

На правах рукописи

**ОЛЕЙНИК
ЕВГЕНИЯ КОНСТАНТИНОВНА**

**ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ
И ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЛИМФОЦИТОВ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**

14.00.14 – Онкология

14.00.36 – Аллергология и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург
2005

Работа выполнена в Институте биологии
Карельского научного центра РАН

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор Моисеенко Владимир Михайлович

доктор медицинских наук, профессор Назаров Петр Григорьевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Берштейн Лев Михайлович

доктор биологических наук, профессор Климович Владимир Борисович

доктор медицинских наук, профессор Серебряная Наталья Борисовна

Ведущее научное учреждение:

Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН

Защита диссертации состоится 14 июня 2005 года в 13.00 часов на заседании специализированного Ученого совета Д 208.052.01 ГУН НИИ онкологии имени проф. Н.Н. Петрова МЗ РФ (197758, г.Санкт-Петербург, Песочный-2, ул. Ленинградская, 68)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института

Автореферат разослан “ “ мая 2005 г.

Ученый секретарь
специализированного совета,
доктор медицинских наук

Р.В. Орлова

2006-4
15905

218 2478

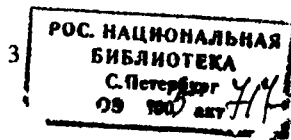
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение функционирования иммунной системы при возникновении и развитии злокачественных новообразований представляет огромный интерес поскольку, несмотря на значительные успехи в изучении молекулярных и генетических аспектов онкогенеза, в настоящее время нет достаточно ясного представления о роли противоопухолевого иммунитета, о взаимоотношениях, которые складываются между иммунной системой хозяина и развивающимися опухолями. Особая актуальность таких исследований для онкологии обусловлена ростом числа заболеваний, связанных с новообразованиями. Недостаточность имеющихся знаний о разнообразных механизмах воздействия опухоли на организм, в частности, на функции иммунной системы, затрудняет разработку новых методов ранней диагностики и эффективной иммунотерапии.

Существует представление о том, что опухоль индуцирует иммуносупрессию, которая может проявляться в широком диапазоне: от слабого иммунного ответа до полной анергии (Dranoff, 2003; Whiteside, 1999). Именно иммуносупрессией объясняют неэффективность противоопухолевой терапии, направленной на стимуляцию иммунных механизмов у больных с растущими опухолями (Kang et al., 1997; Rabinowich et al., 1996). Однако закономерности формирования иммунологической недостаточности, причины и механизмы, приводящие к снижению реактивности иммунной системы, до сих пор четко не определены.

При опухолевом росте часто обнаруживаются изменения в функциях сигнальных и структурных цепей антигенраспознающего рецептора TCR (Zea et al., 1995). Есть данные о том, что среди Th-лимфоцитов крови онкологических больных наблюдается количественный сдвиг в сторону Th2, вызванный способностью опухолевых клеток продуцировать цитокины (TGF β и IL-10), поддерживающие дифференцировку этих клеток (Maeda et al., 1996). Отсутствие иммунного ответа или его недостаточная эффективность могут быть также обусловлены способностью опухолевых клеток различными путями избегать иммунологического распознавания (Bennett et al., 1999; O'Connell et al., 1996; Macher et al., 2003). Клетки опухолей могут избегать распознавания за счет изменения экспрессии молекул MHC, отсутствия корцепторов, мутаций в транспортных белках TAP1, TAP2 и др.

Иммунное распознавание опухоли имеет свои особенности, так как опухолевые клетки происходят из "своего" и антигены опухолей



не совсем соответствуют традиционной роли “чужого” (если сравнивать с вирусами и бактериями, которые поступают в организм извне). В связи с этим считается, что противоопухолевый иммунитет составляет особенную парадигму иммунного распознавания “своего” и “измененного своего” (Houghton, 2001; Turk et al., 2002). Действительно в силу низкой иммуногенности антигенов аутологичного происхождения, видимо, развивается слабый и кратковременный иммунный ответ, который не приводит к разрушению опухоли *in vivo* (Boon, Van der Bruggen, 1996; Lay et al., 1996; Restifo et al., 2002). Кроме того, следствием противоопухолевого иммунитета может быть иницирование аутоиммунных процессов, что важно учитывать при разработке различных способов индукции или стимуляции иммунного ответа к опухолевым антигенам (Bronte et al., 2000; Overwijk et al., 1999; Turk et al., 2002; Wei et al., 2004). Несмотря на эти сомнения в сколько-нибудь значимой роли противоопухолевого иммунитета, ряд авторов признают решающую роль специфического иммунитета в отторжении опухоли и видят перспективу в создании эффективных противоопухолевых вакцин (Alexandroff et al., 1998; Dupont, 2002; Ostrand-Rosenberg, 2004; Pawelec, 2004).

В последние годы появилась концепция “иммунного редактирования опухолей”, согласно которой реакция иммунной системы на опухолевые антигены даже способствует трансформации и прогрессированию опухолей, так как происходит селекция и выживание только иммунологически “невидимых” клонов опухолевых клеток, которые в состоянии преодолеть иммунологический барьер (Дейчман, 2000; Balkwill and Mantovani, 2001; Coussens and Werb, 2001; Spadaro et al., 2004). Несмотря на разные взгляды, авторы солидаризуются в том, что нельзя недооценивать сложность тонкой сети взаимодействий, которые устанавливаются между клетками иммунной системы и опухолевыми клетками. И только проведение фундаментальных исследований в онкоиммунологии позволит установить нарушения в основных механизмах функционирования иммунной системы организма при развитии опухолевого процесса (Valeri et al., 2003).

Для понимания механизмов, генерирующих иммуносупрессию при опухолевом росте, необходимо изучать сдвиги в дифференцировке лимфоцитов, изменение пролиферативной активности и апоптоз клеток иммунной системы, закономерности экспрессии молекул клеточной поверхности. Оценка функциональной активности лимфоцитов, их фенотипических особенностей у больных имеет и практический аспект. Результаты исследований могут быть применены

для диагностики иммунодефицитных состояний, определения характера и интенсивности повреждения иммунной системы, а также в целях совершенствования методов иммунотерапии (Кадагидзе, 1998, 1999; Кадагидзе и др., 2002; Пинегин, Хаитов, 1997; Baryshnikov et al., 1997; Wang et al., 2001). Все вышесказанное позволяет считать изучение функций иммунной системы в процессе опухолевого роста чрезвычайно актуальным, поскольку оно обогатит онкоиммунологию новыми знаниями и будет способствовать решению проблем иммунотерапии.

Цель и задачи исследования. Основная цель исследования заключалась в выяснении закономерностей функционального и фенотипического сдвига в субпопуляциях лимфоцитов крови у больных с различными онкологическими заболеваниями. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. В сравнительном исследовании охарактеризовать особенности функционального состояния Т- и В-лимфоцитов крови по уровню пролиферации при стимуляции митогенами у больных раком легкого, раком желудка, раком молочной железы, колоректальным раком.

2. Изучить фенотипы лимфоцитов крови по экспрессии дифференцировочных CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 и активационных маркеров CD25, CD71, CD95, HLA-DR у больных раком легкого, раком желудка, раком молочной железы, колоректальным раком.

3. Сопоставить динамику изменений уровня пролиферативной активности лимфоцитов и экспрессии антигенов клеточной поверхности на разных стадиях заболевания у больных с различными онкологическими патологиями. Оценить функциональные сдвиги основных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов.

4. Охарактеризовать изменения в фенотипе лимфоцитов крови больных в зависимости от стадии заболевания, локализации и гистологического типа опухоли. Оценить фенотипические сдвиги в лимфоцитах онкологических больных в зависимости от течения и исхода заболевания.

5. Сопоставить функциональные и фенотипические изменения в лимфоцитах крови при различных онкологических заболеваниях и определить наиболее характерные системные сдвиги в функциях иммунной системы, происходящие в процессе опухолевого роста.

6. Выявить особенности состояния иммунной системы при онкологических заболеваниях по сравнению с аутоиммунными патологиями и хроническими инфекциями.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Изменения функциональной активности лимфоцитов крови у больных с разными онкологическими заболеваниями обусловлены активацией Treg супрессорных клеток, экспрессирующих маркер CD25. Эти клетки вызывают снижение уровня поликлональной активации лимфоцитов при стимуляции митогенами.

2. Прогрессирование опухоли сопровождается снижением эффективности взаимодействий между разными субпопуляциями лимфоцитов. Наиболее низкий пролиферативный ответ характерен для онкологических больных при стимуляции митогеном лаконоса, который индуцирует пролиферацию В-клеток только при совместном культивировании Т- и В-лимфоцитов.

3. У больных раком легкого и раком желудка фенотипические сдвиги характеризуются увеличением числа CD95⁺-лимфоцитов крови, что указывает на усиление Fas-зависимого апоптоза клеток при опухолевом росте.

4. Лимфоциты крови онкологических больных характеризуются усилением экспрессии активационных маркеров CD25, CD71, CD95, HLA-DR. Изменения в фенотипах лимфоцитов у больных с онкологическими заболеваниями носят более глубокий и системный характер по сравнению с больными с аутоиммунными заболеваниями и хроническими инфекциями.

Научная новизна. Впервые получены данные о комплексе функциональных и фенотипических изменений в лимфоцитах крови у больных раком легкого, раком желудка, раком молочной железы и колоректальным раком на разных стадиях заболеваний.

Впервые показано, что развитие опухоли сопряжено с угнетением клеточной пролиферации, стимулированной митогенами. При этом снижение пролиферативной активности лимфоцитов наиболее выражено при использовании митогена лаконоса, что свидетельствует о нарушении механизмов межклеточных Т-В взаимодействий.

Впервые установлено, что у больных раком желудка в большей степени подавлена функциональная активность CD4⁺, а у больных раком легкого – CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Впервые показано, что снижение пролиферативного ответа лимфоцитов в процессе роста опухоли у больных раком легкого носит обратимый характер и может восстанавливаться после радикального удаления опухоли.

Впервые охарактеризованы в сравнительном аспекте активационные фенотипы лимфоцитов крови больных раком легкого, раком желудка, раком молочной железы, колоректальным раком.

Впервые показано, что у больных раком легкого и раком желудка наиболее выражен фенотипический сдвиг в сторону лимфоцитов CD25⁺, CD95⁺.

Впервые показано, что уже на ранних стадиях рака желудка экспрессия рецептора апоптоза CD95 на лимфоцитах повышена и сохраняется на высоком уровне в процессе опухолевого развития, что свидетельствует об индукции Fas-опосредованной гибели клеток.

Теоретическое и практическое значение. На основании проведенных исследований и литературных данных предложена концепция развития взаимоотношений между иммунной системой и опухолевыми клетками, заключающаяся в том, что роль иммунной системы трансформируется в процессе онкогенеза. Это проявляется в последовательной смене противоопухолевого иммунного ответа толерантностью, анергией, а затем наступает этап, когда иммунная система способствует развитию опухолей и становится фактором опухолевой прогрессии. Одним из механизмов устойчивого роста опухолей является сдвиг в дифференцировке Treg-клеток (Th1→Th3) и активация супрессорных субпопуляций с фенотипом CD4⁺CD25⁺ (Tr1) с соответствующим изменением спектра секретируемых цитокинов (усиление синтеза ингибиторных цитокинов IL-10, TGF-β). Об этом свидетельствуют данные о системных функциональных и фенотипических сдвигах в лимфоцитах крови онкологических больных. Происходит значительное снижение пролиферативной активности CD4⁺, CD8⁻, CD19⁺-лимфоцитов крови при стимуляции митогенами. Одновременно с этим фенотипы лимфоцитов при опухолевом росте характеризуются усилением экспрессии активационных маркеров CD25, CD71, CD95, HLA-DR. У пациентов с разными онкологическими заболеваниями популяции лимфоидных клеток крови отличаются как по набору фенотипических маркеров активации, так и по степени поликлональной активации митогенами. У больных раком легкого значительно снижен пролиферативный ответ лимфоцитов при стимуляции КонА и МЛ, у больных раком желудка – при стимуляции ФГА, а у больных раком молочной железы – при стимуляции МЛ.

В наших исследованиях было установлено, что у больных раком легкого уровень пролиферации Т- и В-лимфоцитов в ответ на стимуляцию митогенами восстанавливается после радикальной операции. Поэтому определение пролиферативной активности лимфоцитов крови до и после операции может быть рекомендовано к использованию как показатель восстановления функциональной активности

иммунной системы в процессе лечения. Предложен способ интерпретации результатов бласттрансформации с использованием суммарного дозового эффекта, что позволит стандартизировать метод, и облегчит его использование на практике. Разработан оригинальный метод иммунодиагностики рака легкого с использованием кожной реакции "Способ дифференциальной диагностики новообразований легких". Сущность метода заключается в индукции реакции гиперчувствительности замедленного типа путем введения взвеси аутологичных лимфоцитов после их активации фитогемагглютинином. Метод защищен патентом на изобретение. Полученные результаты могут быть использованы для оценки иммунного статуса человека и при диагностике иммунологической недостаточности. Материалы диссертации используются в учебном процессе при чтении лекций по иммунологии студентам и ординаторам ПетрГУ.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на Всесоюзной конференции "Методология, организация и итоги массовых иммунологических обследований" (Москва-Ангарск, 1987), I Всесоюзном иммунологическом съезде (Сочи, 1989), Международном симпозиуме "Реабилитация иммунной системы" (Дагомыс, 1990), I Съезде иммунологов России (Новосибирск, 1992), на I съезде онкологов стран СНГ (Москва, 1996), Выездной сессии Отделения физиологии РАН (Петрозаводск, 1996), II и III Конференции хирургов Северо-Запада России (Санкт-Петербург, 1997, 2001), Международной конференции "Биологические основы изучения, освоения и охраны животного и растительного мира Восточной Фенноскандии" (Петрозаводск, 1999), II Съезде онкологов стран СНГ (Киев, 2000), IV, V, VI, VII Всероссийских научных конференциях с международным участием "Дни иммунологии в Санкт-Петербурге" (Санкт-Петербург, 2000, 2001, 2002, 2003), IV Съезде иммунологов и аллергологов СНГ (Москва, 2001), I, II, IV – XIII Национальных конгрессах по болезням органов дыхания (Москва – Санкт-Петербург, 1994 - 2003), Научной конференции "Карелия и РФФИ" (Москва - Петрозаводск, 2002), Международной конференции "Наземные и водные экосистемы Северной Европы" (Петрозаводск, 2003), Международной научно-практической школе-конференции "Цитокины. Воспаление. Иммунитет" (Санкт-Петербург, 2002).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 79 работ, в том числе 25 статей.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 247 страницах машинописного текста, содержит 32 таблицы, 38 рисун-

ков и состоит из введения, литературного обзора, описания материала и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованных источников. Список включает 570 ссылок, в том числе 56 работ на русском и 514 на иностранных языках.

