

Российский Биотерапевтический Журнал



Гематология



1/2002

СОДЕРЖАНИЕ

Маркина И.Г., Тушицин Н.Н., Андреева Л.Ю.

Использование иммунофенотипирования для совершенствования диагностики и прогнозирования результатов терапии острых нелимфобластных лейкозов 3

Караулов А.В., Калюжнин О.В., Земляков А.Е.

Биологическая активность гликозидных производных N-Ацетилмурамил-L-Аланил-D-Изоглутамина 14

Волкова М.А. (обзор)

Интерфероны и их применение в онкогематологии 25

Кильдюшевский А.В., Молочков В.А., Гостева И.В.

Экстракорпоральная фотохимиотерапия в лечение Т-клеточных злокачественных лимфом кожи 34

Кильдюшевский А.В., Молочков В.А., Карзанов О.В.

Фотофорез — новый метод лечения вульгарной пузырчатки 42

Митина Т.А. (обзор)

Значение экспрессии дифференцировочных антигенов, молекул адгезии и FAS/APO в оценке клинического течения множественной миеломы и хронического лимфолейкоза. 47

Голенков А.К., Митина Т.А., Новиков В.В., Тигиров О.Т., Королева В.В.,

Крыжанов М.А., Луцкая Т.Д., Новиков Д.В., Барышников А.Ю.

Клиническое значение растворимых молекул адгезии (sCD50 - ICAM-3), апоптоза (sCD95) и sHLA класса I при лимфопролиферативных заболеваниях 60

Катаева Е.В., Голенков А.К., Трифонова Е.В., Луцкая Т.Д., А.Н. Ишмаков А.Н.,

Логачева Н.П., Лысюк Е.Ю., Барышников А.Ю.

Сравнительный анализ данных МТТ-пробы у больных хроническим лимфолейкозом с различным ответом на химиотерапию 65

Памяти Н.Н.Трапезникова 68

От редколлегии



**Главный редактор - директор НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН
профессор Анатолий Юрьевич Барышников**

Благодаря успехам в молекулярной биологии и генной инженерии за последние годы существенно изменились наши представления о механизмах возникновения и развития ряда грозных заболеваний человека, в том числе сердечно-сосудистой патологии и злокачественных новообразований. Охарактеризованы различные этапы их развития, выделены основные звенья патогенеза, обнаружены и продолжают выявляться специфические мишени для воздействия. Полученные данные позволяют начать разработку патогенетических подходов в лечении ряда заболеваний, объединив их под общим названием "биотерапия".

Наиболее активно биотерапия используется в онкологии. В настоящее время в биотерапии рака разрабатываются три основных направления. Это - прямое воздействие на опухолевую клетку (ингибирование клеточного деления, прерывание ауто- и паракринной стимуляции клеточного роста, индукция нормальной дифференцировки, запуск апоптоза, элиминация ангиогенного и инвазивного потенциала, снижение устойчивости к воздействиям), блокирование процессов ангиогенеза и инвазии, а также активация иммунной системы.

Основными мишенями в биотерапии рака являются генный, рецепторный аппараты и опухолеассоциированные антигены опухолевых клеток, гены и сигнальные аппараты клеток, участвующих в процессах ангиогенеза, метастазирования и в иммунном ответе.

Средствами для биотерапии рака являются гене-

тические конструкции, биологически активные молекулы различных классов, антитела, гормоны и их антагонисты и т.д. Их появление стало возможным благодаря успехам генной инженерии, биотехнологии, тонкого химического синтеза.

Одним из важнейших моментов в предклиническом изучении препаратов для биотерапии является разработка моделей *in vitro* и *in vivo*, призванных адекватно оценить эффективность будущего лекарства и целесообразность его клинических испытаний. В этой связи в экспериментальной онкологии активно развивается направление, связанное с получением трансфицированных клеток, трансгенных животных и разработка специальных методик изучения противоопухолевой эффективности на них.

В онкологической клинике в настоящее время уже применяются с хорошим терапевтическим эффектом биопрепараты. Это - интерфероны, интерлейкины, моноклональные антитела, генноинженерные вакцины и др.

По мнению многих специалистов-онкологов биотерапия рака является четвертой модальностью в лечении злокачественных новообразований, наряду с хирургическим, лучевым и химиотерапевтическим методами. Признанием перспективности биотерапии рака является открытие в США Института биотерапии рака, создание специальных подразделений по биотерапии рака в ведущих клиниках мира, выходом в свет специальных изданий, посвященных биотерапии рака.

В печати появляется большое количество публикаций, посвященных биотерапии различных заболеваний. Статьи размещаются в различных журналах, не систематизированы и не всегда доходят до интересующихся этой областью читателей. В России отсутствует научный журнал, в котором публикуются систематизированные исследования по этому вопросу, что побудило нас учредить журнал, который бы целиком был посвящен вопросам биотерапии.

Научный и научно-практический "Российский биотерапевтический журнал" состоит из трех разделов: Биомаркеры, Экспериментальная биотерапия и Клиническая биотерапия. В разделе Биомаркеры будут публиковаться научные статьи, посвященные изучению биомаркеров нормальных и патологических клеток, их использованию в диагностике различных заболеваний. В разделе Экспериментальная биотерапия будут помещаться статьи, в которых освещаются предклинические исследования в области биотерапии. Раздел Клиническая биотерапия будет содержать статьи с клиническими результатами по лечению заболеваний биотерапевтическими методами.

В редколлегия журнала и редакционный совет входят крупнейшие российские ученые, которые занимаются различными аспектами биотерапии. Мы полагаем, что журнал станет органом, кристаллизующим и консолидирующим ученых и клиницистов-биотерапевтов и будет способствовать более быстрому внедрению биотерапевтических методов и биопрепаратов в клинику.

Планируется выпуск тематических номеров, посвященных различным областям медицины.

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Теоретический и научно-практический журнал

№1 Том 1 2002 г

Почтовый адрес:

115478 Москва, Каширское шоссе, 24,

НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

Телефон: 324 22 74, ФАКС: 324 22 74

Редколлегия журнала

Главный редактор

А.Ю. Барышников, дмн, проф.

Заместители главного редактора

А.В. Караулов, дмн, проф. (Москва), Н.А. Оборотова, дфн (Москва)

О.А. Бочарова, дбн (Москва), А.К. Голенков, дмн, проф. (Москва), Л.В. Демидов, дмн, проф. (Москва),

И.В. Евсегнеева, кмн (Москва), П.К. Иванов, дмн (Москва), З.Г. Кадагидзе, дмн, проф. (Москва),

И.Ю. Кубасова, кмн (Москва), В.М. Моисеенко, дмн, проф. (Санкт-Петербург), В.В. Новиков, дбн, проф.

(Нижний Новгород), Н.И. Сергеева, дмн, проф. (Москва), Н.С. Тупицын, дмн, проф. (Москва), С.А. Тюляндин, дмн,

проф. (Москва), Е.В. Степанова (Москва), Р.И. Якубовская, дмн, проф. (Москва), Ю.В. Шишкин, дмн (Москва),

Е.Ю. Филинова (Москва)

Редакционный совет

А.П. Арзамасцев, академик РАМН, дфн, проф. (Москва), Н.П. Бочков, академик РАМН, дмн, проф. (Москва),

А.М. Гарин, дмн, проф. (Москва), Г.П. Георгиев, академик РАН, дбн, проф. (Москва),

М.Л. Гершанович, дмн, проф. (Санкт-Петербург), В.А. Гольянкин, дмн, проф. (Санкт-Петербург),

М.И. Давыдов, член-корр. РАМН, дмн, проф. (Москва), В.А. Тутельян, академик РАМН, дмн, проф. (Москва),

К.П. Хансен, член-клрр. РАМН, дмн, проф. (Санкт-Петербург), В.И. Чисов, академик РАМН, дмн, проф. (Москва)

Учредитель:

НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

Для медицинских учреждений бесплатно

Зарегистрировано в Государственном Комитете

Российской Федерации по печати

Рег. Номер: ПИ №77-11695

Тираж 1 000 экз.

Использование иммунофенотипирования для совершенствования диагностики и прогнозирования результатов терапии острых нелимфобластных лейкозов

И.Г.Маркина, Н.Н.Тупицын, Л.Ю.Андреева

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

Эффективность лечения больных острыми лейкозами (ОЛ) в первую очередь зависит от своевременно и точно установленного диагноза. Основой диагностики биологически гетерогенной группы ОЛ является морфологический и цитохимический анализ бластных клеток, позволяющий выявить наиболее стойкие, гистогенетически обусловленные энзимохимические отличия родоначальных кроветворных клеток различного происхождения. На основании морфоцитохимических различий лейкозных клеток, согласно критериям FAB-классификации, предусматривается выделение 3 вариантов острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) и 8 вариантов острого нелимфобластного лейкоза (ОНЛЛ) [15]. Однако, современный уровень диагностики гемобластозов, помимо морфологических и цитохимических исследований, предполагает использование иммунологических методов. В настоящее время иммунофенотипирование при ОЛ стало неотъемлемым компонентом диагностического процесса. Использование широкой панели диагностических моноклональных антител (мкАТ) позволяет определять совокупность поверхностных и цитоплазматических антигенов злокачественных клеток с целью установления принадлежности этих клеток к определенной линии гемопоэза, а также выявления уровня возникновения патологического клона (т.е. стадию, на которой остановлено их нормальное развитие). При ОЛЛ иммунофенотипические особенности бластных клеток, в большей степени, чем их морфоцитохимические характеристики, коррелируют с рядом важных биологических и клинических параметров опухоли и, поэтому, имеют решающее значение при выборе программы терапии больных [28, 36, 42]. Иммунологический метод диагностики при ОНЛЛ позволяет идентифицировать такие варианты как М0, М6 и М7 [13, 29, 38, 43], а также помогает проводить дифференциальную диагностику между М1 и М2, М2 и М3, М2 и М4 вариантами. Кроме того, использование иммунофенотипирования дает возможность выявлять гетерогенность в пределах морфоцитохимически однородной популяции лейкозных клеток внутри отдельных FAB-вариантов, что, несомненно, является существенным для разработки иммуноклассификаций ОНЛЛ, ориентированных на индивидуализацию химиотерапевтических режимов для конкретных иммунологических подгрупп.

В Российском онкологическом научном центре РАМН накоплен достаточно большой опыт по диагностике и лечению ОНЛЛ. У истоков этих работ стоят школы акад. Г.И.Абелева, проф. А.Ю.Барышникова, проф. Н.Н.Тупицына. Исследования иммунофенотипа ОНЛЛ базируются на прочном морфо-иммуноцитохимическом фундаменте, критериях FAB-классификации (этот раздел работ в РОНЦ возглавляет проф. М.А.Френкель). Приводимые нами в статье сведения о взаимосвязи экспрессии тех или иных антигенов с клиническими проявлениями и прогнозом получены совместно с проф. М.А.Волковой (отделение химиотерапии гемобластозов (рук. - к.м.н. Д.Ш.Османов) РОНЦ РАМН). Именно столь комплексный подход к проблеме позволил установить роль иммунофенотипирования как метода исследования и диагностики ОНЛЛ и рекомендовать широкое видение оценки мембранных маркеров в качестве основы совершенствования лечения этого заболевания. В данной публикации мы попытались представить не только алгоритм иммунодиагностики ОНЛЛ, но и дать характеристику наиболее часто используемых антигенов, а также их ассоциации с определенными биологическими свойствами опухоли и прогнозом заболевания на основании собственных наблюдений и анализа данных зарубежной литературы.

Согласно рекомендациям первой Европейской группы по иммунологической классификации лейкозов (EGIL) [1] исследование бластных клеток при ОНЛЛ должно проводиться в два этапа. На первом этапе необходимо подтвердить миелоидную природу опухолевого клона клеток. Для этого используют наиболее специфичные маркеры миелоидного происхождения (анти-МПО, CD13, CD33, CDw65, CD117), а также линейно-неспецифические антигены и антигены, ассоциированные со стволовой клеткой (TdT, CD34, HLA-DR). С целью дифференциальной диагностики с ОЛЛ в панель должны быть включены и наиболее специфичные лимфоидные маркеры, отражающие наиболее ранние стадии В- и Т-клеточной направленности дифференцировки (CD19, цитоплазматический CD22, CD79a, CD10, цитоплазматический CD3, CD2, CD7). На втором этапе используется более широкая панель мкАТ с целью более детальной классификации вариантов ОНЛЛ.

В РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН иммунофенотипирование ОЛ проводится в течение примерно 20 лет. Разуме-

ется, на протяжении этого периода панель мкАТ, используемых для иммунодиагностики ОЛ дополнялась и уточнялась с учетом диагностической и прогностической значимости маркеров. Накопленный нами опыт позволил полностью отказаться от алгоритма двух- или трехэтапного иммунофенотипирования по следующим причинам [5]:

1. При диагностике вариант ОЛ не известен и необходимо применение широкой панели мкАТ как к миелоидным, так и к лимфоидным антигенам.

2. В обязательном порядке в РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН проводится полное цитохимическое исследование [8]. По эти причинам иммунофенотипирование при ОНЛЛ не является главным методом диагностики варианта лейкоза. Диагностическая роль иммунофенотипирования имеет решающее значение при редких вариантах ОНЛЛ - М0, М6 и М7.

3. В значительной части случаев ОНЛЛ решающую роль играют не маркеры линейной принадлежности, а стадийспецифичные и линейно не рестриктированные антигены.

4. Двух- и трехэтапная постановка реакции технически не удобна для лаборантов, так как им приходится неоднократно обрабатывать один и тот же материал (клетки больного), что требует большего времени и не является оправданным.

Используемая в РОНЦ РАМН панель для диагностики ОНЛЛ приведена в табл.1 [5].

Представленный перечень не является исчерпывающим, он может быть дополнен другими антигенами. Чем шире набор диагностических мкАТ, тем большая вероятность выявления аномалий опухолевого фенотипа, что может быть использовано в дальнейшем для контроля минимальной резидуальной болезни. Использование широкой панели мкАТ дает возможность установить линейную коммитацию бластов и позволяет более точно охарактеризовать лейкозный клон клеток миелоидного происхождения для выявления определенных закономерностей между различными морфоцитохимическими вариантами ОНЛЛ и уровнями экспрессии ряда антигенов.

Миелоидная направленность бластных клеток при ОЛ может быть определена по экспрессии двух общемиелоидных антигенов - CD13 и CD33. (В последние годы широкое распространение получили исследование CDw65 и иммунологическое исследование миелопероксидазы, но мы не имеем соответствующего опыта работы с этими маркерами). Оба этих маркера (CD13 и CD33) в нормальной дифференцировке появляются на CD34+ клетках после линейно не ограниченных антигенов CD38 и HLA-DR и в дальнейшем присутствуют на всех стадиях дифференцировки миелоидных клеток.

Антиген CD33 представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 67кД, кодируемый геном, локализованным в длинном плече 19 хромосомы. Имеет лектино-

Таблица 1. Иммунофенотипические маркеры, используемые при диагностике ОНЛЛ.

Антиген	Клеточная специфичность
Миеломоноцитарные антигены CD11b CD13 CD14 CD15 CD33	Гранулоциты, моноциты, ЕК-клетки Гранулоциты, моноциты со стадии КОЕ-ГМ Моноциты, макрофаги, гранулоциты (слабо) Гранулоциты, моноциты Миелоидные клетки-предшественники, моноциты
Эритроидные антигены HAE-3 (гликофорин А) HAE-9 (антиген эритробластов)	Эритроциты, эритроидные предшественники Ядросодержащие эритроидные клетки
Мегакариоцитарные антигены CD41, CD42, CD61	Тромбоциты, мегакариоциты
Антигены различных линий CD34 CD38 HLA-DR CD10	Стволовые клетки Гемопозитические клетки-предшественники, активированные В- и Т-клетки, моноциты Гемопозитические клетки-предшественники, активированные Т-клетки, В-клетки, моноциты/макрофаги В- и Т-клетки предшественники, гранулоциты
В-клеточные антигены CD19 CD22 CD37	В-клеточные предшественники и В-клетки В-клетки Зрелые В-клетки, низкие уровни экспрессии на некоторых Т-клетках и миелоидных клетках
Т-клеточные антигены CD1a CD3 CD2 CD4 CD5 CD7	Кортикальные тимоциты Зрелые Т-клетки Тимоциты, Т-лимфоциты, ЕК-клетки Т-хелперы, моноциты, макрофаги, гранулоциты Тимоциты, зрелые Т-клетки Т-клеточные предшественники и Т-клетки, ЕК-клетки, незрелые клетки миелоидного ряда

вую активность. Антиген экспрессируется на мультипотентных клетках-предшественниках гранулоцитарно-моноцитарной, эритроидной и мегакариоцитарной линий (КОЕ-ГЭММ), а также на клетках-предшественниках, коммитированных в грануломоноцитарном (КОЕ-ГМ) и эритроидном (БОЕ-Э) направлении (рис. 1). Экспрессия CD33 выявляется в подавляющем большинстве случаев при M1 - M5 ОНЛЛ, реже - при M0, M6 и M7. CD33-позитивный иммунофенотип коррелирует с t(15;17) и t(8;21) [11], молодым возрастом больных [3, 33], отсутствием тромбоцитопении в дебюте заболевания [41] и весьма высокой чувствительностью к проводимой терапии [24].

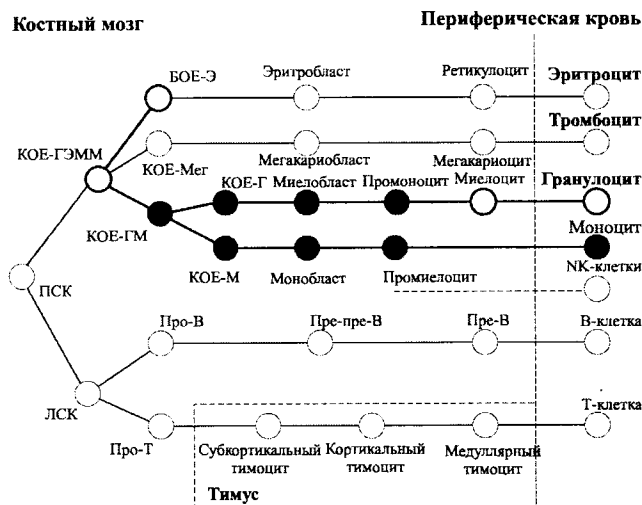


Рис. 1. Экспрессия антигена CD33 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток. Здесь и на последующих рисунках обозначения: ○ – отсутствие антигена на клетках; ● – наличие антигена на клетках.

Антиген CD13 является гликопротеином с молекулярной массой 150 кД, который в нормальной клеточной дифференцировке экспрессируется на поверхности коммитированных гранулоцитарно-моноцитарных предшественников и на клетках гранулоцитарного и моноцитарного направления всех стадий дифференцировки (рис. 2). Молекула CD13 идентична аминопептидазе N, которая известна как мембранная металлопротеаза, участвующая в метаболизме биологически активных пептидов клетками различных типов, включая макрофаги и гранулоциты. Экспрессия антигена CD13 наблюдается приблизительно у 60% больных ОНЛЛ. Реакция на CD13 положительна для 93-100% случаев M1 - M4, несколько реже она встречается при M0 и M5 вариантах (67-86%) и не обнаруживается в большинстве случаев M6 и M7 ОНЛЛ. Отсутствие экспрессии CD13 на поверхности бластных клеток коррелирует с вариантом M2, ассоциированным с t(8;21) [14] и с M5a, ассоциированным с t(9;11) [22]. Особенности CD13-позитивного иммунофенотипа, по нашим данным, также являются исходный гиперлейкоцитоз ($58,8 \pm 3,07$ против $23,5 \pm 6,29$ тыс./мкл; $p = 0,048$), гиперклеточность костного мозга ($201,4 \pm 57,9$ против $106,2 \pm 14,43$ тыс./мкл; $p = 0,03$), низкая общая выживаемость (медиана 5 мес. против 13 мес.; $p = 0,06$).

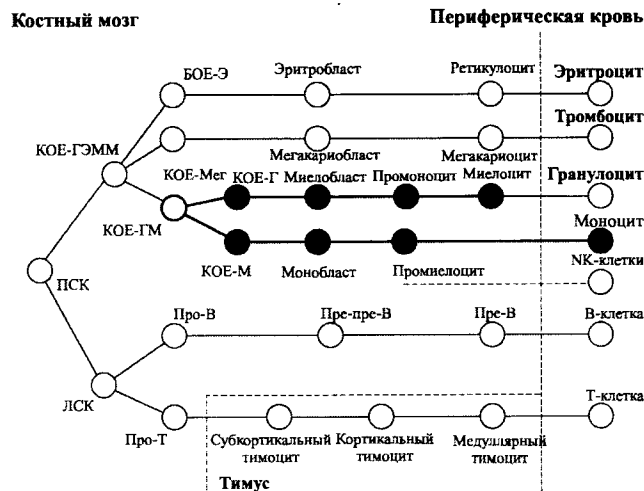


Рис. 2. Экспрессия антигена CD13 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

Помимо общемиелоидных маркеров, позволяющих подтвердить миелоидную природу лейкоза в 98% случаев [17], изучаются линейно не рестриктированные антигены лимфоцитов, экспрессия которых в большинстве случаев ОНЛЛ коррелирует с незрелостью клоногенных элементов. В нормальном костном мозге процент клеток, коэкспрессирующих маркеры различных гемопоэтических линий, невелик, однако этот феномен достаточно часто встречается при гемобластозах. Экспрессия маркеров различных линий кроветворения выявляется в среднем у 35-48% больных ОНЛЛ [12, 30, 37, 48]. В таких случаях вариант заболевания трактуется по-разному в зависимости от того, какие именно «лимфоидные» антигены выявляются на бластных клетках ОНЛЛ. Общим термином, который применим во всей этой группе лейкозов, является термин «острые смешанно-линейные (mixed-lineage) лейкозы (ОСЛЛ)». Наиболее частой разновидностью ОСЛЛ являются линейно-разномаркерные лейкозы, происходящие из клеток-предшественников, коэкспрессирующих в норме маркеры различных линий [6].

Один из наиболее часто встречающихся лимфоидных маркеров при ОНЛЛ антиген CD7 - гликопротеин с молекулярной массой 40 кД, который, кроме клеток Т-ряда, обнаруживается на примитивных гемопоэтических клетках, способных к миелоидной дифференцировке (рис. 3). CD7 играет роль в передаче внутриклеточного сигнала для последующего развития, активации и дифференцировки Т-клеток. Связывание мембранных CD7 с помощью мкАТ вызывает секрецию цитокинов и изменяет клеточную адгезию. По нашим данным CD7 экспрессируется на поверхности мемbrane бластных клеток в 28% случаев ОНЛЛ и ассоциируется с M0, M1, M4, M5a и M6 морфоцитохимическими вариантами. Имеются убедительные данные об ассоциации экспрессии антигена CD7 с наиболее важными факторами неблагоприятного прогноза - фенотипом множественной лекарственной устойчивости, наличием Ph-хромосомы, аномалиями 5 и/или 7 хромосомы, а также со сложными нарушениями кариотипа [48]. Некоторыми авторами также отмечается, что клиническими особенностями CD7-позитивных ОНЛЛ являются вовле-

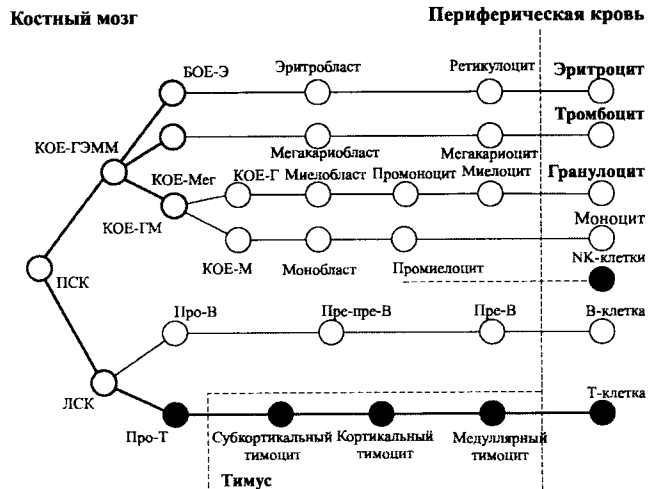


Рис. 3. Экспрессия антигена CD7 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

чение в опухолевой процесс центральной нервной системы, высокий лейкоцитоз в дебюте заболевания, гепатоспленомегалия [25]. По данным РОНЦ РАМН отсутствие на бластных клетках антигена CD7 коррелирует с более длительной безрецидивной выживаемостью (медиана 15,5 мес. против 5 мес.; $p = 0,01$), рис. 4. Низкая эффективность стандартной противоопухолевой терапии, по мнению ряда зарубежных исследований и нашим данным [2, 3, 5, 30, 32, 45], диктует необходимость исходной интенсификации терапии для больных ОНЛЛ с наличием в иммунофенотипе CD7-позитивных бластов.

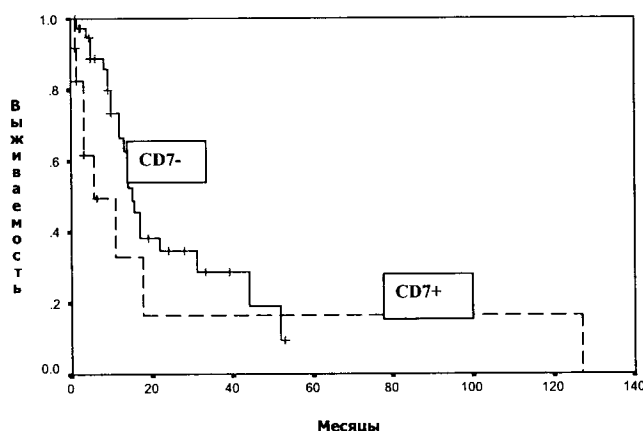


Рис. 4. Безрецидивная выживаемость больных ОНЛЛ в зависимости от экспрессии антигена CD7 на поверхности бластных клеток при использовании цитозар-антрациклиновых программ.

Антиген CD4 представляет собой мембранный гликопротеин с молекулярной массой 55 кД и является рецептором антигена гистосовместимости II класса, а также принимает участие во внутритимической дифференцировке Т-клеток. Помимо экспрессии на Т-клетках, он может присутствовать на мембране гемопоэтических клеток-предшественников, находящихся на очень ранних стадиях развития (КОЕ-ГМ, БОЕ-Э, КОЕ-Мег), а также на поверхност-

ных мембранах моноцитов и макрофагов (рис. 5). Процент выявления CD4 при ОНЛЛ, по данным разных авторов, колеблется от 13% до 48%. Этот антиген наиболее характерен для М0 (57%), М4 (64%) и М5 (83%) вариантов ОНЛЛ [30]. В большинстве случаев данный иммунофенотип обнаруживается у пациентов с наличием аберрации 11q23 и коррелирует с низкой выживаемостью [37].

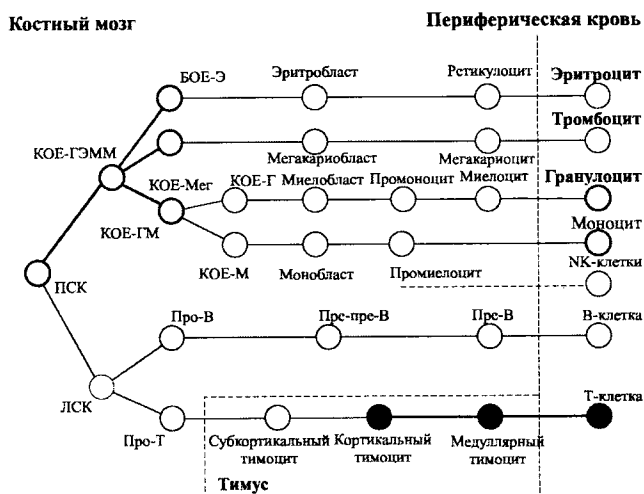


Рис. 5. Экспрессия антигена CD4 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

Антиген CD2 является гликопротеином с молекулярной массой 50 кД, относящимся к суперсемейству иммуноглобулинов. Этот многофункциональный маркер участвует в активации Т-клеток, продукции цитокинов, индукции апоптоза и в регуляции цитолиза, опосредованного Т-лимфоцитами. CD2 экспрессируется на ранних стадиях внутритимической дифференцировки Т-клеток и на последующих этапах их развития, а также обнаруживается на ЕК-клетках (рис. 6). По данным разных авторов частота экспрессии этого антигена колеблется от 11% до 21% случаев ОНЛЛ. Наличие CD2 наиболее часто наблюдается на поверхности бластных клеток при вариантах М3 (осо-

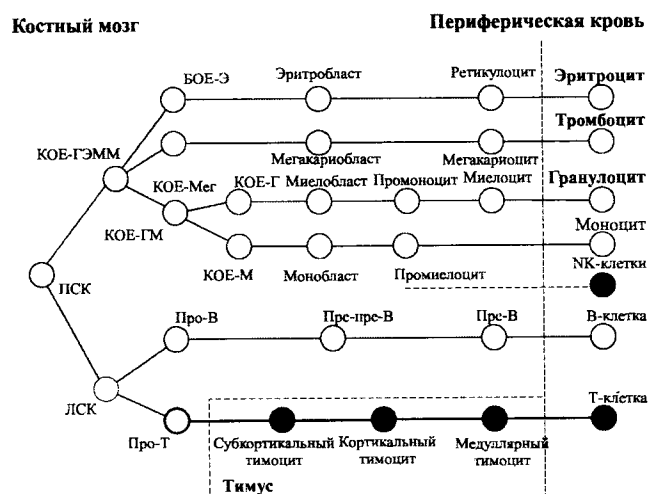


Рис. 6. Экспрессия антигена CD2 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

бенно при М3v) и М4эоз. Козэкспрессия антигенов CD2 и CD19 является одной из наиболее частых при ОНЛЛ, причем при М3 такая комбинация маркеров отмечается в 2, а при М4эоз - в 8 раз чаще по сравнению с другими вариантами ОНЛЛ [12]. По данным этих же авторов, больные с иммунофенотипом [CD2+; CD19+] имеют достоверно более высокую частоту достижения ремиссии и более длительную 2-х летнюю выживаемость по сравнению с [CD2; CD19]-негативными пациентами.

