей после удаления РМЖ. Дальнейшие исследования по корреляции экспрессии галектина-9 и прогнозом состояния прооперированных самок позволят сделать окончательный вывод можно ли рассматривать гал-9 как маркер агрессивности опухоли. (Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований - грант № 13-04-00096).

ИЗМЕНЕНИЯ ИММУНОЦИТОВ ПРИ ПРЕДРАКЕ И РАКЕ ЖЕЛУДКА В СРАВНИТЕЛЬНОМ АСПЕКТЕ

Матвеева Л.В.¹, Мосина Л.М.¹, Стенина М.А.²

¹ МГУ им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия

² РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Введение. Изучение иммунопатогенетических особенностей течения предраковых состояний и рака желудка является весьма актуальным в связи с неснижающейся заболеваемостью гастритом, язвенной болезнью желудка, поздней выявляемостью аденоматозных полипов, рака желудка.

Цель: выявить и оценить иммунные изменения при обострении хронического гастрита, язвенной болезни, полипозе, раке желудка.

Задачи: 1) определить количество основных субпопуляций лимфоцитов крови при предраке и раке желудка, 2) сравнить выраженность и направленность выявленных иммунных изменений.

Материалы и методы. Обследованы после получения информированного согласия 42 пациента с хроническим неатрофическим гастритом (1-я группа), 40 больных очагово-атрофическим гастритом (2-я группа), 40 пациентов с распространенным атрофическим гастритом (3-я группа), 42 больных с обострением язвенной болезни желудка (4-я группа), 40 больных полипозом желудка (5-я группа), 40 больных раком желудка (6-я группа), 40 здоровых добровольцев (контроль).

Забор 3 мл крови на обследование проводился в утренние часы натощак из локтевой вены в пробирку с ЭДТА. Иммунофенотип лимфоцитов по CD-антигенам (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD45, CD56) определяли иммунофлюоресцентным методом на проточном цитометре Cytomics FC 500 с применением моноклональных антител производства «Beckman Coulter» (США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel 7.0. Результаты отражали в виде медиан (Me), 25 и 75 процентилей. Сравнение показателей проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Значимыми различия между группами считали при $p \leq 0,05$.

Результаты. Во всех группах обследованных больных отмечалось увеличение относительного и абсолютного количества лимфоцитов крови при сравнении со значе-

ниями здоровых лиц, особенно выраженное во 2-й, 3-й, 5-й, 6-й группах больных.

Относительное количество CD3⁺-лимфоцитов при сравнении с данными клинически здоровых лиц у больных 1-й, 4-й, 5-й групп проявляло тенденцию к увеличению, 2-й, 3-й, 6-й групп — повышалось. Абсолютные значения CD3⁺-клеток значительно превышали данные контрольной группы в 1-й, 2-й, 3-й, 5-й, 6-й группах, статистических различий при язвенном процессе не выявлено.

Относительное и абсолютное количество CD4⁺-лимфоцитов у больных превышало значения здоровых лиц ($p < 0,01-0,05$), а при неатрофическом гастрите — и значения 3-й группы ($p < 0,01$).

У больных хроническим атрофическим гастритом, раком желудка количество CD8⁺-лимфоцитов значительно превышало значения контрольной и 1-й групп, в среднем по 4-й и 5-й группам статистических различий с контрольной группой не выявлено, что обусловлено широким диапазоном значений показателя у больных.

Иммунорегуляторный индекс (CD4⁺/CD8⁺) в 1-й группе больных превышал значения контрольной и 3-й групп, соответствуя индивидуальным изменениям Т-лимфоцитов с хелперной и цитотоксической активностью. У больных с полипозом (особенно с аденоматозными полипами) и раком желудка также отмечалось увеличение показателя относительно значений здоровых лиц.

Численность CD16⁺-клеток в периферической крови обследованных больных превышала значения контрольной группы, возрастала с увеличением стадии атрофии СОЖ, при язвенном, неопролиферативном процессах. Значимых различий между группами больных по количеству естественных киллерных клеток не наблюдалось.

Относительное и абсолютное количество CD19⁺-лимфоцитов во всех группах больных было меньше данных контрольной группы ($p < 0,05-0,01$), что характерно для активного воспалительного процесса. Наименьший показатель определялся при обострении язвенной болезни желудка и очагово-атрофического гастрита.

Заключение. Выявленные значимые изменения лимфоцитов крови при обострении хронического гастрита, язвенной болезни, полипозе, раке желудка относительно значений здоровых лиц и межгрупповые отличия свидетельствуют об участии иммунных клеток в воспалительном, атрофическом, язвенном, неопролиферативном процессах. Значение данных изменений у конкретного пациента следует интерпретировать, проецируя на морфологическое состояние слизистой оболочки и значения цитокинового и иммуноглобулинового профиля.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ АГРЕССИВНЫХ ФОРМАХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Назарова Е.Л., Шардаков В.И., Демьянова В.Т., Зотина Е.Н., Докшина И.А.