Диссертационная работа выполнялась в соответствии с планом научно-исследовательских работ Института биологии Карельского научного центра РАН, включающем государственные задания и программы (№ гос. регистрации 01.90.0046799, 01.96.0000640, 01.20.0012497) и при поддержке гранта РФФИ, проект № 98-04-03521 (1998-2000г.)

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились с лимфоцитами крови онкологических больных, поступавших на лечение в хирургические отделения Республиканского онкологического диспансера. Всего было обследовано 1120 больных. Среди них было 398 больных раком легкого, 156 больных раком желудка, 84 больных колоректальным раком, 129 больных раком молочной железы, а также 136 больных с онкологическими заболеваниями органов мочевыделительной системы, эндокринной, репродуктивной систем и кожи.

Среди больных раком легкого в возрасте от 30 до 69 лет мужчин было 367, женщин – 31. Периферический рак диагностирован у 34,3%, центральный – у 65,7%. С I стадией рака легкого было 86, со II – 106, с III – 152 и с IV – 54 больных (согласно TNM классификации злокачественных опухолей, 1997). Основной гистологической структурой опухоли был плоскоклеточный рак (62,1%), аденокарцинома диагностирована в 21,7% и мелкоклеточный рак – в 16,2% наблюдений.

Среди больных раком желудка в возрасте от 28 до 84 лет было 109 мужчин и 47 женщин. Средний возраст составил 59,7 лет. Кардиоэзофагеальный рак диагностирован у 25,4%, рак тела желудка - у 36,4% и выходного отдела - у 38,2%.

В группе больных колоректальным раком большинство составили мужчины – 53, а женщин было 31. Средний возраст в этой группе - 63,7 года. Рак ободочной кишки диагностирован у 43, а рак прямой кишки – у 41 пациента. Обследованы 5 больных раком пищевода, все мужчины, средний возраст которых составил 50,2 лет.

Среди больных раком желудка I-II стадии заболевания были диагностированы в 27,6% случаев, III стадия - в 48,3% и IV стадия - в

24,1%. У лиц с опухолями толстой кишки I-II стадии заболевания выявлены в 46,7%, III стадия - в 53,3% наблюдений.

Основной гистологической структурой опухолей желудочно-кишечного тракта была аденокарцинома. В желудке встречались различные ее разновидности: папиллярная, тубулярная и перстневидноклеточная. В толстой кишке у обследуемых лиц преобладала тубулярная аденокарцинома. В то же время во всех случаях опухоли пищевода был диагностирован плоскоклеточный рак.

Согласно классификации по Laugen рак кишечного типа был диагностирован в 57,6%, а диффузного типа - в 42,4% наблюдений.

Были обследованы 129 больных раком молочной железы в возрасте от 32 до 69 лет, средний возраст составил 48,9 лет. Среди больных раком молочной железы I-II стадии заболевания диагностированы у 38, III стадия - у 56 и IV стадия - у 35 женщин. Основной гистологической формой опухолей молочной железы была аденокарцинома.

Были исследованы лимфоциты крови 68 больных с хроническими неспецифическими заболеваниями легких (ХНЗЛ) и 46 больных с доброкачественными опухолями легких (ДОЛ). В группе больных ХНЗЛ большинство были мужчины 61 из 68, средний возраст составил 45,7 лет. Среди лиц с ДОЛ мужчин было 42 и 4 женщины. Средний возраст в этой группе составил 46,9 лет. Также были исследованы лимфоциты крови 86 больных с аутоиммунным заболеванием (аутоиммунный тиреоидит и ревматоидный артрит), 17 больных вирусным гепатитом и 184 здоровых донора в возрасте от 21 до 68 лет.

Определение пролиферативной активности лимфоцитов. В наших исследованиях был использован вариант реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ), основанный на включении меченного по тритию тимидина (^3H -тимидин), и рекомендованный ВОЗ для определения пролиферативного ответа Т- и В-лимфоцитов крови человека (Фримель, 1987). Пролиферативная активность Т- и В-лимфоцитов крови у онкологических больных оценивалась в РБТЛ с поликлональными митогенами по включению ^3H -тимидина. Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе в 96-луночных планшетах "Linbro" в среде RPMI-1640 ("Serva") с добавлением 200 мкг/мл глутамин ("Flow"), 0,02 М HEPES ("Serva"), 100 мкг/мл гентамицин ("Фармахим"). Время культивирования клеток составляло 72-96 часов. За 16-18 часов до окончания культивирования в каждую лунку вносили ^3H -тимидин в объеме 20 мкл по 40 кБк (1 мкКи). Были использованы три митогена ("Serva"), которые стимулируют разные субпопуляции лимфоцитов: фитогемагглютинин (ФГА), конканавин-

лин А (КонА), митоген лаконоса (МЛ). Известно, что на поликлональные митогены реагирует относительно большая популяция лимфоцитов (ФГА – 8-12%, КонА – 23-26%), поэтому число трансформированных клеток может быть высоким (до 80%) (Йегер, 1990). В контрольные пробы не вносили митоген. Все варианты опытных проб и контроль ставили в трех параллелях. Радиоактивность измеряли на автоматическом счетчике “Бета” и результаты представляли в виде индекса стимуляции (ИС), рассчитанного по следующей формуле: (опыт имп/мин)/(контроль имп/мин).

В предварительных исследованиях подбирались оптимальные условия культивирования клеток (72-96 часов), время внесения метки – ³Н-тимидина (за 24, 16, 12 и 4 часа до окончания культивирования) и дозы митогена. Были испытаны разные концентрации митогенов: 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100 мкг/мл. В дальнейшей работе были использованы оптимальные дозы (5, 20, 40 мкг/мл).

Постановка кожной реакции с аутологичными лимфоцитами, обработанными ФГА. Данный раздел исследований был посвящен разработке нового способа диагностики новообразований легких *in vivo*. Для этого были подобраны условия постановки кожного теста с аутологичными лимфоцитами. В качестве антигена, вызывающего реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) использовали аутологичные лимфоциты после их инкубации с ФГА. Лимфоциты выделяли из гепаринизированной крови больных методом градиентного центрифугирования, подсчитывали количество клеток и делили на две пробы. В одну из проб добавляли ФГА (опыт), во вторую – аналогичный объем физиологического раствора (контроль) и инкубировали 30 минут при 37°C. Затем клеточную взвесь освобождали центрифугированием от несвязанного ФГА, вновь подсчитывали количество клеток и полученные взвеси лимфоцитов вводили внутривожно на предплечье. Результаты учитывали через 24 - 72 часа. Классическая реакция ГЗТ, в виде зоны гиперемии и уплотнения, поддающейся учету (измерение диаметра эритемы), развивалась в варианте, где фактором, инициирующим реакцию, служили аутологичные лимфоциты, обработанные ФГА. Осложнений при постановке проб не было. ГЗТ ставили больным при поступлении в стационар, а затем на 30-е сутки после операции и по возможности в более отдаленные сроки (от нескольких месяцев до 3-х лет).

Кожные реакции с аутологичными лимфоцитами были изучены у 220 больных с различными заболеваниями легких. Полученные результаты позволили получить патент на изобретение N 2051385

"Способ дифференциальной диагностики новообразований легких", зарегистрированный в Гос. реестре изобретений 27.12.1995г.

Определение поверхностных маркеров лимфоцитов методом непрямой иммунофлуоресценции. Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили с использованием моноклональных антител (МКА) серии ИКО "Биоскрин" (НИИ клинической онкологии ОНЦ РАМН). Набор МКА включал ИКО-86 (CD4), ИКО-31 (CD8), ИКО-91 (CD22), ИКО-1 (HLA-DR), ИКО-116 (CD16), ИКО-105 (CD25), ИКО-92 (CD71). Также были использованы моноклональные антитела серии ЛТ фирмы "Сорбент ТМ", Москва (Институт иммунологии МЗ РФ): ЛТ3 (CD3), ЛТ4 (CD4), ЛТ8 (CD8), ЛНК16 (CD16), ЛТ19 (CD19), ЛТ25 (CD25), ЛТ71 (CD71), ЛТ95 (CD95), HLA-DR. Иммунофлуоресцентный метод выполняли в модификации, предложенной Институтом иммунологии МЗ РФ и в соответствии с методическими рекомендациями "Стандартизация методов иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга" (1999). В качестве вторых антител использовали F(ab)2-фрагменты антител к Ig мыши, меченные ФИТЦ. Лимфоциты для всех исследований выделяли из гепаринизированной крови центрифугированием на градиенте фиколл-верографин (плотность 1,077 г/мл). В каждом опыте ставили положительный (по общему лейкоцитарному антигену CD45) и отрицательный контроль. Неспецифическое связывание меченой сыворотки составляло не более 4%. Число клеток, имеющих тот или иной мембранный маркер, выражали в % к общему числу лимфоцитов.

Статистическую обработку данных проводили по общепринятым в биологических и медицинских исследованиях методам. Достоверность различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

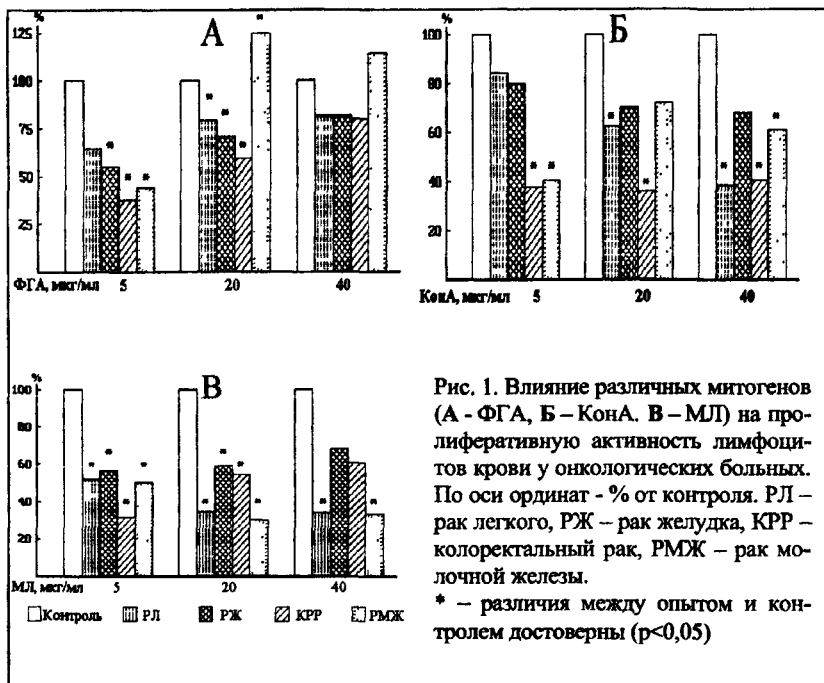
Характеристика функциональной активности лимфоцитов крови у онкологических больных

Была изучена пролиферативная активность разных субпопуляций лимфоцитов как показатель функционального состояния иммунной системы у больных с онкологическими заболеваниями. Уровень стимулированной митогенами пролиферации лимфоцитов периферической крови определяли у больных раком легкого, раком желудка, раком молочной железы, колоректальным раком.

Общая тенденция подавления пролиферации оказалась характерной для всех трех митогенов. При использовании ФГА значительное снижение пролиферативной активности отмечено у больных раком легкого,

раком желудка, колоректальным раком (рис. 1-А). Исключение составляет только группа больных раком молочной железы, в которой при высоких дозах ФГА (20 и 40 мкг/мл) уровень пролиферации лимфоцитов был даже несколько выше, по сравнению со здоровыми донорами, хотя при дозе митогена 5 мкг/мл стимуляция была все-таки снижена. По мере роста концентрации ФГА для всех исследованных групп больных отмечено уменьшение различий с группой доноров.

При стимуляции КонА у больных раком желудка не обнаруживается существенных различий в пролиферативной активности лимфоцитов по сравнению со здоровыми лицами при всех использованных дозах митогена (рис. 1-Б). Группа больных колоректальным раком отличалась от здоровых доноров, а также от других групп больных резко выраженным снижением уровня пролиферации при всех дозах митогена. У больных раком легкого пролиферативный ответ снижался по мере увеличения концентрации КонА. При раке молочной железы существенное снижение пролиферации отмечалось только при минимальной и максимальной дозе данного митогена.



Наиболее выраженная реакция подавления пролиферативной активности лимфоцитов у онкологических больных имела место при стимуляции МЛ. Можно видеть (рис. 1-В), что во всех группах больных присутствует заметно более низкий уровень пролиферации по сравнению с группой здоровых. Особенно это проявляется у больных раком легкого и раком молочной железы, в этих группах наблюдается снижение уровня пролиферации в несколько раз (2 и более). Наименьшее влияние оказывает наличие опухоли в желудочно-кишечном тракте; при максимальной дозе МЛ у этих групп отличия от доноров были недостоверными.