Антиген CD19 является мембранным гликопротеином с молекулярной массой 95 кД, который экспрессируется в костном мозге самыми ранними предшественниками В-клеток и на всех последующих стадиях созревания В-лимфоцитов (рис. 7). CD19 участвует в регуляции развития, активации и дифференцировки В-лимфоцитов. В нашем наблюдении частота экспрессии CD19 при ОНЛЛ составила 15,5%. Наиболее часто он был выявлен при М1, М2 и М4 вариантах в 15%, 23% и 13% случаев соответственно. При варианте М2 экспрессия антигена CD19 с высокой степенью вероятности (90%) коррелирует с транслокацией t(8;21)[31]. По нашим данным прогностическая роль CD19 реализуется в условиях лечения лейкозов по цитозар-идарубициновой программе, которая в настоящее время является базисной в отделении химиотерапии гемобластозов РОНЦ РАМН [4].

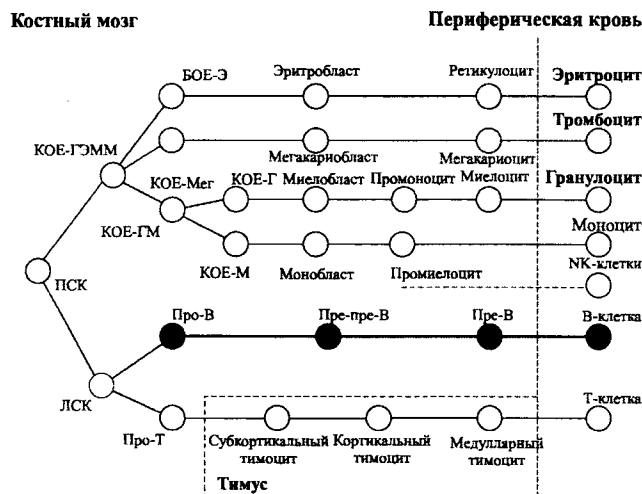


Рис. 7. Экспрессия антигена CD19 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

Антиген CD10 - одноцепочечный гликопротеин с молекулярной массой 100 кД, принадлежащий к семейству мембраноассоциированных пептидаз. Он участвует в росте и формировании В-клеток, гидролизе пептидов, влияющих на пролиферацию. Этот маркер выявляется на ранних лимфоидных родоначальных клетках костного мозга и эмбриональной печени, а среди нелимфоидных гемопоэтических клеток - на зрелых нейтрофилах (рис. 8). В нашем наблюдении [3, 7] экспрессия антигена CD10 на лейкоэмических бластах больных с ОНЛЛ отмечалась в 11 (8%) из 137 исследованных случаев, а именно в 13% - при М1, в 8% - при М2 и в 7% - при М3 и при М4 вариантах. Особенностью CD10-позитивных ОНЛЛ лейкозов явилась высокая частота полных ремиссий (91%) и за счет этого досто-

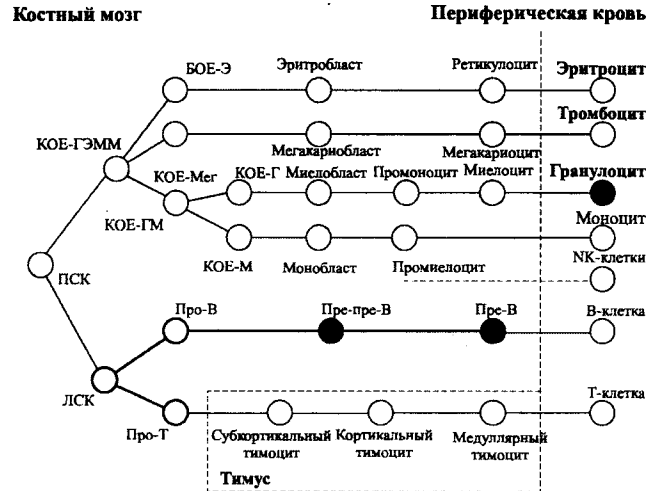


Рис. 8. Экспрессия антигена CD10 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

верно большая общая выживаемость больных (медиана 21 мес. против 6 мес.; $p = 0,049$), рис. 9.

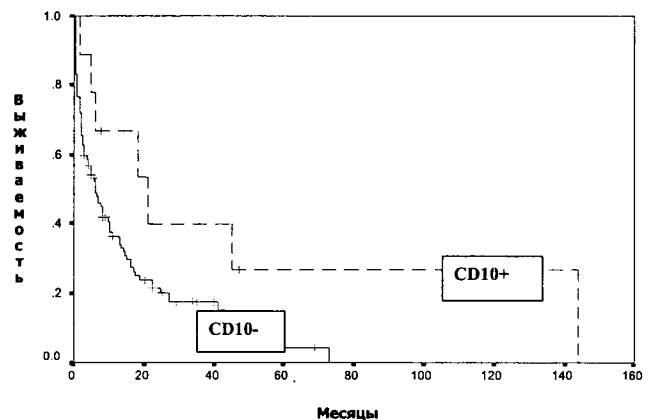


Рис. 9. Общая выживаемость больных ОНЛЛ в зависимости от экспрессии антигена CD10 на поверхности бластных клеток при использовании цитозар-антрациклиновых программ.

Современный уровень диагностики ОНЛЛ предполагает также использование линейно не ограниченных антигенов, которые помогают установить стадию зрелости бластных клеток, что, в ряде случаев, коррелирует с эффективностью лечения.

Стволовоклеточный антиген CD34 представляет собой гликозилированный трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой около 110 кД, который экспрессируется только на незрелых клетках-предшественниках гемопоэза (рис. 10). Ген CD34 локализован в длинном плече 1 хромосомы. В нормальном костном мозге до 1,5% мононуклеарных клеток являются CD34-позитивными, из них только 5% находится в митотическом цикле, а остальные 95% пребывают в фазе покоя (G0). Популяция CD34+ клеток включает в себя все определяемые *in vitro* гемопоэтические колониеобразующие клеточные линии, которые обладают высоким пролиферативным потенциалом и способны полностью восстанавливать гемопоэз. При ОНЛЛ

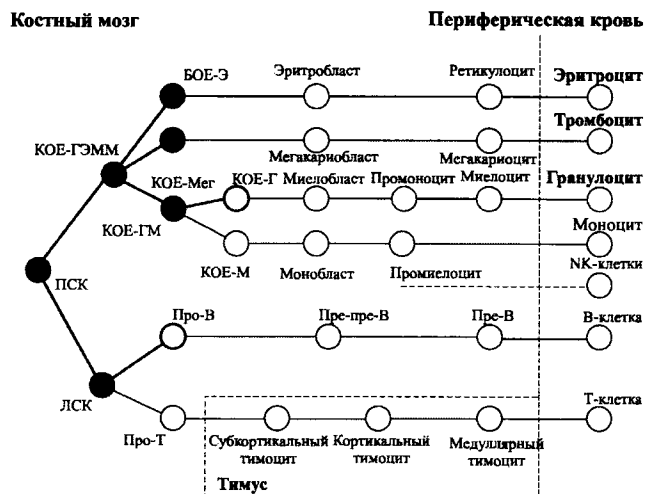


Рис. 10. Экспрессия антигена CD34 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

экспрессия CD34 наблюдается в среднем в 40% случаев. С наибольшей частотой экспрессия данного антигена обнаруживается при низкодифференцированных вариантах (M0, M1 и M5a) и при M4 и в основном отсутствует при M3 и M5b ОНЛЛ. При M2 ОНЛЛ CD34-позитивные бласты наблюдаются примерно у 30% больных, особенно в случаях, ассоциированных с транслокацией t(8;21). Опухолевый клон клеток ОНЛЛ, экспрессирующий стволовую клеточный маркер, характеризуется низким уровнем Ki 67 - маркера активного синтеза ДНК [34]. Это свидетельствует о том, что большинство опухолевых клеток находится в фазах G0/G1 клеточного цикла и, следовательно, являются слабо уязвимой мишенью для химиопрепаратов, действующих на делящиеся клетки. Это подтверждается и клиническими результатами. По данным большинства исследований [3, 10, 23, 26, 27, 43], CD34-позитивные ОНЛЛ характеризуются более высокой злокачественностью и резистентностью к химиотерапии. Имеются данные об ассоциации антигена CD34 с высоким уровнем bcl-2 [18] и геном множественной лекарственной устойчивости [35]. Высокие уровни экспрессии CD34 наблюдаются у больных пожилого возраста [34], а также при вторичных ОНЛЛ и ОНЛЛ, развившихся на основе миелодиспластического синдрома [26].

CD38 представляет собой интегральный мембранный одноцепочечный гликопротеин с молекулярной массой 46 кД, около 20% которой приходится на долю углеводного компонента. Этот антиген обладает активностью (ADP)-рибозилциклазы, которая принимает участие в поступлении аденозин 5'-дифосфат-рибозы в клетку и регуляции ее количества, а также NAD⁺-гликогидразы. Кроме того, антиген CD38 участвует во внутриклеточном обмене кальция. В нормальном костном мозге экспрессия CD38 отмечается на 99% CD34⁺ мононуклеарах. Линейная коммитация клеток-предшественников различных ростков гемопоэза ассоциируется со снижением уровня экспрессии CD34 и повышением уровня CD38. Экспрессия антигена CD38 при нормальной клеточной дифференцировке показана на рис. 11. При ОНЛЛ он выявляется в среднем в 61,5% случаев, наиболее часто при вариантах M0-M2, реже - при

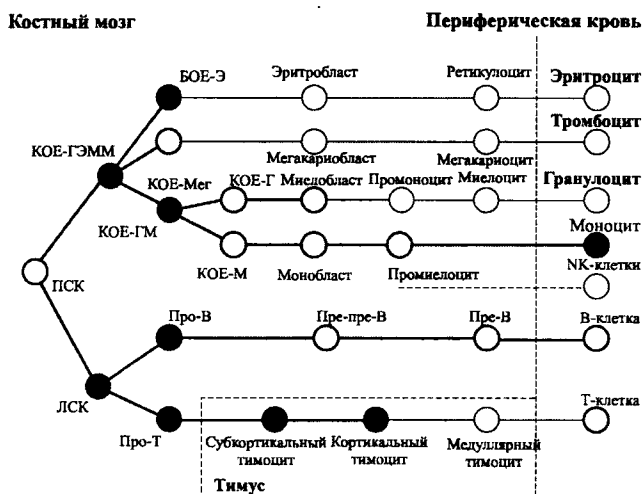
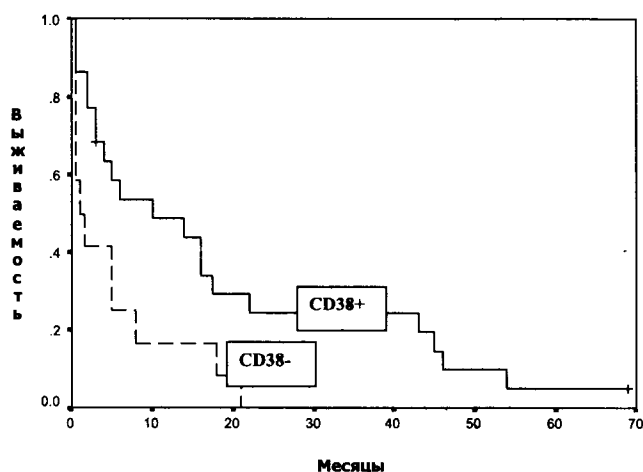


Рис. 11. Экспрессия антигена CD38 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

M3- M5. Прогностическое значение антигена CD38 особенно важно в условиях современных программ химиотерапии ОНЛЛ. По данным РОНЦ РАМН препаратом выбора в лечении ОНЛЛ по цитозар-антрациклиновым программам должен являться идарубинин. Этот антрациклиновый антибиотик полностью нивелирует негативное влияние всех клинко-гематологических и морфоцитохимических факторов на прогноз [3]. При этом прогностическое значение иммунологических маркеров бластных клеток резко возрастает. При использовании идарубина, по сравнению с другими антрациклинами, пациенты с экспрессией CD38 имели более высокую частоту полной ремиссии (68,2% против 33,3% соответственно), а также безрецидивную (медиана 14 мес. против 5 мес.; $p = 0,013$) и общую выживаемость (медиана 12 мес. против 1 мес.; $p = 0,019$), рис. 12.

HLA-DR антиген, так же как и антиген CD38, экспрессируется на гемопоэтических клетках-предшественниках гемопоэза, он обнаруживается и на некоторых последующих стадиях созревания клеток гранулоцитарного, моноцитарного, мегакариоцитарного и эритроидного направления (рис. 13). Присутствие HLA-DR антигена характерно для 69% больных ОНЛЛ. HLA-DR-позитивные бласты регистрируются в подавляющем большинстве случаев M0,



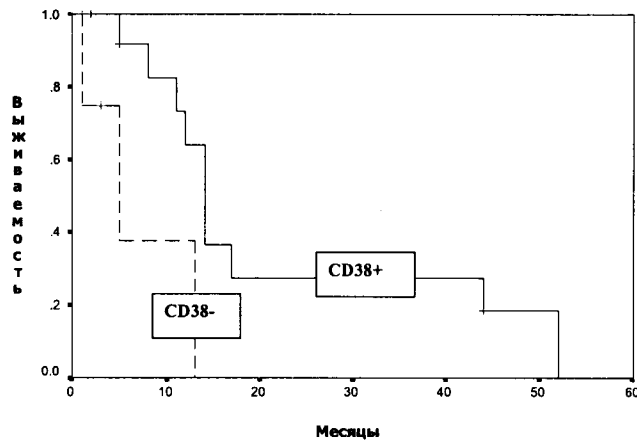


Рис. 12. Общая (вверху) и безрецидивная (внизу) выживаемость больных ОНЛЛ в зависимости от экспрессии антигена CD38 на поверхности бластных клеток при использовании идарубицин-цитарабиновой программы терапии.

M1, M5, M6 и M7 ОНЛЛ и у 60-70% пациентов с вариантами M2 и M4. Дифференциально-диагностическое значение имеет отсутствие HLA-DR антигена при остром промиелоцитарном лейкозе, что, наряду с морфocyтохимической характеристикой, может учитываться для идентификации группы наиболее дифференцированных гранулоцитарных лейкозов. Имеются данные о корреляциях между экспрессией данного маркера с экстрамедуллярными проявлениями заболевания [21] и с меньшей чувствительностью к противоопухолевой терапии как у детей с ОНЛЛ [7], так и у взрослых [2, 16].

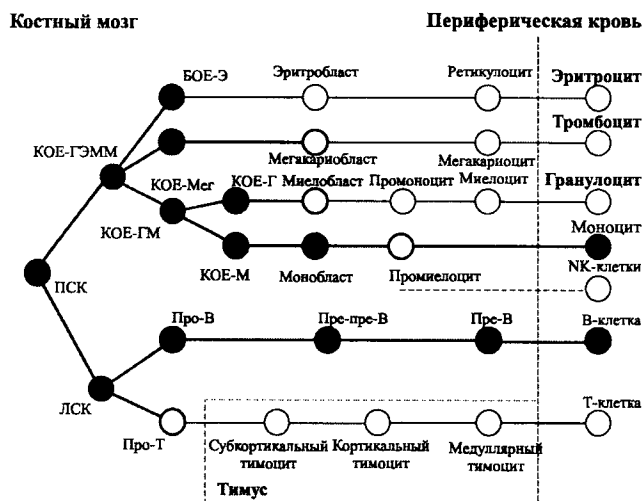


Рис. 13. Экспрессия антигена HLA-DR в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

Панель мкАТ для иммунодиагностики ОНЛЛ включает линейно-специфичные маркеры, характерные для эритроидной и мегакариоцитарной направленности, а также стадийспецифичные маркеры, которые появляются на более поздних стадиях дифференцировки гранулоцитарных или моноцитарных клеток.

Маркер миелоидных клеток CD15 является углеводным антигеном лакто-N-фукопентозы III и участвует в клеточной адгезии. Он появляется на стадии бипотентного предшественника и экспрессируется на большинстве незрелых и дифференцированных клеток, включая промиелоциты, миелоциты, метамиелоциты, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы и эозинофилы, моноциты, тучные клетки, макрофаги и клетки Лангерганса (рис. 14). На поверхности лейкемических клеток ОНЛЛ CD15 обнаруживается в 37% случаев. По нашим наблюдениям, наиболее часто экспрессия антигена CD15 обнаруживается при M2, M3 и M4 и M56 ОНЛЛ, несколько реже - M1 и M6. Характерной особенностью M0 и M7 ОНЛЛ является практически полное отсутствие этого антигена на поверхностных мембранах бластных клеток, поэтому CD15 можно использовать для дифференциальной диагностики M1 и M0 вариантов ОНЛЛ. У больных со специфической транслокацией t(8;21) присутствие данного маркера наблюдается практически в 100% случаев [44]. Ряд исследователей указывает на высокую эффективность стандартной цитозантрациклиновой терапии для больных, имеющих в иммунофенотипе CD15-позитивные бластные клетки [20, 44].

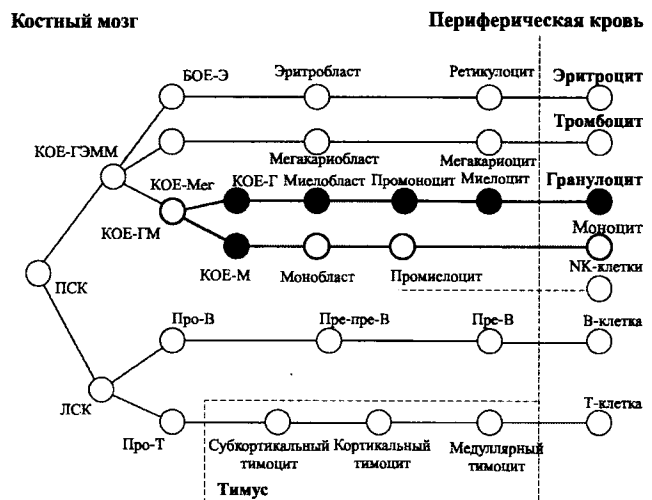


Рис. 14. Экспрессия антигена CD15 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

CD14 - одноцепочечный мембранный гликопротеин с молекулярной массой 55 кД - представляет собой маркер специфичный для клеток моноцитарной линии поздних этапов дифференцировки (рис. 15). В ряде случаев имеет место экспрессия данного маркера при гранулоцитарных лейкозах. Являясь высокоафинным рецептором для липополисахаридов, мембранная форма CD14 принимает участие в активации продукции цитокинов (туморнекротического фактора, интерлекинов 1 и 6), а также, в транспорте липидов. Ген, кодирующий CD14, локализуется на 5 хромосоме в регионе, содержащем множество генов ростовых факторов и рецепторов факторов роста. Экспрессия антигена CD14 обнаруживается у больных ОНЛЛ в среднем в 32% случаев и коррелирует со снижением уровня гемоглобина в дебюте заболевания [41] и низкой эффективностью современной противоопухолевой терапии [19, 21, 25].

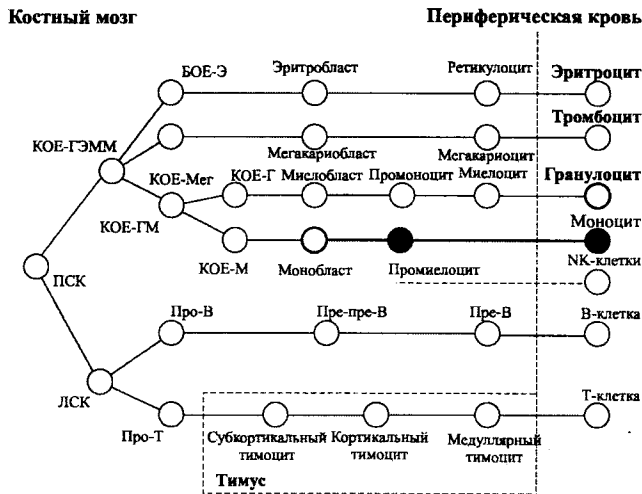


Рис. 15. Экспрессия антигена CD14 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

Наиболее поздний миелоидный антиген CD11b является рецептором для C3bi-комплемента, фибриногена, гепарина и т.д. Он осуществляет взаимодействие кровяных клеток с активизированным эндотелием, участвует в дегрануляции, хемотаксисе и фагоцитозе нейтрофилов. МкАТ к антигену CD11b реагируют с созревающими клетками гранулоцитарного ряда, начиная со стадии миелобласта, а также с моноцитами, ЕК-клетками, субпопуляцией лимфоцитов (рис. 16). Экспрессия антигена CD11b наблюдается в среднем в 33% случаев ОНЛЛ и позволяет прогнозировать высокий риск развития рецидива [19, 39].

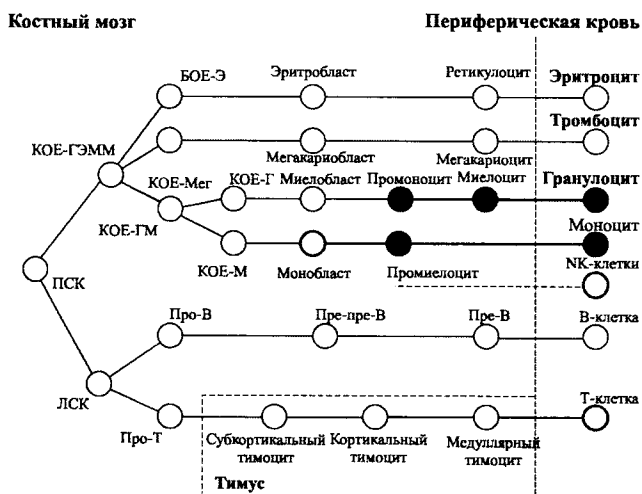


Рис. 16. Экспрессия антигена CD11b в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

Как видно из представленных выше данных, иммунофенотипирование не позволяет с такой надежностью как морфология установить тип бластных клеток при M1-M5 вариантах ОНЛЛ, однако дает возможность выявить множество дополнительных субтипов в морфоцитохимически однородной популяции злокачественного клона клеток, описывая, тем самым, более детальную картину опу-

холевого субстрата заболевания. Принципиальное значение иммунологическое исследование имеет при установлении ОНЛЛ с эритроидной и мегакариоцитарной направленностью дифференцировки, которые в подавляющем большинстве случаев не могут быть определены на основании морфоцитохимических критериев. С целью распознавания этих редких вариантов ОНЛЛ используют линейно-специфичные маркеры - гликофорин А (мкАТ НАЕ-3) для варианта M6 и CD41, CD42, CD61 для варианта M7.

Гликофорин А является специфическим антигеном клеток эритроидного ряда, который выявляется на всех морфологических стадиях, начиная с эритробласта и заканчивая зрелыми эритроцитами (рис. 17). Экспрессия других дифференцировочных маркеров (CD34, CD38, HLA-DR, CD33, CD13, CD15, CD7), по нашим данным, может быть весьма разнообразной и не влияет на установление диагноза. Однако, высокая частота обнаружения таких антигенов, как CD34, CD7, а также линейно не ограниченных маркеров, свидетельствует, что основную массу в пуле опухолевых клеток при M6 варианте ОНЛЛ составляют ранние эритроидные предшественники (БОЕ-Э).

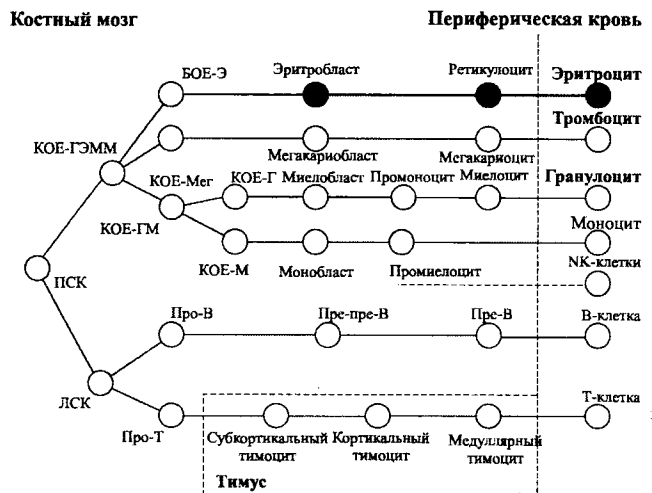


Рис. 17. Экспрессия антигена гликофорина А в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

Дополнительным маркером, свидетельствующим о признаках эритроидной дифференцировки, может служить антиген эритробластов (НАЕ-9), мкАТ к которому получены в лаборатории акад. Г.И.Абелева РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. В дифференцировочном ряду этот антиген появляется раньше гликофорина А и отсутствует на зрелых эритроцитах. НАЕ-9 выявляется в среднем в 78% случаев M6 ОНЛЛ, однако также обнаруживается у 14% больных с другими вариантами (наиболее часто - при M2 и M4 ОНЛЛ в 16 и 21% случаев соответственно). Проведены обширные исследования (более 400 больных) экспрессии эритроидных антигенов при гемобластозах, включая ОНЛЛ [47], и, тем не менее, время вопрос об их прогностической значимости во многом остается открытым. По нашим данным экспрессия бластными клетками гликофорина А была ассоциирована с более короткой продолжительностью ПР (медиана 1,5 мес. против 16 мес.; $p = 0,02$).

В более ранних исследованиях нашей клиники негативное влияние на БРВ обоих эритроидных маркеров оказалось взаимодополняющим [2].

Для установления мегакариоцитарной природы бластных клеток при М7 варианте ОНЛЛ применяют мкАТ к маркерам CD41, CD42 и CD61. Экспрессия антигена CD61 (гликопротеин тромбоцитов GPIIb/IIIa) позволяет выявить самые ранние клетки-предшественники, коммитированные в мегакариоцитарном направлении. Наиболее специфичным маркером тромбоцитов и мегакариоцитов является антиген CD41 (гликопротеин тромбоцитов GP IIb/IIIa), появление которого предшествует процессу полиплоидизации. К более поздним маркерам мегакариоцитарной дифференцировки относится антиген CD42 (гликопротеин тромбоцитов GP Ib), появление которого совпадает с началом процесса полиплоидизации. Экспрессия антигенов CD61, CD41 и CD42 при нормальной клеточной дифференцировке показана на рис. 18, 19 и 20.

