

<sup>1</sup>Национальный институт рака, Киев

<sup>2</sup>Национальный медицинский университет им. акад. А.А. Богомольца, Киев

# ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ



Е.С. Шумилина<sup>1</sup>, Ф.В. Фильчаков<sup>1</sup>,  
С.Н. Кукушкина<sup>1</sup>, А.Д. Лён<sup>1</sup>,  
Ю.М. Ильченко<sup>1</sup>, Г.И. Климнюк<sup>1</sup>,  
Э.В. Шайда<sup>1</sup>, Ю.В. Марушко<sup>2</sup>,  
Т.В. Гищак<sup>2</sup>

Адрес:

Шумилина Екатерина Станиславовна  
03022, Киев, ул. Ломоносова, 33/43  
Национальный институт рака  
Тел.: (044) 259-01-84  
E-mail: labklimmun@i.ua

**Ключевые слова:** функциональная активность лимфоцитов, иммунная дисфункция, злокачественные новообразования мягких тканей.

В связи с разработкой и внедрением в клиническую практику новых, более интенсивных, программ цитостатической терапии детей с солидными злокачественными новообразованиями важное значение приобретает оценка степени нарушений иммунного гомеостаза пациентов. В настоящее время проводится активный поиск лабораторных критериев диагностики дисфункции иммунной системы, учитывающий особенности биологии опухолевого роста во взаимосвязи с реакцией организма и ответом на терапию. Поэтому нами изучены особенности активационного фенотипа и функциональной активности лимфоцитов периферической крови у детей с прогностически неблагоприятными формами злокачественных новообразований мягких тканей. В результате проведенного исследования установлен ряд признаков, важных для диагностики иммунной дисфункции при этих заболеваниях: уменьшение общего количества циркулирующих лимфоцитов; увеличение относительного количества в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих активационные маркеры (CD25<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>); низкие показатели митоген-индуцированной пролиферации лимфоцитов; повышенное содержание Трег в циркуляции. Данные лабораторные критерии могут быть рекомендованы для практического использования в мониторинге состояния иммунной системы детей при проведении основного лечения.

## ВВЕДЕНИЕ

Детская онкология в последние десятилетия достигла значительных успехов в лечении большинства нозологических форм солидных злокачественных новообразований: уровень выживаемости детей с такой патологией, как саркома Юинга, саркомы мягких тканей (не рабдомиосаркомы), нейробластома, сегодня достигает 60–75%, в то время как в 70-е годы XX ст. этот показатель не превышал 10–30% [1]. Вместе с тем сохраняет свою актуальность проблема первичной и вторичной (приобретенной) резистентности опухоли к цитостатической терапии. Последняя формируется под влиянием и во время проведения химиотерапии за счет мутации клеток опухоли и селекции их клонов. При этом селективное преимущество относительно неконтролируемой пролиферации получают как первично резистентные клетки, так и приобретшие рефрактерность вследствие определенных генетических изменений, произошедших под влиянием цитостатиков [2]. Повышение эффективности лечения детей с прогностически неблагоприятными, в том числе рефрактерными, формами солидных злокачественных новообразований

связывают, прежде всего, с разработкой и внедрением в клиническую практику новых противоопухолевых препаратов и более интенсивных программ цитостатической терапии [3–6].

В связи с этим оценка степени нарушений иммунного гомеостаза приобретает особое значение. В настоящее время проводится интенсивный поиск лабораторных критериев диагностики дисфункции иммунной системы, учитывающий особенности биологии опухолевого роста во взаимосвязи с реакцией организма и ответом на терапию [7].

Целью данного исследования было изучение особенностей активационного фенотипа и функциональной активности лимфоцитов периферической крови (ЛПК) у детей с прогностически неблагоприятными формами злокачественных новообразований мягких тканей (ЗНМТ).

## ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включено 20 детей (в возрасте от 7 до 16 лет, средний возраст — 12,5 года) с впервые установленным диагнозом ЗНМТ I–IV стадии, находившихся на лечении в отделении

детской онкологии Национального института рака в 2011–2012 гг. (основная группа, табл. 1).

**Таблица 1.** Распределение детей со ЗНМТ по нозологическим формам

Нозологическая форма	Количество пациентов
Саркома Юинга	3
Примитивная нейроэктодермальная опухоль	3
Нейробластома	5
Синовиальная саркома	2
Фибросаркома	1
Ангиосаркома	2
Злокачественная шваннома	2
Недифференцированная злокачественная опухоль	2

Для сравнения иммунологических показателей использовали данные лабораторно-иммунологического обследования 14 детей в том же возрастном интервале (средний возраст — 11,2 года) без опухолевой патологии (контрольная группа), проходивших обследование в Детской клинической больнице № 5 г. Киева, у которых был исключен острый воспалительный процесс.

Иммунологические исследования включали изучение активационного фенотипа ЛПК с использованием моноклональных антител к HLA-DR и CD95, меченных флуоресцеинизотиоцианатом («Сорбент», Российская Федерация), CD25, меченных фикоэритрином («Vecton Dickinson», США), и содержания естественных регуляторных Т-лимфоцитов (Трег, фенотип — CD4<sup>+</sup>25<sup>high</sup>) [8]. Учет результатов проводили на проточном цитофлуориметре FACScan («Vecton Dickinson», США) с использованием программы «Cell Quest».

Пролиферативную активность лимфоцитов изучали в реакции бласттрансформации (РБТЛ) морфологическим методом с использованием моноклональных антител к CD3 (анти-CD3, «Медбиоспектр», Российская Федерация) в концентрации 3 мкг/мл или фитогемагглютинаина (ФГА, «Sigma», Германия) в концентрациях 10 и 20 мкг/мл (соответственно субагглютинирующая и агглютинирующая концентрации [9]). Результаты выражали процентом бласттрансформированных клеток (% БТ).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Excel (MS Office 2003, XP) и STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., США). Для определения достоверности различий (p) показателей в группах использовали критерий Манна — Уитни. Результаты представляли в виде медианы и значений 10 и 90% квантилей. Различия оценивали как достоверные при p < 0,05.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

У детей со ЗНМТ абсолютное количество лимфоцитов в периферической крови снижено (1,56 (0,44; 2,45) × 10<sup>9</sup>/л, против 2,35 (1,98; 3,17) × 10<sup>9</sup>/л в кон-

трольной группе, p < 0,05), а их активационный фенотип резко выражен (табл. 2).

**Таблица 2.** Содержание активированных ЛПК (%) в крови обследованных детей

Показатели	Основная группа	Контрольная группа
HLA-DR <sup>+</sup>	20,0 (13,0; 35,0)*	14,5 (11,0; 23,0)
CD95 <sup>+</sup>	45,0 (31,0; 76,0)*	32,5 (26,0; 46,0)
CD25 <sup>+</sup>	20,5 (13,0; 35,0)*	12,5 (10,0; 17,0)
CD4 <sup>+</sup> 25 <sup>+</sup>	13,0 (8,0; 24,0)*	8,0 (5,0; 11,0)

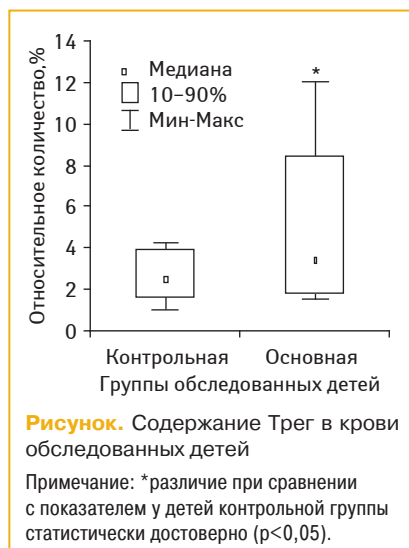
Примечание: \*различие при сравнении с показателем у детей контрольной группы статистически достоверно (p < 0,05).