Анализ полученных результатов показывает, что наиболее существенное снижение пролиферативной активности лимфоцитов у онкологических больных выявляется при стимуляции МЛ, затем в несколько меньшей степени при стимуляции КонА, а при использовании ФГА уровень бластной трансформации в целом снижается меньше, чем при МЛ и при КонА.

Это означает, что при опухолевом росте наиболее выражено нарушение Т-зависимого В-клеточного пролиферативного ответа, который связан с наличием адекватных межклеточных взаимодействий, необходимых для индукции пролиферации МЛ. Присутствие опухоли также обуславливает снижение пролиферативного потенциала $CD8^+$ Т-лимфоцитов, которые являются основными клетками мишенями для КонА. В меньшей степени происходит и подавление функциональной активности $CD4^+$ Т-клеток, которые стимулируются ФГА.

Анализ пролиферации клеток в зависимости от концентрации митогена показывает, что низкие дозы КонА (5 мкг/мл) могут вызывать значительную стимуляцию лимфоцитов при раке легкого и раке желудка, вполне сравнимую с уровнем в контроле. В то же время, больные раком молочной железы и колоректальным раком характеризуются значительным подавлением пролиферативной активности клеток при низких дозах МЛ и КонА. Индукция бласттрансформации лимфоцитов ФГА отличалась тем, что высокие концентрации митогена (20 и 40 мкг/мл) оказывали примерно одинаковое влияние на ответ лимфоцитов при раке легкого, раке желудка, колоректальном раке, и только при раке молочной железы уровень пролиферации имеет даже тенденцию к повышению относительно уровня пролиферации лимфоцитов доноров. Особенностью стимуляции клеток КонА было то, что для более высокого пролиферативного ответа требовались и более высокие дозы этого митогена при раке молочной железы. В ответе на МЛ следует отметить низкий уровень пролиферации при дозе 5 мкг/мл у больных колоректальным раком.

Таким образом, имеется значительная дозовая зависимость пролиферативного ответа, причем для большинства изученных типов рака отсутствует достаточно четкая корреляция между концентрацией митогенов и уровнем поликлональной активации. Поскольку ФГА, КонА, МЛ стимулируют разные группы клеток ($CD4^+T$, $CD8^+T$, $CD4^+T$ -зависимые В-лимфоциты), то, просуммировав значения индексов стимуляции, обусловленные разными дозами, например ФГА, можно получить суммарный индекс стимуляции, который будет отражать уровень пролиферации ФГА-реактивных лимфоцитов данного индивидуума. Этот способ интерпретации РБТЛ более удобен для практического применения. На рисунке 2 показана суммарная величина уровня пролиферации при стимуляции тремя дозами митогенов. В этом случае сразу можно сопоставить индексы стимуляции данной группы больных с аналогичными показателями здоровых доноров, сравнить разные группы больных между собой, а также оценить ответы на разные дозы митогена. Можно видеть совершенно четко, каков уровень пролиферативного ответа в разных группах больных.

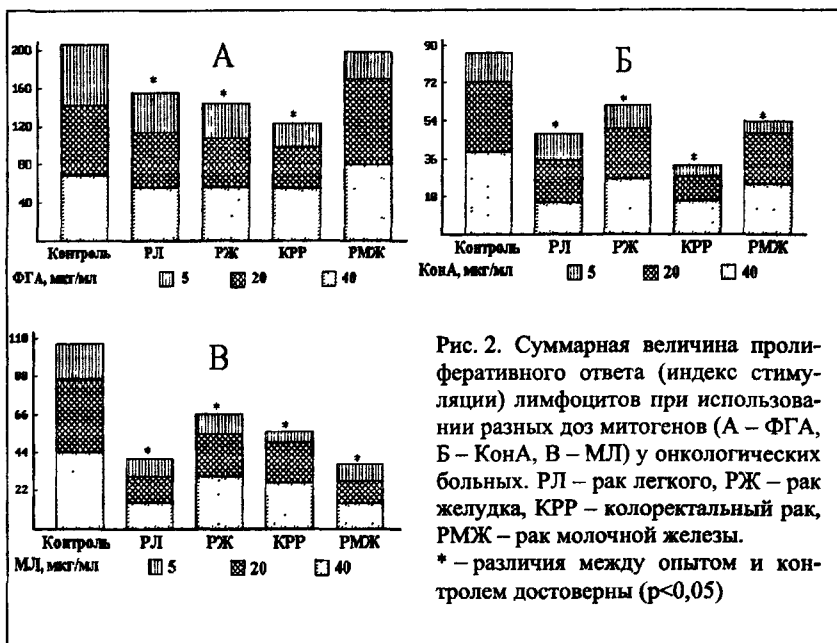


Рис. 2. Суммарная величина пролиферативного ответа (индекс стимуляции) лимфоцитов при использовании разных доз митогенов (А – ФГА, Б – КонА, В – МЛ) у онкологических больных. РЛ – рак легкого, РЖ – рак желудка, КРР – колоректальный рак, РМЖ – рак молочной железы. * – различия между опытом и контролем достоверны ($p < 0,05$)

При использовании ФГА наиболее низким был общий ответ в группах больных колоректальным раком и раком желудка, а наиболее высоким — у больных раком молочной железы (рис. 2—А). Соотношение между тремя разными дозами митогена в группах больных раком легкого, раком желудка и колоректальным раком мало отличалось от группы доноров. Пропорция была несколько нарушена при раке молочной железы, где наблюдалось изменение соотношения клеток, отвечающих на дозы 40, 20 и 5 мкг/мл в сторону увеличения доли клеток, отвечающих на среднюю дозу. Если в контроле это соотношение составляло 34:35:31, то в группе больных раком молочной железы оно равнялось 40:46:14. А в группе больных колоректальным раком происходило некоторое увеличение доли клеток, отвечающих на дозу 40 мкг/мл (45:35:20). Таким образом, несмотря на значительное снижение уровня пролиферации у онкологических больных, соотношение субпопуляций лимфоцитов, отвечающих на ФГА при раке легкого и раке желудка, остается таким же, как и в контроле, тогда как при раке молочной железы и колоректальном раке отмечается сдвиг в сторону увеличения доли клеток, реагирующих на высокие дозы митогена.

Также более четкую картину изменения пролиферативной активности лимфоцитов можно получить при определении суммарной величины уровня пролиферации при стимуляции разными дозами КонаА. Наиболее значительное подавление ответа на митоген отмечается в группах больных раком легкого и колоректальным раком (рис. 2—Б). Однако, соотношение клеток, отвечающих на разные дозы митогена, существенно меняется только у больных раком легкого в сторону повышения доли клеток, реагирующих на дозу 5 и 20 мкг/мл (45:39:16 в контроле и 31:44:25 у больных раком легкого). В то же время у больных раком желудка и колоректальным раком это соотношение оставалось близким к контролю.

При стимуляции МЛ наблюдалось значительное снижение общего пролиферативного потенциала лимфоцитов у больных раком легкого и раком молочной железы (рис. 2—В). Соотношение клеток, реагирующих на разные дозы МЛ, практически мало отличалось от контроля, за исключением больных раком молочной железы и раком легкого. В этих группах больных увеличивалась доля клеток, отвечающих на дозу 5 мкг/мл (40:41:19 в контроле, 39:34:27 при раке молочной железы, 37:37:26 при раке легкого), в то время как у больных колоректальным раком доля таких клеток снижалась (47:42:11).

Такое представление результатов РБТЛ делает их значительно более наглядными и существенно облегчает их интерпретацию. Та-

ким образом, в предлагаемом варианте метод может быть рекомендован к практическому использованию при иммунологических исследованиях как показатель функциональной активности иммунной системы. Можно предложить и конкретное название показателя, например, пролиферативная активность ФГА-реактивных лимфоцитов, КонА-реактивных лимфоцитов, МЛ-реактивных лимфоцитов и т.д.

Если использовался не один митоген, то, сложив суммарные индексы стимуляции, полученные для разных митогенов можно более отчетливо определить соотношение уровня пролиферации в разных группах больных и оценить вклад каждого митогена в общий пул индуцированной пролиферации (рис. 3). Видно, что наиболее значительное угнетение процесса пролиферации происходит при раке легкого и колоректальном раке, хотя и при раке желудка и молочной железы суммарный индекс стимуляции трех митогенов достоверно снижен по отношению к контролю. Такой способ представления результатов помогает также наглядно представить пропорции между лимфоцитами – участниками пролиферативного ответа, которые стимулируются разными митогенами.



Пролиферативная активность лимфоцитов у больных с разными стадиями онкологического заболевания

Для оценки изменения функционального состояния лимфоцитов по мере прогрессирования опухоли была изучена их пролиферативная активность у больных раком легкого на разных стадиях заболевания. Отчетливое снижение уровня включения ^3H -тимидина по мере роста опухоли проявилось при стимуляции лимфоцитов КонаА и ФГА (рис. 4). Наиболее существенное подавление пролиферации лимфоцитов мы наблюдаем у больных с III-IV стадией в ответе на КонаА.

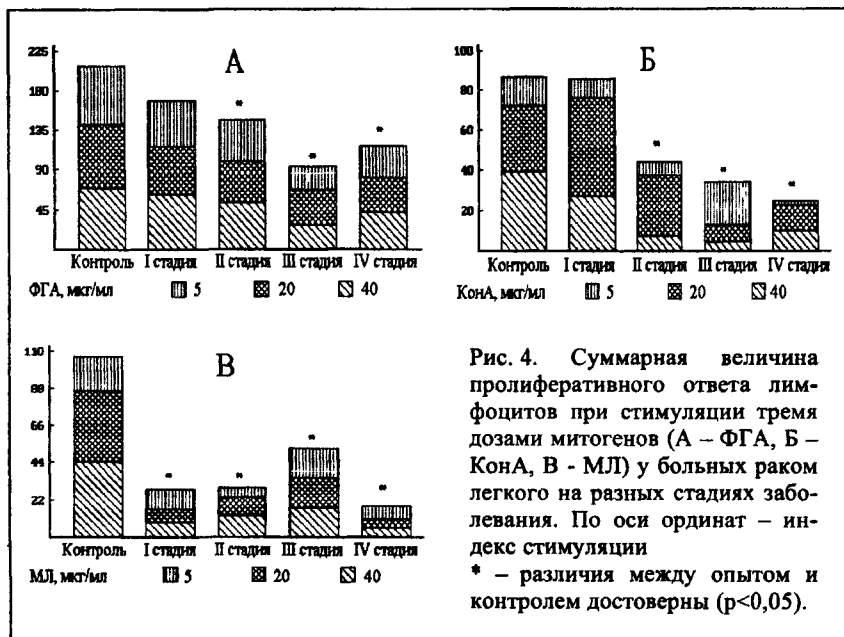


Рис. 4. Суммарная величина пролиферативного ответа лимфоцитов при стимуляции тремя дозами митогенов (А – ФГА, Б – КонаА, В - МЛ) у больных раком легкого на разных стадиях заболевания. По оси ординат – индекс стимуляции
* – различия между опытом и контролем достоверны ($p < 0,05$).

В несколько меньшей степени, но все-таки снижение пролиферативной активности отмечено и для ФГА. Низкий уровень пролиферации здесь также наблюдается преимущественно у больных с III-IV стадией рака легкого. При стимуляции МЛ резкое снижение уровня пролиферации происходит уже на ранних стадиях заболевания (I-II стадии), на III стадии пролиферативная активность восстанавливается почти до контрольного уровня, а IV стадия заболевания характеризуется значительным подавлением функциональной активности МЛ-

реактивных клеток. Так как на стимуляцию МЛ отвечают пролиферацией В-клетки, получившие активационный сигнал от Т-лимфоцитов, то причиной могут быть нарушения на уровне механизмов, регулирующих межклеточные взаимодействия, в частности, сдвиги в дифференцировке Th1/Th2 CD4⁺-лимфоцитов и изменения в синтезе и рецепции цитокинов. Низкий уровень пролиферативной активности лимфоцитов при стимуляции МЛ уже на начальных этапах развития злокачественных новообразований, может быть использован как один из критериев для ранней диагностики рака легкого.

В целом, несомненно, наблюдается четкое изменение потенциала иммунной системы по мере опухолевого роста. Для исследованных групп лимфоцитов, реагирующих на разные митогены, характерно подавление функциональной активности, усиливающееся по мере развития заболевания.

Было исследовано также влияние гистологического типа опухоли на интенсивность пролиферации лимфоцитов, стимулированной разными митогенами. Проведено сравнительное изучение групп больных с мелкоклеточным раком легкого, эпидермоидным раком легкого и аденокарциномой. Подавление пролиферативной активности обнаруживалось во всех группах больных, однако, достоверных различий между группами не выявлено. Лишь как тенденцию можно отметить самый низкий средний уровень индекса стимуляции у больных с мелкоклеточным раком.

Динамика пролиферативной активности лимфоцитов в процессе лечения

Учитывая широкий индивидуальный разброс показателей реактивности иммунной системы, в специальном исследовании проанализировали персональную динамику пролиферативного ответа лимфоцитов в процессе лечения. Определялась величина индекса стимуляции у больных с III стадией рака легкого до хирургической операции и на 14-е сутки послеоперационного периода. В целом наблюдался некоторый рост пролиферативной активности лимфоцитов после операции, наиболее заметный при дозе ФГА 40 мкг/мл ($p < 0,05$). Анализ динамики уровня пролиферации лимфоцитов у каждого больного показал, что их можно разделить на три группы. В первую группу вошли пациенты (60%), у которых наблюдалось четкое усиление пролиферативного потенциала лимфоцитов в ответе на все три митогена, при этом, изначально до операции, у этих больных

отмечался невысокий уровень стимуляции. Удаление опухоли и последующая терапия оказали благоприятное воздействие на больных и, в частности, на активность клеток иммунной системы. Рост пролиферации в ответ на все митогены свидетельствует об общем восстановлении функций иммунной системы и реактивности Т- и В-лимфоцитов. Это означает, что восстанавливаются межклеточные взаимодействия, нарушенные в результате заболевания, нормализуется синтез цитокинов, участвующих в реализации бласттрансформации лимфоцитов. Клиническая картина у этой группы больных сопровождалась существенным улучшением состояния после операции. Таким образом, рост функциональной активности в ответ на КонА, ФГА, МЛ является подтверждением эффективности проведенной терапии и может служить прогностическим признаком положительного результата лечения.