ФГБУН Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России, Киров, Россия

Введение: К агрессивным В-клеточным хроническим лимфопролиферативным заболеваниям (ХЛПЗ) относят некоторые разновидности неходжкинских лимфом (НХЛ) и множественную миелому (ММ). Они различа-

ются по морфологическим, иммунофенотипическим, гистологическим и клиническим характеристикам. В настоящее время считается доказанным, что в основе не только межвидовых, но и внутриопухолевых различий лежит их генетическая гетерогенность.

Цель и задачи: проведение анализа частоты распределения генотипов ряда генов иммунного ответа при различных нозологических формах агрессивных ХЛПЗ в качестве дополнительных дифференциально-диагностических критериев.

Материал и методы: Обследовано 44 пациента с агрессивными ХЛПЗ (4 — с мантийноклеточной лимфомой (МКЛ), 10 — с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ) и 30 — с ММ). Геномное тестирование 19 полиморфных участков 14 генов иммунного ответа (интерлейкина (IL)1 β , IL2, IL4, IL6, IL10, IL17A, фактора некроза опухоли (TNF), толл-подобного рецептора (TLR)2, TLR3, TLR6, TLR9, а также CD14 и FCGR2A) проводили методом полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами и электрофоретической детекцией продуктов реакции в агарозном геле. Распределение генотипов по исследуемому полиморфному локусу проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для расчета результатов использовали пакет программ Statistica V.12 и MS Office Excel 2003. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Основные результаты: При оценке распределения частот генотипов генов иммунного ответа найдено, что среди пациентов с ММ, в отличие от больных ДВККЛ, достоверно чаще встречались носители генотипов с мутантным аллелем Т гена CD14 (C-159T) (40% vs. 15%, $\chi^2=4,19$, $p=0,04$, OR=3,78, 95%CI: 1,00-14,31); в отличие от МКЛ — носители генотипов с мутантным аллелем А гена FCGR2A (His166Arg) (75% vs. 33,9%, $\chi^2=4,96$, $p=0,03$, OR=5,84, 95%CI: 1,074-31,76). При сравнительном анализе частоты распределения генотипов при ДВККЛ и МКЛ найдены следующие особенности: при МКЛ достоверно чаще наблюдались генотипы СТ и ТТ с мутантным аллелем Т гена IL4 (C-589T) (75% vs. 20%, $\chi^2=3,76$, $p=0,05$, OR=12,00, 95%CI: 0,77-186,37); генотипы СТ и ТТ с мутантным аллелем Т гена CD14 (C-159T) (75% vs. 20%, $\chi^2=3,76$, $p=0,05$, OR=12,00, 95%CI: 0,77-186,37); а также генотипы GA и AA с мутантным аллелем А гена FCGR2A (His166Arg) (100% vs. 40%, $\chi^2=4,20$, $p=0,04$, OR=13,00, 95%CI: 0,55-306,22).

Выводы: В результате проведенного исследования установлены генетические маркеры, специфичные для отдельных видов агрессивных ХЛПЗ, которые могут являться дополнительными диагностическими критериями данных форм опухолей лимфатической системы.

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИГЕН-АКТИВИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ IN VITRO ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ОТВЕТА МНК БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

Облеухова И.А., Кирюшина А.Н., Лопатникова Ю.А., Фалалеева С.А., Козлов В.В., Вицин А.Е., Сенников С.В.

НИИФКИ, ГБУЗ ГКБ № 1, ГБУЗ НСО НООД, Новосибирск, Россия

Введение: Ежегодно в России рак легкого диагностируют более чем у 50 тыс. пациентов. Каждая четвертая злокачественная опухоль, выявленная у мужчин, и каждая двадцать пятая — у женщин являются новообразова-

ниями трахеи, бронхов, легкого. Немелкоклеточный рак легкого (плоскоклеточный, аденокарцинома и крупноклеточный рак), составляет 80-85% случаев рака легких. В настоящее время ведутся активные исследования, касающиеся разработки методов иммунотерапии данного заболевания. Поэтому поиск новых мишеней и исследования направленные на разработку новых методов иммунотерапии онкологических заболеваний на сегодняшний день остаются актуальными.

Цель: изучение эффективности стимуляции цитотоксической активности мононуклеарных клеток (МНК) больных немелкоклеточным раком легкого с помощью антиген-активированных дендритных клеток *in vitro*.

Задачи: 1. Изучить функциональную активность дендритных клеток, генерированных из прилипающей фракции МНК периферической крови больных немелкоклеточным раком легкого. 2. Изучить влияние антиген-активированных дендритных клеток и rhIL-12, rhIL-18 на цитотоксическую активность МНК против аутологических опухолевых клеток.

Материалы и методы: В работе использовалась периферическая венозная кровь и материал опухоли от 19 больных немелкоклеточным раком легкого. Из мононуклеарных клеток генерировали дендритные клетки (ДК), к которым впоследствии применялись различные способы доставки антигенного материала (праймирование лизатом опухолевых клеток, РНК опухолевых клеток). Функциональную активность генерированных ДК оценивали по захвату FITC-декстрана. Эффективность влияния антиген-активированных ДК на стимуляцию активности МНК против аутологических опухолевых клеток оценивалась в цитотоксическом тесте (основанном на определении лактатдегидрогеназы, высвободившейся из клеток), после совместного культивирования МНК и ДК в присутствии рекомбинантных человеческих цитокинов (rhIL-12 и rhIL-18).