Костный мозг

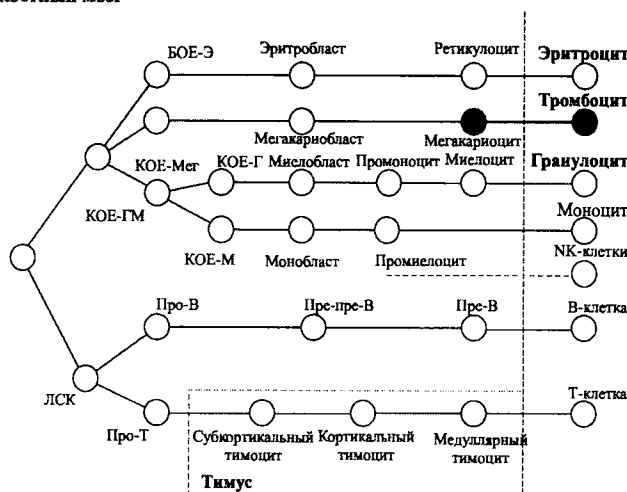


Рис. 20. Экспрессия антигена CD42 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

Костный мозг

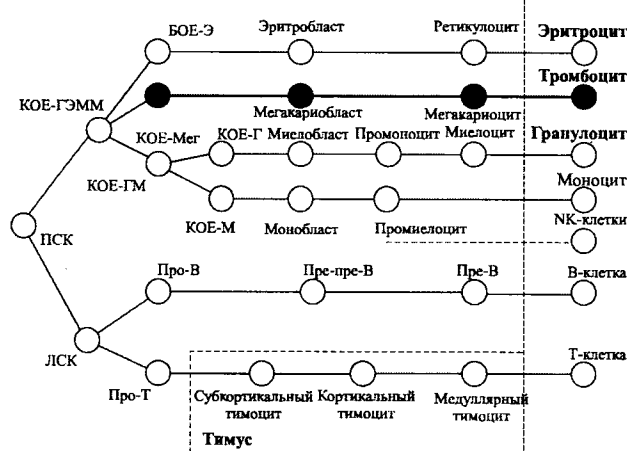


Рис. 18. Экспрессия антигенов CD61 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

Костный мозг

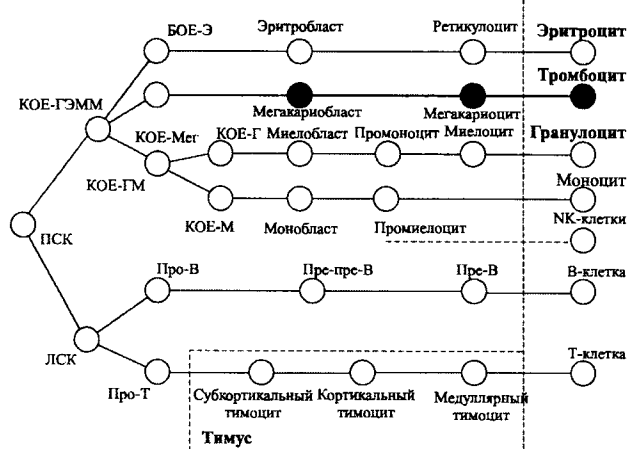


Рис. 19. Экспрессия антигена CD41 в ходе нормальной дифференцировки гемопоэтических клеток.

Сказанным, разумеется, не исчерпывается маркерный набор, изучаемый на мембране бластных клеток ОНЛЛ. Одним из перспективных антигенов для последующих иммунодиагностических работ в этом направлении является панмакрофагальный рецептор CD163. Наши работы указывают на целесообразность использования мкАТ D11 к этому антигену в иммунофенотипировании лейкозов [9, 46], однако, его прогностическая роль еще предстоит оценить в последующем.

По данным Reading C.L. с соавт. одновременная экспрессия антигенов, в норме не встречающихся, определяется в 85 % случаях ОНЛЛ [40]. Основные иммунофенотипические характеристики бластных клеток различных морфоцитохимических вариантов ОНЛЛ суммированы в табл. 2.

В заключение еще раз хотелось подчеркнуть, что в связи с тенденцией к углубленному изучению биологических свойств опухолевой популяции при ОНЛЛ отнюдь не снижаются требования к морфоцитохимическому методу исследования, позволяющему детально описать субстрат заболевания. Однако актуальность иммунофенотипирования, позволяющего выявить характерные и атипичные свойства бластных клеток, все более возрастает. Принимая во внимание собственные данные и публикации последнего времени, следует признать, что результаты терапии отдельных иммунологических вариантов ОНЛЛ являются неудовлетворительными, несмотря на существенные достижения в лечении этого заболевания в целом. Это диктует необходимость индивидуализации химиотерапевтических режимов для больных с различными иммунофенотипами бластных клеток. Помимо вышеперечисленного, детальный анализ опухолевой популяции при диагностике ОНЛЛ, выявляющий aberrantные комбинации антигенов, создает предпосылки для возможности контроля за остаточной опухолевой популяцией. Это, по-видимому, позволит сделать прогноз ОНЛЛ более предсказуемым.

Таблица 2. Особенности иммунофенотипа бластных клеток при различных вариантах ОНЛЛ
(таблица составлена на основании следующих источников: 3, 5, 6, 30, 40, 48 и др.)

Экспрессируемые антигены	Морфоцитохимические варианты ОНЛЛ							
	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
TdT	+/-	+/-	-/+	-	-/+	-/+	-	-/+
МПО	+	+	+	+	+	-/+	+	+
CD34	+	+/-	+/-	-/+	+/-	-/[3]	+/-	+/-
CD38	+	+	+	-/+	+	-/+	+/-	+/-
HLA-DR	+	+	+	-	+	+	+	+
CD33	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+/-
CD13	+/-	+	+	+	+	+/-	-/+	-/+
CD15	-	+/-	+	+/-	+/-	-/+	-/+	-
CD11b	-	-/+	+/-	-/+	+	+	-/+	-
CD14	-	-	-/+	-	+	+/-[3]	-	-
HAЕ-3	-	-	-	-	-	-	+	-
HAЕ-9	-	-/+	-/+	-	-/+	-	+	-
CD41/CD42/CD61	-	-/+ [1]	-/+ [1]	-	-	-/+ [1]	-	+
CD10	-	*	*	*	*	-	-	-
Т-клеточные	CD7*** CD4***	CD2* CD4** CD7**	CD2** CD4* CD5* CD7*	CD2*** CD5*	CD2*[2] CD3*[2] CD4** CD5*[2] CD7**	CD2** CD3** CD4*** CD5*[3] CD7**	CD2* CD4* CD5* CD7***	CD4** CD7**
В-клеточные	-	CD19*	CD19**	CD19*	CD19*	-	CD19*	-

Примечание: *** часто, ** редко, * крайне редко

[1] только для антигена CD61

[2] для М4эоз с аномалиями хромосомы 16 – CD2***, CD3**, CD5**

[3] для М5b обычно CD34 (-), CD14 (+), для М5a – CD5**

Литература

1. Бене М.К., Кастолди Г., Напп В. и др. Гематол. и трансфузиол. - 1996. - Т. 41, N6. - С. 43-45.
2. Калетин Г.И., Тупицын Н.Н., Волкова М.А. и др. В кн.: Новое в онкологии. Вып. 2/Под ред. И.В.Поддубной и Н.А. Огнерубова. - Воронеж, 1997. - С. 11-14.
3. Маркина И.Г. Автореф. дисс. канд. мед. наук. - М. - 2000. - 30 С.
4. Маркина И.Г., Волкова М.А., Тупицын Н.Н. и др. Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. - 2000. - N2. - С. 30-36.
5. Тупицын Н.Н. В кн.: Клиническая онкогематология /Под ред. М.А.Волковой. - Москва, 2001. - С. 124-145.
6. Тупицын Н.Н. Гематол. и трансфузиол. - 1990. - Т. 35, N9. - С. 18-20.
7. Тупицын Н.Н., Попа А.В., Маркина И.Г. и др. Гематол. и трансфузиол. - 1999. - Т. 44, N. 3. - С. 3-8.
8. Френкель М.А. В кн.: Клиническая онкогематология/Под ред. М.А.Волковой. - Москва, 2001. - С. 146-155.
9. Френкель М.А., Тупицын Н.Н., Рудинская Т.Д. и др. Гематол. и трансфузиол. - 1995. - Т. 40, N4. - С. 13-16.
10. Adamczyk-Cioch M.B., Dmoszyncka A., Hus M. et al. Pol. Arch. Med. Wewn. - 1995. - Vol. 94(1). - P. 40-46.
11. Baer M.R., Stewart C.C., Lawrence D. et al. Prog. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol. - 1994. - Vol. 13. - abstr. A1004.
12. Ball E.D., Davis R.B., Griffin J.D. et al. Blood. - 1991. - Vol. 77(10). - P. 2242-2250.
13. Ball E.D., Fanger M.W. Blood. - 1993. - Vol. 61 (3). - P. 456-463.
14. Bene M.C., Bernier M., Casasnovas R.O. et al. Leukemia. - 1998. - Vol. 2. - P. 54.
15. Bennet J.M., Catovsky D., Daniel M.T. et al. Brit. J. Haematol. - 1991. - Vol. 78. - P. 325-328.
16. Bernier M., Massy M., De Leeuw N. et al. Leuk. Lymphoma. - 1994. - Vol. 13(1). - P. 109.
17. Bloomfield C., Lawrence D., Byrd C. et al. Cancer Res. - 1998. - Vol. 58 (18). - P. 4173-4179.
18. Bradbury D.A., Russel N.H. Br. J. Haematol. - 1995. - Vol. 91. - P. 374-379.
19. Bradstock K., Matthews J., Benson E. et al. Blood. - 1994. - Vol. 84(4). - P. 1220-1225.
20. Campos L., Guyotat D., Archimbaud E., et al. Br. J. Haematol. - 1989. - Vol. 72. - P. 161-166.
21. Casasnovas R.O., Solary E., Campos L. et al. Leuk. Lymphoma. - 1994. - Vol. 13(1). - P. 109.
22. Creutzig U., Ritter Y., Ludwig W.D. et al. Klin. Radiatr. - 1993. - Vol. 205. - P. 272-300.
23. Cuneo A., Fagioli F., Passi I. et al. Leuk. Res. - 1992. - Vol. 16(8). - P. 789-796.
24. De Nully Broun P., Jurlander J., Pedersen-Bjergaard J. et al. Leuk. Res. - 1997. - Vol. 21(10). - P. 985-995.
25. Del Poeta G., Stasi R., Venditti A. et al. Leukemia. - 1994. - Vol. 8(3). - P. 388-394.
26. Fagioli F., Cuneo A., Carli M.G. et al. Cancer Genet. Cytogenet. - 1993. - Vol. 71 (2). - P. 119-124.
27. Guinot M., Sans G.F., Sempere A. et al. Br. J. Haematol. - 1991. - Vol. 78. - P. 533-534.
28. Herlzer D., Seipelt G. Leukemithérapie. - Bremen: Uni-Med Verlag A.G. - 1998. - P. 66-80.
29. Jennings C.D., Foon K.A. Blood. - 1997. - Vol. 90. - P. 2863.
30. Khalidi H.S., Medeiros L.J., Chang K.L. et al. Am. J. Clin. Pathol. - 1998. - Vol. 109. - P. 211-220.
31. Kita K., Miwa H., Nakase K. et al. Blood. - 1992. - Vol. 80. - P. 470-477.
32. Kita K., Miwa H., Nakase K. et al. Blood. - 1993. - Vol. 81(3). - P. 2399-2405.
33. Kristensen J.S., Hokland R. Leuk. Res. - 1991. - Vol. 15(8). - P. 693-700.
34. Lanza F., Rigolin G.M., Moretti S. et al. Leuk. Lymphoma. - 1994. - Vol. 13. - P. 81-85.
35. Leith C.P., Chen I.M., Kopckey K.J. et al. Blood. - 1995. - Vol. 86. - P. 2329-2342.
36. Luesma-Gonalons M., Pavlovsky S., Santarelli M.T. et al. Ann. Oncol. - 1992. - Vol. 2. - P. 33-39.
37. Mizutani M., Miwa H., Tarahashi T. et al. Br. J. Haematol. - 1997. - Vol. 66. - P. 479.
38. Nooter K., Sonneveld P. Cytotechnology. - 1993. - Vol. 12. - P. 213-230.
39. Paietta E., Andersen J., Yunis J. et al. Br. J. Haematol. - 1998. - Vol. 100(2). - P. 265-272.
40. Reading C.L., Estey E.H., Huh Y.O. et al. Blood. - 1993. - Vol. 81. - P. 3083-3090.
41. Solary E., Casasnovas R.O., Campos L. et al. Leukemia. - 1992. - Vol. 6(5). - P. 393-399.
42. Sullivan M.P., Pullen D.J., Crist W.M. et al. Leukemia. - 1990. - Vol. 4. - P. 6-11.
43. Terstappen L.W., Safford M., Konemann S. et al. Leukemia. - 1991. - Vol. 5. - P. 75-80.
44. Tien H.F., Wang C.H., Lee M.C. et al. Cancer Genet. Cytogenet. - 1995. - Vol. 84(11). - P. 60-68.
45. Tupitsyn N., Volkova M., Frenkel M. et al. Leuk. Lymph. - 1994. - Vol. 13(suppl. 1). - P. 109.
46. Tupitsyn N.N., Frenkel M.A., Rudinskaja T.D. et al. Int. J. Cancer. - 1996. - Vol. 68. - P. 160-163.
47. Tupitsyn N.N., Mechetner E.B., Baryshnikov A.Yu. et al. Int. J. Cancer. - 1989. - Vol. 44. - P. 589-592.
48. Venditti A., Del Poeta G., Buccisano F. et al. Leukemia. - 1998. - Vol. 12. - P. 1056-1063.

Биологическая активность гликозидных производных N-Ацетилмурамил-L-Аланил-D-Изоглутамина

А.В.Караулов, О.В.Калюжин, А.Е.Земляков

Московская академия им. И.М.Сеченова, Москва, Россия;

НИИ Морфологии человека РАМН, Москва, Россия;

Таврический национальный университет им. В.И.Вернадского,

Симферополь, Украина

Введение

Н-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (мурамилдипептид, МДП), представляет собой компонент пептидогликана группы А клеточной стенки ряда бактерий [25]. МДП является минимальным компонентом, обуславливающим иммуностимулирующий эффект полного адьюванта Фрейнда и способным заменить в его составе микобактерию туберкулеза [19]. Препятствиями к клиническому применению МДП являются его пирогенная активность, связанная как с прямым действием на центральную нервную систему, так и с индукцией выработки эндогенных пирогенов (интерлейкина-1 (ИЛ-1), фактора некроза опухоли (ФНО) и др.) [25,26], и быстрое выведение из организма вследствие высокой гидрофильности [18]. Для преодоления этих препятствий разработаны различные носители, такие как липосомы [20] и нанокапсулы [28], снижающие пирогенность мурамилпептидов, облегчающие доставку внутрь иммунокомпетентных клеток и увеличивающих время их циркуляции в организме. Кроме того, было синтезировано большое количество производных МДП, многие из которых при сохранении выраженной иммуностимулирующей активности были лишены пирогенности [обзоры 11,16,25]. Отдельные мурамилпептиды (Ромуртид, Мурабутид, мурамилтрипептид-фосфатидилэтаноламин), в том числе отечественный препарат Ликопид [5,6], нашли клиническое применение.

Хотя некоторые подходы к синтезу биологически активных мурамилпептидов описаны [25], вопрос о предпочтительных направлениях поиска высокоэффективных низкотоксичных дериватов МДП в теоретическом аспекте до конца не решен.

Целью настоящей работы было изучение биологической активности оригинальных гликозидных производных мурамилдипептида, отличающихся по физико-химическим свойствам, структуре агликона и конфигурации гликозидной связи, для определения предпочтительных направлений синтеза высокоэффективных иммуномодуляторов из этой химической группы и создания нового иммуностимулирующего препарата.

1. Синтез гликозидов МДП

Для введения модифицирующих компонентов в структуру N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина с целью увеличения его иммуномодулирующей активности использован гликозидный центр молекулы [2,3]. Выбор гликозидного способа модификации с созданием О-гликозидов продиктован рядом соображений. Во-первых, закрепляется конфигурация у С-1 и следовательно в водных растворах не образуется аномерная смесь, характерная для МДП и его производных со свободным гидроксилом. Во-вторых, упрощается методика синтеза гликопептида за счет исключения стадии постановки и удаления временной защиты аномерного гидроксила. В-третьих, обеспечивается большая устойчивость в биологических средах мурамилпептидов с липофильными агликонами по сравнению с липофильными сложными эфирами МДП.

Нами синтезированы гликозиды, различающиеся по структуре агликона: β-бутилгликозид-МДП (β-С₄МДП), β-гексилгликозид-МДП (β-С₆МДП), β-гептилгликозид-МДП (β-С₇МДП), β-октилгликозид-МДП (β-С₈МДП), β-циклогексилгликозид-МДП (β-циклогексил-МДП), β-адамантилгликозид-МДП (β-адам-МДП), β-фенилгликозид-МДП (β-фенМДП), β-бензилгликозид-МДП (β-бензилМДП), β-нафтилгликозид-МДП (β-нафтил-МДП). Кроме того, для оценки влияния конфигурации аномерного центра О-гликозидов МДП на их биологическую активность были синтезированы также α-гептил-МДП (α-С₇МДП), α-циклогексил-МДП гликозиды.

2. Иммуномодулирующая активность гликозидов мурамилдипептида в модельных тест-системах in vitro и in vivo

Задачей этого этапа исследования являлось определение в модельных тест-системах in vitro и in vivo наиболее биологически активных веществ из вышеуказанных гликозидных производных МДП. Исследование проведено в соответствии с утвержденными Министерством здравоохранения РФ методическими рекомендациями по изучению иммуностимулирующей активности фармакологических веществ [17].

Изучено влияние мурамилпептидов на спонтанную и индуцированную Т- и В-клеточными митогенами пролиферацию мышинных спленоцитов и выработку ими ИЛ-2, а также действие производных МДП на продукцию ИЛ-1 и ФНО перитонеальными макрофагами. Поскольку испытываемые соединения незначительно отличаются по молекулярной массе, проведено их сравнительное изучение в эквиграммовых, а не в эквимольных концентрациях. Препараты тестировались в 3 серийных 10-кратных разведениях в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл. В тест-систему в качестве референс-контроля вводили МДП в этих же концентрациях.

Кроме того, в модели сепсиса, вызванного внутрибрюшинным введением *Salmonella typhimurium*, исследовано влияние препаратов на резистентность мышей к бактериальной инфекции.

2.1. Действие гликозидов МДП на пролиферацию лимфоцитов

При исследовании производных МДП на пролиферацию лимфоцитов изучено влияние препаратов на спонтанное клеточное деление и их комитогенное действие с субоптимальными дозами Т- и В-клеточных митогенов: конканавалина-А (Кон-А) и липополисахарида (ЛПС) соответственно.

Субоптимальные дозы ЛПС и Кон-А для комитогенного теста были подобраны эмпирически таким образом, чтобы индекс пролиферации (ИП) составлял 30-50% от показателей клеточного деления, вызванного оптимальными дозами митогенов. В результате предварительной серии экспериментов и для ЛПС, и для Кон-А выбрана доза 1 мкг/мл.

Таблица 1. Влияние производных МДП (10 мкг/мл) на спонтанную и стимулированную субоптимальными дозами Кон-А и ЛПС пролиферацию спленоцитов мышей С57BL/6

Производные МДП (10 мкг/мл)	Спонтанная пролиферация	Кон-А (1 мкг/мл)	ЛПС (1 мкг/мл)
Контроль	1±0,2	11,8±1,1	5,3±0,6
МДП	3,1±0,3*	19,1±1,2*	9,9±1,1*
в-С ₄ МДП	3,2±0,4*	19,3±1,8*	10,5±1,3*
в-С ₆ МДП	3,8±0,4*	20,5±2,9*	11,0±1,0*
в-С ₇ МДП	4,2±0,3*†	25,2±1,7*†	13,4±0,9*†
в-С ₈ МДП	4,3±0,4*†	24,8±2,0*†	13,6±1,2*†
α-С ₇ МДП	1,8±0,2*†	13,0±1,8†	7,2±1,1†
в-АдаМДП	3,9±0,2*†	25,0±2,2*†	14,1±1,3*†
в-Циклогексил-МДП	2,9±0,4*	19,9±2,6*	10,2±1,0*
α-Циклогексил-МДП	1,9±0,2*†	13,8±1,7†	6,5±0,9†
в-ФенМДП	4,0±0,3*†	23,7±2,1*†	13,0±1,5*†
в-ФенэтилМДП	3,0±0,3*	20,6±2,4*	8,9±1,0*
в-НафтилМДП	2,6±0,4*	19,8±1,8*	9,7±1,2*

В таблице представлены данные 3-х независимых экспериментов. Цифры в таблице представляют средние арифметические индексов пролиферации ($n=3$) ± стандартное отклонение.

* - Достоверность различия с контролем - $p<0,05$.

† - Достоверность различия с МДП (референс-контролем) - $p<0,05$.

Все испытываемые препараты в широком диапазоне доз стимулировали спонтанную пролиферацию лимфоцитов *in vitro*. Для большинства препаратов оптимальной для стимуляции клеточного деления в культуральной среде была концентрацией 10 мкг/мл (табл. 1). Обнаружено, что α-гликозиды МДП уступали по активности как β-гликозидным аналогам, так и немодифицированному МДП. Среди β-гликозидов наибольшую активность проявили препараты β-С₇МДП, β-С₈МДП, β-адаМДП, β-фенМДП. В большинстве экспериментов они превышали по активности МДП. Эти же дериваты МДП обладали наибольшей комитогенной активностью с субоптимальными дозами Кон-А и ЛПС. Другие β-гликозиды вызывали сходную с МДП активацию митоген-индуцированного клеточного деления. α-Гликозиды МДП во всех дозах не оказали существенного влияния на стимулированную Т- и В-клеточными митогенами пролиферацию лимфоцитов. Для обоих исследованных α-гликозидов можно отметить лишь тенденцию к активации пролиферации в концентрации 10 мкг/мл.

2.2. Действие мурамилпептидов на продукцию интерлейкина-2

Важным показателем функционального состояния Т-лимфоцитов является их цитокин-продуцирующая активность. ИЛ-2 представляет собой один из ключевых цитокинов, вырабатываемых Т-лимфоцитами, преимущественно CD4+ Th1. ИЛ-2 является важнейшим фактором пролиферации всех Т-клеток, активирует дифференцировку Th1 и Т-киллеров, стимулирует деление и функцию ЕК, стимулирует синтез В-клетками IgM, IgG и IgA.

Учитывая центральную роль ИЛ-2 во многих гомеостатических и защитных иммунных реакциях, представлялось интересным изучить влияние исследуемых дериватов МДП на продукцию указанного лимфокина.

Нами исследована способность мурамилпептидов индуцировать продукцию ИЛ-2 (точнее, ИЛ-2-подобных факторов) мышинными спленоцитами, а также действие этих веществ на выработку ИЛ-2 спленоцитами, стимулированными субоптимальной дозой поликлонального активатора Т-клеток - Кон-А (1 мкг/мл).

Содержание ИЛ-2 в супернатанте стимулированных спленоцитов определяли по способности усиливать пролиферацию индикаторных клеток, в качестве которых использовали либо 96-часовые Кон-А-бласты, либо клетки ИЛ-2-зависимой линии СТЛЛ [17].

Из таблицы 2 видно, что все тестируемые производные МДП в той или иной степени стимулировали продукцию ИЛ-2-подобных факторов, индуцированную Кон-А. Наибольшую активность в этом плане проявили β-гликозиды с алифатическими (β-С₄МДП, β-С₆МДП, β-С₇МДП, β-С₈МДП), карбоциклическими (β-циклогексилМДП, β-адаМДП) и фенольными (фенМДП и β-фенэтилМДП) агликонами. Эти соединения превосходили по стимулирующему влиянию на продукцию ИЛ-2 немодифицированный МДП. Другие β-гликозиды МДП достоверно не отличались по активности от референс-контроля (МДП), хотя индексы пролиферации клеток СТЛЛ и Кон-А-бластов в ответ на образцы ИЛ-2, индуцированного комбинацией этих β-гликозидов и Кон-А, в большинстве случаев были выше, чем при использовании МДП+Кон-А.

α -Гликозиды обладали достоверно меньшей способностью по стимуляции ИЛ-2, чем немодифицированный МДП.

В следующей серии экспериментов мы изучили способность дериватов МДП индуцировать продукцию ИЛ-2 неактивированными мышными спленоцитами.

Таблица 2. Влияние гликозидов МДП на продукцию ИЛ-2 спленоцитами мышей С57BL/6, стимулированными Кон-А (1 мкг/мл) (ИЛ-2 определяли в тест-системе с СТЛЛ)

Производные МДП	Концентрация производных МДП		
	1 мкг/мл	10 мкг/мл	100 мкг/мл
Контроль	12,7 $\pm$ 1,5	-	-
МДП	18,1 $\pm$ 2,2*	22,8 $\pm$ 2,8*	19,5 $\pm$ 2,0*
в-С ₄ МДП	17,6 $\pm$ 2,0*	28,9 $\pm$ 1,8*†	24,9 $\pm$ 2,3*†
в-С ₆ МДП	21,8 $\pm$ 1,8*	29,7 $\pm$ 2,1*†	25,6 $\pm$ 3,1*†
в-С ₇ МДП	20,9 $\pm$ 1,8*	30,3 $\pm$ 3,3*†	26,4 $\pm$ 3,2*†
в-С ₈ МДП	22,1 $\pm$ 2,5*	29,5 $\pm$ 2,7*†	25,5 $\pm$ 2,5*†
α -С ₇ МДП	14,7 $\pm$ 1,7	16,9 $\pm$ 2,1*†	18,1 $\pm$ 2,6*
в-АдаМДП	21,9 $\pm$ 1,8*	31,1 $\pm$ 3,9*†	26,4 $\pm$ 2,9*†
в-Циклогексил-МДП	22,3 $\pm$ 2,1*	29,8 $\pm$ 2,8*†	24,7 $\pm$ 3,3*
α -Циклогексил-МДП	15,0 $\pm$ 1,6	18,4 $\pm$ 2,5*	16,9 $\pm$ 2,7
в-ФенМДП	20,8 $\pm$ 2,2*	29,9 $\pm$ 3,3*†	25,7 $\pm$ 2,4*†
в-ФенэтилМДП	19,7 $\pm$ 2,0*	30,7 $\pm$ 3,5*†	23,9 $\pm$ 1,5*†
в-НафтилМДП	16,9 $\pm$ 1,6*	25,3 $\pm$ 3,7*	19,1 $\pm$ 2,4*

В таблице представлены данные 3-х независимых экспериментов. Цифры в таблице представляют средние арифметические индексов пролиферации клеток линии СТЛЛ ($n=3$) $\pm$ стандартное отклонение.

* - Достоверность различия с контролем - $p < 0,05$.

† - Достоверность различия с МДП (референс-контролем) - $p < 0,05$.

24-часовая предобработка спленоцитов различными мурамилпептидами по-разному влияла на выработку ИЛ-2. В тест-системах и с клетками СТЛЛ (табл. 3), и с Кон-А-бластами показано, что немодифицированный МДП во всех дозах вызывает лишь статистически недостоверную тенденцию к индукции синтеза ИЛ-2. Сходную тенденцию проявляли и α -гликозиды МДП в высоких концентрациях (100 мкг/мл). В более низких концентрациях (1 и 10 мкг/мл) α -гликозиды не изменяли фоновой продукции ИЛ-2 неактивированными лимфоцитами.

Что касается β -гликозидов, то β -С₆МДП, β -С₇МДП, β -С₈МДП, β -циклогексилМДП, β -адаМДП и β -фенМДП в большинстве случаев вызывали выработку ИЛ-2, достоверно превышавшую фоновую секрецию этого лимфокина в контроле. Активность ИЛ-2 в образцах, индуцированных β -фенэтилМДП, была выше контроля только в тест-системе с клетками СТЛЛ (табл. 3). β -С₄МДП и β -нафтилМДП проявляли лишь тенденцию к стимуляции продукции ИЛ-2.

Сравнение эффектов α -гликозидов и β -гликозидов с референс-контролем в тест-системе с Кон-А-бластами показало, что β -С₇МДП в концентрации 10 мкг/мл, β -С₈МДП в концентрации 100 мкг/мл, β -адаМДП (1 мкг/мл) статистически значимо превышали действие немодифицированного МДП (данные не представлены).

При тестировании супернатантов спленоцитов на содержание ИЛ-2 с использованием клеток СТЛЛ выявлено, что достоверно сильнее, чем МДП, индуцировали продукцию ИЛ-2 следующие гликозиды: β -С₆МДП (10 и 100 мкг/мл), β -С₇МДП (1, 10 и 100 мкг/мл), β -С₈МДП (1 и 100 мкг/мл), β -адаМДП (10 и 100 мкг/мл) и β -фенМДП (100 мкг/мл).

Таким образом, продемонстрирована способность ряда дериватов МДП индуцировать и усиливать продукцию ИЛ-2 лимфоцитами. Это в первую очередь касается β -гликозидов МДП (β -С₆МДП, β -С₇МДП, β -С₈МДП, β -циклогексилМДП, β -адаМДП и β -фенМДП), которые превосходили по активности немодифицированный МДП. Вышесказанное говорит об увеличении биологической активности МДП при его структурной модификации с созданием β -гликозидов. В противоположность этому, α -гликозидирование вело к снижению активности МДП.

Полученные данные коррелируют с результатами оценки влияния этих производных МДП на пролиферативную активность лимфоцитов. В этом нет ничего удивительного. Известно, что в процессе пролиферативного ответа лимфоцитов на митогены после стимулирующего сигнала через определенный интервал времени происходит выработка и рецепция ИЛ-2. Последние события играют ключевую роль при вовлечении лимфоцитов в пролиферативный цикл.