Как видно из данных табл. 2, у детей со ЗНМТ регистрируют существенное увеличение относительного количества клеток, несущих как ранние (CD25), так и поздние (CD95, HLA-DR) маркеры активации. Усиление экспрессии CD25- и HLA-DR-антигенов на ЛПК детей может свидетельствовать в пользу реализации иммунной системой эффекторных функций, в частности генерации опухолеспецифической цитотоксичности (позитивная активация) [10]. С другой стороны, увеличение в циркуляции количества CD95<sup>+</sup>-клеток отражает процесс негативной активации, приводящий к апоптозу лимфоцитов, что, по-видимому, обуславливает развитие лимфоцитопении у этих больных. Такие изменения активационного фенотипа ЛПК могут ассоциироваться с развитием онкопатологии [11].

Кроме того, у детей со ЗНМТ существенно повышена доля активированных Т-хелперов с рецептором к ИЛ-2 (CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>), хотя относительное количество CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов в циркуляции не отличается от такового у детей контрольной группы (соответственно 39,5 (26,0; 53,0)% и 36,5 (30,0; 45,0)%, p > 0,05). Этот факт заслуживает особого внимания, поскольку известно, что среди популяции CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>-клеток присутствуют Трег, механизмы иммуносупрессии которых направлены на подавление противоопухолевых иммунных реакций [12–14]. В связи с этим изучено содержание Трег в периферической крови детей (рисунок).

Как видно из данных (см. рисунок), у детей со ЗНМТ регистрируют высокое содержание Трег в циркуляции, существенно превышающее аналогичный показатель у детей контрольной группы (соответственно 3,7 (1,7; 8,4)% против 2,1 (1,5; 3,9)%, p < 0,05). Следовательно, на фоне приобретения лимфоцитами детей со ЗНМТ активационного фенотипа повышается содержание в циркуляции клеток с супрессорными свойствами, что определяет необходимость лабораторной оценки функциональной активности ЛПК.

С этой целью изучено активирующее действие митогена (ФГА) или моноклональных антител к одному из компонентов антиген-распознающего ком-



**Рисунок.** Содержание Трег в крови обследованных детей  
Примечание: \*различие при сравнении с показателем у детей контрольной группы статистически достоверно (p < 0,05).

плекса Т-лимфоцита (CD3-ТкР) на ЛПК в РБТЛ *in vitro* (табл. 3).

**Таблица 3.** Пролиферативная активность (% БТ) ЛПК у детей основной и контрольной групп

Показатели	Основная группа	Контрольная группа
% БТ (10 мкг/мл ФГА)	15,5 (1,0; 31,5)*	32,5 (10,0; 73,0)
% БТ (20 мкг/мл ФГА)	32,0 (7,5; 64,5)*	75,3 (58,0; 87,0)
% БТ (анти-CD3)	43,3 (15,0; 66,0)*	37,0 (22,0; 68,5)

Примечание: \*различие при сравнении с показателем у детей контрольной группы статистически достоверно (p < 0,05).

Из данных, представленных в табл. 3, следует, что пролиферативный ответ Т-ЛПК у детей со ЗНМТ при активации клеток по классическому пути, инициированному через CD3-рецептор, не отличается от такового у детей контрольной группы. В то же время их митоген-индуцированная пролиферация, отражающая альтернативный путь активации Т-лимфоцитов в ответ как на субагглютинирующую, так и агглютинирующую дозу ФГА, существенно снижена по сравнению с показателем у детей контрольной группы. Эти данные свидетельствуют о том, что Т-лимфоциты детей с ранними стадиями опухолевого процесса сохраняют способность к формированию антигенспецифических иммунных реакций. Вместе с тем митоген (ФГА), индуцирующий *in vitro* поликлональную активацию Т-лимфоцитов, в условиях данной модельной системы неэффективен, что, вероятно, обусловлено исходно высокой экспрессией активационных антигенов на ЛПК детей, описанной выше.