Основные результаты: Установлено, что генерированные из МНК ДК обладают способностью к захвату FITC-декстрана на стадии незрелых ДК, и теряют ее по мере своего созревания. Показана возможность ДК, праймированных лизатом опухолевых клеток, а также ДК, трансфицированных тотальной РНК, при немелкоклеточном раке легкого, повышать цитотоксическую активность МНК против аутологических клеток опухоли по сравнению с контрольными группами, где применялись ДК, не праймированные антигенами опухоли. Стимулирующий эффект ДК, праймированных опухолевым лизатом, усиливался при добавлении rhIL-12 и rhIL-18 в совместную культуру МНК и ДК.

Заключение: Нагруженные различными способами доставки опухолевых антигенов, дендритные клетки, генерированные из МНК больных немелкоклеточным раком легкого, способны стимулировать цитотоксическую активность МНК против аутологических опухолевых клеток *in vitro* при немелкоклеточном раке легкого. Полученный эффект можно усилить путем добавления rhIL-12 и rhIL-18 в совместную культуру МНК и ДК, праймированных лизатом опухолевых клеток. Работа поддержана ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы», Соглашение № 14.607.21.0043. Уникальный идентификатор RFMEFI60714X0043.

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ IL-4 И IL-6 В РАЗВИТИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

Павлова А.А., Бубнова Л.Н., Соколова Ю.В.,
Бессмельцев С.С., Павлова И.Е.

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства»,
Санкт-Петербург, Россия

Введение. Множественная миелома (ММ) — опухольное заболевание системы крови, характеризующееся неконтролируемой пролиферацией клональных плазматических клеток, которая обусловлена хромосомными нарушениями и патологией стромального микроокружения. Известно, что нарушения иммунной системы играют существенную роль в процессе созревания и дифференцировки опухолевого клона при развитии этого заболевания. Интерлейкин 6 (IL-6), как известно, стимулирует пролиферацию опухолевых плазматических клеток, стимулирует рост миеломных клеток и клеток-предшественников, является остеокласт-активирующим фактором (играет важную роль в развитии костной болезни), тогда как интерлейкин 4 (IL-4) подавляет рост ММ за счет ингибирования синтеза IL-6. Известно, что одиночные нуклеотидные замены (SNPs) в регуляторных областях генов цитокинов могут повлиять на транскрипцию и продукцию цитокинов, что может оказать влияние на развитие различных заболеваний.

Цель. Целью настоящего исследования явилось определение SNP генов IL-6 (-174G/C, rs1800471) и IL-4 (-1098T/G, -590T/C, -33T/C), ассоциированных с развитием ММ у жителей Северо-Западного региона России, а также определяющих тяжесть поражения костной ткани.

Материалы и методы. Обследовано 43 больных ММ, средний возраст пациентов составил 69,3 ± 9,2 лет. Пациенты были разделены на две группы в зависимости от выявленных изменений в костях: 1-ая группа (19 пациентов) - с выраженными остеолитическими поражениями костной ткани (III стадия по классификации Durie-Salmon); 2-ая группа (24 пациента) — с проявлениями остеопороза и единичными очагами лизиса (II стадия по классификации Durie-Salmon). Контрольную группу составили 40 здоровых доноров (средний возраст — 54 ± 10,1 лет). Все обследованные лица являлись жителями Северо-Западного региона (г. Санкт-Петербург) считающие себя и своих родителей русскими и не связанными кровным родством. Геномную ДНК выделяли из ядродержащих клеток периферической крови. Определение SNP генов IL-4 и IL-6 проводили с помощью стандартного набора реагентов (Invitrogen), используя PCR-SSP. Визуализацию результатов осуществляли посредством горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Основные результаты. На основании результатов типирования полиморфных участков гена IL-4 -1098T/G установлено, что в общей когорте обследованных больных ММ и в контрольной группе частоты генотипов существенно не отличались друг от друга, за исключением генотипа IL-4 -1098GG, который не был выявлен у здоровых, а у больных встречался с частотой 0,05. При анализе SNP гена IL-4 -590T/C выявлено, что частота генотипа IL-4 -590TC в общей группе больных ниже, чем в контрольной группе (0,37 к 0,53), тогда как для IL-4 -590TT частота в группе больных с проявлением остеопороза в 3 раза выше, чем в группе доноров (0,17 к 0,05 соответственно). Генотип IL-4 -33TT у больных ММ с проявлением остеопороза также встречался в 3 раза чаще, чем в контрольной группе (0,33 против 0,10 соответственно).