Вторая группа включала больных (26,7%), у которых особых изменений в уровне пролиферации в послеоперационный период не произошло. У остальных пациентов (13,3%) пролиферативный ответ на ФГА, КонА и МЛ снижался через две недели после операции, что может быть связано с наличием у данной группы больных сопутствующих заболеваний, которые могли оказать влияние на функции лимфоидных клеток. Анализ результатов исследований у этих больных не выявил определенных тенденций. Рост ответа на ФГА мог сочетаться со снижением реакции на КонА или наоборот. Было замечено, что у больных с сопутствующей инфекцией или другими заболеваниями неопухолевого характера пролиферативный ответ на МЛ, как правило, возрастает, а на КонА и ФГА падает. В то же время следует отметить, что при исходно (до операции) низком индексе стимуляции наблюдается рост уровня пролиферации через две недели после операции, а при исходно высоком – в послеоперационный период не происходит значительных изменений в пролиферативной активности.

Если расположить номера больных в порядке убывания их первоначального индекса стимуляции (до операции), то можно увидеть, что более выраженный рост уровня пролиферации имеет место у пациентов с исходно более низким первоначальным уровнем (рис. 5). Особенно это характерно для КонА и МЛ (больные в правой части диаграммы). А у большинства больных с исходно высокими показателями не происходило значительных изменений в пролиферативной активности лимфоцитов (на диаграмме в основном слева и по центру).

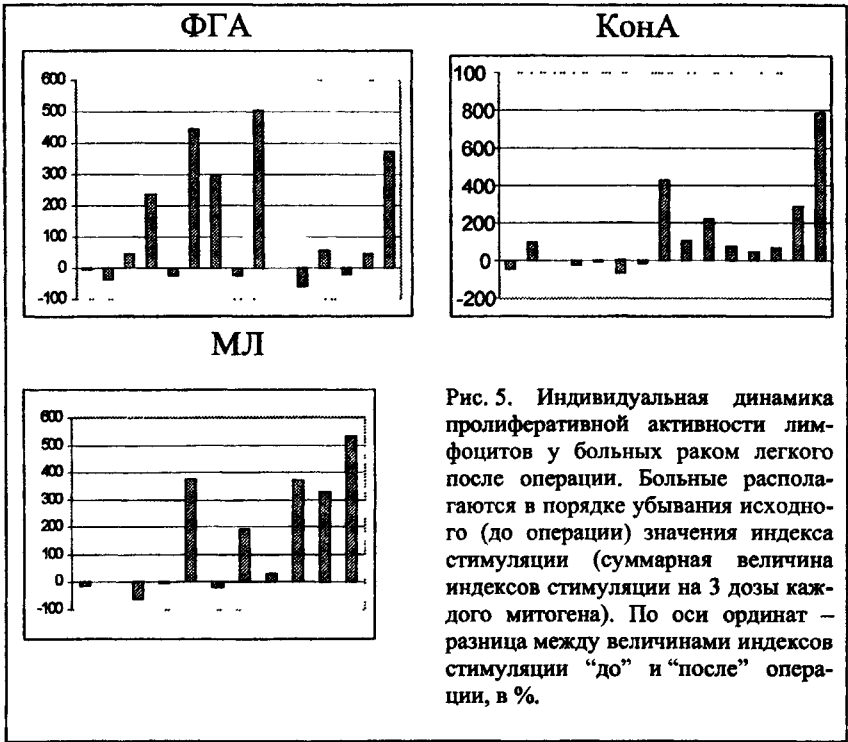


Рис. 5. Индивидуальная динамика пролиферативной активности лимфоцитов у больных раком легкого после операции. Больные располагаются в порядке убывания исходного (до операции) значения индекса стимуляции (суммарная величина индексов стимуляции на 3 дозы каждого митогена). По оси ординат – разница между величинами индексов стимуляции “до” и “после” операции, в %.

В ряде случаев отмечалось смещение пика включения ³H-тимидина в сторону меньших концентраций КонА, что может быть связано с активацией CD8⁺-лимфоцитов после операции. Следовательно, нормальная иммунная реакция в послеоперационный период объясняется в значительной степени восстановлением активности этой субпопуляции Т-лимфоцитов. Подтверждением такого вывода служит и тот факт, что динамика ответа на ФГА и МЛ в зависимости от дозы митогена практически не изменялась, совпадая по форме "доза-эффект" с группой доноров.

Таким образом, в процессе опухолевого роста происходит снижение пролиферативной активности лимфоцитов крови при стимуляции ФГА, КонА, МЛ. При использовании МЛ подавление пролиферативного ответа лимфоцитов наиболее велико, причем уже на ранних стадиях опухолевого роста. Значительное подавление пролиферативного ответа наблюдается у больных раком легкого в ответе на КонА и МЛ, у больных раком желудка при стимуляции ФГА, при раке молочной железы – при стиму-

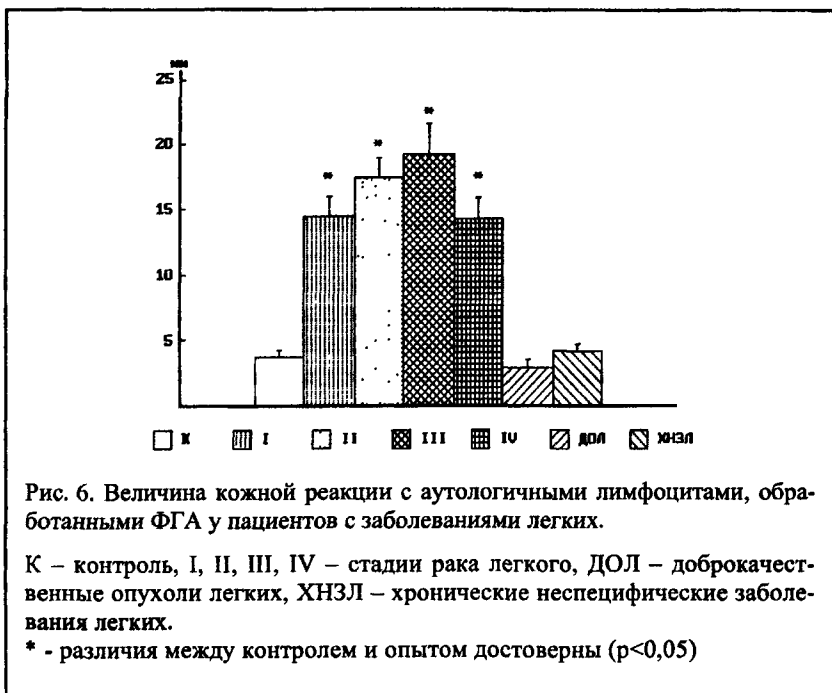
ляции МЛ и у больных колоректальным раком в ответе на ФГА и КонА. Степень снижения пролиферативного потенциала лимфоцитов крови увеличивается по мере развития опухоли: индекс стимуляции у больных с III-IV стадией рака легкого был в среднем значительно меньшим, чем у пациентов с I-II стадией болезни. Предложенный способ интерпретации результатов РБТЛ с определением суммарного индекса стимуляции при использовании разных доз митогена ИС (5+20+40), а также суммарного пула пролиферации при использовании разных митогенов ИС (ФГА+КонА+МЛ), значительно облегчает анализ полученных данных и может быть рекомендован для использования в клинической практике.

Оценка состояния клеточного иммунитета у больных раком легкого с использованием реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)

ГЗТ – Т-зависимая иммунная реакция, в основе которой лежит специфическое взаимодействие между Т-лимфоцитами и антигеном, проявляющаяся в виде воспаления в месте попадания антигена в организм. У человека интенсивность ГЗТ можно определить по диаметру уплотненного участка кожи с гиперемией через 24-48 часов после инициации реакции.

Было проведено изучение функционального состояния иммунной системы онкологических больных с использованием разработанного нами способа постановки кожной реакции ГЗТ с модифицированными аутологичными лимфоцитами. ГЗТ была индуцирована путем внутрикожного введения взвеси аутологичных лимфоцитов, предварительно модифицированных инкубацией *in vitro* с Т-клеточным митогеном – ФГА. Предварительно были подобраны оптимальные концентрации ФГА, не вызывающие агглютинации клеток.

Величина кожной реакции у больных раком легкого была значительно выше, чем у здоровых индивидуумов (рис. 6). Величина эритемы у больных в среднем составила $17,2 \pm 2,5$ мм. Наблюдалось увеличение диаметра эритемы в зависимости от стадии заболевания. Максимальные зоны гиперемии отмечены у больных с III стадией, а у больных с IV стадией реакция была такой же, как при I стадии. На I-III стадии болезни положительная реакция наблюдалась в 92,9% случаев, при IV стадии - в 80,0%. Частота положительных реакций у больных доброкачественными опухолями легких (ДОЛ) составила 7,1%, при хронических неспецифических заболеваниях легких (ХНЗЛ) – 10,4%, а у здоровых лиц – 5,0%



С целью определения практической значимости реакции ГЗТ с аутологичными лимфоцитами, обработанными ФГА, для послеоперационного мониторинга исследовано 118 больных раком легкого, перенесших хирургическое лечение. Из 107 радикально оперированных больных положительная реакция до операции наблюдалась в 99 случаях (92,5%), а в группе не радикально оперированных - у 10 из 11 (90,9%). На 30-е сутки среди больных, у которых была выполнена радикальная операция, положительная кожная проба сохранялась лишь в 7 случаях (6,1%), в то время как у больных, которым была выполнена пробная торакотомия, реакция оставалась положительной во всех 10 случаях.

Полученные данные дают основание рассматривать реакцию ГЗТ с аутологичными лимфоцитами, обработанными ФГА, в качестве одного из дифференциальных признаков в комплексной диагностике рака легкого.

Фенотипическая характеристика лимфоцитов крови у онкологических больных

У онкологических больных изучалась экспрессия дифференцировочных (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19) и активационных (CD25, CD71, CD95,

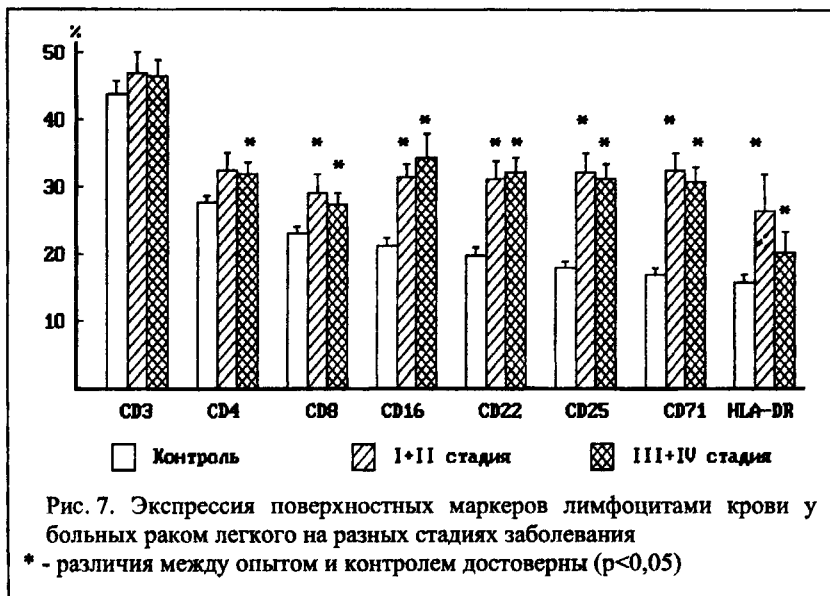
CD98, HLA-DR) антигенов лимфоцитов крови. Исследовались пациенты с опухолями легкого, раком желудка, раком молочной железы, колоректальным раком, раком мочевого пузыря, раком поджелудочной железы, раком яичников и другими опухолями. По сравнению со здоровыми донорами у онкологических больных в среднем отмечается значительное увеличение числа CD16⁺, CD25⁺, CD95⁺, HLA-DR⁺-клеток. Среди активационных маркеров обращает на себя особое внимание динамика экспрессии CD25, CD71 и CD95, так как по мере развития опухолей совершенно отчетливо происходит усиление экспрессии этих антигенов. Наиболее высокие уровни для CD25 и для CD95 отмечены на III-IV стадиях заболевания.

При анализе экспрессии поверхностных маркеров на лимфоцитах крови у больных с разными локализациями опухолевого роста оказалось, что при раке желудка, легкого, мочевого пузыря и при колоректальном раке среди активационных антигенов можно выделить заметное усиление экспрессии CD25. Уровень экспрессии маркера апоптоза CD95 был наиболее высоким при раке желудка, в то время как рецептор трансферрина CD71 - при колоректальном раке. Причем, при раке желудка и раке легкого усиление экспрессии Fas-антигена сопровождалось ростом экспрессии и другого активационного маркера CD71.

Изменение фенотипа лимфоцитов периферической крови у больных раком легкого

Экспрессия исследованных маркеров на лимфоцитах больных раком легкого существенно отличалась от показателей в контрольной группе здоровых доноров. Число CD16⁺-лимфоцитов значительно превышало контрольный уровень (30,9±2,0 и 21,1±1,3, соответственно, p<0,01). Количество CD25⁺-клеток у больных раком легкого почти вдвое превышало показатели доноров (32,2±1,6 и 17,9±1,0, p<0,001). Аналогичная картина наблюдалась с экспрессией рецептора трансферрина CD71, который, как правило, обнаруживается преимущественно на лимфоцитах и участвует в железозависимом росте клеток. У больных раком легкого число CD71⁺-клеток составляло 31,8±1,7, а у доноров - 16,9±1,0, p<0,001.