Конечно, существуют и другие ростовые факторы и сигналы, определяющие митоген-индуцированную пролиферацию. Тем не менее, можно заключить, что стимуляция производными МДП как спонтанной, так и индуцированной митогенами пролиферации, в значительной степени связана с усилением этими веществами продукции ИЛ-2 Th1-лимфоцитами.

Таблица 3. Оценка способности мурамилпептидов индуцировать выработку ИЛ-2 спленоцитами мышей С57BL/6 (ИЛ-2 определяли в тест-системе с СТЛЛ)

Производные МДП	Концентрация производных МДП		
	1 мкг/мл	10 мкг/мл	100 мкг/мл
Контроль	5,1 $\pm$ 1,1	-	-
МДП	6,3 $\pm$ 0,8	8,4 $\pm$ 1,6*	6,9 $\pm$ 1,0
в-С ₄ МДП	6,8 $\pm$ 1,2	10,5 $\pm$ 1,5*	7,0 $\pm$ 1,3
в-С ₆ МДП	8,9 $\pm$ 1,5*	12,8 $\pm$ 1,2*†	10,3 $\pm$ 1,1*†
в-С ₇ МДП	9,3 $\pm$ 1,1*†	12,7 $\pm$ 1,0*†	10,6 $\pm$ 1,4*†
в-С ₈ МДП	9,1 $\pm$ 1,3*†	13,1 $\pm$ 1,6*	10,1 $\pm$ 1,3*†
α -С ₇ МДП	5,3 $\pm$ 0,8	5,6 $\pm$ 0,9	6,3 $\pm$ 1,2
в-АдаМДП	7,6 $\pm$ 0,8*	13,5 $\pm$ 2,1*†	9,9 $\pm$ 1,2*†
в-Циклогексил-МДП	7,9 $\pm$ 1,1*	11,3 $\pm$ 2,0*	7,5 $\pm$ 0,8*
α -Циклогексил-МДП	4,9 $\pm$ 0,7	4,7 $\pm$ 1,0†	5,9 $\pm$ 1,1
в-ФенМДП	8,2 $\pm$ 0,9*	9,6 $\pm$ 1,1*	10,3 $\pm$ 1,2*†
в-ФенэтилМДП	6,4 $\pm$ 0,8	8,5 $\pm$ 0,9*	7,6 $\pm$ 0,8*
в-НафтилМДП	7,1 $\pm$ 1,1	7,9 $\pm$ 1,3*	6,8 $\pm$ 1,0

В таблице представлены данные 3-х независимых экспериментов. Цифры в таблице представляют средние арифметические индексов пролиферации клеток линии СТЛЛ ($n=3$) $\pm$ стандартное отклонение.

* - Достоверность различия с контролем - $p < 0,05$.

† - Достоверность различия с МДП (референс-контролем) - $p < 0,05$.

Очевидно, индукция и стимуляция мурамилпептидами продукции ИЛ-2 в использованных нами тест-системах связаны как с прямым влиянием производных МДП на клетки-продуценты (преимущественно Th1-лимфоциты), так и опосредованным действием на них через макрофаги, продукты которых (в частности, ИЛ-1) стимулируют не только продукцию ИЛ-2, но и рецепцию этого цитокина лимфоцитами.

2.3. Действие мурамилпептидов на продукцию макрофагами ФНО и ИЛ-1

Одной из важных функций макрофагов является продукция цитокинов, инициирующих и регулирующих многие биологические процессы в организме, в том числе защитные реакции на внедрение инфекционных агентов и опухолевую трансформацию клеток.

Ключевыми и, вероятно, наиболее плейотропными цитокинами, секретируемыми моноцитами/макрофагами, являются ИЛ-1 и ФНО- α [14].

В связи с этим, мы исследовали способность гликозидов МДП регулировать продукцию этих монокинов перитонеальными макрофагами *in vitro*. Так как производные МДП действуют синергично с ЛПС по индукции продукции ИЛ-1 и ФНО, в ряде экспериментов в культуральную среду, помимо тестируемых мурамилпептидов, добавляли ЛПС в субоптимальной концентрации (20 нг/мл). Так же, как и на предыдущих этапах исследования, в качестве референс-контроля использовался МДП. Изучение влияния мурамилпептидов на продукцию монокинов проводили по методу [27]. ИЛ-1 тестировали с использованием в качестве индикаторных клеток мышинных тимоцитов [29], ФНО - по лизису ФНО-чувствительных клеток L929 [21].

Индукторами выработки ИЛ-1 являлись все испытываемые препараты в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкг/мл (табл. 4). Наибольшей активностью в индукции выработки указанного монокина обладали β -алкилгликозиды МДП (β -С₄МДП, β -С₆МДП, β -С₈МДП) и β -циклогексил-МДП. В большинстве случаев они превышали МДП по стимулирующему влиянию на продукцию этого цитокина. β -АдаМДП проявил более высокую в сравнении с МДП активность только в концентрации 1 мкг/мл, а β -фенэтилМДП - в концентрации 100 мкг/мл. Другие β -гликозиды существенно не отличались по активности от референс-контроля, а α -гликозиды были менее активными.

Результаты изучения сочетанного действия мурамилпептидов и ЛПС в субоптимальной концентрации на продукцию ИЛ-1 представлены в таблице 5. Максимальную биологическую активность все дериваты МДП проявили в концентрации 10 мкг/мл. Увеличение концентрации до 100 мкг вело к некоторому снижению стимулирующего влияния на выработку ИЛ-1. Также как и в предыдущем случае, высокую активность проявили β -алкилгликозиды МДП (β -С₄МДП, β -С₆МДП, β -С₈МДП, β -С₁₀МДП), β -циклогексил-МДП и β -адаМДП. Кроме того, β -фенМДП превышал эффект немодифицированного МДП. Препараты β -фенэтилМДП и β -нафтилМДП стимулировали продукцию монокина сильнее референс-контроля только в высокой концентрации (100 мкг/мл). α -Гликозиды и в этой модельной тест-системе уступали по активности МДП.

Таблица 4. Действие производных МДП на продукцию ИЛ-1 мышинными (С57ВL/6) перитонеальными макрофагами.

Производные МДП	Концентрация производных МДП		
	1 мкг/мл	10 мкг/мл	100 мкг/мл
Контроль	2,3 $\pm$ 0,6	-	-
МДП	6,7 $\pm$ 0,9*	8,4 $\pm$ 1,0*	3,8 $\pm$ 0,5*
в-С ₄ МДП	9,2 $\pm$ 1,4*	10,5 $\pm$ 1,8*	5,0 $\pm$ 0,6*
в-С ₆ МДП	11,1 $\pm$ 1,2*†	11,6 $\pm$ 1,1*†	6,5 $\pm$ 1,2*†
в-С ₇ МДП	9,9 $\pm$ 1,7*†	12,4 $\pm$ 1,2*†	6,9 $\pm$ 1,0*†
в-С ₈ МДП	10,6 $\pm$ 1,9*†	11,3 $\pm$ 1,4*†	4,3 $\pm$ 0,7*
α -С ₇ МДП	3,4 $\pm$ 0,8†	5,4 $\pm$ 1,1*†	3,3 $\pm$ 0,8
в-АдаМДП	10,1 $\pm$ 1,0*†	9,4 $\pm$ 0,9*	2,9 $\pm$ 0,9
в-Циклогексил-МДП	10,9 $\pm$ 0,9*†	12,3 $\pm$ 1,4*†	3,7 $\pm$ 1,1
α -Циклогексил-МДП	5,2 $\pm$ 1,1*	5,3 $\pm$ 0,9*†	4,1 $\pm$ 0,7*
в-ФенМДП	6,8 $\pm$ 0,8*	7,6 $\pm$ 1,8*	5,2 $\pm$ 0,8*
в-ФенэтилМДП	7,3 $\pm$ 1,4*	9,5 $\pm$ 1,6*	6,1 $\pm$ 1,2*†
в-НафтилМДП	6,9 $\pm$ 0,6*	6,8 $\pm$ 1,4*	4,8 $\pm$ 0,7*

В таблице представлены данные 3-х независимых экспериментов. Цифры в таблице представляют средние арифметические индексов пролиферации тимоцитов на образцы ИЛ-1 ($n=3$) $\pm$ стандартное отклонение.

* - Достоверность различия с контролем - $p < 0,05$.

† - Достоверность различия с МДП (референс-контролем) - $p < 0,05$.

Таблица 5. Действие производных МДП на продукцию ИЛ-1 мышинными (С57ВL/6) перитонеальными макрофагами в сочетании с субоптимальной дозой липополисахарида (20 нг/мл).

Производные МДП	Концентрация производных МДП		
	1 мкг/мл	10 мкг/мл	100 мкг/мл
Контроль (ЛПС 20 нг/мл)	3,1 $\pm$ 0,6	-	-
МДП	8,8 $\pm$ 1,1*	11,3 $\pm$ 1,4*	4,9 $\pm$ 0,7*
в-С ₄ МДП	12,3 $\pm$ 1,5*†	15,3 $\pm$ 1,7*†	10,1 $\pm$ 0,9*†
в-С ₆ МДП	11,9 $\pm$ 0,9*†	15,7 $\pm$ 1,5*†	8,2 $\pm$ 1,1*†
в-С ₇ МДП	12,8 $\pm$ 1,4*†	17,4 $\pm$ 2,1*†	9,8 $\pm$ 1,3*†
в-С ₈ МДП	13,2 $\pm$ 1,6*†	17,2 $\pm$ 1,9*†	10,2 $\pm$ 1,9*†
α -С ₇ МДП	4,6 $\pm$ 0,9†	7,3 $\pm$ 1,2*†	6,9 $\pm$ 1,2*
в-АдаМДП	14,0 $\pm$ 1,5*†	18,1 $\pm$ 2,3*†	8,7 $\pm$ 0,8*†
в-Циклогексил-МДП	12,4 $\pm$ 1,1*†	16,3 $\pm$ 1,8*†	6,7 $\pm$ 1,4*
α -Циклогексил-МДП	6,4 $\pm$ 1,0*†	8,9 $\pm$ 1,2*	4,1 $\pm$ 0,7*
в-ФенМДП	11,8 $\pm$ 1,7*	15,9 $\pm$ 1,9*†	9,5 $\pm$ 1,7*†
в-ФенэтилМДП	7,9 $\pm$ 1,5*	11,4 $\pm$ 1,0*	9,7 $\pm$ 1,6*†
в-НафтилМДП	8,1 $\pm$ 0,9*	9,8 $\pm$ 2,1*	8,1 $\pm$ 1,4*†

В таблице представлены данные 3-х независимых экспериментов. Цифры в таблице представляют средние арифметические индексов пролиферации тимоцитов на образцы ИЛ-1 ($n=3$) $\pm$ стандартное отклонение.

* - Достоверность различия с контролем - $p < 0,05$.

† - Достоверность различия с МДП (референс-контролем) - $p < 0,05$.

В нашей работе исследование продукции ФНО под влиянием мурамилпептидов существенно не изменило

представления об их макрофаг-активирующем действии, полученного в результате изучения влияния этих веществ на выработку ИЛ-1.

Самыми мощными стимуляторами секреции ФНО были β -C₇МДП, β -C₈МДП, β -адаМДП и β -фенМДП, которые во многих случаях оказывались достоверно ($p < 0,05$) более эффективными, чем немодифицированный МДП. В сочетании с ЛПС, кроме вышеуказанных препаратов, действие комбинации МДП+ЛПС превышали β -C₆МДП (1 мкг/мл) и β -циклогексил-МДП (10 мкг/мл).

β -C₇МДП и α -циклогексилМДП в отдельности и в сочетании с ЛПС уступали по биологической активности референс-контролю (МДП или МДП+ЛПС соответственно).

Таким образом, проведенные нами испытания ряда оригинальных гликозидных аналогов МДП позволили сделать следующий вывод: в модельных тест-системах *in vitro*, характеризующих функциональную активность Т- и В-лимфоцитов, а также макрофагов, α -гликозиды значительно уступали по активности и немодифицированному МДП, и β -гликозидным аналогам. Последние, в частности β -C₆МДП, β -C₇МДП, β -C₈МДП, β -циклогексилМДП, β -адаМДП и β -фенМДП, превышали по стимулирующему влиянию на иммунокомпетентные клетки МДП, который использовался в качестве референс-контроля во всех тест-системах *in vitro*.

2.4. Влияние гликозидов мурамилдипептида на резистентность к бактериальной инфекции

Для завершения выбора наиболее перспективных иммуномодуляторов из группы гликозидных производных МДП с целью их дальнейшего углубленного исследования мы изучили влияние этих веществ на резистентность мышей к бактериальной инфекции.

Ближайшие «соседи» вещества β -C₇МДП по количеству атомов углерода в алифатическом агликоне (β -C₆МДП и β -C₈МДП) в сравнении с ним не имели преимуществ в оказании биологических эффектов в моделях *in vitro*. Отличаясь от β -C₇МДП только одним атомом углерода в линейной углеводородной цепи агликона, они обладают сходными физико-химическими свойствами и, очевидно, существенно не отличаются по биологической активности от β -C₇МДП. В связи с этим, препараты β -C₆МДП и β -C₈МДП были исключены из дальнейшего скрининга на этапе исследований *in vivo*.

Для оценки влияния мурамилпептидов на резистентность к бактериальной инфекции использовали модель с внутрибрюшинным заражением мышей F₁ (СВА х С57В1/6) штаммом *S. typhimurium* № 415 в дозе, вызывающей 100% гибель животных в контроле. Эта доза подбиралась эмпирически в предварительной серии экспериментов и составляла 100 LD₅₀.

Однократное внутрибрюшинное введение различных гликозидов МДП за 24 часа до заражения культурой *S. typhimurium* по-разному влияло на выживаемость экспериментальных животных.

В той или иной степени все производные МДП оказывали профилактический эффект, дозозависимо снижая летальность инфицированных мышей. Наименее активными оказались α -C₇МДП и α -циклогексил-МДП. Не одна

Таблица 6. Действие производных МДП на резистентность к внутрибрюшинному заражению *S. typhimurium* в дозе 100 LD₅₀

Препарат	Доза (мкг/мышь)	Выживаемость* (%)	ED ₅₀ (мг/кг)
1	2	3	4
Контроль	-	0	-
МДП (референс-контроль)	200	73,3±5,8	3,93
	20	53,3±5,8	
	2	33,3±5,8	
β -C ₄ МДП	200	76,7±5,8	5,01
	20	36,7±5,8†	
	2	16,7±15,3	
β -C ₇ МДП	200	86,7±11,5	2,57
	20	66,7±5,8†	
	2	56,7±5,8†	
α -C ₇ МДП	200	43,3±20,8	5,33
	20	36,7±5,8†	
	2	30±10	
β -АдаМДП	200	83,3±5,8	2,39
	20	76,7±5,8†	
	2	63,3±5,8†	
β -Циклогексил-МДП	200	76,7±5,8	3,46
	20	60±10	
	2	36,7±5,8	
α -Циклогексил-МДП	200	56,7±5,8†	5,58
	20	46,7±5,8	
	2	6,7±5,8†	
β -ФенМДП	200	83,3±5,8	2,65
	20	66,7±15,3	
	2	56,7±20,8	
β -ФенэтилМДП	200	73,3±11,5	3,52
	20	66,7±11,5	
	2	26,7±5,8	
β -НафтилМДП	200	76,7±5,8	3,46
	20	60±10	
	2	36,7±5,8	

В таблице представлены типичные данные трех независимых экспериментов.

* - Цифры в указанной колонке таблицы представляют средние арифметические выживаемости животных ($n=3$) ± стандартное отклонение.

† - Достоверность различия с МДП (референс-контролем) в соответствующей дозе - $p < 0,05$.

из использованных доз этих двух препаратов не обеспечивала 60% выживание животных - критического показателя, позволяющего рассматривать испытываемое вещество как иммуностропное средство в соответствии с методическими рекомендациями по изучению иммуностропной активности фармакологических веществ [17]. МДП и его β -гликозидные аналоги по крайней мере в одной из примененных доз превышали 60% рубеж выживаемости. Препараты β -C₇МДП и β -адаМДП в дозах 2 и 20 мкг/мышь оказались более эффективными в сравнении с МДП в тех же дозах ($p < 0,05$), тогда как β -C₄МДП (20 мкг/мышь) усту-

пал ему по способности стимулировать резистентность животных к бактериальной инфекции. β -ФенМДП во всех дозах вызывал большее в процентном отношении, чем МДП, выживание инфицированных мышей, но различия с референс-контролем в этих случаях были статистически не достоверными. Другие препараты по своей активности существенно не отличались от немодифицированного гликопептида.

Этот экспериментальный блок подтвердил полученные в модельных тест-системах *in vitro* данные, касающиеся существенных отличий биологической активности α - и β -гликозидных аномеров. Присоединение агликонов в β -положении вело к увеличению активности МДП, так как α -гликозидирование снижало ее. Вероятно, активной формой мурамилдипептида является соединения с β -конфигурацией аномерного гидроксила, что объясняет меньшую по сравнению с β -гликозидами МДП иммуностимулирующую активность свободного мурамилдипептида, который в водных растворах находится в виде смеси α - и β -гликозидных аномеров.

Среди β -гликозидов наиболее перспективными представляются β -С₇МДП, β -адаМДП и β -фенМДП.

Ранее нами показано, что β -С₇МДП в широком диапазоне доз стимулировал пролиферацию в смешанной культуре лимфоцитов, усиливал цитотоксическую активность естественных киллеров по отношению к опухолевой линии УАС-1, активировал генерацию аллоспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов, стимулировал продукцию ИЛ-1 и ФНО перитонеальными макрофагами [12,23]. Практически во всех тест-системах его эффекты превышали действие немодифицированного МДП и ряда его производных.

Исходя из вышесказанного, именно β -С₇МДП (глимурид) был выбран для разностороннего изучения, направленного на определение перспектив и возможности его клинического применения.

3. Распределение [¹⁴C]-меченого β -гептилгликозид-МДП по органам и тканям после внутривенного и перорального введения

Исследование распределения меченого гликопептида по органам и тканям проводили по методу [18,22].

Через 10 минут после внутривенной инъекции смеси немеченого и [¹⁴C]-меченого β -С₇МДП в дозе 100 мкг наибольшая концентрация препарата наблюдалась в крови. Существенная радиоактивность была выявлена в печени, почках и легких. Через 30-60 минут после внутривенного введения гликопептида концентрация препарата в крови, а затем и в других органах начинала снижаться одновременно с подъемом концентрации в моче. К четвертому часу определенная часть препарата задерживалась в печени, несколько меньше в почках. В других органах отмечались лишь следовые количества вещества. Через 24 часа содержание препарата в организме не превышало 2% от общей радиоактивности.

Динамика изменения концентраций β -С₇МДП во внутренних органах и биологических жидкостях говорит о преимущественном выведении препарата из организма через почки с мочой. Это совпадает с литературными дан-

ными по изучению фармакокинетики мурамилпептидов [18,22]. Сравнение этих данных с результатами, полученными нами, показывает, что меченый глимурид (β -С₇МДП) существенно дольше задерживался в тканях, чем его гидрофильные аналоги.

Изучение динамики распределения [¹⁴C]- β -С₇МДП по организму после приема *per os* выявило существенные различия от таковой после внутривенной инъекции.

В течение первых 30 минут после перорального применения глимурида значительное количество меченого соединения обнаруживалось только в желудке и кишечнике. Через 1 час радиоактивность в желудочно-кишечном тракте начинала существенно снижаться и одновременно повышаться в других органах. Наибольшая концентрация препарата вне желудка и кишечника отмечена в печени на второй час после приема глимурида. Через 24 часа в организме оставалось около 10% от введенной радиоактивной метки.

В целом надо отметить большее время циркуляции препарата в организме при пероральном приеме глимурида в сравнении с внутривенным введением, что связано с постепенным всасыванием соединения в желудочно-кишечном тракте. Это объясняет и отсутствие резких пиковых концентраций препарата в крови и органах с последующим спадом, что отмечалось при внутривенном введении глимурида.

Пероральный путь введения препарата и соответствующая ему динамика распределения вещества в организме выглядят благоприятными для оказания иммуномодулирующих эффектов, а отсутствие высоких пиковых концентраций в системной циркуляции позволяет предположить отсутствие выраженного пирогенного действия, вызванного быстрым поступлением в кровоток больших доз мурамилпептида.

4. Влияние β -гептилгликозид-МДП на клеточный и гуморальный иммунитет *in vivo*

Этот блок работы, направленный на оценку влияния препарата на клеточные и гуморальные реакции у мышей, обладающих разной генетически детерминированной иммунореактивностью, проводили по методу [17].

4.1. Действие β -гептилгликозид-МДП на гуморальный иммунитет

Влияние β -гептилгликозид-МДП на гуморальное звено иммунной системы оценивалось по его действию на образование антител (агглютининов) к эритроцитам барана у мышей двух оппозитно реагирующих линий (СВА и С57BL/6). При этом изучали его влияние как на индуктивную, так и на продуктивную фазы этого ответа. В первом случае (препарат вводили одновременно с антигеном) уже на 4 сутки отмечено повышение уровня антител и в контроле, и во всех тест-группах мышей [7]. У животных высокорезирующей линии СВА, получавших β -гептилгликозид-МДП, на 4-7-е сутки существенных различий в сывороточной концентрации антител в сравнении с контролем не отмечено. На 14-й день титры антител были достоверно ниже, чем в контрольной группе животных. Однако, повышенный уровень антител в этой группе сохранялся до 21-х суток исследования, в то время как у мышей конт-

рольной группы, иммунизированных эритроцитами барана, отмечено в этот срок резкое падение титров антител.

У низкореагирующих мышей C57BL/6 отмечено статистически достоверное повышение концентрации агглютининов в группе мышей, получавших мурамилпептид в дозах 200 мкг/мышь (4 и 21 сутки) и 20 мкг/мышь (7 сутки). В других случаях титры антител были также в целом выше, чем контрольные значения, однако из-за индивидуальных вариаций эти различия были статистически не значимы.

Следует отметить, что препарат у высокочувствительной к эритроцитам барана линии мышей обуславливал во всех случаях более длительное сохранение повышенного уровня антител, в то время как у мышей низкореагирующей линии отмечено существенное повышение уровня антител от введения высоких доз (20 и 200 мкг/мышь) β -гептилглизид-МДП. Это повышение сохранялось в течение 21 суток только после введения 200 мкг препарата.

При оценке действия β -гептилглизид-МДП на продуктивную фазу иммунного ответа (препарат вводили на 3-и сутки после иммунизации) обнаружены в целом сходные с вышеописанными закономерности изменения продукции гемагглютининов как у высокореагирующих мышей, так и у низкореагирующих на эритроциты барана (табл. 7). Однако, имелись и некоторые отличия. В этом случае была заметна явная тенденция к снижению титра антител на 4-7-е сутки у высокоотвечающих животных, а у оппозитно реагирующих мышей препарат в более широком диапазоне доз усиливал антителообразование на протяжении всего эксперимента.

Таблица 7. Влияние β -гептилглизид-МДП на продуктивную фазу антителообразования

Линия Мышей	Доза препарата (мкг)	Титр антител			
		Сроки взятия крови			
		4 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
СВА	200	77±29	102±35	179±70*	38±14*
	20	102±35	90±35	154±57*	90±35*
	0,2	141±70	115±27	307±114	58±14*
	контроль	170±86	170±86	426±170	16±0
	норма	16±0			
C57BL/6	200	141±70*	154±57*	115±29*	179±70*
	20	90±35	179±70*	102±35*	102±35*
	0,2	77±29	90±35	115±29*	83±43
	контроль	48±22	48±22	64±0	64±0
	норма	4±0			

Каждое значение в таблице представляют собой среднее арифметическое ($n=5$) $\pm$ стандартное отклонение. Показаны результаты 1 типичного из 3 независимых экспериментов.

* - Достоверность различия с контролем ($p<0,05$).

Таким образом, β -гептилглизид-МДП оказывал влияние и на индуктивную, и на продуктивную фазу антителообразования. Обобщая полученные результаты, можно заключить, что у мышей высокореагирующей на эритроциты барана линии СВА препарат преимущественно

снижал титры антител в течение первых 14 дней, однако способствовал сохранению повышенного уровня продукции гемагглютининов до 21-го дня после иммунизации эритроцитами барана. У низкореагирующих мышей C57BL/6 β -гептилглизид-МДП стимулировал продукцию антител в течение всего эксперимента. Изменение антителобразования в разные сроки после иммунизации (с 4-го по 21-й день) свидетельствует о способности препарата регулировать продукцию как IgM, так и IgG, хотя действие на выработку последнего, очевидно, более выражено.

4.2. Действие β -гептилглизид-мурамилдипептида на проявление реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)

О влиянии β -гептилглизид-МДП на клеточное звено иммунитета судили по действию на реакцию ГЗТ. Так же, как и при оценке влияния препарата на гуморальное звено, исследование проводили на мышах оппозитно реагирующих на эритроциты барана линий СВА и C57BL/6 [7]. При этом оценивали действие препарата на стадии сенсибилизации и разрешения. С этой целью β -гептилглизид-МДП в дозах 0,2, 20 и 200 мкг/мышь вводили внутривенно одновременно с сенсибилизирующей или с разрешающей дозами антигена. При введении мурамилпептида одновременно в сенсибилизирующей дозой эритроцитов барана у мышей линии СВА происходило уменьшение выраженности реакции ГЗТ в сравнении с контролем (рис. 1). Максимальный угнетающий эффект отмечен у препарата в дозе 20 мкг/мышь. Наоборот, у мышей линии C57BL/6 наблюдалось увеличение индекса реакции при использовании β -гептилглизид-МДП в широком диапазоне доз (рис. 2). Можно заключить, что у двух оппозитно реагирующих линий мышей препарат оказывал разнонаправленное влияние на процесс образования клона антиген-специфических Т-лимфоцитов. Причем характер этого влияния определялся генетически обусловленной иммунореактивностью животных. У низкореагирующих мышей глимурид обуславливает иммуностимулирующий эффект на эту стадию Т-клеточного ответа, а его введение высокореагирующей линии мышей оказывает супрессирующее действие.

Внутривенная инъекция разных доз гликопептида одновременно с разрешающей дозой антигена также влияла на выраженность реакции ГЗТ (данные не представлены). У низкореагирующих мышей отмечено усиление проявления реакции мурамилпептидом во всех использованных дозах. У высокоотвечающих животных индекс реакции ГЗТ снижался. Указанные эффекты препарата, вероятно, обусловлены изменением способности антиген-специфических Т-лимфоцитов при встрече с антигеном (эритроцитами барана) продуцировать провоспалительные цитокины.

В целом, введение β -гептилглизид-МДП в стадию разрешения давало сходный эффект на реакцию ГЗТ с его введением в фазу сенсибилизации за исключением одного отличия: у мышей высокореагирующей линии СВА препарат угнетал реакцию в дозах 0,2 и 20 мкг при внутривенной инъекции одновременно с сенсибилизирующей дозой эритроцитов барана, и в дозах 20 и 200 мкг - при введении в стадию разрешения.

Таким образом, продемонстрирована способность препарата оказывать на клеточный и гуморальный иммунитет разнонаправленные дозозависимые эффекты, определяющиеся исходной иммунореактивностью организма. Характер этих эффектов говорит о том, что глимурид правильнее классифицировать не как иммуностимулятор в узком понимании этого термина, а как иммуномодулятор.

5. Влияние перорального и внутривенного введения β -гептилглюкозид-мурамилдипептида на выживаемость животных с экспериментальной сальмонеллезной септикотоксемией

Выше показана высокая эффективность глимурид (β -C₇МДП) и ряда других глюкозидов МДП в стимуляции неспецифической резистентности в модели сепсиса, вызванного внутрибрюшинным заражением культурой *S. typhimurium*. В указанной модели исследуемые препараты вводились также интраперитонеально за 24 часа до заражения. Вероятно, продемонстрированный нами выраженный профилактический эффект препаратов связан не только с резорбтивным эффектом и с системной активацией звеньев неспецифической резистентности, но и в значительной степени с локальной стимуляцией местных защитных механизмов в брюшной полости. С нашей точки зрения, пероральный и внутривенный способы применения β -C₇МДП выглядят как наиболее реальные и обоснованные пути введения в случае его клинического использования для системной стимуляции противинфекционного иммунитета. Поэтому представлялось целесообразным исследовать влияние перорального и внутривенного введения глимурид на неспецифическую резистентность организма в модели септикотоксемии, вызванной внутрибрюшинным введением *Salmonella typhi* [8].

Культуру *S. typhi* (Ty2 4446), суспендированную в 5% муцине, в дозе, равной 100 LD₅₀, вводили беспородным белым мышам внутрибрюшинно через 24 часа после применения β -C₇МДП в/в или per os в дозах: 0,2; 2; 20 и 200 мкг/мышь.