Кроме того, в группе пациентов с ММ наблюдались различия по частоте генотипа IL-6 -174GG по сравнению со здоровыми лицами: в общей группе пациентов - 0,47 (0,53 для 1 гр. и 0,42 для 2 гр.) против 0,13 в контрольной группе. Генотип IL-6 -174GC, напротив, встречался чаще в группе доноров, нежели в группе больных с выраженными остеолитическими поражениями (0,70 к 0,26 соответственно). Похожая картина наблюдалась и для генотипа IL-6 nt565GA – у здоровых лиц данный генотип встречался значительно чаще (0,80), чем у пациентов (0,26 - 0,42 для всех групп). Генотип IL-6 nt565GG достоверно реже определялся у здоровых, чем у больных ММ (0,13 к 0,49 соответственно). Значительно чаще генотип IL-6 nt565GG выявлялся у больных с выраженными остеолитическими поражениями костной ткани, чем у больных с проявлениями остеопороза и в контрольной группе (0,53 к 0,46 и к 0,13 соответственно), также как и генотип IL-6 nt565AA, частота которого составила в 1 гр. больных 0,21; во 2-ой группе - 0,13 и 0,08 – у здоровых.

Заключение. Таким образом, полученные нами результаты позволяют расценивать следующие генотипы: IL-4 -33TT, IL-4 -590TT, IL-6 -174GG, IL-6 nt565AA и IL-6 nt565GG как маркеры, предрасполагающие к развитию ММ, тогда как генотипы IL-6 -174GC и IL-6 nt565GA, вероятно, можно рассматривать как протекторы развития заболевания. Генотипы IL-6 -174GG, IL-6 nt565AA и IL-6 nt565GG ассоциированы с развитием тяжелых остеолитических поражений костей при множественной миеломе, в свою очередь генотипы IL-4 -33TT, IL-4 -590TT – являются иммуногенетическими маркерами более легкой формы костной болезни, проявляющейся остеопорозом и единичными очагами лизиса.

СТИМУЛЯЦИЯ IN VITRO ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ОТВЕТА С ПОМОЩЬЮ АНТИГЕН-АКТИВИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Сенников С.В., Облеухова И.А., Курилин В.В., Шевченко Ю.А., Куликова Е.В., Кирюшина Н.А., Христиан А.А., Соколов А.В., Сидоров С.В., Козлов В.В., Вицин А.Е., Гончаров М.А., Козлов В.А.

НИИФКИ, ГБУЗ ГКБ № 1, ГБУЗ НСО НООД, Новосибирск, Россия

Введение: В настоящее время эффективность современной иммунотерапии и профилактики рецидивов неопластических процессов заключается в коррекции нарушений презентации антигена и генерации антиген-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов. Ключевая роль в активации противоопухолевого клеточного иммунитета принадлежит дендритным клеткам. В связи с этим на протяжении последних лет ведется активный поиск и разработка современных подходов получения дендритных клеток, способствующих стимуляции противоопухолевого ответа у больных онкологическими заболеваниями.

Цель: изучение эффективности стимуляции цитотоксического противоопухолевого ответа в культуре мононуклеарных клеток (МНК) больных онкологическими заболеваниями с помощью антиген-активированных дендритных клеток.

Задачи

1. Изучить влияние антиген-активированных дендритных клеток и rhIL-12, rhIL-18 на цитотоксическую активность МНК против аутологичных опухолевых клеток.

2. Изучить влияние антиген-активированных дендритных клеток и rhIL-12, rhIL-18 на относительное содержание перфорин-позитивных и гранзим В-позитивных лимфоцитов в культуре МНК больных онкологическими заболеваниями.

3. Изучить влияние антиген-активированных дендритных клеток и rhIL-12, rhIL-18 на продукцию IFN- γ и IL-4 МНК больных онкологическими заболеваниями

Материалы и методы: В работе использовалась периферическая венозная кровь и материал опухоли от 72 больных онкологическими заболеваниями (рак яичника (РЯ) (10 больных), колоректальный рак (КРР) (16 больных), рак молочной железы (РМЖ) (32 больных), немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) (14 больных)). Из полученной фракции мононуклеарных клеток генерировали дендритные клетки (ДК), к которым впоследствии применялись различные способы доставки антигенного материала (праймирование лизатом опухолевых клеток, РНК опухолевых клеток). Эффективность влияния антиген-активированных ДК на стимуляцию активности МНК против аутологичных опухолевых клеток оценивалась в цитотоксическом тесте, после совместного культивирования МНК и ДК в присутствии IL-12 и IL-18, по продукции IFN- γ , IL-4 и относительному содержанию перфорин, гранзим В-позитивных клеток в популяции лимфоцитов.

Основные результаты: Показана способность ДК, праймированных лизатом опухолевых клеток, при всех нозологиях, а также ДК, трансфицированных тотальной РНК, при раке молочной железы и немелкоклеточном раке легкого, повышать цитотоксическую активность МНК по сравнению с контрольными группами, где применялись ДК, не праймированные лизатом. Стимулирующий эффект ДК, праймированных опухолевым лизатом, усиливался при добавлении IL-12, IL-18 в совместную культуру МНК и ДК при каждой патологии. Установлено, что стимуляция с помощью ДК, праймированных лизатом, эффекторной способности МНК сопровождается увеличением относительного содержания перфорин-позитивных лимфоцитов при раке яичника, колоректальном раке и раке молочной железы. Исследования по продукции IFN- γ и IL-4 МНК после совместного культивирования с антиген-активированными ДК свидетельствуют о продукции цитокинов преимущественно по Th1 типу.