Повышенная экспрессия молекулы CD25, вероятно, была связана с ростом числа Treg-супрессоров, имеющих фенотип CD4⁺CD25⁺, так как есть данные, что при раке желудка, эзофагеальном раке и раке молочной железы количество CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в крови увеличивается в два и более раза по сравнению с контролем (Liyanage et al., 2002; Ichihara et al., 2003).



Для более детального анализа больные раком легкого были разделены на группы по стадиям заболевания, по гистологическому типу опухолей (аденокарцинома, эпидермоидный рак, мелкоклеточный рак), и локализации опухоли (центральная и периферическая). Оказалось, что уже на ранних стадиях (I-II) заболевания значительно усиливается экспрессия маркеров активации CD25, CD71, HLA-DR (рис. 7), которая лишь в незначительной степени уменьшается по мере развития опухоли (III-IV стадия). Происходит и увеличение экспрессии дифференцировочных антигенов CD4, CD8, CD16, CD22 у больных раком легкого, хотя в последнем случае не обнаруживается тенденции к ее ослаблению по мере усиления опухолевого процесса. Только количество CD3 у больных не отличалось от контрольного уровня. В то же время существенных различий между группами больных с разными гистологическими типами опухоли легкого и с различной ее локализацией по уровню экспрессии изученных мембранных маркеров лимфоцитов не выявлено.

Таким образом, при раке легкого клетки иммунной системы обладают выраженным активационным фенотипом. Следует особо подчеркнуть наличие существенно повышенного уровня экспрессии

маркеров активации уже на начальных (I-II) стадиях заболевания, что может служить одним из важных аргументов, подтверждающих существование иммунологической реакции на опухолевые клетки.

Изменение фенотипа лимфоцитов периферической крови при раке желудка

Среди больных с опухолями в разных отделах желудочно-кишечного тракта наиболее часто встречаются лица с раком желудка. Всего было обследовано 66 больных (46 мужчин и 20 женщин). Кардиоэзофагеальный рак диагностирован у 25,4%, рак тела желудка – у 36,4%, рак выходного отдела – у 38,2%.

Был проведен анализ особенностей экспрессии дифференцировочных и активационных маркеров лимфоцитов на различных стадиях рака желудка (табл.). Изменения иммунологических показателей наиболее выражены при III стадии рака желудка. У таких больных отмечено наибольшее число клеток, несущих маркеры CD16, CD19, CD25, CD71, CD95 и HLA-DR ($p < 0,05$). Содержание основных субпопуляций Т-лимфоцитов CD3⁺ и CD8⁺ в сравниваемых группах больных существенно не отличалось от уровня в группе доноров. Число CD4⁺-лимфоцитов, было повышенным у больных с III стадией.

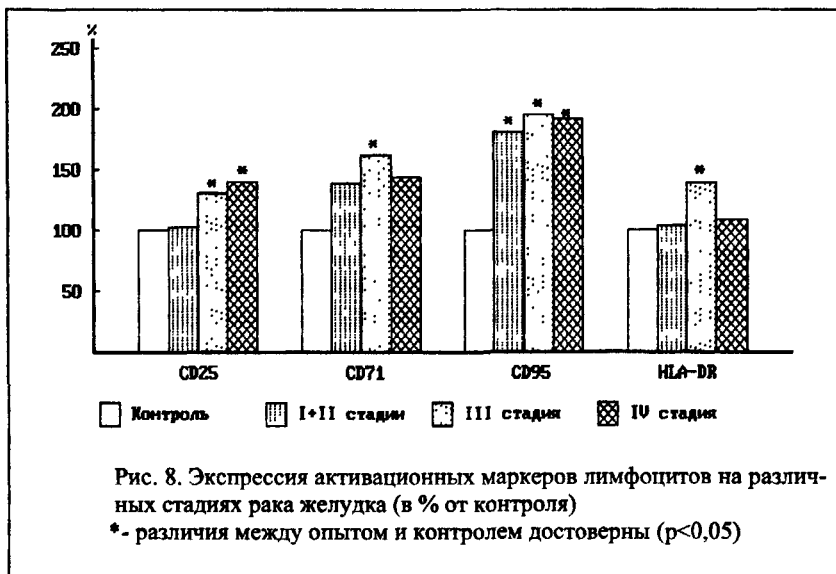
Таблица. Экспрессия поверхностных маркеров лимфоцитов на различных стадиях рака желудка (%)

Маркер	Контроль (n=38)	I-II стадии (n=18)	III стадия (n=32)	IV стадия (n=16)
CD3	57,6±1,6	62,8±2,4	63,3±2,0	62,8±2,4
CD4	29,8±1,2	34,5±2,2	35,0±1,6*	33,4±2,4
CD8	28,8±2,0	30,9±2,0	33,2±1,5	32,6±1,9
CD16	16,1±1,5	17,9±1,9	24,1±1,7*	20,5±2,4
CD19	12,1±1,9	16,4±1,5	21,9±1,9*	21,1±2,9*
CD25	16,0±1,3	16,3±2,0	20,9±2,0*	22,4±2,8*
CD71	11,4±2,0	15,9±1,6	18,5±1,6*	16,4±1,8
CD95	9,5±2,3	17,2±1,7*	18,6±1,7*	18,2±2,9*
HLA-DR	15,8±1,2	16,4±1,7	22,1±1,8*	17,2±2,0

* - различия между опытом и контролем достоверны ($p < 0,05$)

Следует особо отметить, что на всех стадиях рака желудка выявлен высокий уровень экспрессии рецептора апоптоза CD95 (рис. 8). Даже у больных с начальными стадиями заболевания (I-II) обнаруживается повышенное число CD95⁺-лимфоцитов и это может представлять интерес в плане использования маркера апоптоза в ранней

диагностике рака желудка. В то же время уровень экспрессии CD25, CD71 и HLA-DR на начальной стадии заболевания практически не отличался от контроля. Далее, по мере развития опухолевого процесса происходило усиление экспрессии и этих маркеров.



Больные с III стадией рака желудка характеризуются ростом экспрессии всех исследованных активационных маркеров, а при IV стадии обнаруживается повышенный уровень экспрессии CD25 и CD95. Таким образом, для больных раком желудка характерен активационный фенотип лимфоцитов, наиболее выраженный у больных с III стадией заболевания.

Была изучена также зависимость экспрессии поверхностных антигенов на лимфоцитах периферической крови больных раком желудка от гистологического типа опухоли. В частности, сравнивали иммунологические показатели при аденокарциноме с различной степенью дифференцировки (высокодифференцированная - рак кишечного типа, низкодифференцированная - рак диффузного типа). Оказалось, что значительное повышение уровня экспрессии поверхностных молекул лимфоцитов по сравнению с контролем наблюдается у больных раком желудка и кишечного и диффузного типа. В этих группах больных происходит усиление

экспрессии и дифференцировочных и активационных антигенов. Однако у лиц с низкодифференцированной аденокарциномой показатели экспрессии CD25 оказались более высокими, чем в группе больных раком кишечного типа ($p < 0,05$). Кроме того, в группе больных раком диффузного типа количество CD16⁺-лимфоцитов было повышенным по сравнению со второй группой ($p < 0,05$).

В зависимости от локализации опухоли в желудке различают кардиоэзофагеальный рак, рак тела желудка и рак выходного отдела. Группа больных раком тела желудка отличалась от остальных высоким уровнем экспрессии CD25. В то же время более высокий уровень экспрессии CD95 и HLA-DR отмечался на лимфоцитах периферической крови пациентов с кардиоэзофагеальным раком по сравнению с больными раком тела и выходного отдела желудка ($p < 0,05$).

Характеристика фенотипа лимфоцитов периферической крови у больных колоректальным раком

Среди активационных маркеров лимфоцитов периферической крови больных колоректальным раком наиболее высоким оказался уровень экспрессии CD71 ($p < 0,05$). В отношении остальных маркеров активации CD25, CD95 и HLA-DR можно отметить лишь тенденцию к усилению их экспрессии по сравнению с контролем.

Изучение зависимости иммунологических показателей от стадии опухолевого роста у больных раком толстой кишки выявило более высокое содержание в крови Т-клеток (CD3⁺) на I-II стадиях, чем на более поздних стадиях ($p < 0,05$). А в отношении численности остальных субпопуляций лимфоцитов (CD8⁺, CD16⁺, CD19⁺) особых различий по стадиям заболевания не наблюдалось.

Сравнительная оценка иммунологических показателей в зависимости от расположения опухоли в толстой кишке показала, что при раке прямой кишки повышено количество CD3⁺ и CD8⁺ лимфоцитов ($p < 0,05$). При раке ободочной кишки повышалось количество CD16⁺- и CD19⁺-клеток. Среди активационных маркеров было отмечено более значительное усиление экспрессии CD71 у больных раком ободочной кишки. Существенных различий в уровне экспрессии остальных активационных антигенов между сравниваемыми группами больных не выявлено.

Был проведен анализ экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов у больных колоректальным раком при различном течении заболевания. Больные находились под наблюдением в течение четырех лет после операции. В результате было выделено две группы больных: 1-я группа со стабилизацией процесса, которую мы оцени-

ваем как благоприятное течение, и 2-я группа с прогрессированием заболевания. В 1-й группе больных отмечено значительное усиление экспрессии маркеров CD16, CD19, CD71 и HLA-DR по сравнению с контролем. Кроме того, сравнение двух групп больных между собой выявило существенные различия в экспрессии активационных антигенов. Уровень экспрессии CD71 и HLA-DR был гораздо выше в 1-й группе, чем во 2-й ($p < 0,05$). Также можно отметить тенденцию к повышенной экспрессии и других маркеров активации CD25 и CD95 в группе больных со стабилизацией процесса.

Различия по изученным параметрам между группами больных с прогрессированием заболевания и стабилизацией позволяют предполагать, что усиление экспрессии активационных антигенов лимфоцитов CD71 и HLA-DR при колоректальном раке является благоприятным прогностическим признаком.

Сравнительная характеристика фенотипов лимфоцитов крови у больных с опухолями в различных отделах желудочно-кишечного тракта

Сопоставлялись группы больных с раком пищевода, раком желудка, колоректальным раком. Количество лимфоцитов, несущих рецептор трансферрина CD71, у пациентов с опухолями было существенно выше, чем у здоровых лиц, независимо от их локализации ($p < 0,05$). Наиболее значительные изменения наблюдались в экспрессии маркера апоптоза CD95. У больных раком пищевода и раком желудка количество CD95⁺-лимфоцитов оказалось значительно выше, чем у лиц с колоректальным раком.

При анализе зависимости экспрессии Fas-антигена от локализации опухоли (пищевод, кардиоэзофагеальный отдел, тело желудка, выходной отдел, ободочная и прямая кишка) выявлены более высокие уровни экспрессии CD95 в проксимальных отделах пищеварительного тракта по сравнению с дистальными. Существенные различия обнаруживаются между больными с кардиоэзофагеальным раком и раком ободочной и прямой кишки. Значительных различий в экспрессии CD25, CD71, CD98 и HLA-DR между данными группами не обнаружено. В разной степени повышение экспрессии молекул CD25, CD71, CD95 и HLA-DR происходит у всех онкологических больных. У больных раком желудка на всех стадиях заболевания лимфоциты крови характеризуются повышенной экспрессией рецептора апоптоза. При колоректальном раке фенотипы лимфоцитов крови больных отличались повышенным уровнем экспрессии CD71.

Влияние рекомбинантного IL-2 на иммунологические показатели онкологических больных

Современные исследования в онкоиммунологии показали, что перспективным методом воздействия на иммунную систему является цитокинотерапия. Цитокины могут функционировать как ингибиторы опухолевого развития и прогрессирования и поэтому представляют огромный интерес для онкологов. В то же время известно, что опухолевые клетки могут реагировать на цитокины, выделяющиеся в опухолевом микроокружении, усилением роста, ослаблением апоптоза и метастазированием (Dranoff, 2003). Изучение взаимодействий между цитокинами и развитием опухоли осложняется тем, что эти медиаторы отличаются плеiotропностью, избыточным синтезом, а эффект отдельных цитокинов может изменяться под действием микроокружения. Поэтому, выяснение любых конкретных деталей этих взаимодействий поможет пониманию функционирования иммунной системы и позволит более успешно манипулировать балансом цитокинов в терапии опухолей.

Группе онкологических больных была проведена комплексная терапия с использованием препарата ронколейкин ("Биотех", Санкт-Петербург), который является лекарственной формой рекомбинантного человеческого IL-2. Описан положительный эффект его использования у некоторых больных с глиомами мозга, раком мочевого пузыря, меланомой и раком почки (Свадовский и соавт., 1996; Козлов и соавт., 2002). Однако, имеющийся на сегодня опыт применения данного препарата не позволяет однозначно определить мишени, на которые воздействует ронколейкин.

В настоящей работе исследовалось влияние ронколейкина на иммунологические показатели больных с опухолями в различных отделах желудочно-кишечного тракта в раннем послеоперационном периоде. Ронколейкин вводился онкологическим больным в дозе 1 млн ЕД, начиная с 5-х суток после операции, внутривенно капельно с интервалом 48 часов трехкратно. Развития побочных эффектов после введения препарата не наблюдалось, а субъективное улучшение самочувствия в процессе иммунотерапии отмечали все больные. Была проанализирована динамика экспрессии поверхностных маркеров у отдельных больных. Уровень экспрессии CD25 после введения ронколейкина возрастал, снижение отмечалось только у 1-го из 12-ти больных. Количество других маркеров активации CD71 и CD95 также изменялось в сторону увеличения у 9-ти больных, а у 3-х наблюдалось снижение уровня их экспрессии (рис. 9).