Обобщая полученные данные, можно заключить, что изменения в иммунной системе детей с впервые установленным диагнозом ЗНМТ отражают процесс общего реактивного воспаления, лабораторным признаком которого является поликлональная активация

лімфоцитів. В таких умовах *in vivo* для предотвращения розвитку гіперімунних реакцій, потенційно небезпечних для організму ребенка, включаються механізми, направлені на подавлення протипухлинного імунного відповіді, опосередовані, в частині, Трег. Такі зміни в імунній системі дітей, по-видимому, несуть захитно-приспосібальний характер і відображають ранню реакцію організму на присутність пухлини.

### Висновки

1. Аналіз виявлених змін параметрів імунної системи у дітей з ЗНМТ дозволяє виділити ряд ознак, важливих для діагностики імунної дисфункції при цих захворюваннях:

- зменшення загальної кількості циркулюючих лімфоцитів;
- збільшення відносного кількості в периферическій крові лімфоцитів, експресуючих

активаційні маркери (CD25<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>);

- низькі показники мітоген-індукованої проліферації лімфоцитів;
- підвищене вміст Трег в циркуляції.

2. Дані лабораторні критерії можуть бути рекомендовані для практичного використання в моніторингу стану імунної системи дітей при проведенні основного лікування.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Детская онкология / под ред. И.Б. Белогуровой (2002) СПб., 249 с.
2. Pincerton C.R., Plowman C.N. (2005) Cancer chemotherapy and mechanisms of resistance. *Pediatric oncology*. London, 159–184.
3. Kushner B.H., Cheung N.K., Kramer K. et al. (2001) Topotecan combined with myeloablative doses of thiotepa and carboplatin for neuroblastoma, brain tumors, and other poor-risk solid tumors in children and young adults. *Bone Marrow Transplant.*, 28(6): 551–556.
4. Casanova M., Ferrari A., Sperafico F. et al. (2002) Vinorelbine in previously treated advanced childhood sarcomas. Evidence of activity in rhabdomyosarcoma. *Cancer*, 94(12): 3263–3268.

5. Saylor R.L., Stine K.C., Sallivan J. et al. (2001) Cyclophosphamide plus topotecan in children with recurrent or refractory solid tumors: a pediatric Oncology Group Phase II study. *J. Clin. Oncol.*, 19(15): 3463–3469.
6. Cosetti M., Wexler L., Colleja E. (2002) Irinotecan for pediatric solid tumors: the Memorial Sloan-Kettering experience. *J. Pediatr. Oncol*, 24(2): 84–85.
7. Wolchok J.D., Hoos A., O'Day S. et al. (2009) Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin. Cancer Res.*, 15(23): 7412–7420.
8. Пинегин Б.В., Ярилин А.А., Симонова А.В. и др. (2001) Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. Пособие для врачей-лаборантов. Москва, 55 с.
9. Луцки М.Д., Панасюк Е.Н., Луцки А.Д. (1981) Лекции. Львов: Вища школа, 156 с.
10. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. (2008) Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. Челябинск, 195 с.
11. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. (2009) Руководство по клинической иммунологии: диагностика заболеваний иммунной системы. М.: ГЭОТАР-Медиа, 345 с.
12. Ярилин А.А. (2007) Естественные регуляторные Т-клетки. *Рос. мед. журн.*, 1: 43–48.
13. Козлов В.А., Ярилин А.А., Аметов А.С. и др. (2008) Естественные регуляторные Т-клетки и связанные с ними цитокины при хроническом аутоиммунном тиреоидите. *Иммунология*, 29(6): 357–361.
14. Widen K., Mozaffari F., Choudhury A., Mellstedt H. (2008) Overcoming immunosuppressive mechanisms. *Ann. Oncol.*, 29(7): 241–247.