Обращает на себя внимание значительное усиление глимуридом сопротивляемости мышей к микробной инвазии, что проявлялось существенным снижением гибели животных (табл. 8). Интересно, что максимальный профилактический эффект оказал пероральный прием препарата в дозе 20 мкг/мышь - выживание 80% животных. Это свидетельствует о высокой системной иммуномодулирующей активности β -C₇МДП при применении per os, что коррелирует с описанными выше данными о достаточно хорошей усвояемости глимурид из желудочно-кишечного тракта. Внутривенное введение характеризовалось несколько большим диапазоном эффективных доз в сравнении с пероральным приемом. Препарат в дозе 0,2 и 2 мкг/мышь повышал выживаемость животных до 60% при внутривенном введении и до 20% при приеме per os. В последнем случае эффект был статистически не достоверным. Увеличение дозы глимурид при обоих видах введения до 200 мкг/мышь не привело к повышению профилактического действия в сравнении с 20 мкг/мышь.

На основании полученных результатов произведен расчет ED₅₀: при пероральном введении препарата - 0,75±0,1 мг/кг, при внутривенном введении - 0,2 мг/кг.

Обсуждение

Результаты настоящей работы говорят, что β -глюкозидирование МДП ведет к увеличению биологической активности гликопептида. Наоборот, α -глюкозиды во всех используемых нами тест-системах in vitro и in vivo обладали меньшей активностью в сравнении с МДП.

Наши предыдущие исследования показали, что β -C₇МДП превосходил по иммуностимулирующей активности в модельных тест-системах in vitro и по способности проникать через модельные и клеточные мембраны своего более липофильного гомолога β -C₁₆МДП [12,13,23].

Настоящие данные показывают преимущества β -C₇МДП и над более гидрофильным гомологом β -C₄МДП. Это подтверждает высказанное ранее предположение о том, что определенное сочетание гидро- и липофильных свойств β -C₇МДП представляет собой принципиальное качество, позволяющее этому препарату воздействовать на основные звенья иммунитета эффективнее, чем его более гидрофильные и липофильные аналоги [9,13].

Таким образом, можно сформулировать одно из предпочтительных направлений поиска высокоэффективных иммуномодуляторов-мурамилпептидов: синтез β -О-глюкозидов, в которых биологически активные группы сочетаются с амфифильностью молекулы в целом.

Таблица 8. Влияние глимурид на резистентность мышей к внутрибрюшинному заражению *S. typhi* (10³ микробных клеток/мышь)

Метод введения глимурида	Доза (мкг)	Гибель животных (%)					Выжившие животные, %
		1-й день	2-й день	3-й день	4-й день	5-й день	
Контроль (физр-р <i>per os</i>)		40	60	-	-	-	0
Контроль (физр-р в/в)		40	30	20	10	-	0
<i>per os</i>	200	40	20	-	-	-	40*
	20	20	-	-	-	-	80*
	2	20	-	-	-	-	20
	0,2	40	40	-	-	-	20
Внутривенно	200	60	-	-	-	-	40*
	20	20	20	-	-	-	60*
	2	20	20	-	-	-	60*
	0,2	-	40	-	-	-	60*

В таблице представлены данные одного типичного из 3-х независимых экспериментов. Каждая группа животных включала 10 особей.

* - Достоверность различия с контролем - $p < 0,05$.

Полученные нами данные, а также результаты предыдущих исследований иммуномодулирующего действия β -гептилглюкозид-МДП in vitro и in vivo [10,12,23], говорят о перспективности клинического применения данного препарата. Существенным положительным моментом явля-

ется высокая эффективность не только при внутривенном введении, но и при приеме *per os*, что расширяет возможные формы его применения.

В 1997 году β -гептилгикозид-МДП как активный компонент парафармацевтического препарата Глимурид успешно прошел испытания в Центре гигиенической сертификации пищевой продукции при институте питания РАМН и рекомендован к клиническому применению Фармакологическим государственным комитетом Российской Федерации как средство профилактики и комплексного лечения заболеваний, сопровождающихся вторичной иммунной недостаточностью. В настоящее время проходят его клинические испытания при вирусных, бактериальных и паразитарных инфекциях, ведутся исследования целесообразности его использования в реабилитации онкологических больных, получающих полихимиотерапию после радикального удаления опухоли.

Несмотря на то, что из трех наиболее перспективных β -гликозидов (β -С₇МДП, β -фенМДП и β -адаМДП) только один препарат β -С₇МДП в настоящей работе был выбран для углубленного экспериментального и клинического изучения, мы считаем целесообразным и интересным продолжение исследования и двух других гликопептидов: β -фенМДП и β -адаМДП.

Трициклическая структура агликона β -адаМДП обладает максимальной гидрофобностью при минимальных размерах, что безусловно влияет на способность гликопептида взаимодействовать с биомембранами, а также в значительной степени определяет внутриклеточное движение вещества. В молекуле адамантана атомы углерода имеют такое же пространственное строение, как в кристаллической решетке алмаза. Углерод адамантан не растворим в воде, но растворяется в липидном слое клеточных мембран [2]. Соприкасаясь с живой клеткой, он изменяет физическое состояние клеточных мембран, повышая их проницаемость. С этим связано использование адамантановых радикалов для улучшения проникновения лекарственных препаратов внутрь клетки и повышения их фармакологической активности. Известно, что многие соединения, имеющие в своем составе адамантановые радикалы, проявляют высокую биологическую активность. Такие препараты, как мидантан, бромантан, кемантан, обладают одновременно противовирусной, противоопухолевой, иммуностимулирующей и детоксицирующей активностью, а также широким спектром нейротропных эффектов [1].

Пожалуй не менее интересен для расширенного изучения и β -фенМДП. Этот препарат оказался наиболее биологически активным из группы арилгликозидов и арилалкилгликозидов МДП. Структуры, схожие с агликонами гликопептидов указанной группы входят в состав многих биологически активных веществ, таких как витамин К, убинохинон (коэнзим Q) и др. Предстоит ответить на вопрос: являются ли эти структуры биологически активными центрами молекулы или лишь выполняют роль гидрофобного якоря. И в том, и в другом случае целесообразно продолжение исследований иммуностимулирующей активности и терапевтических эффектов β -фенМДП в моделях опухолевых и инфекционных заболеваний.

Также, с нашей точки зрения, внимания заслуживает β -циклогексилМДП, хотя карбоциклический агликон этого вещества не вызвал столь значительного увеличения биологической активности гликопептида, как карбоцепной агликон препаратов β -С₆МДП, β -С₇МДП и β -С₈МДП. Однако, в тест-системах *in vitro* β -циклогексилМДП стимулировал продукцию ИЛ-1 и ФНО мышинными перитонеальными макрофагами эффективнее немодифицированного МДП. При этом его действие по выраженности было сходно с гликозидами с алифатическими цепями агликонов. В литературе имеются указания на то, что карбоциклические структуры могут увеличить биологическую активность мурамилпептидов. Так, оригинальный карбоциклический аналог нор-МДП, лишенный пирогенности, предохранял мышей от иммуносупрессивного действия циклофосамида и увеличивал неспецифическую резистентность к грибковым инфекциям [24]. Кроме того, этот препарат активировал функции Т- и В-лимфоцитов и макрофагов и стимулировал дифференцировку В-клеток в плазмциты.

Таким образом, β -гликозиды МДП представляют собой группу химических веществ, обладающих широким спектром биологических эффектов и являющихся перспективными в плане создания на их основе иммуномодулирующих лекарственных средств.

Разработка новых иммуностимулирующих препаратов и методов регуляции иммунных реакций является важнейшей задачей, стоящей перед учеными медико-биологических направлений. На большом клиническом и экспериментальном материале продемонстрирована целесообразность включения методов направленной иммунокоррекции в тактические схемы лечения многих заболеваний [15]. В связи с этим представляется крайне актуальным определение предпочтительных направлений синтеза высокоэффективных иммуномодуляторов.

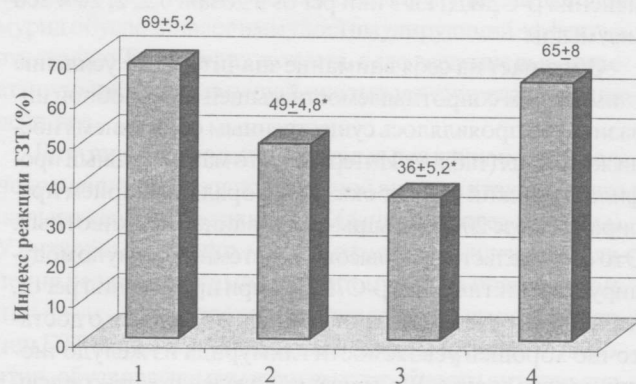


Рисунок 1. Влияние глимурида на проявление реакции ГЗТ при введении одновременно с сенсибилизирующей дозой антигена (ЭБ) мышам высокореагирующей линии СВА

Цифрами по оси абсцисс обозначены группы животных: 1 – контроль, 2 – β -гептилгикозид-МДП (глимурид) (0,2 мг/кг), 3 – β -гептилгикозид-МДП (20 мг/кг), 4 – β -гептилгикозид-МДП (200 мг/кг).

Показаны результаты 1 типичного из 3 независимых экспериментов. Каждое группа животных включала 10 особей.

* Достоверность различия с контролем ($p < 0,05$).

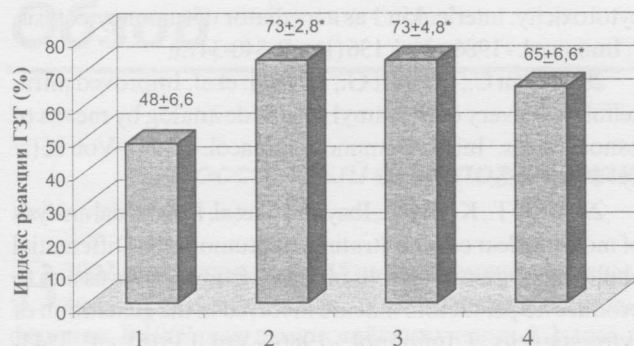


Рисунок 2. Влияние глимуриды на проявление реакции ГЗТ при введении одновременно с сенсibilизирующей дозой антигена (ЭБ) мышам низкореагирующей линии C57BL/6

Цифрами по оси абсцисс обозначены группы животных: 1 – контроль, 2 – β -гептилглизид-МДП (глимурид) (0,2 мг), 3 – β -гептилглизид-МДП (20 мг), 4 – β -гептилглизид-МДП (200 мг).

Показаны результаты 1 типичного из 3 независимых экспериментов. Каждое группа животных включала 10 особей.

* Достоверность различия с контролем ($p < 0,05$).

Литература

1. Арцимович Н.Г., Галушкина Т.С., Фадеева Т.А. Адамантаны – лекарства XXI века. Int. J. Immunorehabilitation. - 2000. - Vol. 2 (1). P. 54-60.
2. Багрий Е.И. Адамантаны: получение, свойства, применение. - М.: Наука. - 1989.
3. Земляков А.Е. Мурамоилпептиды: синтез и биологическая активность. Автореф. дис... док. хим. наук. - Одесса. - 2000.
4. Земляков А.Е., Чирва В.Я. Синтез гликозидных аналогов N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина. Химия природн. соедин. - 1987. - № 5. - С. 714.
5. Иванов В.Т., Андропова Т.М., Несмеянов В.А. и др. Механизм действия и клиническая эффективность иммуномодулятора глюкозаминилмурамил дипептида (ликопида). Клиническая медицина. - 1997. - № 3. - С. 11-15.
6. Иванов В.Т., Хаитов Р.М., Андропова Т.М., Пинегин Б.В. Ликопид (ГМДП) – новый отечественный высокоэффективный иммуномодулятор для лечения и профилактики заболеваний, связанных со вторичной иммунной недостаточностью. Иммунология. - 1996. - №2. - С. 4-6.
7. Калюжин О.В., Захарова Н.С., Брицина М.В. и др. Иммуномодулирующая активность β -гептилглизид-мурамилдипептида in vivo. Бюлл. Эксп. Биол. Мед. - Т. 128. - № 11. - С. 553-554.
8. Калюжин О.В., Калюжин В.В., А.Е.Земляков и др. Стимуляция неспецифической резистентности мышей β -

гептилглизид-мурамилдипептидом. Бюлл. Эксп. Биол. Мед. - 1999. - Т. 127. - № 5. - С. 543-545.

9. Калюжин О.В., Караулов А.В. Поиск предпочтительных направлений синтеза и разработка новых высокоэффективных иммуномодуляторов-мурамилпептидов. В книге «Успехи клинической иммунологии и аллергологии» под ред. А.В.Караулова. - Т. 1. - М. - 2000. - С. 252-258.

10. Калюжин О.В., Мулик Е.Л., Сергеев В.В. и др. Применение β -гептилглизид-мурамилдипептида в экспериментальной терапии генерализованных бактериальных инфекций. Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2000. - № 4. - С. 73-77.

11. Калюжин О.В. Производные мурамилдипептида в эксперименте и клинике. Журн. микробиол. - 1998. - № 1. - С. 104-108.

12. Калюжин О.В., Фукс Б.Б., Бовин Н.В. и др. Иммуномодулирующая активность новых производных мурамилдипептида in vitro. Бюлл. экспер. биол. - 1994. - Т. 117. - № 5. - С. 510-513.

13. Калюжин О.В., Фукс Б.Б. Влияние гидро-липофильного баланса производных мурамилдипептида на их взаимодействие с биомембранами и включение в клетки. Бюлл. экспер. биол. - 1996. - Т. 122. - № 12. - С. 658-661.

14. Караулов А.В., Калюжин О.В. Цитокины: биологическое действие и клиническое применение. В книге «Успехи клинической иммунологии и аллергологии» под ред. А.В.Караулова. - Т. 1. - М. - 2000. - С. 193-205.

15. Караулов А.В., Сокурено С.И., Калюжин О.В., Евсегнеева И.В. Направленная регуляция иммунных реакций в профилактике и лечении заболеваний человека. Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2000. - № 1. - С. 7-13.

16. Пинегин Б.Ф., Андропова Т.М., Карсонова М.И. Препараты мурамилдипептидового ряда – иммуностропные лекарственные средства нового поколения. Int. J. Immunorehabilitation. - 1997. - N. 6. - С. 27-34.

17. Хаитов Р.М., Гушин И.С., Пинегин Б.Ф., Зебрев А.И. Методические указания по изучению иммуностропной активности фармакологических веществ. В книге «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». - М.: ИИА «Ремедиум». - 2000. - С. 257-263.

18. Ambler L., Hudson A.M. Pharmacokinetics and metabolism of muramyl dipeptide and nor-muramyl dipeptide (^3H -labelled) in the mouse. Int. J. Immunopharmacol. - 1984. - Vol. 6. - P. 133-139.

19. Ellouz E., Adam A., Cioburi R. & Lederer E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1974. - Vol. 59. - P. 1317-1325.

20. Fidler I.J., Kleinerman E.S. Clinical application of phospholipid liposomes containing macrophage activators for therapy of cancer metastasis. Adv. Drug. Deliv. Rev. - 1994. - Vol. 13 (3). - P. 325-340.

21. Fish H., Gifford G.E. In vitro production of rabbit macrophage tumor cell cytotoxin. Int. J. Cancer. - 1983. - Vol. 32. - P. 105-112.

22. Fogler W.E., Wade R., Brundish D.E., Fidler I.J. Distribution and fate of free and liposome-encapsulated

[³H]nor-MDP dipeptide and [³H]muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine in mice. *J. Immunol.* - 1985. - Vol. 135 (2). - P. 1372-1377.

23. Kalyuzhin O.V., Zemlyakov A.E. & Fuchs B.B. Distinctive immunomodulating properties and interactivity with model membranes and cells of two homologous muramyl dipeptide derivatives. *Int. J. Immunopharmacol.* - 1996. - Vol. 18 (11). - P. 651-659.

24. Kikelj D., Pecar S., Kotnik V. et al. N-[trans-2-[[2'-(acetylaminocyclohexyl)oxy]acetyl]-L-alanyl-D-glutamic acid: a novel immunologically active carbocyclic muramyl dipeptide analogue. *J. Med. Chem.* - 1998. - Vol. 41 (4). - P. 530-9.

25. Kotani S., Tsujimoto M., Koga T. et al. Chemical structure and biological activity relationship of bacterial cell walls and muramyl peptides. *Federat. Proc.* - 1986. - Vol. 45 (11). - P. 2534-2540.

26. Kotani S., Watanabe Y., Shimono T. et al. Correlation between the immunoadjuvant activities and pyrogenicities of synthetic N-acetylmuramyl peptides or amino acids. *Biken J.* - 1976. - Vol. 19 (1). - P. 9-13.

27. Lovett D., Kozan B., Hadam M. et al. Macrophage cytotoxicity: interleukin 1 as a mediator of tumor cytostasis. *J. Immunol.* - 1986. - Vol. 136 (1). - P. 340-347.

28. Morin C., Barratt G., Fessi H. et al. Improved intracellular delivery of muramyl dipeptide analog by means of nanocapsules. *Int. J. Immunopharmacol.* - 1994. - Vol. 16 (5/6). - P. 451-456.

29. Uede T., Kocda Y., Ibayashi Y. et al. Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors. II. Differential ability of mononuclear cells obtained from various tissues to produce helper factors that are involved in the generation of cytotoxic cells. *J. Immunol.* - 1986. - Vol. 135 (5). - P. 3243-3251.

Интерфероны и их применение в онкогематологии Обзор

М.А.Волкова

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

В 2002 году исполняется 45 лет со времени одного из замечательных открытий 20-го века - открытия интерферонов. В 1957 году два английских ученых А. Isaacs и J. Lindenmann, изучали причину невосприимчивости животного, зараженного определенным вирусом, к вирусам не только этого вида, но и к генетически отличающимся, что свидетельствовало о существовании в организме механизма защиты, не связанного с выработкой антител против перенесенной инфекции. Они установили, что при контакте с любым вирусом клетки вырабатывают и выделяют в окружающую среду некое растворимое вещество, которое и определяет противовирусную резистентность организма. Поскольку явление невосприимчивости к различным вирусам после контакта с одним из них уже ранее было названо интерференцией вирусов, А. Isaacs и J. Lindenmann назвали обнаруженное и изученное ими вещество интерфероном [1].

Интерфероны имеются у всех позвоночных от рыб до человека, более того, белки, напоминающие интерфероны, обнаруживаются даже у насекомых и растений. Это свидетельствует о том, что интерфероны относятся к древнейшим защитным системам в живой природе.

Вскоре после открытия интерферонов была установлена неспецифичность их действия - интерфероны, появившиеся в организме после контакта с определенным вирусом, оказывают защитное действие против всех известных вирусов. В то же время интерфероны обладают строгой видовой специфичностью, то есть, интерфероны, синтезированные клетками животного одного вида, демонстрируют противовирусную активность только в клетках животных этого вида.

Дальнейшее изучение интерферонов показало, что их выработка в организме может быть индуцирована не только вирусами, но и бактериями, простейшими, эндотоксинами и неинфекционными агентами, иными словами, любыми антигенами, в том числе и собственными клетками с измененным геномом, например, клетками опухоли [2,3].

Еще в начале 70-х годов были охарактеризованы 3 основных типа интерферонов - α , β и γ . Несколько позднее были открыты еще 2 интерферона - ω и τ , имеющие до 70% ДНК-гомологов с генами интерферонов α . Интерферон ω обнаружен у человека и копытных животных, но отсутствует у мышей и собак, интерферон τ , впервые выделенный у птиц, не найден у человека [4].

У человека имеется всего по одному функционирующему гену, кодирующему образование интерферонов β ,

γ и ω и, следовательно, существует лишь один тип каждого из этих интерферонов. В то же время обнаружено по крайней мере 14 генов, кодирующих образование 14 различных подтипов интерферона α [5]. Причина существования такого количества подтипов интерферона α у высших позвоночных неизвестна, поскольку различные подтипы гомологичны по аминокислотной последовательности на 70-80% [6]. Так, существует 3 подтипа интерферона α 2 - α 2a, α 2b и α 2c, которые отличаются друг от друга всего на 1-2 аминокислоты: α 2a содержит лизин в 23 позиции полипептидной цепи и гистидин в 34, α 2b - аргинин в 23 и гистидин в 34, α 2c - аргинин в обеих указанных позициях. Более 90% всех α -интерферонов, вырабатываемых в организме человека, относятся к подтипу α 2b.

Гены, кодирующие образование интерферонов α , β и ω , у человека располагаются компактно на коротком плече хромосомы 9, ген, кодирующий образование интерферона γ , локализуется на длинном плече хромосомы 12 [7]. Интерфероны α и ω - мало- или негликозилированные протеины, β и γ - гликопротеины. Интерферон β и 13 подтипов интерферона α содержат в своем составе 166 аминокислот, один из интерферонов α , интерферон α 2, утратил аспарагиновую кислоту в 44 позиции полипептидной цепи и поэтому состоит из 165 аминокислот. Интерферон γ содержит 143 аминокислоты, интерферон ω - 172.

Образование интерферонов в организме происходит под воздействием антигенной стимуляции, 99% всех интерферонов вырабатывается клетками крови и костного мозга, хотя установлено, что интерфероны могут синтезироваться любыми клетками человеческого организма. Небольшое количество интерферонов в костном мозге, бронхах, кишечнике, коже образуется без антигенного стимула, по всей вероятности, являясь частью системы регуляции роста и дифференцировки клеток. Так, показано, что ретиноиды, играющие важную роль в дифференцировке миелоидных клеток, частично осуществляют свой эффект, индуцируя выработку одного из так называемых интерферон-регуляторных факторов (Interferon Regulatory Factor-1), действие которого направлено на прекращение клеточной пролиферации и индукцию апоптоза [8,9].

Несмотря на поистине огромное число исследований, посвященных изучению механизма действия интерферонов, он все еще не вполне ясен. Взаимодействие интерферона с клеткой начинается со связывания интерферона со специфическими интерфероновыми рецепторами на поверхности клетки, по своей структуре напоми-

нающими строение иммуноглобулина. Имеется общий рецептор для интерферонов α и β и отдельный – для интерферона γ . Ген, кодирующий образование интерферонного рецептора α/β у человека локализуется на длинном плече хромосомы 21, ген, кодирующий образование рецептора для интерферона γ , - на длинном плече хромосомы 6.

С помощью меченых молекул интерферона было установлено, что различные клетки организма чувствительны к интерферонам различных типов, следовательно, несут различные интерфероновые рецепторы на своей поверхности [10]. Количество интерфероновых рецепторов у разных клеток также различно, что является одной из причин неодинаковой чувствительности к интерферонам клеток разных тканей. Роль интерфероновых рецепторов в эффективности действия интерферонов α и β была показана в прямых опытах – удаление у мыши интерферонного рецептора α/β вело к потере в организме животного антипролиферативной активности интерферонов α и β и к повышению чувствительности к вирусным инфекциям [11].

Комплекс, образовавшийся в результате соединения интерферона с интерфероновым рецептором, погружается внутрь клетки, после чего эта связь разрывается, и рецептор вновь возвращается на поверхность клетки, а освободившийся интерферон активирует гены, кодирующие выработку так называемых эффекторных белков, которые и осуществляют защитный эффект. К настоящему времени известны 12 эффекторных белков, выработка которых индуцирована интерферонами α и β , и 16 - обусловленных действием интерферона γ [12].

Уже на первых этапах изучения механизма действия интерферонов было показано, что под влиянием интерферонов α и β повышается продукция 2'-5'-олигоденилат-синтетазы, являющейся катализатором синтеза олигонуклеотидов. Основная функция олигонуклеотидов - активация содержащегося в клетке в неактивной форме фермента эндорибонуклеазы, который, переходя в активную форму, фрагментирует вирусную и клеточную информационную РНК, осуществляя таким образом противовирусное и антипролиферативное действие [13].

Увеличивается продукция и другого фермента этого же семейства - 2'-5'-рибонуклеазы, которая инактивирует энзимы, необходимые для построения рибосом. Увеличивается также продукция 2'-5'-фосфодиэстеразы, которая ингибирует фосфорилирование, нарушая тем самым РНК- транскрипцию, что ведет к прекращению синтеза клеточных белков и таким образом к уменьшению клеточной пролиферации [14]. Изменяется продукция ряда других ферментов, например, под влиянием интерферона увеличивается продукция индоламин-2,3-дезоксигеназы, превращающей триптофан в формилкимураин, что ведет к истощению запасов внутриклеточного триптофана, необходимого для синтеза ряда физиологически важных ферментов, отсутствие которых приводит к деградации вирусной и бактериальной РНК.

Важной группой эффекторных белков, образование которых индуцируется интерферонами α и β , являются белки, обозначаемые как Мх-протеины, которым принадлежит основная роль в ингибировании вируса гриппа и некоторых других вирусов [15].

Под влиянием интерферонов α и β увеличивается также экспрессия антигенов большого комплекса гистосовместимости I класса, которые презентуют вирусные и бактериальные антигены Т-лимфоцитам. Это ведет к более легкому распознаванию клеток, инфицированных вирусом, и уничтожению их иммунокомпетентными клетками организма. На поверхности макрофагов под влиянием этих интерферонов усиливается экспрессия Fc-рецептора, что увеличивает цитотоксичность антител, взаимодействующих с инфицированными клетками.

Основная функция интерферона γ - усиление экспрессии на поверхности макрофагов антигенов большого комплекса гистосовместимости II класса, связывающих и представляющих цитотоксическим лимфоцитам неинфекционные антигены [16].

Из сказанного очевидно, что интерфероны α , β и γ выполняют различные функции в системе защиты организма. Интерфероны α и β обозначаются как интерфероны I типа, интерферон γ - как интерферон II типа, или в соответствии с его функцией как иммунный интерферон. Интерферон α вырабатывается главным образом В-лимфоцитами и активированными макрофагами, интерферон β - фибробластами и эпителиальными клетками, интерферон γ - Т-лимфоцитами, стимулированными антигенами, или Т-митогенами.

Различие функций обуславливает и различное время образования интерферонов после встречи организма с чужеродным антигеном.

Интерфероны α и β начинают вырабатываться немедленно после контакта с индуцирующим агентом, и уже через 30 минут может быть констатировано наличие эффекторного белка. Для синтеза γ - интерферона требуется несколько часов.

При большом сходстве в механизме действия интерферонов α и β их функции при встрече с возбудителями инфекций различны. Действие интерферона β главным образом локальное, поскольку его роль - предотвращение распространения инфекционного агента из места внедрения. Подтверждением такой роли β -интерферона является очень высокая его концентрация в месте инъекции инфекционного возбудителя при крайне низкой концентрации в крови. Скорее всего, после встречи организма с возбудителем инфекции первым из интерферонов начинает вырабатываться β -интерферон.

Если не происходит локальной инактивации внедрившегося агента, и он постепенно распространяется в организме, его контакт с лимфоцитами и макрофагами индуцирует выработку α -интерферона. В отличие от интерферона β α -интерферон свободно циркулирует в крови и быстро распространяется от места его образования, его главная функция - защита отдаленных органов. Он проникает из крови в окружающие ткани, исключением являются только центральная нервная система при неповрежденном гемато-энцефалическом барьере и плацента, куда интерфероны почти не проникают.

Из сказанного ясно, что интерфероны α и β осуществляют раннюю и неспецифическую защиту организма от чужеродного антигена еще до того как начинают действовать специфические иммунные механизмы защиты.

При дальнейшем распространении внедрившегося, чаще всего инфекционного, агента начинается выработка интерферона γ , который синтезируется сенсибилизированными Т-лимфоцитами после их повторной встречи с антигеном. Не имея механизма непосредственного воздействия на чужеродный антиген, интерферон γ активно стимулирует макрофаги, увеличивая их связь с антителами и способность распознавать посторонние антигены, усиливает действие других интерферонов, стимулирует выработку антител, интерлейкинов, фактора некроза опухоли, активирует действие естественных киллеров и цитотоксических лимфоцитов.

Различиями в функциях интерферонов объясняется тот факт, что в естественных условиях интерфероны α и β образуются в организме чаще всего в ответ на встречу с возбудителем инфекции, в то время как для синтеза интерферона γ инфекционный агент является лишь одним из многих равных индуцирующих факторов.

Важнейшее значение для понимания роли интерферонов в живом организме как защитной системы с широким диапазоном действия и одновременно для их дальнейшего клинического применения имели исследования I. Gresser и его коллег, показавших, что интерфероны подавляют рост опухолей, не только индуцированных вирусами, но и тех, возникновение которых прямо с вирусом не связано [17].