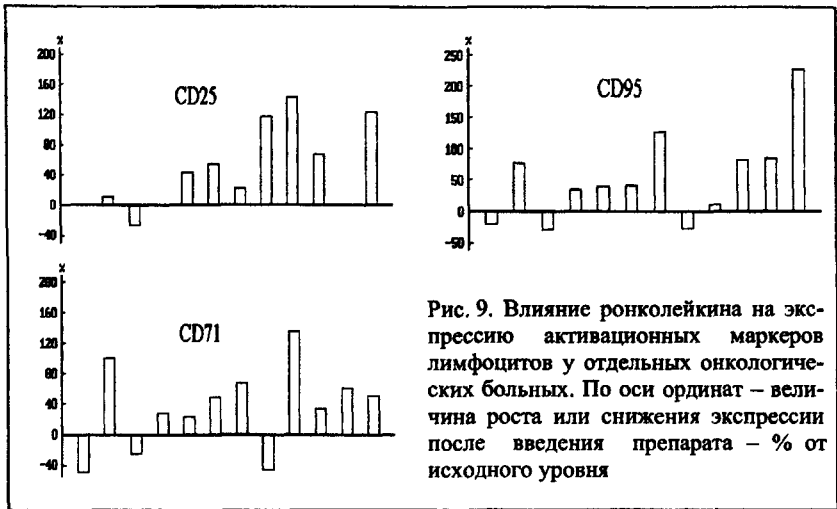


Рис. 9. Влияние ронколейкина на экспрессию активационных маркеров лимфоцитов у отдельных онкологических больных. По оси ординат – величина роста или снижения экспрессии после введения препарата – % от исходного уровня

Усиление экспрессии α -цепи рецептора IL-2 выявлялось у больных с изначально низким уровнем содержания CD25⁺-лимфоцитов, тогда как у лиц с исходно более высоким уровнем экспрессии CD25 наблюдалось уменьшение числа клеток, несущих данный маркер. Возможно, такая динамика экспрессии CD25 объясняется тем, что ронколейкин обладает регуляторным воздействием на клетки иммунной системы, вследствие чего результат его влияния зависит от исходного уровня экспрессии рецептора IL-2

На втором месте по увеличению уровня экспрессии оказался маркер апоптоза CD95. По всей видимости, одним из механизмов действия ронколейкина является индукция Fas-зависимого апоптоза, что и приводит к дополнительной экспрессии CD95 (Zheng et al., 1998).

Таким образом, у большинства онкологических больных в раннем послеоперационном периоде на фоне проведения иммунотерапии с помощью рекомбинантного IL-2 наблюдается значительное усиление экспрессии активационных маркеров (CD25 и CD95) на лимфоцитах периферической крови.

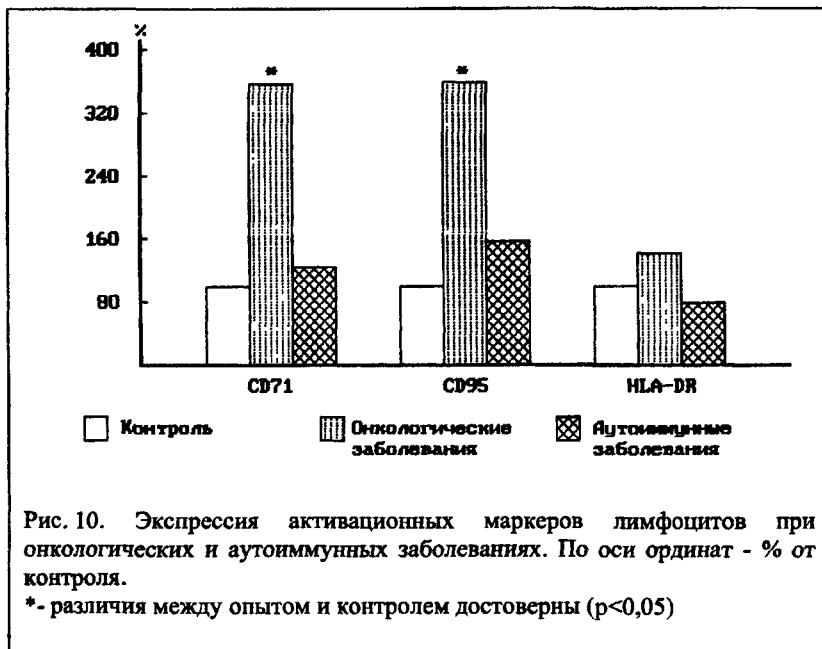
Сравнительный анализ экспрессии поверхностных антигенов лимфоцитов при онкологических и аутоиммунных заболеваниях

В последнее время в оценке иммунного статуса лиц с онкологической и аутоиммунной патологией особое внимание уделяют активационным антигенам (Бубнова, 1999). Например, показано, что неадекватная

экспрессия рецептора апоптоза играет одну из ведущих ролей при онкологических и аутоиммунных заболеваниях (Вахакмадзе и др., 2000). Имеющиеся сведения носят весьма фрагментарный характер и не позволяют составить общее представление о том, в какой степени функции иммунной системы изменяются при этих заболеваниях.

Для того чтобы более четко оценить влияние именно опухоли на состояние иммунной системы был проведен сравнительный анализ экспрессии дифференцировочных и активационных антигенов на лимфоцитах периферической крови у онкологических больных, и больных с аутоиммунными заболеваниями (ревматоидный артрит, аутоиммунный тиреоидит).

Уровень экспрессии дифференцировочных антигенов CD16 и CD19 у онкологических больных был в среднем значительно выше, чем при аутоиммунных патологиях ($p < 0,05$), в то время как в количестве CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺-лимфоцитов существенных различий между этими группами больных не наблюдалось.



Более интересным нам представлялось выяснить различия в количестве лимфоцитов с активационными маркерами. На рисунке 10

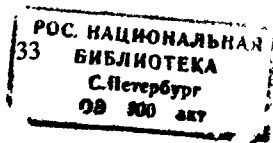
показан уровень экспрессии таких маркеров (CD71, CD95 и HLA-DR) при онкологических и аутоиммунных заболеваниях. Отчетливо видно, что заметное усиление экспрессии активационных маркеров на лимфоцитах периферической крови обнаруживается при онкологических заболеваниях. Наиболее значительные различия выявлены для показателей CD71 и CD95 ($15,83 \pm 2,38$ и $12,41 \pm 2,92$, соответственно, тогда как в контроле $4,73 \pm 2,55$ и $3,73 \pm 2,43$). При аутоиммунных заболеваниях уровень экспрессии исследуемых активационных маркеров существенно не отличался от контрольной группы.

Полученные результаты указывают на разный характер экспрессии активационных маркеров при онкологических и аутоиммунных заболеваниях. Данные патологии можно объединить по двум признакам: и в том и другом случае имеет место нарушение распознавания и длительное присутствие антигена в организме. Эти важные для функционирования иммунной системы факторы, естественно наводят на мысли о возможности существования и общих механизмов развития иммунного дисбаланса. Полученные нами результаты свидетельствуют до некоторой степени в пользу этого, поскольку и при аутоиммунной патологии имеется тенденция к повышению уровня CD71 и CD95, а уровень экспрессии HLA-DR в обоих случаях не отличается от контрольного. Конечно, этот вопрос требует дальнейшего изучения и осмысления.

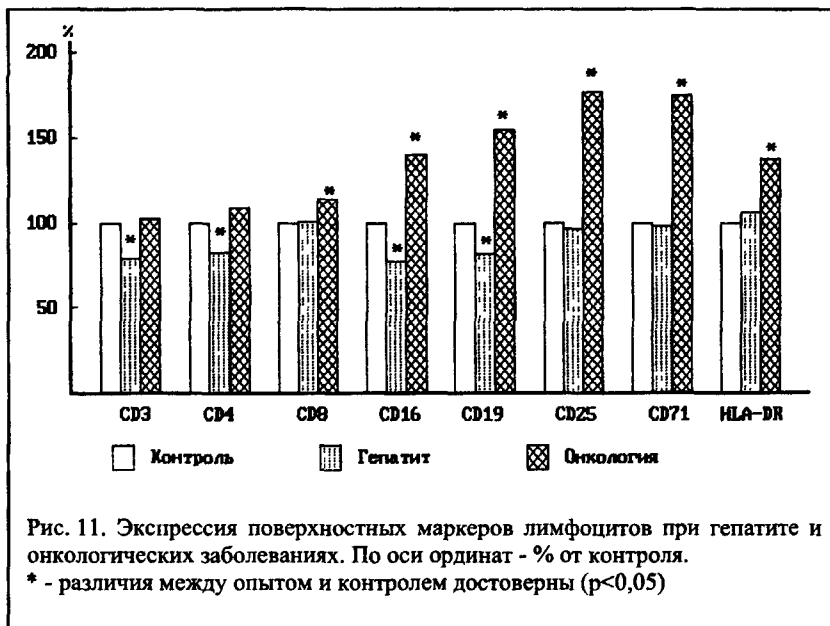
Сравнительный анализ фенотипов лимфоцитов при онкологических заболеваниях и гепатите.

Интерес к состоянию иммунной системы больных хроническим вирусным гепатитом связан с тем, что у них часто развиваются карциномы печени и поэтому вирусы В и С считаются онкогенными. Если согласиться с тем, что вирус индуцирует развитие опухоли, то вирусная инфекция представляет собой самый ранний этап онкогенеза. В связи с этим был проведен сравнительный анализ фенотипов лимфоцитов онкологических больных и больных гепатитом. Были составлены две группы больных: 1-ая группа состояла из 16 больных вирусным гепатитом (гепатитом В – 13 больных, С – 3 больных) в возрасте от 16 до 43 лет; 2-ую группу составили 29 онкологических больных в возрасте от 32 до 67 лет. В контрольную группу вошли 19 практически здоровых лиц в возрасте от 19 до 52 лет.

Фенотипы лимфоцитов в сравниваемых группах четко отличались по уровню экспрессии как дифференцировочных, так и активационных антигенов (рис. 11). В группе больных гепатитом снижено общее число Т-лимфоцитов CD3⁺, а также число CD4⁺, в то время как



у онкологических больных численность этих клеток не отличалась от контроля. Количество CD16⁺- и CD19⁺-лимфоцитов у онкологических больных повышено по отношению к контролю, а при гепатите, наоборот, снижено ($p < 0,05$). Уровень экспрессии активационных антигенов CD25, CD71, HLA-DR значительно усиливался при онкологических заболеваниях ($p < 0,05$), а у больных гепатитом достоверных различий с контролем не отмечалось.



Хотя сравнивались заведомо разные заболевания, но и в том и в другом случае антиген длительное время присутствует в организме, и можно было ожидать каких-то параллельных сдвигов в состоянии иммунной системы организма. Однако, практически никаких параллелей в изменениях фенотипа лимфоцитов крови при этих заболеваниях не наблюдалось.

Особого внимания заслуживает тот факт, что при вирусном гепатите фенотип лимфоцитов отличается от контроля по экспрессии дифференцировочных антигенов, основные различия приходятся на экспрессию CD3, CD4, CD16, CD19. А у онкологических больных, наоборот, главные различия с практически здоровыми лицами отно-

сятся в большей степени к экспрессии активационных антигенов CD25, CD71, HLA-DR. Такие различия в фенотипах лимфоцитов позволяют предполагать, что онкологические больные характеризуются более глубокими нарушениями в функционировании иммунной системы по сравнению с больными гепатитом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что пролиферативный потенциал Т- и В-лимфоцитов у онкологических больных в целом снижен. При этом разные онкологические заболевания характеризуются различной степенью иммуносупрессии и отличаются по уровню поликлональной активации лимфоцитов в зависимости от митогенов.

Наиболее угнетенным был пролиферативный ответ на митоген лаконоса, что может быть связано со способностью именно данного митогена стимулировать пролиферацию при условии совместного участия в ответе и Т- и В-лимфоцитов, их взаимодействия. Следовательно, при опухолевом росте происходит снижение эффективности взаимодействия иммунокомпетентных клеток. Интересно, что уже на ранних стадиях рака легкого пролиферативный ответ, индуцированный митогеном лаконоса, заметно снижен. Эти изменения в функциональной активности лимфоцитов вероятнее всего связаны с нарушениями в продукции цитокинов. Например, известно, что при онкологических заболеваниях снижена продукция IL-2. Другой причиной иммунологических дисфункций может быть прямое повреждающее действие веществ, которые выделяются опухолевыми клетками (например, клетки меланомы продуцируют ганглиозиды, которые разрушают IL-2).

Подавление пролиферативного ответа CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов у онкологических больных вероятнее всего вызвано активацией Т-клеток, экспрессирующих α -цепь рецептора для IL-2 (CD25). Эти клетки в норме поддерживают иммунологическую толерантность в организме (предотвращая аутоиммунитет и отторжение трансплантата), а при активации секретируют цитокины-ингибиторы IL-10, TGF- β , которые могут подавлять пролиферацию аутологических лимфоцитов (Sakaguchi et al., 2001; Somasundaram et al., 2002). По нашим результатам наиболее выраженное подавление пролиферативного ответа наблюдается у больных раком легкого (CD8⁺) и раком желудка (CD4⁺) и в этих же группах больных отмечается наиболее значительный рост числа CD25⁺-лимфоцитов. Это позволяет предполагать, что при опухолевом росте происходит активация отвечающих за толерантность

Treg клеток (CD25⁺), что и обеспечивает иммуносупрессию у онкологических больных. Об увеличении числа Т-лимфоцитов CD25⁺ в крови больных раком яичника и раком поджелудочной железы имеются сведения в литературе (Liyanage et al., 2002; Woo et al., 2002).