Заключение: Генерированные из МНК больных злокачественными новообразованиями дендритные клетки, нагруженные антигенами различными способами доставки, способны стимулировать цитотоксическую активность эффекторных клеток против аутологичных опухолевых клеток in vitro при ряде онкологических заболеваний.

Работа поддержана ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы», Соглашение № 14.607.21.0043. Уникальный идентификатор RFMEFI60714X0043.

ИММУННАЯ СИСТЕМА КАК МНОГОМЕРНОЕ НАБЛЮДЕНИЕ: ПРИМЕНЕНИЕ В ОНКОЛОГИИ

Стахеева М.Н., Чердынцева Н.В., Эйдензон Д.В., Слонимская Е.М., Тузиков С.А.

*Томский НИИ онкологии, г. Томск, Россия
Novospark Corporation, Waterloo, Canada*

Актуальность. Многочисленность эффекторных и регуляторных путей, а также плейотропность биологических эффектов иммунной системы значительно затруд-

няют применение иммунотерапии в онкологической практике. Однако, с другой стороны, многокомпонентная организация иммунной системы позволяет представить ее как многомерное наблюдение [Капра Ф, 2005]. Такой подход создает условия для выявления значимых различий в функционировании единой интегрированной системы в различных патологических условиях [Чередеев А.Н., Ковальчук Л.В., 1997, Стахеева М.Н. и соавт., 2001]. **Цель:** показать различия между состоянием иммунной системы как многомерного целого у здоровых лиц и у больных злокачественными новообразованиями (ЗНО), а также у больных ЗНО различных локализаций в зависимости от исхода.

Материал и методы. В исследование вошли 37 лиц без онкологических заболеваний и 247 больных ЗНО, стадии I-III, из них 197 пациенток с раком молочной железы (РМЖ), 25 с раком гортани (РГ) и 30 с раком желудка (РЖ), проходивших лечение в Томском НИИ онкологии. Оценивали основные параметры врожденного и адаптивного иммунитета. Для представления иммунной системы как многомерного объекта был применен оригинальный метод визуализации, разработанный совместно Томским НИИ онкологии и корпорацией NovoSpark (Канада) [Стахеева М.Н. и соавт., 2011]. Метод визуализации основан на изометричности двух пространств, где объекты одного пространства (пространства данных) считаются оригиналами, в то время как объекты другого играют роль изображений. Основой выявления сходства или различия в оригинальных данных является визуальная близость соответствующих этим данным образов, выражаемая в расстоянии Махалонобиса [Eidenzon D.V. et al., 2009].

Результаты. Используя представление иммунной системы как многомерного взаимосвязанного целого, показали, что ее состояние у здоровых лиц и у больных злокачественными новообразованиями (РМЖ, РГ, РЖ) различно. Лямбда Уилкса, характеризующая точность дискриминации, составила 0,07. Расположение визуального образа состояния иммунной системы у здоровых лиц в условном пространстве многомерных признаков определяют показатели гуморального иммунитета и активности NK-клеток. Для больных ЗНО наибольшее значение имеет соотношение Т-клеточных субпопуляций. Состояние иммунной системы, представленное как визуальный образ многомерного наблюдения, до начала противоопухолевого лечения различно у больных ЗНО и ассоциировано с последующим исходом – клинической ремиссией или прогрессированием злокачественного процесса. Это было выявлено для пациентов с РЖ ($\lambda=0,008$), РГ ($\lambda=0,005$) и РМЖ ($\lambda=0,059$). Конкретные механизмы вовлечения иммунной системы в прогрессирование опухоли или в обеспечение клинической ремиссии связаны с локализацией новообразования. Для прогрессирования РЖ наибольшее значение имела активность гуморального звена, для РГ – эффективность цитотоксических механизмов (нейтрофилы и CD8+Т-киллеры), для РМЖ – количество В-лимфоцитов. Более того, у больных РМЖ показано, что различия в состоянии иммунной системы в зависимости от исхода наблюдаются и в последующем: после 2 курсов НАХТ ($\lambda=0,014$), после 3-4 курсов НАХТ ($\lambda=0,029$), после операции ($\lambda=0,043$), через 1 год после завершения лечения ($\lambda=0,131$). При этом основные механизмы, определяющие различия состояния иммунной системы как многомерного целого, зависят от этапа наблюдения.

Выводы: Подход к оценке состояния иммунной системы как многомерного наблюдения позволяет понять, что злокачественный рост сопровождается изменением функционирования иммунной системы в целом. При этом вклад отдельных механизмов в формирование об-

щего статуса иммунной системы зависит от конкретной локализации новообразования и этапа лечения. Представляется перспективным использовать данный подход для выявления критериев прогноза и поиска терапевтических мишеней ЗНО.

ВЛИЯНИЕ ЖИВЫХ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ А НА РОСТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ У МЫШЕЙ

Суворова М.А.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
Санкт-Петербург, Россия

Противоопухолевая активности ряда стрептококков группы А была показана достаточно давно, однако механизмы данного феномена до сих пор неизвестны. В 2008 году был показан эффект ингибирования роста солидной опухоли у мышей в результате внутриопухолевого введения штамма *Streptococcus pyogenes* (СГА) М49 серотипа [Malezki et al 2008].