Большинство из рассмотренных выше составляющих механизма действия интерферонов играет ту или иную роль и в их противоопухолевом эффекте. Упомянувшееся увеличение синтеза Мх-протеинов, являющихся ингибиторами транскрипции информационной РНК, ферментов системы 2'-5'-олигоденилат синтазы, ингибирующих трансляцию, необходимую для синтеза клеточных белков, истощение внутриклеточных запасов триптофана, ведущее к нарушению белкового синтеза в клетке, имеют большое значение в антипролиферативном, в том числе и противоопухолевом действии интерферонов. Показано, что эффект терапии интерфероном прямо коррелирует с уровнем 2'-5'-олигоденилат синтазы при некоторых лимфомах [18]. Однако основной механизм антипролиферативного действия интерферонов, по всей вероятности, связан с удлинением клеточного цикла и накоплением клеток в фазе G0 с их последующим апоптозом, что показано рядом работ [19,20].

К настоящему времени установлено, что взаимодействие интерферона с интерфероновым рецептором на поверхности клетки передает в ядро сигнал по одному из основных путей передачи сигнала транскрипции в клетке - через систему JAK-STAT протеин-киназ. Этот сигнал является пусковым механизмом для фосфорилирования тирозина, приводящего к активации молекул STAT1, STAT2, каспаз, что ведет к блокаде клеточного цикла и апоптозу клеток [21].

Активация многих генов, например, p21, p27 вносит свой вклад в антипролиферативную активность интерферонов. Немаловажную роль в противоопухолевом эффекте играет усиление активности натуральных киллеров, подавление ангиогенеза и усиление экспрессии молекул большого комплекса гистосовместимости. Недавними исследованиями показано, что интерлейкин 12, обладаю-

щий выраженным антиангиогенным эффектом, осуществляет свое действие, усиливая образование интерферона γ и его эффекторного белка p-10 [22].

На клеточных культурах здоровых доноров и больных острым лейкозом недавно было продемонстрировано, что интерферон α значительно подавляет активность теломеразы, фермента, регулирующего нормальную длину теломера, необходимую для клеточного деления [23]. Имеются неоднократно подтвержденные данные о том, что интерферон γ увеличивает экспрессию FAS антигена и каспазы 3 и тем самым индуцирует апоптоз в костномозговых (CD34+) предшественниках [24,25]. Недавно получены данные о том, что аналогичным образом действует и интерферон α , причем эффект апоптотического действия α -интерферона усиливается вызываемой им фрагментацией антиапоптотической молекулы Bax [26].

Вызываемое α -интерфероном подавление активности протоонкогена c-Myc, участвующего в регуляции клеточного роста, также ведет к антипролиферативному эффекту [27]. Интерферон α усиливает также выброс в кровь фактора некроза опухоли, действие которого направлено на деградацию опухолевых клеток [28].

Таким образом, из имеющихся к настоящему времени данных очевидно, что интерфероны обладают антипролиферативным, в том числе противоопухолевым, действием, реализуемым несколькими, нередко взаимосвязанными, путями. В противоопухолевом действии интерферонов имеют значение как изложенные способы непосредственного воздействия на опухоль, так и не прямые противоопухолевые механизмы, связанные с увеличением активности макрофагов, активацией Т-клеток, натуральных киллеров и увеличением продукции антител.

Со времени открытия интерферонов до их широкого клинического применения прошло около 20 лет. Использувавшиеся в начале лейкоцитарные интерфероны не были вполне безопасными, так как нельзя было полностью исключить возможность передачи вирусных инфекций донорскими лейкоцитами. Кроме того, метод их получения был очень дорогим. Широкое клиническое применение интерферонов началось только после разработки промышленного производства рекомбинантных интерферонов.

Изучение эффективности различных интерферонов при многих заболеваниях показало, что в большинстве случаев наиболее эффективными являются интерфероны α . Интерферон β оказался эффективнее других типов интерферонов при рассеянном склерозе, в лечении которого он применяется в настоящее время [29].

Интерферон γ эффективен при хронической гранулематозной болезни - редком наследственном заболевании, при котором имеется сочетанный дефект нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов, не способных вырабатывать антимикробные оксиданты, в результате чего носители этого врожденного дефекта страдают склонностью к повторяющимся бактериальным инфекциям [30]. Недавними исследованиями на больных детях показано, что интерферон γ увеличивает продукцию основного из антимикробных оксидантов - супероксидазы, устраняя молекулярный дефект нейтрофилов [31].

Интерфероны α были изучены и показали свою высокую эффективность прежде всего в лечении вирусных гепатитов.

В 80-90-х годах эффективность интерферонов α была испытана практически при всех солидных опухолях, однако, в большинстве случаев результаты оказались либо разочаровывающими (рак легкого, предстательной железы, молочной железы), либо сомнительными (рак яичников, опухоли мозга). Лишь при раке почки, мочевого пузыря, прямой кишки, злокачественной меланоме был продемонстрирован лечебный эффект α -интерферонов [32]. Наиболее эффективными α -интерфероны оказались при ВИЧ-ассоциированной саркоме Капоши и онкогематологических заболеваниях, в первую очередь при волосатоклеточном лейкозе и хроническом миелолейкозе.

Волосатоклеточный лейкоз - редкий вариант лейкоза, на долю которого в европейских странах, Северной Америке и Японии приходится не более 2% среди всех лейкозов и который почти не встречается в остальных регионах мира. В качестве самостоятельной нозологической единицы заболевание выделено лишь в 1958 году. Оно характеризуется особой морфологией патологических клеток - наличием тонких волосяных отростков цитоплазмы, из-за которых и получило свое название, в большинстве случаев - анемией, лейкопенией и тромбоцитопенией, фиброзом костного мозга и спленомегалией. Гранулоцитопения обуславливает частое развитие инфекций, которые оказываются непосредственной причиной смерти большинства больных. Продолжительность жизни при волосатоклеточном лейкозе колеблется в широких пределах - от 1 года до 30 лет, но в среднем она составляет 5 лет [33].

До появления в клинической практике интерферонов применявшиеся методы терапии волосатоклеточного лейкоза не давали удовлетворительных результатов. Основное лечебное мероприятие - спленэктомия была сопряжена с послеоперационными осложнениями и нередко давала лишь временный эффект. В 1984 году J. Quesada и соавторы впервые с успехом применили натуральный человеческий α -интерферон для лечения 7 больных [34]. В течение 2-3-х лет после первого сообщения появились публикации об успешном лечении рекомбинантным интерфероном десятков больных, а в настоящее время лечение проведено уже сотням больных, и его методика хорошо известна.

При применении 3 MU (1 MU равна 1000 000 международных единиц) после начального снижения количества лейкоцитов и тромбоцитов в течение 4-6 недель происходит постепенная нормализация картины крови, несколько позже - картины костного мозга и сокращение размеров селезенки. Для исключения быстрого наступления рецидива лечение интерфероном должно продолжаться длительно - в поддерживающих дозах в течение 1-1,5 лет.

При лечении интерфероном полные ремиссии после 4-6 недель лечения наступают не более чем у 10-12% больных, но продолжение терапии интерфероном позволяет увеличить их число в течение 5-6 месяцев до 55-65% [35]. Показано, что длительное применение интерферона позволяет получить ремиссию даже при гиперлейкоцитозном варианте волосатоклеточного лейкоза, отличающемся особенно агрессивным течением, нередкой резистентностью к терапии и короткой продолжительностью жизни [36].

Даже в тех случаях, когда удается получить лишь частичную ремиссию, почти всегда достигаются удовлетворительные показатели крови, которые позволяют больному восстановить соматическую компенсацию и трудоспособность. Очень важным является достоверное уменьшение частоты инфекций при лечении интерфероном. Так, по данным H. Golomb и соавторов, после месячного лечения α -интерфероном частота инфекционных осложнений уменьшилась в 3 раза [37].

Повторное лечение α -интерфероном в случае возникновения рецидива позволяет вновь получить полные или хорошие частичные ремиссии с нормализацией картины периферической крови у 75-90% больных. Пятилетний срок при лечении интерфероном переживает подавляющее большинство больных - по данным разных авторов, от 75 до 100% больных.

В механизме действия α -интерферона при волосатоклеточном лейкозе помимо антипролиферативного эффекта имеют значение и другие факторы. Характерная для этого заболевания моноцитопения ведет к снижению продукции цитокинов и фактора некроза опухоли, а также самого интерферона α , что обнаружено многими исследователями [38, 39]. Показано, что лечение α -интерфероном увеличивает продукцию эндогенного α -интерферона и одновременно подавляет продукцию фактора роста опухоли β (TGF- β), которая повышена при этом заболевании [40].

В настоящее время подход к лечению волосатоклеточного лейкоза изменился, и препаратами выбора в его терапии стали пуриновые аналоги - кладрибин (2-Cda) и пентостатин (DCF). Тем не менее, интерферон сохраняет свое значение, поскольку лечение пуриновыми аналогами при очень высокой эффективности сопряжено с возможностью развития инфекционных осложнений в периоде вызываемой ими миелосупрессии. Частота инфекционных осложнений значительно снижается при предварительном 3-4-месячном лечении α -интерфероном.

Еще более впечатляющими являются результаты применения α -интерферона при хроническом миелолейкозе.

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) - распространенный вид лейкоза, на долю которого приходится около 20% среди всех лейкозов. ХМЛ - первая опухоль, при которой у человека обнаружены специфические хромосомные изменения - описанная в 1960 г Р. Nowell и D. Hungerford характерная для этого заболевания филадельфийская хромосома (Ph-хромосома), расщипованная поздней J. Rowley как результат реципрокной транслокации части длинного плеча хромосом 9 и 22 - t(9;22)(q34;q11) [41, 42].

В результате произошедшей транслокации часть протоонкогена ABL, локализованного на длинном плече хромосомы 9, оказывается перенесенной на длинное плечо хромосомы 22 в район расположения гена BCR, в результате чего на длинном плече хромосомы 22 образуется химерный ген BCR-ABL.

Нормальный ген ABL кодирует образование белка p-145, относящегося к семейству тирозин-протеинкиназ - энзимов, катализирующих процессы фосфорилирования аминокислот в клеточном цикле. При образовании гена BCR-ABL кодируется белок p-210, обладающий значительно более выраженной тирозин-киназной активностью за

счет того, что тирозин 177, локализованный в области гена BCR, ускоренно фосфорилируется тирозинкиназой гена ABL, активность которой в свою очередь увеличивается при образовании гена BCR-ABL за счет серин-треонин-протеинкиназы, расположенной в области BCR. Усиленное фосфорилирование тирозина приводит к активации ряда клеточных белков, которая в конечном итоге ведет к ускорению сигнала пролиферации, поступающего в клетку через систему митогенактивных протеинкиназ - активация сигнального пути RAS-MAPK, являющегося в клетке основным путем, по которому передаются сигналы дифференцировки и пролиферации [43].

Активируется и локализованный в области гена BCR циклин-D-комплекс, передающий «разрешающий» сигнал, необходимый для перехода клетки из фазы G1 в фазу S. Активация указанного сигнального пути, кроме того, приводит к активации генов c-MYC, которое ведет к независимости клеточной пролиферации от регулирующего влияния ростовых факторов [44]. Факторы роста помимо влияния на пролиферацию, созревание и дифференцировку клеток в нормальных условиях усиливают адгезию клеток к белкам стромы, чего не происходит при хроническом миелолейкозе в силу указанных изменений сигнальных клеточных путей. Это обуславливает характерное для ХМЛ увеличение пролиферации и циркуляции в крови незрелых клеток, в том числе и клеток-предшественников.

Показано также, что клетки - носители гена BCR-ABL имеют меньшую по сравнению с нормальными чувствительность к сигналам апоптоза, что играет отрицательную роль в эволюции заболевания, так как ведет не только к увеличению массы опухолевых клеток, но и способствует выживанию клеток с добавочными мутациями, которые могут становиться причиной развития терминального обострения заболевания [45].

До появления в клинической практике интерферонов в лечении ХМЛ основными средствами были в течение 40 лет алкилирующий препарат миелосан, а с начала 90-х годов - гидроксимочевина, препарат, являющийся ингибитором рибонуклеотидазы фермента, необходимого для синтеза ДНК. Медиана продолжительности жизни при миелосанотерапии составляла 42-54 месяца, при лечении гидроксимочевинной 55-56 месяцев.

Применение интерферона а при ХМЛ началось с 1981 года, и вскоре начали появляться публикации о том, что при лечении интерфероном удается получить не только клиничко-гематологические, но у ряда больных и цитогенетические ремиссии, чего практически не наблюдалось при использовании цитостатических препаратов. В некоторых публикациях сообщалось о том, что полные цитогенетические ремиссии, когда не удается обнаружить BCR-ABL- позитивных клеток, достигаются у 13-32% больных [46]. Было показано, что даже частичная элиминация BCR-ABL- позитивных клеток способствует удлинению хронической фазы заболевания. Благодаря многочисленным публикациям, посвященным результатам терапии ХМЛ α -интерфероном, стало очевидным, что интерферонотерапия позволяет добиться увеличения продолжительности хронической стадии заболевания и в результате этого увеличения продолжительности жизни.

Несколько рандомизированных исследований в различных странах, включившие суммарно более 2000 боль-

ных, показали достоверное увеличение медианы продолжительности жизни при лечении интерфероном до 61-72 месяцев. [47,48]. В некоторых публикациях сообщалось о еще более высоких результатах. Так, по данным Н. Kantarjian и соавторов, медиана выживаемости при лечении интерфероном составила 89 месяцев, а в группе с благоприятными прогностическими признаками - 104 месяца [49]. Предполагаемая 10-летняя выживаемость достигает 40%, а у больных с полной цитогенетической ремиссией - 80%. [50]. Как известно, при цитостатической терапии 10-летний срок, по данным большинства публикаций, переживают лишь 5% больных.

Некоторыми исследованиями показано, что даже в группах больных, у которых не наблюдается цитогенетического ответа на интерферонотерапию, достигается увеличение продолжительности жизни по сравнению с больными, не получавшими интерферона [51].

При хроническом миелолейкозе используются более высокие дозы интерферона, чем при волосатоклеточном лейкозе - рекомендуемая доза составляет 5 MU/м² в день. При плохой переносимости эта доза обычно уменьшается до 5-3 MU в день, однако, возможность достижения цитогенетического ответа у большинства больных при таких дозах снижается. Мы наблюдали возврат к полной Ph-позитивности у больного с цитогенетическим ответом (46% - Ph - негативных клеток) после вынужденного из-за плохой переносимости снижения дозы интерферона.

В последние годы интерферон комбинируется либо с малыми дозами цитозин-арабинозида, либо с гидроксимочевинной.

В механизме действия интерферона при хроническом миелолейкозе большое значение придается восстановлению интегринзависимой адгезии клеток и восстановлению сигнала, обеспечивающего ингибирование связанной с адгезией пролиферации клеток [52], увеличению активности натуральных киллеров и Т-лимфоцитов и активации опосредующей апоптоз молекулы FAS [53, 54]. Имеются данные о том, что действие α -интерферона при ХМЛ может быть связано и с индуцируемой интерфероном дифференцировкой дендритических клеток, которые способны презентировать иммунокомпетентным клеткам специфический ХМЛ-антиген [55].

Недавно произошло событие, коренным образом изменившее подходы к терапии хронического миелолейкоза: в арсенале лечебных средств появился препарат STI 571 (Signal transduction inhibitor), ингибирующий активность ABL- тирозинкиназы, то есть являющийся патогенетическим средством лечения этого заболевания. Уже первые исследования показали высокие результаты - после 6 месяцев лечения больных, у которых терапия интерфероном не вызвала даже гематологической ремиссии, клиничко-гематологическая ремиссия достигнута у подавляющего большинства пациентов, полная и частичная цитогенетическая - почти у 40% из них [56] Тем не менее, интерферон, по всей вероятности, останется в арсенале терапевтических средств при ХМЛ, тем более, что уже имеются данные о его синергическом с STI 571 действии [57].

Успех терапии ХМЛ со снижением количества не только лейкоцитов, но и тромбоцитов побудил к применению а-интерферона при других миелопролиферативных забо-

леваниях, прежде всего при эссенциальной тромбоцитемии и истинной эритремии.

Эссенциальная тромбоцитемия - редкое заболевание, характеризующееся преимущественной пролиферацией мегакариоцитов и повышенным образованием тромбоцитов. Заболевание опасно возможностью развития сосудистых осложнений, которые нередко становятся причиной инвалидизации и даже гибели больных. Алкилирующие препараты, применявшиеся в терапии эссенциальной тромбоцитемии до появления интерферонов, позволяют удерживать число тромбоцитов на нормальном уровне, однако, они обладают определенным лейкозогенным эффектом, и поэтому в настоящее время предпочтение отдается α -интерферону, особенно при лечении пациентов молодого возраста.

В терапии эссенциальной тромбоцитемии эффективными оказались небольшие дозы α -интерферона: при применении 3-5 MU в день уже в течение нескольких недель удается получить нормализацию количества тромбоцитов у 70-100% больных, последующая поддерживающая терапия по 3 MU 3 раза в неделю позволяет длительно удерживать достигнутый эффект с полным отсутствием сосудистых осложнений [58, 59].

Столь же эффективным оказалось и лечение α -интерфероном истинной полицитемии (эритремии). Заболевание характеризуется повышенной пролиферацией эритроцитов, сочетающейся с менее выраженной пролиферацией лейкоцитов и тромбоцитов. Увеличение массы циркулирующих эритроцитов приводит к повышению вязкости крови, замедлению кровотока, развитию микрососудистых осложнений, а иногда образованию тромбов и в крупных сосудах с большим риском нарушения мозгового кровообращения. Миелоидная пролиферация, как правило, приводит к увеличению размеров селезенки. Лечение обычно включает кровопускания, антиагреганты и цитостатические препараты, которые дают несомненный эффект, но обладают лейкозогенным действием.

Применение α -интерферона в таких же, как при тромбоцитемии, дозах позволяет получить эффект у 60-80% больных с уменьшением или исчезновением потребности в кровопусканиях, сокращением размеров селезенки и исчезновением мучительного кожного зуда, который имеется у многих больных и обычно не уменьшается при применении других терапевтических средств [60].

Недавно опубликованные данные о длительном (от 1 года до 10 лет) применении α -интерферона в поддерживающих дозах 1-3 MU 2-3 раза в неделю для лечения 55 больных показали хорошую переносимость при очень хорошей эффективности: у всех достигнута нормализация показателей гематокрита, числа тромбоцитов и лейкоцитов и сокращение размеров селезенки, не было ни одного случая развития тромботических осложнений или острого лейкоза [61]. Эти данные подтверждены анализом результатов лечения 279 больных, - у всех достигнуто улучшение гематологических показателей, у 77% - сокращение размеров селезенки, у 81% - исчезновение кожного зуда, у 50% получены полные ремиссии, причем в некоторых случаях исчезли имевшиеся до лечения хромосомные aberrации [62].

При других онкогематологических заболеваниях лечебное действие α -интерферона не столь выражено. В рандо-

мизированном исследовании, включавшем 256 больных множественной миеломой, показано, что при лечении больных с I-II стадией заболевания сочетанием химиотерапии с α -интерфероном прогрессирование наступало реже и в более отдаленные сроки, чем при терапии только цитостатическими средствами. Это, однако, не дало преимуществ в общей выживаемости. В то же время использование α -интерферона в качестве поддерживающей терапии после достижения ремиссии достоверно продлило как период ремиссии, так и общую выживаемость больных [63]. Эти данные подтверждены в недавней публикации, подводящей итоги 24 рандомизированным исследованиям, включившем 4012 больных, - при использовании интерферона как в индукционных терапевтических курсах одновременно с химиотерапией, так и в качестве поддерживающей терапии получено незначительное, но достоверное преимущество в группе получавших интерферон с увеличением общей выживаемости в этой группе на 4 месяца [64]. Как эксперты, участвующие в данном исследовании, так и авторы других публикаций делают вывод, что эти незначительные преимущества должны быть проанализированы в соответствии со стоимостью лечения интерфероном и наличием ухудшающих качество жизни побочных явлений. Возможно, заметные преимущества как в удлинении безрецидивного периода болезни, так и в увеличении продолжительности жизни при лечении интерфероном получают всего 5-10% больных множественной миеломой, и важной задачей является выделение прогностических признаков, позволяющих определить эту группу пациентов еще до начала терапии. [65].

Большое количество работ посвящено изучению эффективности α -интерферона при неходжкинских злокачественных лимфомах. Полученные данные об антипролиферативном действии интерферона α - нарушении целостности митохондриальных мембран, активации каспазы 3, повреждении молекулы Вах при действии α -интерферона на культуру клеток В-клеточной лимфомы дают основание для применения интерферона в терапии лимфом [66]. Действительно, применение α -интерферона в качестве единственного лечебного средства при В-клеточных лимфомах низкой степени злокачественности оказалось эффективным у 50-75% ранее нелеченных больных, однако, эти результаты не превысили получаемые с помощью монотерапии циклофосфамидом или хлорамбуцилом, которые лучше переносятся и лечение которыми значительно выгоднее экономически [67, 68].

Рандомизированные исследования с использованием комбинации хлорамбуцила и интерферона или только хлорамбуцила для индукции ремиссии и затем применение интерферона в качестве поддерживающей терапии или отсутствие поддерживающей терапии не показали преимуществ назначения интерферона ни в одной из указанных групп. Оказалось, однако, что достигнута достоверно большая продолжительность ремиссии в группе получавших интерферон в индукции и в качестве поддерживающего лечения по сравнению с не получавшими его вовсе, но и при таком анализе не получено разницы в продолжительности жизни [69].

В дальнейшем рандомизированное исследование CALGB, включавшее 581 больного, показало такие же

результаты при использовании интерферона и циклофосфамида [70].

Дальнейшие рандомизированные исследования EORTC, ECOG, MD Anderson, GELA, включавшие в общей сложности около 800 больных, продемонстрировали, что при комбинации полихимиотерапии с интерфероном и дальнейшем проведении поддерживающего лечения интерфероном получено достоверно более высокое число ремиссий и достоверно более длительная безрецидивная и общая выживаемость [71, 72, 73, 74]. При этом показано, что результаты зависят от дозы интерферона, которая не должна быть меньше 3 MU 3 раза в неделю и назначаться длительно - не менее 18-20 мес, поскольку именно такой режим введения обеспечивает 5-летнюю выживаемость 70% больных.

При лимфомах промежуточной и высокой степени злокачественности рандомизированные исследования, включавшие более 600 больных, показали отсутствие эффекта при добавлении интерферона к полихимиотерапии - не было получено разницы ни в частоте или продолжительности ремиссий, ни в общей выживаемости [75, 76].

Из Т-клеточных лимфом чувствительны к интерферону лимфомы кожи - синдром Сезари, грибовидный микоз. На ранних стадиях, как показывает наш собственный опыт, иногда удается добиться полной ремиссии с помощью умеренных (3 MU в день) доз интерферона. При проведении затем поддерживающей терапии в указанной дозе 3 раза в неделю такие ремиссии удается сохранить на 6-12 месяцев. В большинстве случаев, особенно при частичных ремиссиях эффект оказывается более коротким, поэтому рекомендуется комбинировать назначение интерферона с другими средствами, применяемыми при лечении кожных лимфом [77].

Показанная в недавних исследованиях способность α -интерферона усиливать экспрессию CD20 на поверхности лейкоэмических клеток при лимфопролиферативных заболеваниях может послужить рациональной основой для использования α -интерферона в комбинации с анти-CD20 моноклональными антителами (Rituximab) для усиления их действия при лимфомах и особенно при хроническом лимфолейкозе, где экспрессия CD20 слабо выражена.

В настоящее время в клинической практике используются два подтипа α -интерферона - α 2a - роферон и α 2b - интрон. Сравнительно недавно появилась новая форма α -2 β интерферона - PEG-интерферон, представляющий собой конъюгированное соединение молекулы α 2b-интерферона с полиэтиленгликолем. Фармакокинетические исследования показали, что PEG-интерферон имеет в 7 раз более продолжительный период полувыведения, чем обычный интерферон- α 2b, за счет чего достигается более длительный контакт с тканями, что позволяет вводить препарат реже. В настоящее время еще не закончены клинические испытания и не определены оптимальные дозы препарата. Он вводится в дозе 0,35 мг/кг и выше, обычно 1 раз в неделю. Первые опубликованные результаты при ХМЛ показывают, что хорошо переносимой является даже доза 6 мг/кг в неделю, которая соответствует примерно 15 MU/м² в день, то есть трем дневным дозам, обычного интерферона. У некоторых больных, не давших цитогенетического ответа при лечении обычным интерфероном

применение PEG-интерферона позволило получить полные цитогенетические ремиссии [78].

Побочные явления, которые связаны с применением интерферона и которые нередко являются причиной недостаточной дозы или полной невозможности использования интерферона, обусловлены теми биологическими процессами, которые вызывают интерфероны в организме.

В начале лечения практически у всех пациентов развивается гриппоподобный синдром с высоким (38-39) подъемом температуры, ознобом, мышечными и суставными болями, который, по всей вероятности, обусловлен быстрым образованием и выбросом в кровь интерлейкина-1, простагландина E2 и фактора некроза опухоли. Изредка наблюдаются тошнота, рвота, падение артериального давления, нарушения сердечного ритма. При длительном многомесячном лечении у некоторых больных снижается масса тела, появляется анорексия, бессонница, чувство постоянной усталости, алопеция. Нам пришлось наблюдать больную ХМЛ, у которой после 6 лет успешного лечения интерфероном развилась резчайшая слабость, выраженная алопеция, анasarка, резкие нарушения сердечного ритма и глубокие неврологические расстройства с полной невозможностью передвигаться. Отмена интерферона и применение сердечных и нейротропных средств постепенно привело к полному восстановлению соматического благополучия.

Неврологические и психические расстройства чаще наблюдаются у пожилых пациентов, они могут выражаться в полной дезориентации в окружающем, в резкой агрессивности или глубокой депрессии с суицидальными действиями.

К очень редким осложнениям, встречающимся менее чем у 2% больных, относятся аутоиммунные процессы - аутоиммунная анемия или тромбоцитопения, тиреоидит или синдромы, напоминающие системную красную волчанку или ревматоидный артрит.

В процессе терапии иногда наблюдается не только снижение количества лейкоцитов, но и развитие тромбоцитопении. Описана даже смертельная аплазия кроветворения как следствие применения интерферона при хроническом миелолейкозе [79]. Подобные исходы, к счастью, являются редкостью, и обычно отмена интерферона и назначение необходимой терапии осложнений приводит к их ликвидации в довольно короткие сроки.