### Функціональна активність лімфоцитів периферическої крові у дітей зі зляжкісними новоутвореннями м'яких тканин

К.С. Шуміліна<sup>1</sup>, Ф.В. Фільчаков<sup>1</sup>, С.М. Кукушкіна<sup>1</sup>, Г.Д. Льон<sup>1</sup>, Ю.М. Ільченко<sup>1</sup>, Г.І. Климнок<sup>1</sup>, Е.В. Шайда<sup>1</sup>, Ю.В. Марушко<sup>2</sup>, Т.В. Гишчак<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Національний інститут раку, Київ

<sup>2</sup>Національний медичний університет ім. акад. О.О. Богомольця, Київ

**Резюме.** У зв'язку з розробкою і впровадженням у клінічну практику нових, більш інтенсивних, програм цитостатичної терапії дітей із солідними зляжкісними новоутвореннями важливого значення набуває оцінка ступеня порушень імунного гомеостазу пацієнтів. Сьогодні проводиться активний пошук лабораторних критеріїв діагностики дисфункції імунної системи, який враховує особливості біології пухлинного росту у взаємозв'язку з реакцією організму й відповіддю на терапію. Саме тому нами досліджено особливості активаційного фенотипу й функціональної активності лімфоцитів периферическої крові у дітей із прогностично несприятливими формами зляжкісних новоутворень м'яких тканин. У результаті проведеного дослідження визначено низку ознак, важливих для діагностики імунної дисфункції при цих захворюваннях: зменшення загальної кількості циркулюючих лімфоцитів; збільшення відносної кількості в периферическій крові лімфоцитів, що експресують активаційні маркери (CD25<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>); низькі показники мітоген-індукованої проліферації лімфоцитів; підвищений вміст Трег у циркуляції. Дані лабораторні критерії можуть бути рекомендовані для практичного використання під час моніторингу стану імунної системи дітей при проведенні основного лікування.

**Ключові слова:** функціональна активність лімфоцитів, імунна дисфункція, зляжкісні новоутворення м'яких тканин.

### Functional activity of peripheral blood lymphocytes in children with malignant tumours of soft tissues

E.S. Shumilina<sup>1</sup>, F.V. Fil'chakov<sup>1</sup>, S.N. Kukushkina<sup>1</sup>, A.D. Lon<sup>1</sup>, Y.M. Il'chenko<sup>1</sup>, G.I. Klimnyk<sup>1</sup>, E.V. Shaida<sup>1</sup>, Y.V. Marushko<sup>2</sup>, T.V. Gishchak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National cancer institute, Kyiv

<sup>2</sup>A.A. Bogomolets National Medical University, Kyiv

**Summary.** In connection with development and introduction of new, more intensive programs of cytostatic therapy of children with solid malignant tumours in clinical practice assessment of degree of disorder of an immunological homeostasis of patients is of more importance. Currently laboratory criteria of diagnostics of dysfunction of the immune system considering features of biology of tumoral growth are searched in interrelation with reaction of organism and answer to therapy. Thereupon we have studied features activation phenotype and functional activity of peripheral blood lymphocytes in children with prognostic unfavorable forms of malignant tumors of soft tissues. As a result of the conducted research a series of features important for diagnostics of immune dysfunction when having these diseases is determined: decrease of total amount of circulating lymphocytes; increase of degree in peripheric blood of lymphocytes, expressing activation markers (CD25<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>); low indexes of mitogen-induced proliferation of lymphocytes; increased number of Treg in circulation. These laboratory criteria can be recommended for practical use in monitoring of the state of immune system of children when carrying out of the basic treatment.

**Keywords:** functional activity of lymphocytes, immune dysfunction, malignant tumours of soft tissues.