Цель исследования заключалась в изучении влияния СГА серотипа М39 и его мутанта по М белку на рост двух перевиваемых опухолей у мышей.

В экспериментах были использованы клетки перевиваемых опухолей сингенной гепатомы 22а на мышцах СЗНА и саркомы 37 на беспородных мышцах. Опухолевые клетки вводили подкожно в количестве 200000 клеток на животное. СГА вводили внутрь опухоли дважды на 7 и 12 день опухолевого роста в количестве 5×10^4 на животное. Опыты проводили со штаммом СГА серотипа М39 (штамм Гуров) и его мутантом по гену *emm*, кодирующему М белок. Штамм Гуров был любезно предоставлен в наше распоряжение академиком РАН В.А. Черешневым. Мутант был получен посредством инсерции неспособной к автономной репликации стрептококков плазмиды в область гена *emm39*. Исходный штамм Гуров использовался в качестве контроля. Противоопухолевую активность оценивали по размеру среднего диаметра опухоли и выживаемости животных. Измерения проводились через день после введения опухоли. Кроме того, цитотоксическую активность штаммов СГА изучали *in vitro* на клетках линии гепатомы 22а с помощью двух методов: окрашивания клеток метиленовым синим и учета характера роста клеток в режиме реального времени на приборе exCelligence (Roche).

На модели роста саркомы 37 противоопухолевый эффект дикого штамма СГА был более выражен по сравнению с гепатомой: выживаемость мышей была выше. Применение мутантного штамма по М белку показало достоверную задержку роста опухоли и значительное снижение смертности мышей на обеих моделях. В экспериментах *in vitro*, проводимых с помощью двух методов, дикий штамм Гуров и его мутант продемонстрировали одинаково высокий цитотоксический эффект при совместном культивировании СГА и клеток гепатомы 22а. Совместное культивирование проводилось в течении четырех часов.

Таким образом, в нашем исследовании впервые было показано, что удаление М белка у СГА М39 серотипа существенным образом влияет на увеличение продолжительности жизни животных и замедление роста опухоли. Поскольку М белок отвечает за антифагоцитарные свойства стрептококков можно предположить, что усиление противоопухолевой активности мутантных штаммов связано с активацией макрофагов в организме опухоленосителей. Данные исследования в перспективе могут иметь значение для разработки альтернативных методов лечения онкологических заболеваний.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЦИТАРНОМ ЛЕЙКОЗЕ С ПОВТОРЯЮЩИМИСЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ АНОМАЛИЯМИ

Сухина И.А., Никитин В.Ю., Иванов А.М.,
Колубаева С.Н., Никитин Ю.В., Поляков А.С.,
Семелев В.Н., Исакова Т.В., Мешкова М.Е.,
Малахова Е.А.

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

Введение. Опухолевые клетки при хроническом лимфоцитарном лейкозе (ХЛЛ) чаще всего демонстрируют «классический» иммунофенотип CD19+, CD5+, CD23+, SmIg^{dim}, CD20^{dim}, FMC7-, CD79b^{-/dim}, CD22^{-/dim}. Тем не менее, в некоторых случаях обнаруживаются отклонения в антигенном профиле ХЛЛ-клеток, такие как повышенная экспрессия антигенов CD79b, CD22 или более сильная степень экспрессии SmIg и CD20. Наиболее часто встречающимися цитогенетическими аномалиями при ХЛЛ являются трисомия по хромосоме 12, делеции 13q14, 13q34, 6q, 11q и 17p. Замечено, что иммунофенотипические отклонения при ХЛЛ часто обусловлены наличием этих генетических нарушений в кариотипе опухолевых клеток. Поэтому изучение взаимосвязи антигенной экспрессии и кариотипа ХЛЛ-клеток перспективно для усовершенствования дифференциальной диагностики и оценки течения ХЛЛ.

Цель и задачи исследования. Выявление взаимосвязей между иммунофенотипическими особенностями ХЛЛ-клеток и их кариотипом.

Материалы и методы. Обследованы клетки костного мозга/периферической крови 35 пациентов с ХЛЛ. Иммунофенотипирование выполнено на проточном цитометре «Cytomics FC500» «Beckman Coulter» с применением моноклональных антител (США): CD3/CD19/CD45, SmIgк/SmIgγ/CD19, CD5/CD23/CD19, FMC7/CD38/CD19, CD22/CD79b/CD19, CD10/CD20/CD19. Для определения кариотипа ХЛЛ-клеток использовали рутинные цитогенетические исследования и метод FISH (флуоресцентной in situ гибридизации).