Литература

1. Isaacs A. and Lindenmann J. Virus interference. I. The Interferon. Proc R Soc Ser B 1957, 147, p 258
2. Sutton R.N.P and Tyrrell D.A.J. Some observations on interferon prepared in tissue cultures. Brit J Exp Pathol 1961, 42, p99
3. Wheelock E.F. Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. Science 1965, 169, p310
4. Himmler A, Hauptmann R, Adolf G.R. and Swetly P. Structure and expression in Escherichia coli of canine IFN- α . J Interferon Res 1987, 7, p173
5. Testa D., Distribution of Interferon- α 2 Genes in Humans. In: Interferons, Biological Activities and Clinical Efficacy, Springer-Verlag, 1997, p 1- 13

6. Finter N.B. The subtypes of alpha interferon and their importance. In: Lymphoblastoid Alpha- Interferon, London, Current Medical Literature, 1995
7. Weissmann C. and Weber H. The interferon genes. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 1986, 17, p3415
8. Matikainen S, Ronni T., Hurme M et al. Retinoic acid activates interferon regulatory factor-1 gene expression in myeloid cells. Blood 1996, 88, p114
9. Tanaka N., Ishihara M., Kitagawa M. et al. Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on transcription factor IFR-1. Cell 1994, 77, p892
10. Хесин Я.Е., Наровлянский А.Н., Амченкова А.М. Система интерферонов в норме и при патологии. Москва, 1996, стр.39-52
11. Hwang S.Y., Hertzog P.J., Holland K.A. et al. A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons α and β and alters macrophage responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92, p11284-11288
12. Dianzani F. The interferon system. London, Health Sciences Press, 1993, p 7
13. Chebath J. and Revel M. The 2-5 A system: 2-5 A synthetases, isospecies and functions. In: Interferon, principles and medical applications. Calveston, 1992, p 225
14. Taylor J.L., Grossberg S.E. Recent progress in interferon research: molecular mechanisms of regulation, action and virus circumvention. Virus Res 1990, 15, p1-25
15. Horisberger M. Mx protein: function and mechanism of action. In: Interferon, principles and medical application, Calveston, 1992, p215- 224
16. Amaldi I., Reith W., Berte C. and Mach B. Induction of HLA class II genes by IFN- γ is transcriptional and requires a trans-acting protein. J Immunol 1989, 142, p999
17. Gresser I., Maury C. and Brouty-Boye D. Mechanism of the antitumour effect of interferon in mice. Nature 1972, 239, p167
18. De Mel W.C.P., Hoffbrand A.V., Giles F.E. et al Alfa interferon therapy for haematological malignancies: correlation between in vivo induction of the 2'-5'- oligoadenilate system and clinical response Br J Haematol 1990, 74, p452-456
19. Kirchner H. Interferons- α a group of multiple lymphokines. Semin Immunopathol 1984, 7, p347-374
20. Stewart W.E., Blanchard D.K. Interferons: cytostatic and immunomodulatory effects. In: Immunity to cancer, Academic, New York 1985, pp 295-307
21. Pfeffer L.M., Dinarello Ch. A., Herberman R.B. et al. Biological Properties of Recombinant α -Interferons: 40th Anniversary of the Discovery of Interferons. Cancer Research 1998, 58, p2489-2499
22. Yao L., Pike S.E., Setsuda J et al. Effective targeting of tumor vasculature by angiogenesis inhibitors vasostatin and interleukin-12. Blood 2000, 96, p1900-1905
23. Xu D., Erickson S., Szeps M et al. Interferon alpha down-regulates telomerase reverse transcriptase and telomerase activity in human malignant hematopoietic cells
24. Won J.H., Hong D.S., Kim S.J. et al. Increased expression of FAS antigen and apoptosis are induced by interferon- γ in long-term marrow culture of human cord blood CD34+ cells. Experimental Hematology 2001, 29,suppl 1, p29,abstr 113
25. Welsh J.P., Rutherford T.R., Gordon-Smith E.C, Gibson F.M. In vitro effects of INF- γ and TNF- α on bone marrow progenitor cells from aplastic anemia patients and normal donors. Experimental. Hematology 2001, 29,suppl 1, p111, abstr 437
26. Yanase N., Ohshima K., Ikegami H., Mizuguchi J. Cytochrome c release, mitochondrial membrane depolarization, caspase-3 activation, and Bax- α cleavage during INF- α -induced apoptosis in Daudi B lymphoma cells. J Interferon Cytokine Res 2000, 20, p1121-1129
27. Geng Y., Choubey D. Differential induction of the 200-family proteins in Daudi Burkitt's lymphoma cells by interferon- α . J Biol Regul Homeost Agents 2000, 14, p263-268
28. Gisslinger H., Kurzrock R., Gisslinger B et al. Autocrine cell suicide in a Burkitt lymphoma cell line(Daudi) induced by interferon alpha: involvement of tumor necrosis factor as ligand for the CD95 receptor. Blood 2001, 97, p2791-2797
29. Panitch H.S. and Bever Ch.T. Clinical use of interferons in multiple sclerosis. In: In: Interferon, principles and medical applications. Calveston, 1992, pp581-587
30. Gallin J.I., Malech H.L., Weening R.S. et al. A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. N Engl J Med 1991, 324, p509
31. Nunoi H., Ishibashi F., Mizukami T. et al. Interferon- γ improves superoxide generating ability accompanied by splicing pattern change of CYBB gene transcripts in neutrophils from CGD patients with a splice site mutation. Blood 2000, 96, p14a, abstr 47
32. Heimpel H. And Schmid M. Interferon- α : its current clinical utility and future perspectives. In: Interferons, Biological Activities and Clinical Efficacy, Springer-Verlag, 1997, p 267-281
33. Bouroncle B.A. The history of hairy cell leukemia. Characteristics of long term survivors. Semin Oncol 1984, 11, p479-485
34. Quesada J.R., Reuben J., Manning J.T. et al. Alpha-interferon for induction of remission in hairy cell leukemia. N Engl J Med 1984, 310, p15
35. М.А.Волкова, С.В.Лепков. Лечение волосатоклеточного лейкоза. Гематология и трансфузиология 1997, 3, стр. 15-20
36. Lepcov S.V., Volkova M.A. Interferon- α in the treatment of hairy cell leukemia variant. Haematologica 1999, 84, EHA-4 abstract book, # O-0676
37. Golomb H.M., Jacobs A., Fever A. et al Alpha-2 interferon therapy of hairy cell leukemia: a multicenter study of 64 patients. J Clin Oncol 1986, 4, p 900
38. Porzolt F., Janik R., Heil G. Et al. Deficient of IFN- α production in hairy cell leukemia. Blut 1986, 52, p 185-190
39. Aderka D., Levo Y., Ramot B. Et al Reduced production of tumor necrosis factor by mononuclear cells in hairy cell leukemia patients and improvement following interferon therapy. Cancer 1987, 60, p 2208-2212
40. Schwarzmeier J.D., Shehata M.M., Hubmann R. et al. Reconstitution of endogenous IFN- α through downregulation of TGF- β expression by recombinant IFN- α in hairy cell leukemia. Blood 2000, 96, p698a
41. Nowell P.C., Hungerford D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 1960, 132, p 1497
42. Rowley J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa binding. Nature 1973, 243, p 290
43. Afar D.E., Goga A., Cohen L et al Genetic approaches to defining signaling by the CML-associated tyrosine kinase BCR-ABL. Cold Spring Harbor Quant Biol 1994, 59, p 589

44. Afar D.E., Goga A., McLaughlin J. et al Signaling by ABL oncogenes through cyclin D1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92, p9540
45. Lotem J., Sachs L. Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. *Leukemia* 1996, 87, p2450
46. Kantarjian H., O'Brien S., Anderlini P. et al Treatment of chronic myelogenous leukemia: current status and investigational options. *Blood* 1996, 87, p3069
47. Hehlmann R., Heimpel H., Hasford J. et al Randomized comparison of interferon- α with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994, 84, p4064
48. Italian Cooperative Study Group on chronic myeloid leukemia: Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1994, 330, p820
49. Kantarjian H., Smith T., O'Brien S. et al Prolonged survival following achievement of cytogenetic response with alpha interferon therapy in chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med* 1995, 122, p254
50. Selected Proceedings of the First European School of Haematology Course on Chronic Myelogenous Leukemia. *Biother Update* 1997, 1, p1-16
51. Allan N., Richards S., Shepherd P. et al UK Medical Research Council randomized multicenter trial of interferon- α 1 for chronic myeloid leukemia: improved survival irrespective of cytogenetic response. *Lancet* 1995, 345, p1392
52. Bhatia R., McCarthy J.B., Verfaillie C.M. Interferon- α restores normal b1-integrin mediated negative regulation of chronic myelogenous leukemia progenitor proliferation. *Blood* 1996, 87, p3883
53. Castro F.A., Palma P.B., Morais F.R. et al Immunological correlations of therapeutic effect of alpha-IFN on chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2000, 96, p253b, abstr 4823
54. Reuben J., Lee B.-N., Gao H., et al T-cell specific immunity in chronic myelogenous leukemia: restoration in complete cytogenetic remission with interferon- α . *Blood* 2000, 96, p 737a, abstr 3185
55. Paquette R.L., Hsu N., Said J. et al Response of CML to interferon- α may be related to dendritic cell differentiation. *Blood* 2000, 96, p738a, abstr 3191
56. Kantarjian H., Sawyers C., Hochhaus A. et al Phase II study of STI 571, a tyrosine kinase inhibitor, in patients with resistant or refractory Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000, 96, p 470a, abstr 2022
57. Barteneva N., Kantarjian H., Somasundaram B. et al Interferon- α augments the apoptotic effect of STI571 in Philadelphia crisis cell lines by inducing trail and FAS(CD95/APO1) *Blood* 2000, 96, p345a, abstr 1489
58. Giles F.J., Singer C.R., Gray A.G. et al Alpha interferon therapy for essential thrombocythemia. *Lancet* 1988, 2, p70-72
59. Wehmeier A., Meierkord F., Schneider W. Long-term therapy with interferon alpha in patients with essential thrombocythemia. *Blood* 1994, 84, suppl 1, p58a
60. Taylor P.C., Dolan G., Ng J.-P. et al Efficacy of recombinant interferon- α in polycythemia vera: a study of 17 patients and an analysis of published data. *Br J Haematol* 1996, 92, p55-59
61. Silver R.T., Pahuja M., Klein J. Long term effects of the treatment of polycythemia vera with recombinant interferon alpha. *Blood* 2000, 96, p 741a, abstr 3205
62. Lengfelder E., Berger U., Hehlmann R. Interferon alpha in the treatment of polycythemia vera. *Ann Hematol* 2000, 79, p103-109
63. Ludwig H., Cohen A.M., Polliack A. et al Interferon- α for induction and maintenance in multiple myeloma: results of two multicenter randomized trials and summary of other studies. *Ann Oncol* 1995, 6, p467-476
64. The Myeloma Trialists' Collaborative Group. *Br J Haematol* 2001, 113, p1020-1034
65. Blade J., Esteve J. Viewpoint on the impact of interferon in the treatment of multiple myeloma: benefit for a small proportion of patients. *Med Oncol* 2000, 17, p77-84
66. Yanase M., Ohshima K., Mitzuguchi J. Cytochrome c release, mitochondrial membrane depolarization, caspase-3 activation, and Bax- α cleavage during IFN- α -induced apoptosis in Daudi B lymphoma cells. *J Interferon Cytokine Res* 2000, 20, p1121-1129
67. Wagstaff J., Loynds P., Crowther D. et al A phase II study of human recombinant alpha-2-interferon in patients with low grade non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986, 18, 54-58
68. Coiffier B., Berger F., and Giles F. Follicular lymphomas: morphology, prognostic factors and treatment. In: *Interferons, Biological Activities and Clinical Efficacy*, Springer-Verlag, 1997, pp 84-114
69. Price C.G.A., Rochatiner A.Z.S., Steward W. et al Interferon alpha-2b in addition to clorambucil in the treatment of follicular lymphoma: preliminary results of randomized trial in progress. *Eur J Cancer* 1991, 27, suppl 4, pp S34-S36
70. Peterson B.A., Petroni G., Oken M.M. et al Cyclophosphamide versus cyclophosphamide plus interferon alpha-2b in follicular low grade lymphomas: a preliminary report of an intergroup trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1993, 12, p366, abstr 1240
71. Hagebeek A., Carde P., Somers R. et al on behalf of the EORTC Lymphoma Cooperative Group. Maintenance of remission with human recombinant alpha-2a interferon in patients with stages III and IV low grade malignant non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1992, 80, suppl 1, p74a, abstr 288
72. McLaughlin P., Cabanillas F., Hagemester F.B. et al Chop-Bleo plus interferon for stage IV low grade lymphoma. *Ann Oncol* 1993, 4, pp 205-211
73. Smalley R.V., Andersen J.W., Hawkins M.J. et al Interferon alpha combined with cytotoxic chemotherapy for patients with non-Hodgkin's lymphoma *N Engl J Med* 1992, 327, pp 1336-1341
74. Solal -Celigny P., Lepage E., Brousse N et al Recombinant interferon alpha-2b combined with doxorubicin -containing regimen in advanced follicular lymphoma patients. *N Engl J Med* 1993, 329, 1608-1614
75. Aviles A., Cleto S., Huerto-Guzman J., Neri N. Interferon alpha 2b as maintenance therapy in poor risk diffuse large B-cell Lymphoma in complete remission after intensive CHOP-Bleo regimens. *Eur J Haematol* 2001, 66, pp 94-99
76. Giles F.J., Shan J., Advani S.H. et al A prospective randomized study of CHOP plus alpha-2b interferon in patients with intermediate and high grade non-Hodgkin's Lymphoma: the International Oncology Study Group NHL1 Study. *Leuk Lymphoma* 2000, 40, pp 95-103
77. Dummer E. Cutaneous lymphomas: a heterogeneous group of lymphoproliferative disorders at least in part sensitive to interferon treatment. In: *Interferons, Biological Activities and Clinical Efficacy*, Springer-Verlag, 1997, pp 147-164.
78. Talpaz M., O'Brien S., Rose E. et al Updated phase I study of polyethylene glycol formulation of interferon alpha-2b in Philadelphia chromosome - positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2000, 96, p736a, abstr 3183
79. Chiusolo P., Sica S., Laurenti L. et al Fatal bone marrow aplasia during interferon- α treatment in chronic myelogenous leukemia. *Haematologica* 2000, 85, p 212

Экстракорпоральная фотохимиотерапия в лечении Т-клеточных злокачественных лимфом кожи

А.В. Кильдюшевский, В.А. Молочков, И.В. Гостева
Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф.Владимирского (МОНИКИ). Москва

Т-клеточная злокачественная лимфома кожи (ТЗЛК) - низкодифференцированная, не-Ходжкинская лимфома, характеризующаяся злокачественной пролиферацией Т-хелперных лимфоцитов, инфильтрирующих кожу [25].

Этиология злокачественных лимфом кожи (ЗЛК), как и других опухолей остается не ясной. В литературе обсуждается роль генетических и инфекционных факторов, влияние окружающей среды. В качестве хронического стимулирующего агента, вызывающего развитие опухолевого процесса при определенном состоянии иммунной системы, может выступать вирус [19, 29, 49].

Анализ данных литературы последних лет свидетельствует о многообразии клинических проявлений ЗЛК, которые отличаются по локализации, распространенности, степени злокачественности и длительности течения, что сочетается с вариабельностью их фенотипа и гистологической картиной [31, 47].

При этом выделяют ЗЛК с преимущественной пролиферацией Т-лимфоцитов (ТЗЛК), в частности, Т-хелперов (грибовидный микоз (ГМ), синдром Сезари) и с преимущественной пролиферацией В-лимфоцитов (первичный ретикулез кожи, ретикулосаркоматоз кожи Готторна).

Распространение злокачественных клеток в лимфатические узлы, периферическую кровь и висцеральные органы может приводить в последствии к опухолевым образованиям. Наличие эритродермии совместно с лимфаденопатией и циркуляцией злокачественных клеток характеризуется как синдром Сезари [39].

Как правило, различные формы и стадии ТЗЛК имеют характерные изменения в очагах поражения. Больные с инфильтративно-бляшечной формой заболевания имеют относительно благоприятное течение процесса, а опухолевая или эритродермическая стадия характеризуется низкой медианой выживаяния, в пределах 30-50 месяцев [21]. Общая черта ТЗЛК - наличие экспансии доминантного Т-клеточного клона в коже.

На ранних этапах заболевания иммунологические показатели, как правило, не имеют существенных отклонений. На более поздних этапах иммунные нарушения становятся более очевидными [45]. Характерные изменения заключаются в уменьшении клеточной цитотоксичности (NK-клеток и лимфокин активированных киллеров (LAK)), снижении ответа Т-лимфоцитов на антигенные раздражители и митогены, эозинофилию и увеличение уровней IgE и IgA.

Существенный интерес связан с ролью злокачественного клона Т-клеточной популяции в патогенезе этих иммунных нарушений. Множество групп исследователей независимо пришли к выводу, что злокачественная популяция Т-клеток функционально является Т-хелперной [6].

Haynes et al. (1981) установили, что клетки Сезари экспрессируют на поверхности фенотипический признак Т-хелперного лимфоцита - CD4⁺ мембранный антиген [15]. Поскольку Т-хелперные лимфоциты высвобождают множество растворимых факторов, в основном лимфокинов, это послужило предположением, что хелперная функция клеток Сезари обусловлена производством этих факторов. Впоследствии подтвердилось, что моноклеарные клетки периферической крови больных ТЗЛК характеризуются изменением в секреции лимфокинов, которые и обуславливают многие иммунные нарушения, происходящие в процессе этого заболевания [10]. Vowels et al. (1994), используя моноклеарные клетки периферической крови больных с синдромом Сезари, показали, что они продуцируют повышенное количество цитокинов, характерных для 2 типа Т-хелперных клеток (Th2), в частности интерлейкина-4 (ИЛ-4), при значительном дефиците продукции цитокинов, характерных для 1 типа Т-хелперных клеток (Th1) - интерлейкина-2 (ИЛ-2), гамма интерферона (ИФН-γ) и фактор некроза опухоли альфа (ФНО-α) [46]. Отмечены убедительные корреляционные ассоциации между количеством атипичных клеток и концентрацией произведенного ИЛ-4. Кроме того, было обнаружено, что у больных ТЗЛК с эозинофилией в периферической крови, моноклеарные клетки продуцировали повышенное количество интерлейкина-5 (ИЛ-5) [14]. В биоптатах кожи также часто обнаруживаются ИЛ-4 или ИЛ-5 [46].

Результаты повышенной экспрессии ИЛ-4 и ИЛ-5 в коже и крови больных с ТЗЛК говорят о том, что злокачественным клоном этой лимфоидной опухоли является Th2 хелперная клетка [38, 43]. В настоящее время известно, что Th2 клетки в основном производят ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и ответственны за гуморальный иммунитет [28]. В связи с тем, что Th2 цитокины могут снижать Th1 цитотоксическую экспрессию, увеличенное производство Th2 цитокинов злокачественной Т-клеточной популяцией может, по крайней мере, частично объяснять сниженное содержание ИФН-γ и ИЛ-2, наблюдаемое на поздних стадиях заболевания [30]. Сниженное количество нормальных циркулирующих хелперных Т-клеток из-за экспансии

злокачественной клональной популяции может также играть существенную роль в дефиците Th1 цитокинового производства [17].

Важное значение в патогенезе ТЗЛК имеет функциональное состояние естественных киллерных Т-лимфоцитов (NK-клеток). Активизированные NK-клетки осуществляют секрецию нескольких цитокинов, преимущественно ИФН- γ , который оказывает непосредственное противоопухолевое действие [8]. Исследования Chan S.H. et al. (1991) показали, что мощным индуктором выработки ИФН- γ является интерлейкин-12 (ИЛ-12), [8]. ИЛ-12 усиливает также пролиферацию и повышает функцию цитотоксических Т-лимфоцитов, которые становятся более активными по отношению к патологическому клону Th2 хелперов [23, 27]. Исследования Rook et al. (1995) подтвердили, что моноклеарные клетки больных синдромом Сезари недостаточно продуцируют ИЛ-12 в ответ на разнообразные антигенные стимулы [35].

Поскольку ИЛ-12 стимулирует секрецию ИФН- γ , его дефицит может иметь важное значение в дефиците производства ИФН- γ на ранних стадиях заболевания. При добавлении рекомбинантного ИЛ-12 *in vitro* к культуре моноклеарных клеток периферической крови от больных с синдромом Сезари, происходит стимуляция выработки ИФН- γ , которая может быть увеличена до нормального уровня [50]. Кроме того, ИЛ-12 обладает подавляющим эффектом на избыток ИЛ-4, усиливая, таким образом, ингибирующее действие ИФН- γ [50]. Предварительные исследования указывают также на то, что ИЛ-12 подавляет рост злокачественных CD4⁺ Т клеток *in vitro* [36]. Таким образом, ИЛ-12, обладает способностью *in vitro* модулировать, по крайней мере, частично, некоторое расстройство цитокинового взаимодействия при ТЗЛК и подавлять рост злокачественного клона. Несмотря на то, что ИЛ-12 один или вместе с другими активными биологическими средствами дают положительный клинический эффект в опытах над животными, тем не менее широкого клинического применения этот препарат пока не получил. В настоящее время проводятся только I и II фаза клинических испытаний над рекомбинантным ИЛ-12, вводимым подкожно для лечения ТЗЛК [36].

ИЛ-2, в качестве лечебного средства применяется с целью уменьшить выработку ИЛ-4 и снизить пролиферативный рост злокачественных CD4⁺ [26]. Однако из-за выраженного токсического эффекта этот препарат применяется редко.

В последние годы получила широкое признание идея активного лечения ТЗЛК с применением современных химиотерапевтических препаратов в качестве моно- или полихимиотерапии, альфа интерферона, электроимпульсной терапии на всю поверхность кожи, ПУВА-терапии, или сочетания этих методов. Тем не менее, резистентность к проводимой терапии, возникающая при тяжелом, прогрессирующем течении заболевания, осложнения, связанные с длительным применением агрессивных химиопрепаратов, а также низкая медиана выживания, в пределах 30 месяцев, делают чрезвычайно актуальной разработку новых подходов к лечению ТЗЛК [7, 24, 42, 50].

Большой интерес во всем мире вызывает применение различных модификаторов биологических реакций (ре-

комбинантные цитокины, ретиноиды и др.). В этой связи мы сосредоточили свое изучение на особенностях иммунных модификаций под воздействием нового модулятора биологических реакций - экстракорпоральной фотохимиотерапии (ЭФХТ). Этот метод был предложен Edelson et al. (1987, 1989) в качестве высокоэффективного способа лечения больных ТЗЛК. Авторы показали, что ЭФХТ или фотоферез (ФФ) был особенно эффективен у больных с эритродермической стадией ТЗЛК [11]. По данным авторов у 27 из 37 резистентных больных ТЗЛК был получен выраженный клинический эффект. Медиана выживания составила 60.3 месяца [12].

Фотоферез - это новая форма лечения, основанная на аферезной иммуно-модуляторной терапии, представляющая собой вариант ПУВА-терапии, в котором обогащенная лейкоцитами периферическая кровь подвергается ультрафиолетовому облучению (УФО) в экстракорпоральном контуре, чтобы фотоиницировать метоксален. В настоящее время этот метод лечения применяется примерно в 80 крупнейших медицинских центрах мира.

В нашем учреждении ФФ как метод монотерапии или в сочетании с другими модификаторами биологических реакций применяется в течение последних 10 лет и является стандартной терапией для лечения кожной Т-клеточной лимфомы и синдрома Сезари. Целью этого лечения является воздействие на циркулирующие патологические лимфоциты и на нормальные моноклеарные клетки крови.

Материал и методы

Под нашим наблюдением находилось 37 больных различными стадиями и формами ГМ, лечение которых включало в себя ФФ. Наибольшее количество больных (около 70%) находилось в возрасте от 50 до 70 лет. Наличие 12% пациентов в возрасте до 40 лет свидетельствовало об «омоложении» этого тяжелого процесса. Женщин было 12 человек, мужчин в 2 раза больше - 25.

Среди наблюдаемых пациентов четверо имели инвалидность II группы. Длительность заболевания была различной и варьировала от нескольких месяцев до нескольких лет. Наибольшую группу - 25 человек (67,5%) составили больные с давностью заболевания от 1 до 5 лет.

Распределение больных по клинико-морфологической картине проводилось по классификации Каламкаряна А.А. (1983).

Как видно из представленной таблицы 1, в эритематозно-эритродермической стадии классической формы ГМ находилось 9 человек. У больных на участках кожного покрова наблюдали эритематозные шелушащиеся пятна, иногда даже с явлениями везикуляции (у 2-х больных), в 80% случаев процесс носил распространенный характер с увеличением региональных лимфоузлов. Больные характеризовались отсутствием положительной динамики от гормональной и химиотерапии.

Больных в инфильтративно-бляшечной стадии классической формы ГМ было 11 человек. Они характеризовались наличием бляшек, размером от крупной монеты до ладони взрослого человека застойно-красного цвета, с отсутствием роста волос, чешуйкокорками, лихенификацией на поверхности.

Таблица 1. Распределение больных по клиническим формам и стадиям грибовидного микоза

Форма заболевания	Количество больных	%
Классическая форма	31	83,8
а) эритематозно-эритродермическая стадия	9	24,3
б) инфильтративно-бляшечная стадия	11	29,7
в) опухолевая стадия	11	29,7
Эритродермическая форма	5	13,5
Синдром Сезари	1	2,7
Всего	37	100,0

В опухолевой стадии ГМ наблюдалось также 11 человек. На месте бляшек и на пораженной коже отмечали появление опухолей размером от вишни до кулака взрослого человека, плотно-эластической консистенции, плоской или шаровидной формы, фиолетовой окраски, в 60% случаев с некрозом или изъязвлениями в центре опухоли.

У 4 больных эритродермической формой Аллопо-Бенне наряду с эритродермией отмечалась выраженная инфильтрация кожи, лимфаденопатия, интенсивный зуд, аллопеция, опиходистрофия, гиперкератоз ладоней и подошв, гиперпигментация кожи.

Синдром Сезари мы рассматривали как лейкоемический вариант эритродермической формы ГМ. Под нашим наблюдением находился 1 такой больной.

Во всех случаях заболевание характеризовалось хроническим прогрессирующим течением. У 11 пациентов очаги поражения практически не разрешились под воздействием стероидной и ПХТ. Из них 7 человек находилось в опухолевой стадии ГМ, 3 - с эритродермической формой ГМ и 1 - с синдромом Сезари.

При исследовании пунктатов лимфоузлов у всех больных отмечалась неспецифическая гиперплазия. У больного синдромом Сезари в пунктате лимфоузла были обнаружены крупные церибродерные клетки.

Методика экстракорпорального фотофереза

Фотоферез проводили на аппарате «ПРИЗ-2» по ранее описанной методике [11] в собственной модификации [3, 20].

Аппарат снабжен перистальтическим насосом с дискретным изменением скорости прокачки, имеется индикация времени и интенсивности облучения с автоматическим отключением аппарата при завершении процесса облучения. Облучение компонентов крови происходит в специальной кассете, снабженной одноразовой магистралью из инертного акрила. Внутренний просвет, направленной в кассету магистрали, составляет не более 1 мм, что обеспечивает адекватное воздействие УФ-облучения.

За 1,5-2 часа до процедуры больной принимал 8-methoxypsoralen (8-МОР) (0,6 мг/кг oxsoralen ultra). Затем больные подвергались прерывистой процедуре лейкофе-

реза. Во избежание перекрытия спектральных полос излучения УФ света белками плазмы, их удаляли дополнительным центрифугированием. Оставшиеся клетки ресуспендировали в 200,0 мл физиологического раствора NaCl. Таким образом, УФ облучению подвергали приблизительно 250,0 мл обогащенной лейкоцитами крови, состоящей на 70-80% из мононуклеарных клеток. При этом их общее количество составляло в среднем $2,4-3,6 \times 10^9$. Гематокрит находился в пределах от 2 до 5%. Перед реинфузией ее пропускали через стерильную одноразовую акриловую систему с внутренним просветом в 1 мм, и подвергали облучению ультрафиолетовым светом А ($\lambda = 360-420$ нм) в течение 30 мин на аппарате «ПРИЗ-2». Мощность излучения составляла 2 Дж/см². Полная процедура занимает приблизительно 2 часа. Курс лечения состоял из 4-х процедур, проводимых через день. Спустя 3-4 месяца курс лечения при необходимости повторяли. 19 больным ФФ был проведен в качестве монотерапии; 18 - в комплексе с кортикостероидной, цитостатической или ПХТ.

Оценка клинического ответа

Результаты лечения оценивались нами по следующим критериям: клиническая ремиссия, значительное улучшение, улучшение, отсутствие эффекта, ухудшение.

Клиническая ремиссия - полное разрешение очагов поражения, на месте которых оставались гиперпигментированные или депигментированные участки кожи без признаков воспаления, отсутствие зуда, значительное уменьшение в размерах лимфоузлов. **Значительное улучшение** - почти полное разрешение очагов поражения, когда в оставшихся элементах наблюдалась четко выраженная тенденция к их разрешению, значительное уменьшение зуда, уменьшение размеров лимфоузлов. **Улучшение** - очаги поражения бледнели, отмечалось уплощение инфильтративно-бляшечных и опухолевых элементов, уменьшался зуд кожи. **Ухудшение** - диссеминация процесса, дальнейший рост элементов, усиление зуда, дальнейшее увеличение лимфоузлов.

При оценке эффективности лечения учитывали также общее состояние больных (температура тела, потливость, слабость, утомляемость, клинические и биохимические анализы).

Лабораторные исследования

Всем больным проводились базовые методы исследования, включая общий анализ крови, биохимические показатели крови: определение концентрации печеночных ферментов, уровень общего белка и белковых фракций, креатинин, холестерин, триглицериды, электролитный состав и факторы свертывания крови. Эти исследования проводились перед каждым циклом ФФ.

Поверхностные антигены дифференцировки лимфоцитов крови (CD3, CD4, CD8, CD95 и CD16) исследовали на проточном цитофлюориметре-сортере FACScan. Оцен-

ку субпопуляций лимфоцитов проводили до и после каждого цикла ФФ.

Результаты

Проведенный анализ показал, что у 31-го больного ГМ в результате ФФ был получен положительный терапевтический эффект различной степени выраженности. При этом в 13 случаях (35,1%) наблюдалась клиническая ремиссия, в 7 (18,9%) - значительное улучшение и в 11 (29,9%) улучшение состояния больных. Оценка клинической эффективности ФФ у больных ГМ в зависимости от формы и стадии заболевания представлена в табл. 2 и рис. 1.