По нашим данным, у части больных раком легкого с исходно низким уровнем пролиферативной активности лимфоцитов после удаления опухоли происходит рост уровня стимуляции митогенами. Это может быть связано с тем, что состояние супрессии Т- и В-лимфоцитов обратимо и снятие опухолевого прессинга реабилитирует их функциональные возможности, восстанавливая нормальные межклеточные взаимодействия.

Как показали наши исследования, для интерпретации результатов поликлональной активации лимфоцитов в реакции бласттрансформации целесообразно использовать суммарный эффект нескольких доз митогена (в наших опытах – 3 дозы каждого из трех митогенов). Это позволяет оценить уровень пролиферативного ответа отдельных субпопуляций лимфоцитов, отвечающих на разные митогены, и в то же время дать оценку общего функционального состояния клеток иммунной системы. Возможно, именно такой подход поможет решить вопрос стандартизации получаемых данных и позволит сравнивать результаты разных исследователей.

Изучение взаимоотношений между иммунной системой организма и опухолью затруднено тем, что каждое онкологическое заболевание имеет свои особенности, а иммунная система отдельного человека в свою очередь также характеризуется неповторимостью. Это нашло отражение в наших результатах при изучении фенотипов лимфоцитов крови у больных с различными онкологическими заболеваниями.

Полученные данные указывают на усиление экспрессии активационных маркеров (CD25, CD71, CD95, HLA-DR) при различных онкологических заболеваниях. Повышение экспрессии CD95 на лимфоцитах периферической крови, вероятно, указывает на усиление уровня апоптоза Т-лимфоцитов. Проявления этого процесса гибели клеток становятся более значительными по мере роста опухоли. Результаты свидетельствуют о том, что экспрессия CD95 заметно усиливается на более поздних стадиях заболевания по сравнению с I-II стадиями. Изучение экспрессии активационных маркеров в зависимости от локализации опухоли показало заметное повышение уровня CD95⁺-лимфоцитов при раке желудка и при раке легкого, то-

гда как при колоректальном раке, раке молочной железы значительных изменений в числе CD95⁺-клеток не отмечалось. Экспрессия маркера апоптоза CD95 на лимфоцитах периферической крови может служить дополнительным критерием в диагностике солидных опухолей различной локализации и, вероятно, характеризует степень выраженности иммунодефицита. Увеличение уровня CD95⁺-клеток коррелирует с повышенной экспрессией другого активационного маркера CD71. При раке легкого, раке желудка и при колоректальном раке выявлено увеличение HLA-DR⁺-клеток. Это может означать, что растет число активированных CD4⁺ Т-клеток или других субпопуляций лимфоцитов и этот рост, скорее всего, обусловлен индуцированными опухолью нарушениями в цитокиновом балансе.

Как показали наши исследования, изменения в экспрессии активационных маркеров лимфоцитов зависят от того, в каком органе происходит опухолевый рост. Связать это можно с тем, что развитие иммуносупрессии под влиянием опухолевого процесса во многом связано с факторами микроокружения, со специфичностью ткани, в которой возникает первоначально трансформированная клетка, от генетических особенностей организма.

Сравнение онкологических заболеваний с аутоиммунными патологиями и хроническими инфекциями показало, что развитие опухолей сопровождается более глубокими системными иммунологическими сдвигами. Это выразилось в значительном снижении пролиферативной активности лимфоцитов у больных с опухолями различной локализации, в то время как у больных с тиреотоксикозом и ревматоидным артритом уровень митоген-индуцированной стимуляции практически не отличался от контроля. Усиление экспрессии мембранных маркеров активации лимфоцитов CD95, CD71, HLA-DR у больных с онкологическими заболеваниями было заметно выше, чем аналогичные показатели у пациентов с аутоиммунными заболеваниями и хроническим вирусным гепатитом В и С. Эти данные позволяют предполагать, что опухоль индуцирует иммуносупрессию, нарушая регуляторные функции иммунной системы. Поэтому не отмечается значительных колебаний в численности основных субпопуляций лимфоцитов CD3, CD4, CD8, CD19, но при этом существенно изменяются функциональные и фенотипические характеристики лимфоцитов крови.

Иммунологическая недостаточность возникает и развивается в результате действия на организм какого-то фактора, оказывающего отрицательное влияние на иммунитет. Проявление воздействия повреждающего

фактора на иммунную систему будет зависеть не только от силы и продолжительности этого воздействия, но и от общего состояния организма, его генотипа. Одно и то же повреждающее воздействие может вызывать у разных индивидов отличающиеся по масштабам и интенсивности состояния иммуносупрессии: от незначительных и слабо выраженных форм иммунной недостаточности до полной анергии.

В норме гомеостаз клетки поддерживается за счет баланса между позитивными и негативными сигналами, регулирующими клеточный рост. Развитие опухолевых клеток может быть следствием преобладания позитивных сигналов (увеличения выживаемости) и снижения уровня апоптоза. Апоптоз может быть индуцирован удалением факторов роста и факторов выживаемости или напротив, может быть вызван сигнализацией через такие молекулы как CD95. В активированных Т-клетках TCR опосредует апоптоз, включая аутокринный суицид через взаимодействие CD95 рецептор/лиганд. Нарушения в системе CD95 приводят к различным патологиям человека, а мутации этого рецептора находят у больных с онкологическими заболеваниями и аутоиммунитетом. Особо широкий интерес к апоптозу в онкологии проявился в последнее время в связи с данными о том, что этот способ смерти клеток индуцируется химиотерапией, радиацией или гипертермией. Причем способность опухолевых клеток отвечать апоптозом на эти воздействия, как правило, коррелирует с экспрессией нескольких онкогенов (с-myc, ras, bcl-2) или с опухолевым супрессорным геном p53. Как оказалось, целое семейство супрессорных генов p53 формирует одно из молекулярных звеньев между причинами рака (канцерогенами, физическими агентами, онкогенными вирусами) и его клиническим развитием. Нарушение нормальной функции p53 (то есть p53-индуцированного апоптоза) является необходимым условием для развития большинства типов опухолей. Возможно, последовательный рост числа клеток с маркером апоптоза CD95, который был отмечен нами для большинства онкологических больных с развивающимися опухолями, указывает на усиление гибели Т-лимфоцитов, которая могла быть индуцирована p53.

Таким образом, существует множество вариантов нарушений в иммунной системе и разные молекулярные и клеточные механизмы могут приводить к внешне одним и тем же проявлениям – опухолевым заболеваниям. В результате пока не выработано общей точки зрения на то, каким образом формируется состояние иммуносупрес-

сии при опухолевом росте и что должно быть главной мишенью иммунотерапии онкологических больных. Определенные надежды связываются в последнее время с цитокинами. Как иммунокомпетентные, так и опухолевые клетки секретируют много цитокинов, которые играют важную роль в стимуляции клеточной активности. В этом отношении роль цитокинов особенно важна вследствие того, что они могут влиять на ответ потенциально реактивных лимфоцитов, на активность эндотелиальных и стромальных клеток, что может быть использовано в иммунотерапии.

Имеющиеся на сегодня данные позволяют резюмировать, что в истории сложных взаимоотношений между иммунной системой хозяина и опухолью можно выделить несколько этапов. На подавляющее большинство возникающих опухолевых клеток иммунная система реагирует адекватно и благополучно элиминирует их из организма, осуществляя иммунологический надзор (особенно в отношении вирусиндуцированных трансформаций). Часть мутаций, например, связанная с утерей молекул МНС I класса, позволяет опухолевой клетке избежать распознавания лимфоцитами и трансформироваться дальше. На этом этапе Т-лимфоциты, специфичные к опухолевым антигенам, проявляют иммунологическую толерантность, которую отчасти можно связать с нарушением процессов распознавания с участием TCR (дефекты в ζ , β -цепях), а также с тем, что опухолевые клетки различными приспособительными механизмами избегают распознавания (изменением экспрессии молекул МНС, корцепторов, молекул адгезии и др.). Вполне возможно, что опухоль часто прогрессирует у больных не вследствие дисфункции иммунной системы, а потому, что опухолевые клетки успешно развивают различные стратегии ухода от распознавания. По мере прогрессирования опухолевые клетки теряют первоначальные признаки своего происхождения, в каком-то смысле эволюционируют, приобретая новые свойства. Например, они генерируют инвазивные способности для того, чтобы мигрировать и колонизировать новые ткани. Опухоль индуцирует иммуносупрессию различными способами, включая апоптоз активированных лимфоцитов, функциональный и фенотипический сдвиг регуляторных CD4⁺-клеток в сторону Th2, секрецию TGF- β , IL-10 и др. Дальнейшие взаимоотношения между иммунной системой и опухолью характеризуется тем, что они перестают быть антагонистическими, если первоначально таковыми и были.

Под влиянием длительного и тесного контакта с опухолью клетки микроокружения приобретают некоторые необычные свойства и

способствуют росту опухоли (выделяют ростовые факторы, участвуют в ангиогенезе). Например, фибробласты, изолированные из опухоли молочной железы, оказываются гораздо более эффективными в стимуляции клеточной пролиферации, чем фибробласты из нормальных тканей (Weinberg, 2003). Эти измененные фенотипы стромальных клеток сохраняются даже после нескольких пассажей в культуре клеток, что позволяет предполагать, что что-то фундаментальное изменилось в их геноме или поведении за то время, когда они были ассоциированы с растущей опухолью. Можно провести параллель с тем, как факторы микроокружения в тимусе определяют дифференцировку Т-лимфоцитов и индуцируют апоптоз аутореактивных клонов. Только опухолевые клетки вызывают гибель клонов специфических Т-лимфоцитов-эффекторов и оказывают влияние на дифференцировку наивных Т-клеток.

Анализ клеточной пролиферации показывает, что лимфоциты крови больных раком желудка не проявляют адекватной реакции на CD3-, CD2- и ФГА-опосредованную стимуляцию, при этом изменения в функциональной активности могут сохраняться длительное время в культурах клеток. Имеются данные о том, что дисфункции Т-лимфоцитов крови больных вызваны не только зависимыми от опухоли факторами, но и существенными внутренними дефектами, например, нарушением CD2- и CD3-опосредованной сигнальной трансдукции, которое возникает в самих лимфоидных клетках. В результате иммунная система тем или иным путем способствует опухолевому росту и становится фактором опухолевой прогрессии. (Valeri et al., 2003). Таким образом, роль иммунной системы трансформируется в процессе развития опухоли и антагонизм во взаимоотношениях между иммунной системой и опухолевыми клетками постепенно исчезает.

ВЫВОДЫ

1. Общей закономерностью, характеризующей функциональные изменения в субпопуляциях лимфоцитов периферической крови у больных с разными онкологическими заболеваниями (рак легкого, рак желудка, рак молочной железы, колоректальный рак), является снижение уровня пролиферативного ответа лимфоцитов при стимуляции митогенами.
2. Степень подавления пролиферативной активности лимфоцитов различается в разных группах больных и зависит от митогена. При

стимуляции ФГА наиболее низкий уровень клеточной пролиферации наблюдается у больных раком желудка и колоректальным раком, при стимуляции Кон А – у больных раком легкого и колоректальным раком, при стимуляции митогеном лаконоса – у больных раком молочной железы и раком легкого.

3. У больных раком легкого уровень пролиферативного потенциала лимфоцитов крови зависит от стадии заболевания. По мере прогрессирования опухоли происходит углубление функциональной недостаточности лимфоцитов: наименьшая величина суммарного индекса стимуляции отмечается у больных с III-IV стадиями ($p < 0,001$).

4. После радикального удаления опухоли у больных раком легкого пролиферативный ответ лимфоцитов на стимуляцию митогенами возрастает, что свидетельствует о восстановлении функциональной активности иммунокомпетентных клеток. Обратимый характер функционального сдвига лимфоцитов может быть использован как важный критерий при оценке иммунной реабилитации онкологических больных.

5. Общей закономерностью, характеризующей фенотипические изменения лимфоцитов крови у онкологических больных, является рост числа клеток, экспрессирующих молекулы CD25. Самый значительный рост количества CD25⁺-лимфоцитов отмечается у больных раком легкого ($p < 0,001$).

6. У больных раком желудка наблюдается повышенное число клеток с рецептором апоптоза CD95 (I-II стадия – 181% от уровня здоровых доноров; III – 192%, IV – 196%). Увеличение количества CD95⁺-клеток, вероятно, отражает процесс индуцированного апоптоза лимфоцитов и может быть одним из показателей иммуносупрессии у онкологических больных.

7. Изменения в экспрессии активационных маркеров лимфоцитов при онкологических заболеваниях носят более глубокий и системный характер по сравнению с аутоиммунными патологиями и хроническими инфекциями. Только у онкологических больных происходит значительное возрастание числа клеток с активационным фенотипом.

8. Определение уровня пролиферативного ответа лимфоцитов на стимуляцию митогенами (ФГА, КонА, митогеном лаконоса) и иммунофенотипирование лимфоцитов (по маркерам активации CD25, CD71, CD95, HLA-DR) может быть рекомендовано для оценки состояния иммунной системы при проведении мониторинга онкологических больных.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Лившиц А.Х., Олейник Е.К. Изменение показателей иммунного статуса больных диффузным токсическим зобом на ранних стадиях заболевания // Проблемы эндокринологии - 1985.- Т.31. - № 6. -С. 6-10.

2. Аметов А.С., Лившиц А.Х., Олейник Е.К. Радиоиммунологический и иммунологический контроль ремиссии токсического зоба после радиойодтерапии и тиреоидэктомии // Медицинская радиология - 1987.- Т.32. - № 2.- С. 38-41.

3. Аметов А.С., Лившиц А.Х., Олейник Е.К. Прогнозирование рецидива тиреотоксикоза после радиойодтерапии диффузного токсического зоба // Проблемы эндокринологии – 1988. - Т.34.- №1.- С. 13-16.