Основные результаты. Генетические исследования показали, что у больных ХЛЛ чаще всего встречалась делеция del(13)(q14.3) одна или в сочетании с 13q34. Она была обнаружена у 18 пациентов, что составило 51% от всех обследуемых. ХЛЛ-клетки у 56% пациентов (10/18) данной группы имели фенотип CD19+/CD5+/CD23+/SmIg^{dim}/CD20^{dim}/FMC7-CD79b-/CD22- и отсутствие экспрессии антигена CD38. Слабая (dim) экспрессия антигена CD79b (24-92% клеток) наблюдалась у 39% (7/18) больных с del(13)(q14.3), а экспрессия антигена CD38 (22-86% клеток) – у 17% (3/18). Сходный иммунофенотип отмечался у 2 (6%) больных ХЛЛ только с делецией del(13q34), у 1 (3%) больного с трисомией локуса 13q34 и у 6 (17%) пациентов с нормальным кариотипом 46,XY.

Следующей по частоте встречаемости хромосомной аномалией была трисомия по хромосоме 12. Данная аномалия была выявлена у 14% (5/35) больных ХЛЛ. Иммунофенотип ХЛЛ-клеток в этой группе существенно отличался от предыдущей. У всех без исключения пациентов (100%) с трисомией по хромосоме 12 наблюдалась экспрессия антигенов CD79b (у 72,8 – 99,2% клеток), CD22 (у 54,2 – 94,6% клеток), CD38 (у 31,1 – 99,3% клеток). Кроме того, у 2 из 5 (40%) обследуемых данной группы

наблюдалась более яркая (dim to mod) экспрессия антигена CD20 и у 1 больного (20%) яркая экспрессия антигена CD79b (у 94,2% клеток). Аналогичный фенотип демонстрировали ХЛЛ-клетки у 1 (3%) больного с del(6q.23). У него также обнаружена экспрессия CD79b (у 97,8% клеток), CD22 (у 62,6% клеток), CD38 (у 32,5% клеток).

У 2 (6%) обследуемых с делецией del(11q23) особенностью фенотипа явилось наличие экспрессии антигенов CD79b (у 47,3 – 44,8% клеток) и CD38 (у 35,3 – 64,6% клеток).

Заключение. Таким образом, экспрессия антигенов CD79b, CD22, CD38 является основным признаком, отражающим наличие повторяющихся генетических аномалий. Иммунофенотип без экспрессии CD79b, CD22, CD38 в большинстве случаев дифференцирует больных ХЛЛ с del(13)(q14.3), del(13q34), трисомией локуса 13q34 и нормальным кариотипом. Обнаружение экспрессии на большинстве ХЛЛ-клеток всех трех антигенов CD79b, CD22, CD38 и более яркая экспрессия антигена CD20 позволяет предполагать наличие трисомии по хромосоме 12 или del(6q). При частичной экспрессии CD79b и CD38 можно ожидать выявление del(11q).

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ПРОГНОЗА ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА ПРИ ТЕРАПИИ ПРЕПАРАТАМИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Чуксина Ю.Ю., Катаева Е.В., Голенков А.К.,
Яздовский В.В.

ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

Высокая эффективность иммунохимиотерапии в лечении больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) препаратами на основе моноклональных антител, в частности, программа R-FC (Ритуксимаб, Флюдарабин, Циклофосфан) доказана фактами достоверного увеличения беспрогрессивной и общей выживаемости пациентов, особенно с рецидивирующим и рефрактерным характером течения заболевания. Прогнозирование течения заболевания и результатов лечения у пациентов ХЛЛ является особенно актуальным на современном этапе.

Цель: определение прогностической значимости иммунофенотипических показателей лимфоцитов периферической крови (ПК) при лечении больных ХЛЛ по программе R-FC.

Материалы и методы: обследовано 60 больных ХЛЛ, ранее не леченных или резистентных к предшествующим курсам химиотерапии. Пациенты были обследованы до начала лечения, в процессе и после проведения 6 курсов терапии R-FC. Клиническую эффективность лечения больных ХЛЛ оценивали по критериям NCI-WG (1996) как полную ремиссию (ПР), частичную ремиссию (ЧР), стабилизацию (СБ) и прогрессирование болезни (ПБ). Иммунофенотипическая диагностика минимальной остаточной болезни (МОБ) проводилась методом 4-цветной проточной цитометрии по стандартизованному международному протоколу. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводилось методом 4-цветной проточной цитометрии («Vecton Dickinson», США) по В-, Т-, НК-клеточным антигенам и маркерам их активации.

В дебюте заболевания содержание CD25+В-клеток (экспрессирующих R-ИЛ-2) варьировало от 0,06 до 76%.

Содержание CD25+/CD19+клеток более 20% от популяции клеток В-ХЛЛ отмечено у 37% пациентов в дебюте заболевания и у 92% пациентов, вышедших в рецидив после предшествующих курсов терапии ($p=0,000013$; отношение шансов=19,5). При достижении больными ХЛЛ ЧР и ПР в процессе терапии отмечено существенное ($p<0,001$) снижение содержания CD25+В-лимфоцитов, напротив, при ПБ выявлено существенное их увеличение (46,8+/-5,4%) по сравнению с уровнем до начала лечения (23,5+/-6,5%). Восстановление нормального содержания В-лимфоцитов ПК после достижения ПР происходило в среднем к 8,6 месяцам. При сравнительной оценке эффективности терапии в зависимости от исходного уровня CD25+/CD19+клеток было установлено, что при наличии у больных CD25+/CD19+лимфоцитов более 20% вероятность достижения МОБ-негативной ПР была достоверно ниже, чем у больных с отсутствием экспрессии CD25+ на В-лимфоцитах ($p=0,0377$; отношение шансов=8,9).

Выводы: Уровень экспрессии CD25 на В-лимфоцитах уже на этапе первичной диагностики может быть маркером высокой вероятности рефрактерности к проводимым режимам терапии

Уровень экспрессии CD25 на В-лимфоцитах может быть прогностическим критерием прогрессирования и рецидива заболевания.

ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ СУБПОПУЛЯЦИЙ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Шевченко Ю.А.¹, Христин А.А.¹, Курилин В.В.¹, Фалалеева С.А.¹, Кузнецова М.С.¹, Сидоров С.В.², Сенников С.В.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

² ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница № 1», Новосибирск, Россия

Актуальность. Заболеваемость раком молочной железы (РМЖ) постоянно увеличивается в развитых странах в течение последних нескольких десятилетий, однако смертность от данного заболевания снижается благодаря улучшению методов скрининга, совершенствованию методов хирургического вмешательства, лучевой терапии, химиотерапии. При обнаружении на ранних стадиях РМЖ, как правило, успешно лечится, в то время как метастазирующие или прогрессирующие формы имеют плохой прогноз. Средняя продолжительность жизни с момента выявления отдаленных изменений составляет 2-3 года, и только треть пациентов при своевременном и комплексном лечении переживает 5-летний рубеж.

Целью данной работы является изучение функциональных маркеров дендритных клеток (ДК) и супрессорных клеточных популяций в периферической крови как потенциальных биологических показателей снижения противоопухолевого иммунитета при первичном и метастазирующем РМЖ.

Материал и методы. В исследовании использовалась венозная кровь пациентов, больных первичным и метастатическим раком молочной железы с разным сроком

прогрессирования после основного заболевания. Основные очаги локализации метастазирования находились в коже, костях, легких, лимфоузлах. В качестве контроля была использована периферическая кровь условно-здоровых доноров, не имеющих диагностированных патологий молочной железы. Для изучения фенотипических характеристик ДК периферической крови, а так же потенциала для созревания и миграционной активности, проводилось исследование как интактных клеток периферической крови, так и специфически стимулированных для созревания агонистами TLR-4 (LPS) и TLR-8 (R 848). Оценка фенотипа ДК проводилась на клетках с помощью многоцветной проточной цитометрии с использованием специфических маркеров ДК крови – BDCA-1 и BDCA-2 (миелоидные и плазмацитоидные ДК, соответственно), а также поверхностных маркеров HLA-DR, CD 83, CD 86, CCR7. Для определения Т-регуляторных клеток также использовалась многоцветная панель, включающая маркеры CD 4, CD 25, CD 127, FoxP3.

Результаты. У пациентов с метастатическим РМЖ наблюдается сниженное содержание плазмацитоидных ДК, по сравнению с пациентами с первичным РМЖ и сниженное количество миелоидных ДК по сравнению со здоровыми донорами. Достоверные различия по содержанию миелоидных и плазмацитоидных ДК обнаружены только у пациентов с первичным РМЖ. У пациентов с метастатическим раком молочной железы не наблюдается различий по содержанию активационных маркеров на миелоидных и плазмацитоидных ДК. В периферической крови как здоровых доноров, так и пациентов с РМЖ циркулирующие ДК являются незрелыми, так как на них отсутствует маркер CD 83 (менее 0,5% позитивных клеток), но несут достаточное количество маркеров функциональной активности (HLA-DR и CD 86) и эффективно созревают при TLR-стимуляции (содержание CD 83-позитивных клеток достигает 90%). Кроме того в крови больных метастатическим РМЖ отмечено большее содержание плазмацитоидных CD 86-позитивных клеток (76,2%), по сравнению с больными с первичным РМЖ (47,8%) и здоровыми донорами (44,9%). В то же время у здоровых доноров (91,33%) и больных первичным РМЖ (92,1%) этот маркер преобладает на миелоидных дендритных клетках (у больных метастазирующим РМЖ этот показатель на уровне 72,4%). При исследовании ДК, экспрессирующих маркер миграционной активности CCR-7, было показано, что у больных с метастазирующим РМЖ наблюдается повышенное содержание CCR-7 позитивных плазмацитоидных ДК, по сравнению с больными с первичным РМЖ и здоровыми донорами, у которых этот показатель был минимален. У больных метастатическим РМЖ повышено содержание FoxP3-позитивных клеток в популяции активированных CD 4+CD 25+ лимфоцитов по сравнению с больными с первичным РМЖ и здоровыми донорами.

Заключение. Таким образом, в работе показаны фенотипические различия циркулирующих подтипов ДК у пациентов с первичной и метастазирующей формами РМЖ, что может способствовать оценке участия данных клеточных популяций в метастазировании и дает основания для лучшего понимания процессов иммунологического надзора.

Работа поддержана грантом Президента РФ № 14.120.14.161-МК.