4. Ageenko A.I., Erkhov V.S., Bachlaev I.E., Oleinik E.K., Trakhtenberg A.H. Delayed-type hypersensitivity reaction in the skin with autologous modified lymphocytes in lung cancer patients // Exp. Oncol. - 1994. - Vol.16. - № 4-6.- P. 367-370.

5. Бахлаев И.Е., Ерхов В.С., Агеенко А.И., Олейник Е.К., Трахтенберг А.Х. Кожная реакция ГЗТ с аутологичными модифицированными лимфоцитами в диагностике и мониторинге больных раком легкого // Вопросы онкологии - 1994.-Т.40. - № 7-12. - С. 284-288.

6. Бахлаев И.Е., Олейник Е.К., Агеенко А.И., Ерхов В.С. Патент № 2051385 на изобретение: “Способ дифференциальной диагностики новообразований легких”. Гос. регистр. в реестре изобретений 27.12.1995г..

7. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е., Агеенко А.И. Активация лимфоцитов крови больных раком легкого поликлональными митогенами // Вопросы онкологии - 1997.- Т.43. - № 6.- С .584-586.

8. Бахлаев И.Е., Олейник Е.К., Агеенко А.И., Ерхов В.С., Трахтенберг А.Х. Комплексная диагностика первичного рака легкого с использованием иммунологических исследований // Клиническая медицина - 1997.- № 8.- С.45-48.

9. Bachlaev I.E., Oleinik E.K., Oleinik V.M., Ageenko A.I. Comparative analysis of immunological methods of investigation in screening, diagnostics and monitoring of lung cancer // Oncology - 2000.- Vol.2. - № 1-2.- P. 60-63.

10. Олейник Е.К., Шibaев М.И. Особенности экспрессии CD95 на лимфоцитах периферической крови при онкологической и аутоиммунной патологиях // Бюлл. экспер. биол. мед. - 2000. -Т. 130.- № 9.- С. 324-326.

11. Олейник Е.К., Олейник В.М., Бахлаев И.Е., Агеенко А.И. Изучение фенотипа лимфоцитов периферической крови у больных раком легкого // Вопросы онкологии - 2001.- Т. 47 - № 4. - С. 436-439.

12. Бахлаев И.Е., Олейник Е.К., Агеенко А.И., Олейник В.М. Оценка маркеров опухолевого роста у больных раком легкого // Пульмонология - 2001. - №1.- С. 52-55.

13. Борисова А.Г., Олейник Е.К. Анализ изменений терморезистентности эритроцитов при раке легкого // Клинич. лаб. диагностика – 2001.- № 5.- С. 14-16.

14. Шibaев М.И., Олейник Е.К., Олейник В.М Особенности функционального состояния иммунной системы больных раком желудка, проживающих в Карелии // Медицинская иммунология - 2002. - Т. 4.- № 4-5.- С. 655-660.

15. Олейник Е.К., Шibaев М.И., Олейник В.М. Иммунологическое состояние больных с опухолями желудочно-кишечного тракта в Карелии // Иммунология –2004. – Т. 25. -№2. – С. 100-103.

16. Олейник Е.К., Шibaев М.И., Олейник В.М. Анализ экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов при различном течении онкологических заболеваний желудочно-кишечного тракта // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2004. - №4. – С.437-440.

17. Олейник Е.К., Донников М.Ю., Олейник В.М. Система апоптоза Fas/FasL в онкогенезе // Иммунология – 2004.- Т.25. - №4. – С. 251-255.

Другие публикации:

18. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е. Динамика клинико-иммунологических показателей у больных раком легкого при иммунотерапии. // Мат-лы 2-го Международного симпозиума “Реабилитация иммунной системы”. Дагомыс. 9-11 окт. 1990. - С. 115.

19. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е. Активация лимфоцитов периферической крови поликлональными митогенами у больных раком легкого //Мат-лы I-го съезда иммунологов России. Новосибирск. - 1992. - С. 123.

20. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е. Изучение функциональной активности Т и В лимфоцитов у онкологических больных. //Мат-лы 5-го Национального конгресса по болезням органов дыхания. М. - 1995. - С.189.

21. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е. Изучение молекулярных механизмов снижения иммунологического контроля при опухолевом росте // Мат-лы I съезда онкологов стран СНГ. М. - 3-6 дек. 1996. - Часть I. - С.181-182.

22. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е. Стимулированная митогенами пролиферация Т и В лимфоцитов у больных раком легкого // Мат-лы 6-го

Национального конгресса по болезням органов дыхания. Новосибирск - 1-4 июля 1996. - С. 620.

23. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е. Снижение эффективности иммунологического контроля при раке легкого // Мат-лы 6-го Национального конгресса по болезням органов дыхания. Новосибирск - 1-4 июля 1996. - С. 331.

24. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е. Фенотипирование клеток иммунной системы у больных раком легкого // Мат-лы 8-го Национального конгресса по болезням органов дыхания и Европейской респираторной школы. М. - 22-24 окт. 1998. - С. 369.

25. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е., Белов В.М., Толстогузова Т.И., Шibaев М.И. Функциональная активность иммунной системы в условиях опухолевого роста // Мат-лы междунар. конф. "Биологические основы изучения, освоения и охраны животного и растительного мира Восточной Фенноскандии. Петрозаводск. 6-10 сент. 1999. - Часть 2 - С.93-94.

26. Олейник Е.К. Механизмы снижения иммунологического контроля при опухолевом росте // Мат-лы юбилейной научной конференции Карельского научного центра РАН, посвящ. 275-летию РАН. Петрозаводск. 1999. - С.17-18.

27. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е., Олейник В.М. Экспрессия активационных маркеров на лимфоцитах периферической крови у больных раком легкого // Мат-лы 9-го Национального конгресса по болезням органов дыхания. М. - 31 окт.-3 нояб. 1999. - С. 320.

28. Олейник Е.К., Шibaев М.И. Особенности активации лимфоцитов периферической крови онкологических больных в Карелии // Мед. иммунология - 2000. - Т. 2. - № 2. - С. 120-121.

29. Олейник Е.К., Шibaев М.И., Олейник В.М. Экспрессия активационных маркеров на лимфоцитах периферической крови больных раком желудка в Карелии. Мат-лы конф. "Дни иммунологии в С-Петербурге". 21-24 мая 2001 г. // Медицинская иммунология - 2001. - Т.3. - №2. - С. 274-275.

30. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е., Олейник В.М., Малышева И.Е., Донников М.Ю. Экспрессия Fas (CD95) рецептора на лимфоцитах периферической крови у больных раком легкого. Мат-лы 10-го Нац. конгресса по болезням органов дыхания. СПб. 1-4 ноября 2000 г. - С. 240.

31. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е., Шibaев М.И., Олейник В.М. Изучение эффективности иммунологического распознавания при опухолевом росте. Мат-лы 4-го Съезда иммунологов и аллергологов стран

СНГ. М., 9-14 сентября 2001 // Аллергология и иммунология – 2001. - Т.2. - №2. - С. 117-118.

32. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е., Олейник В.М., Шибаев М.И. Сравнительный анализ активационных маркеров лимфоцитов крови при раке легкого и раке желудка. // Пульмонология - Мат-лы. 11-го Нац. Конгресса по болезням органов дыхания. – М. –2001. - С. 236.

33. Олейник Е.К., Шибаев М.И., Олейник В.М., Толстогузова Т.И. Анализ взаимосвязи экспрессии CD71, CD95 и HLA-DR на лимфоцитах периферической крови больных раком желудка в Карелии // Медицинская иммунология. - 2002. - Т.4. -№2. - С. 304.

34. Олейник Е.К., Олейник В.М., Бахлаев И.Е., Шибаев М.И. Изучение эффективности иммунологического распознавания при опухолевом росте и аутоиммунных процессах // "Карелия и РФФИ" (тез. докл. научной конференции). – Петрозаводск. - 2002. - С. 37-38.

35. Олейник Е.К., Шибаев М.И., Олейник В.М. Влияние препарата ронколейкин на экспрессию маркеров лимфоцитов больных с вторичными иммунодефицитами. Мат-лы междуна.конф. “Цитокины. Воспаление. Иммунитет” СПб., 23-26 июня 2002 г. // Цитокины и воспаление – 2002. – Т.1 - №2 – С. 36.

36. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е., Шибаев М.И., Олейник В.М. Влияние ронколейкина на экспрессию поверхностных маркеров лимфоцитов при мезотелиоме. Мат-лы 12 Нац. Конгресса по болезням органов дыхания. М., 11-15 ноября 2002 г.// Пульмонология – 2002. - приложение 2. - С. 286.

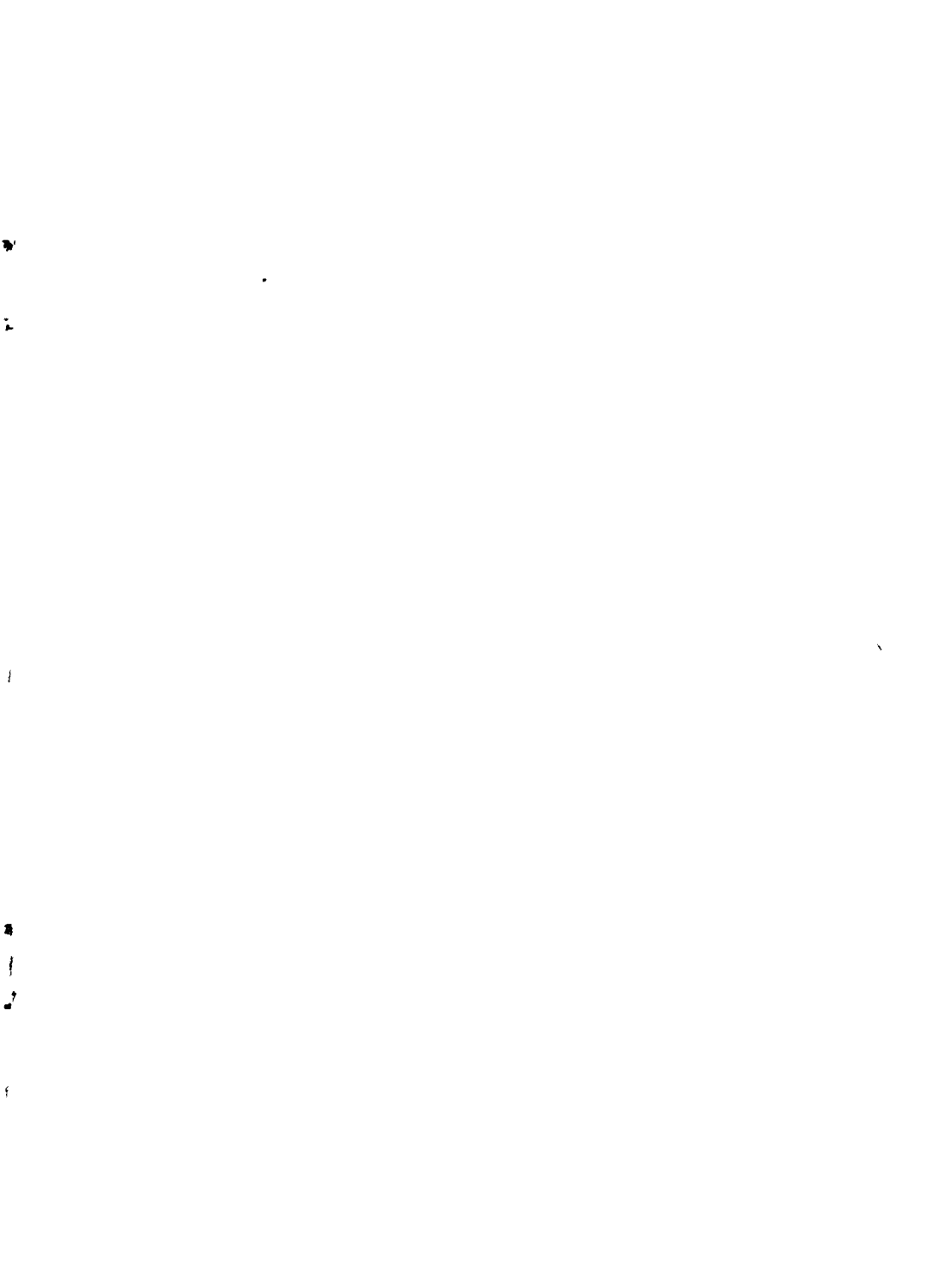
37. Олейник Е.К., Шибаев М.И., Олейник В.М., Бахлаев И.Е. Молекулярные механизмы формирования иммунного дефицита при опухолевом росте. В сб. Мат-лы междуна. конф. “Наземные и водные экосистемы Северной Европы: управление и охрана”. Петрозаводск. - 8-11 сентября 2003 г. - С. 106-110.

38. Олейник Е.К. Иммунология в XXI веке. Труды Карельского научного центра РАН – 2003. - выпуск 5 – С. 85-88.

39. Олейник Е.К., Бахлаев И.Е., Шибаев М.И., Олейник В.М. Изучение экспрессии активационных маркеров лимфоцитов у больных раком легкого и раком желудка при использовании Ронколейкина // Мат-лы 13-го Нац. конгресса по болезням органов дыхания. СПб., 10-14 ноября 2003 // Пульмонология, приложение 3. – 2003. - С. 175.

Изд. лиц. № 00041 от 30.08.99. Подписано в печать 27.04.05.
Формат 60×84¹/₁₆. Бумага офсетная. Гарнитура «Times». Печать офсетная.
Уч.-изд. л. 2,2. Усл. печ. л. 2,7. Тираж 100 экз. Изд. № 32. Заказ № 494

Карельский научный центр РАН
185003, Петрозаводск, пр. А. Невского, 50
Редакционно-издательский отдел



№ 17908

РНБ Русский фонд

2006-4

15905