Таблица 2. Оценка клинической эффективности экстракорпоральной фотохимиотерапии у больных грибовидным микозом в зависимости от формы и стадии заболевания

Клиническая форма (стадия)	Количество больных	Терапевтическая эффективность				
		Ремиссия	Значительное улучшение	Улучшение	Без улучшения	Ухудшение
Эритематозно-эритродермическая	9	6	2	1	-	-
Инфильтративно-бляшечная	11	2	2	5	2	-
Опухолевая	11	1	2	4	4	-
Эритродермическая форма	5	4	1	-	-	-
Синдром Сезари	1	-	-	1	-	-
Всего	37	13	7	11	6	-

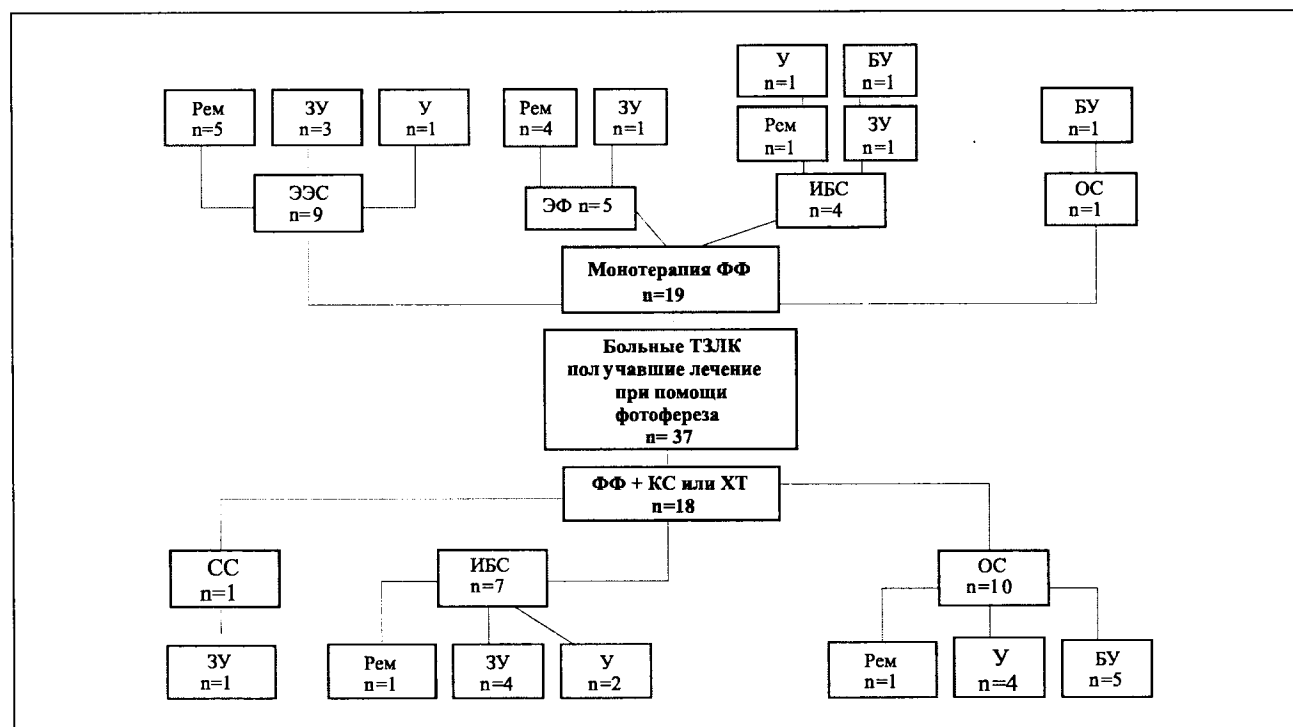


Рис. 1. Эффективность ФФ у больных различными формами и стадиями ГМ, проводимого в качестве монотерапии и в сочетании с кортикостероидной или химиотерапией.

Условные обозначения: КС - кортикостероиды, ХТ - химиотерапия, ЭЭС - эритематозно-эритродермическая стадия, ЭФ - эритематозная форма, ИБС - инфильтративно-бляшечная стадия, ОС - опухолевая стадия, СС - синдром Сезари, Рем - ремиссия, ЗУ - значительное улучшение, У - улучшение, БУ - без улучшения.

Наибольший эффект ФФ проявился у больных эритродермической формой и в эритематозно-эритродермической стадии классической формы ГМ. Первые признаки регресса (снижение интенсивности зуда, уменьшение гиперемии и шелушения) отмечались уже после 1-го сеанса ФФ, а полное разрешение эритродермии наступало через 3-4 недели после окончания 2-го курса лечения. Лимфаденопатия уменьшалась в течение 4-6 недель после окончания лечения.

Менее эффективным клиническим действием ФФ обладал у больных инфильтративно-бляшечной и опухолевой стадией заболевания.

Так, у больных инфильтративно-бляшечной стадией ГМ первые явления регресса патологического процесса (уменьшение зуда, уплотнение и побледнение бляшек) отмечались после 1-го курса ФФ, после 2-го - дальнейший регресс наблюдался у 4 больных (в течение 3-4 недель). Остальным 5 пациентам в связи с недостаточной эффективностью были назначены кортикостероидные препараты в дозе 30-40 мг преднизолона, а двум - в сочетании с проспирином.

При неэффективности ФФ у больных опухолевой стадией, был назначен курс ПХТ, включавший в себя проспиридин, циклофосфан и винкристин. Эффект от комплексной терапии, включавшей в себя ФФ и ПХТ, был отмечен у больного синдромом Сезари. Улучшение процесса выражалось в полном разрешении эритродермии и уменьшении количества клеток Сезари. Ремиссия наблюдалась более 1-го года.

Отдаленные результаты

Сроки развития рецидивов у больных ГМ в зависимости от формы и стадии заболевания представлены в таблице 3.

У 13 больных рецидивы наблюдались в сроки от 1 года до 3 лет после проведения лечения, еще у 13 - от 6 месяцев до 1 года, у 6 - от 3 до 6 месяцев, у 2 больных рецидив имел место спустя 3-3,5 года после окончания курса терапии и лишь у 3 больных рецидив возник спустя 3 месяца после выписки. Эти пациенты имели опухолевую стадию заболевания, получали комплексную терапию и закончили лечение без существенного улучшения.

Таким образом, анализ отдаленных результатов показал, что наиболее продолжительная ремиссия наблюдалась у больных эритематозно-эритродермической стадией и эритродермической формой ГМ.

В течение всего времени активного наблюдения был зафиксирован только 1 случай перехода инфильтративно-бляшечной стадии в опухолевую. Необходимо отметить также, что темп возникновения новых высыпаний при рецидивировании был значительно медленнее, чем у этих же больных до лечения.

В течение 5 лет наблюдения летальный исход зафиксирован у 4 больных, причем все находились в опухолевой стадии. У 2-х больных летальный исход наступил через 2 года после лечения в результате сепсиса, у 1-го - смерть наступила через 4 месяца также вследствие сепсиса и еще 1 больная погибла после трехлетней ремиссии вследствие астматического статуса.

По результатам наблюдения за больными в отдаленном периоде следует, что рецидивы возникали не только в более поздние сроки, но и протекали более благоприятно. Это выражалось в более полноценном ответе на проводимую терапию. Как известно, курсы стероидной терапии и ПХТ при каждом последующем рецидиве дают все меньший клинический эффект. У больных, получавших ФФ, последующие курсы банальной терапии были достаточно эффективны, более того, примерно в 50% случаев лечения рецидивов использовались редуцированные курсы ПХТ.

Обсуждение

Обнадешивающие результаты ФФ были достигнуты при лечении различных иммунопатологических заболеваний, включая аутоиммунные процессы [1, 2, 32, 33, 34] и реакции отторжения трансплантированных органов [9, 40, 37, 48]. Фотоферез был эффективен у 21 из 31 больного (68%) с прогрессирующей системной склеродермией [33]. Улучшение заключалось в существенном смягчении кожи, которое продолжалось на протяжении 10 месяцев. Кроме того, экспериментальные исследования ФФ в лечении вульгарной пузырчатки [34] и системной красной волчанки [22] указывают на высокую потенциальную роль этой терапии в случаях резистентности к иммуносупрессивным лекарственным препаратам.

Таблица 3. Отдаленные результаты фотофереза у больных различными формами и стадиями грибовидного микоза

Клиническая форма (стадия)	Кол-во больных	Сроки развития рецидивов				
		до 3 мес	3-6 мес	6-12 мес	1-3 года	3-5 лет
Эритематозно-эритродермическая стадия	9	-	-	4	4	1
Инфильтративно-бляшечная стадия	11	-	2	3	6	-
Опухолевая стадия	11	3	4	3	1	-
Эритродермическая форма	5	-	-	2	2	1
Синдром Сезари	1	-	-	1	-	-
Всего	37	3	6	13	13	2

Поскольку ФФ оказал выраженный эффект в купировании симптомов острого отторжения трансплантируемых органов, он все чаще используется в качестве альтернативы к применению иммуносупрессивных препаратов. В процессе рандомизированного исследования, включавшего 16 больных, Costanzo-Nordin et al. (1996) показали, что фотоферез был, по крайней мере, столь же эффективен, как и стероидная пульс-терапия для купирования острого отторжения пересаженного сердца [9]. Подобные результаты были получены после лечения легочного [40] и почечного трансплантационного отторжения [48]. Характерно, что во время этой процедуры, авторы отмечали отсутствие серьезных побочных эффектов. Кроме аутоиммунных заболеваний и отторжений аллотрансплантатов, ФФ является наиболее эффективным методом лечения Т-клеточных лимфом кожи [5, 16, 18].

В нашем исследовании было установлено, что ФФ более эффективен у больных эритродермической формой лимфомы кожи (у 98%) и в эритематозно-эритродермической стадии классической формы (88,8%). Положительное действие коррелировало с нормализацией иммунорегуляторного индекса (Т-хелперы/Т-супрессоры) и количеством естественных киллеров в периферической крови. Отдаленные результаты (до 5 лет) свидетельствовали об увеличении продолжительности межрецидивного периода в 1,5-2,0 раза. Химиотерапия по нашим и литературным данным не давала подобного эффекта.

Эффективность применения ФФ у больных опухолевой стадией заболевания по данным литературы носит противоречивый характер [16, 51]. По нашим данным эффективность фотофереза в этой стадии наименее выражена. Возможно, что этот метод лечения более целесообразно применять после уменьшения массы опухоли в результате использования других терапевтических средств, а ФФ назначать впоследствии в качестве модуляции остаточных атипичных лимфоцитов. В данном случае ФФ можно рассматривать как метод иммуноадаъювантной терапии.

ФФ практически не обладает побочным действием и не дает серьезных осложнений. Иногда больные жаловались на кратковременные эпизоды тошноты после приема оксоралена, в некоторых случаях отмечалась транзиторная гипотензия, вызванная эксфузией крови. Депрессии костномозгового кроветворения или возникновения инфекционных осложнений в результате применения ФФ мы и другие авторы не наблюдали.

В исследовании Gottlieb S.L. et al. (1996) при использовании ФФ в качестве монотерапии у больных ТЗЛК удовлетворительный эффект продолжительностью более 6 месяцев составлял 71% из них у 25% была отмечена полная клинико-диагностическая ремиссия, а у 46% был достигнут частичный ответ. Авторы отмечают, что применение только альфа-интерферона давало 45-74% улучшения. Комбинация его с ретиноидами - около 69% улучшения [13]. Эти же авторы утверждают, что лечение мало эффективно при отсутствии в периферической крови клеток Сезари. На основании этого они пришли к заключению, что отсутствие клеток Сезари является относительным противопоказанием к применению ФФ [13]. По нашим наблюдениям из 37 обследованных больных только у од-

ного были выявлены эти клетки, тем не менее, клиническая эффективность лечения была достаточно высокой независимо от их присутствия.

В настоящее время механизм действия ФФ окончательно не определен. Считается, что УФ облучение лимфоцитов активизирует молекулу псоралена, в результате чего происходит «сшивание» тимидиновых оснований двойной спирали молекулы ДНК и прекращается ее репликация [41]. Это приводит к остановке пролиферации патологического клона лимфоцитов. Однако все больше и больше появляются данных, свидетельствующих о том, что ФФ может действовать как иммуномодулятор, приводящий к активации системных противоопухолевых ответов.

Нами было установлено, что ФФ приводит к восстановлению цитотоксической активности природных киллеров. Известно, что НК клетки обладают важными эффекторными механизмами в иммунных реакциях, главными из которых являются секреция иммунорегуляторных цитокинов, необходимых для активации Th1 хелперных клеток, таких как ИФН- γ , ФНО- α , и естественная цитотоксичность. Очевидно, что ФФ стимулирует цитолитический эффект НК-клеток и Т-супрессорных лимфоцитов, который направлен, в первую очередь, на лизис неопластических клеток. Кроме того, активизируется системный противоопухолевый ответ за счет секреции мононуклеарными клетками ФНО- α и ИЛ-12, которые играют важную иммунорегуляторную роль [44]. ИЛ-12 опосредованно стимулирует ответ цитотоксических Т-лимфоцитов, а ФНО- α оказывает непосредственное противоопухолевое действие [35, 44].

В дополнение к этому, ФФ стимулирует также синтез других лимфокинов, включая ИЛ-1 и ИЛ-6. Поскольку все они являются моноцит-зависимыми цитокинами, возможно, что ФФ может неспецифически активизировать периферические моноциты крови или макрофаги, чем, и обусловлено повышение концентрации этих цитокинов.

Многие авторы проводят сочетанное лечение ТЗЛК с применением ФФ и ИФН- α . Считается, что ИФН- α может усиливать действие ФФ за счет стимуляции синтеза ИФН- γ и клеточной цитотоксичности [13, 42].

Нами было установлено, что лимфокумулятивные нарушения у больных ТЗЛК преобладают над лимфопролиферативными. Можно предположить, что эпидермис является в некотором роде «убежищем» от апоптотических сигналов или же опухолевые клетки обладают невосприимчивостью к апоптозу в связи с нарушением освобождения ферментов, опосредующих апоптоз.

Результаты наших исследований свидетельствовали, что практически у всех больных было снижено количество CD95 позитивных клеток, а уже сразу после курса ФФ их количество возрастало в 3-4 раза. Такую же закономерность мы впервые отметили у больных хроническим лимфолейкозом и множественной миеломой [1, 2, 20]. Активизированные цитолитические Т-лимфоциты и НК клетки индуцируют апоптоз двумя различными путями. Первый путь реализуется через экзоцитоз гранул с последующей секрецией перфорины и серин-эстераз (гранзимов) к целевой клетке. Этот путь играет центральную роль в CD8⁺ Т клеточной литической функции. Предполагается, что лимфоцит гранул-опосредованная цитотоксич-

ность предназначена для защиты хозяина от вторжения опухолевых клеток и патогенных микроорганизмов. Вторым путем требует прямой эффекторной клеточно - целевой передачи сигналов через FAS/FAS-лигандное взаимодействие.

Принимая во внимание, что апоптоз направлен в первую очередь на элиминацию клоновой экспансии, можно предположить, что таким образом реализуется механизм противоопухолевого действия ФФ, усиливающийся под действием апоптогенных химиопрепаратов [1].

Анализ нашего опыта проведения ФФ в течение 10-летнего периода свидетельствует о том, что эта терапия эффективна для лечения ТЗЛК, и может явиться альтернативой к существующим методам лечения. В связи с более длительным периодом ремиссии и увеличением продолжительности жизни в отдаленном периоде, а также минимальным побочным действием, ФФ должен рассматриваться как метод выбора для больных ТЗЛК и синдромом Сезари. При опухолевой стадии заболевания или с недостаточно выраженным клиническим эффектом после 2-3 сеансов ФФ необходимо проводить комбинированный метод лечения в сочетании с гормональной, химиотерапией или с другими модификаторами биологических реакций (ИФН- α , ИЛ-12 и т.п.). Он позволяет в 97,3% случаев добиться положительного клинического эффекта различной степени выраженности и удлинения сроков ремиссии в 1,6-3,0 раза в зависимости от формы и стадии ТЗЛК, снизить темпы прогрессирования процесса и уменьшить летальность.

Литература:

1. Кильдюшевский А.В., Голенков А.К., Луцкая Т.Д., и соавт. Экстракорпоральная фотодинамическая иммуномодуляция при лекарственной устойчивости у больных множественной миеломой. Альманах клинической медицины. Том II, Москва, 1999, 245-253
2. Кильдюшевский А.В., Голенков А.К., Луцкая Т.Д., и соавт. Экстракорпоральная фотохимиотерапия в комплексном лечении хронического лимфолейкоза. 3-ий Всероссийский съезд гематологов и трансфузиологов. С-Петербург, 1996г. стр. 24.
3. Кильдюшевский А.В., Шабалин В.Н., Голенков А.К., Барышников А.Ю., и соавт. Опыт применения экстракорпоральной фотохимиотерапии при лечении хронического лимфолейкоза. Актуальные вопросы службы крови и трансфузиологии. Тезисы докладов Российской Конференции. С.-Петербург, 1995, стр. 396-397.
4. Agrewala J. N., Suvas S., Verma R. K. and Mishra G.C. Differential Effect of Anti-B7-1 and Anti-M150 Antibodies in Restricting the Delivery of Costimulatory Signals from B Cells and Macrophages. The Journal of Immunology, 1998, 160: 1067-1077.
5. Armus S., Keyes B., Cahill C., et al. Photopheresis for the treatment of cutaneous T cell lymphoma. J Am Acad Dermatol., 1990;23:898-902.
6. Broder S., Edelson R.L., Lutzner M. et al. Tte Sezary syndrome: A malignant proliferation of helper T cells. J Clin. Invest. 1976; 58: 1297-1306.
7. Bunn P.A., Hoffman S.J., Norris D., et al. Systemic therapy of cutaneous T-cell lymphomas (mycosis fungoides and the Sezary syndrome). Ann Intern Med 1994; 121:592-602.
8. Chan S.H., Perussia B., Gupta J.W. et al. Induction of IFN- γ production by NK cell Stimulatory factor (NKSf) Characterization of the responder cells and synergy with other inducers. J. Exp. Med. 1991; 173: 869-879.
9. Costanzo-Nordin M.R., Hubbell E.A., Cysullivan E.J., et al. Photopheresis versus corticosteroids in the therapy of heart transplant rejection. Circulation 1992;86(suppl 2):242-50.
10. Dummer R., Kohl O., Gillessen J et al. Peripheral blood mononuclear cells in non-leukemic cutaneous T-cell lymphoma patients: Reduced proliferation and preferential secretion of a T helper 2 like cytokine pattern upon stimulation. Arch Dermatol. 1993; 129:433-6.
11. Edelson R.L., Berger C., Gasparro F., et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. N Engl J Med. 1987;316: 297-303
12. Edelson R.L., Photopheresis: a new therapeutic concept. Yale J Biol Med 1989;62:565-577.
13. Gottlieb S.L., Wolfe J.T., Fox F.E. et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma with extracorporeal photopheresis monotherapy and in combination with recombinant interferon alfa: A 10-year experience at a single institution. J Am Acad Dermatol 1996;35:946-57.
14. Gottlieb S.L., Fox F.E., Cassin M., et al. Interleukin 5 expression by peripheral blood mononuclear cells in Sezary syndrome correlates with peripheral eosinophilia and is suppressed by interferon alpha. J Invest. Dermatol. 1995; 104:683.
15. Haynes B.F., Bunn P., Mann D., Thomas C. Cell surface differentiation antigens of the malignant T cell in Sezary syndrome and mycosis fungoides. J Clin. Invest. 1981; 67: 523-30
16. Heald P., Rook A., Perez M., et al. Treatment of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma with extracorporeal photochemotherapy. J Am Acad Dermatol 1992;27:427-33.
17. Heald P., Van S.L., Latkowski J. et al. Profound deficiency in normal circulating T-cells in erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma. Arch Dermatol 1994;130:198-203.
18. Heald P.W., Perez M.I., Christensen L., et al. Photopheresis therapy of cutaneous T-cell lymphoma: the Yale-New Haven experience. Yale J Biol Med 1989;62:629-38.
19. Kaplan E.H., Leslie W.T. Cutaneous T-cell lymphomas. Curr-Opin-Onco. 1993; N.5. V.5.-P. 812-818.
20. Kildushevskiy A.V., Golencov A.K., Dudina G.A., Polosuchina E.R. Importance of ultra violet radiation of blood lymphocytes for induction of apoptosis in refractory patients of multiple myeloma 8th International Congress of the

European Medical Laser Association (EMLA). 1-й Российский Конгресс Медицинской Лазерной Ассоциации (ПМЛА). Book of Abstracts. Russia, Moscow, May 23-26, 2001, P.74

21. Kim Y.H., Bishop K., Varghese A., Hoppe R.T. Prognostic factors in erythrodermic mycosis fungoides and the Sezary syndrome. *Arch. Dermatol.* 1995; 131:1003-1008

22. Knobler R.M., Graninger W., Graninger W., et al. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of systemic lupus erythematosus: a pilot study. *Arthritis Rheum* 1992;35:319-24.

23. Koayashi M., Fitz L., Hewick P.M. et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) a cytokine with multiple biologic effects human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1989; 170: 827-846

24. Kuzel T.M., Roenigk H.H. Jr., Samuelson E., et al. Effectiveness of interferon alfa-2a combined with phototherapy for mycosis fungoides and the Sezary syndrome. *J Clin Oncol* 1995;13:257-63.

25. Lutzner M., Edelson R., Schein P. et al. Cutaneous T-cell lymphomas: The Sezary syndrome, micosis fungoides and related disorders. *Ann Int. Med.* 1975; 83:534-52.

26. Marolleau J.P., Baccard M., Flageul B et al. High-dose interleukin 2 in advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Arh. Dermatol.* 1995; 131: 574-579.

27. Mehrotra P.T., Wu D., Crim J.A., Mostowski H.S., Siegal J.P. Effects of IL-12 on the generation of cytotoxic activity in human CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 1993; 151: 2444-2452.

28. Mosmann, T. R., M. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Gieldin, and R. L. Coffman. Two types of murine T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokines activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 1986; 136:2348.

29. Nagatani T., Baba N., Nakajima H. Lymphomas of the skin // *Gan. To. Kagaku. Ryoho.* - 1993. - N.10. - V.20. - P.1308-1313

30. Peleman R., Wu J., Rargeas C., Delespesse G. Recombinant interleukin -4 suppresses the production of interferon gamma by human mononuclear cells. *J Exp Med.* 1989; 170:1751-56.

31. Prinz B., Behrens W., Holze E. et al. Extracorporeal photopheresis for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma - the Dusseldorf and Munich experience. *Arh. Dermatol. Res.* 1995; 287 (7): 621-626.

32. Rook A.H., Cohen J.H., Lessin S.R., et al. Therapeutic applications of photopheresis. *Dermatol Clin* 1993;11:339-47.

33. Rook A.H., Freundlich B., Nahass G., et al. Treatment of systemic sclerosis with extracorporeal photochemotherapy: results of a multicenter trial. *Arch Dermatol* 1992;128: 337-46.

34. Rook A.H., Jegasothy B.V., Heald P, et al. Extracorporeal photochemotherapy for drug-resistant pemphigus vulgaris. *Ann Intern Med* 1990; 112: 303-305.

35. Rook A.H., Kubin M., Cassin M., et al. Interleukin 12 reverses cytokine and immune abnormalities in Sezary syndrome. *J Immunol* 1995; 154:1491-1498.

36. Rook A.H., Gottlieb., Wolfe J.T., Vowels B.R. et al. Pathogenesis of cutaneous T-cell lymphoma: implications for the use of recombinant cytokines and photopheresis. *Clin. Exp. Immunol* 1997; 107 (Suppl. 1): 16-22.

37. Rossetti F., Zulian F., DalFamico R., et al. Extracorporeal photochemotherapy as single therapy for extensive, cutaneous, chronic graft-versus-host disease. *Transplantation* 1995; 59:149-51.

38. Rottevel F.T.M., Kokkelink I., vanLier R.A.W. et al. Clonal analysis of functionally distinct human CD4+ T cell subsets. *J Fxp Med* 1988; 168: 1659-1673.

39. Sezary A., Bouvrain Y., Erythrodermie avec presence de cellules monstreuses dans le derme et dans le sang circulant. *Bull Soc Fr Dermatol. Syphiligr* 1939; 45:254-260.

40. Slovis B.S., Loyd J.E., King L.E. Photopheresis for chronic rejection of lung allografts [letter]. *N Engl J Med* 1995;332:362.

41. Song P.S., Tapley K.J. Photochemistry and photobiology of psoralens. *Photochem Photobiol* 1979;29:1177-1197.

42. Stadler R., One H.G. Combination therapy of cutaneous T cell lymphoma with interferon alpha-2a and photochemotherapy. *Recent Results Cancer Res* 1995;139:392-401.

43. Umetsu D.T., Jabara H.H., DeKruyff R.H. et al. Functional heterogeneity among human inducer T cell clones. *J. Immunol.* 1988; 140:421-426.

44. Vowels B.R., Cassin M. et al Extracorporeal photochemotherapy induces the production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes: implications for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and systemic sclerosis. *J.Inv.Derm* 1992; N.5.-V.98.-P.68

45. Vowels B.R., Cassin M., Vonderheid E. Rook A.H. Aberrant cytokine production by Sezary syndrome patients: Cytokine secretion pattern resembles murine Th 2 cells. *J Invest Dermatol.* 1992, 99: 90-94.

46. Vowels B.R., Lessin S.R., Cassin M. et al. Th2 cytokine expression in skin in cutaneous T-cell lymphoma. *J. Invest. Dermatol.* 1994; 103:669-673.

47. Wieselthier J.S., Koh H.K. Sezary syndrome: diagnosis, prognosis, and critical review of treatment options // *J. Am. Acad. Dermatol.* - 1990. - N.3. - V.22. - P. 381-401.

48. Wolfe J.T., Tomaszewski J., Grossman R., et al. Reversal of acute renal allograft rejection by extracorporeal photopheresis: A case presentation and review of the literature. *J Apheresis* 1996; 11:36-41.

49. Worobec-Victor S.M. Cutaneous T-cell lymphoma // *N.J. Med.* - 1989. - N.5. - V.86. - P.395-400.

50. Zackheim H.S. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Semin Dermatol* 1994; 13:207-15.

51. Zic J., Arzubiaza C., Salhany K.E., et al. Extracorporeal photopheresis for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27: 729-36.

Фотоферез – новый метод лечения вульгарной пузырчатки

А.В. Кильдюшевский, В.А. Молочков, О.В. Карзанов
Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им М.Ф. Владимирского (МОНИКИ). Москва

Акантолитическая пузырчатка - тяжелое, потенциально смертельное заболевание, которое проявляется как в ограниченной, так и в генерализованной формах.

Патогенез вульгарной пузырчатки (ВП) связан с аутоагрессией к антигену десмоглеину-3 - представителю семейства кадгеринов и к нормальному компоненту клеточной мембраны кератиноцитов человека с молекулярным весом 130 кДа [3, 17]. При этом акантолиз является конечным результатом плазмин-индуцированного протеолиза, возникающего в результате связывания антигена с соответствующими антителами на клеточных мембранах кератиноцитов. Протеолиз сопровождается продукцией и освобождением активатора пламиногена и последующим превращением его в плазмин в пределах пораженного эпидермиса [18]. Предрасполагающими факторами развития этого заболевания служат наличие генетических особенностей, связанных с HLA гаплотипами: A10, A26, Bw28, DR4, которые ассоциированы с ВП [17].

Клиническое течение ВП во многом зависит от эффективности ее терапии. В истории ее лечения выделяют 3 этапа: достероидный (до 1962 г), кортикостероидный (с 1962 по 1982 гг) и этап применения кортикостероидов с адъювантами (метотрексатом, азатиоприном, циклофосфаном, препаратами золота, циклоспорином, плазмаферезом и т.д.) [6].

Пузырчатка по степени тяжести делится на:

- легкую, захватывающую небольшие поверхности кожи;
- умеренную, поражающую довольно обширные поверхности кожи и слизистые оболочки;
- тяжелую, при которой наряду с распространенными поражениями кожи и слизистых оболочек имеются сопутствующие заболевания (инфекции, гипопроотеинемия и др.) [6].

Летальный исход при ВП наступает вследствие нарушения сердечной деятельности (инфаркт миокарда, инсульт), развития инфекций, сепсиса, и т.д. [1].

При острой стадии заболевания больным назначают высокие дозы кортикостероидных гормонов, применение которых значительно снизило смертность и увеличило продолжительность ремиссии [6]. В последнее время все чаще описывают случаи резистентности пузырчатки к кортикостероидным гормонам. Кроме того, многие исследователи считают, что осложнения и побочные действия как кортикостероидов, так и кортикостероидов с адъювантами, являются основной причиной смерти больных пузырчаткой.

В связи с отсутствием на сегодняшний день методов лечения ВП, способных не только сохранять жизнь больного, но и обеспечивать возможность поддержания дерматоза в преморбидной стадии, мы обратили внимание на новый экстракорпоральный метод лечения - фотоферез (ФФ), который находит все большее применение при целом ряде аутоиммунных заболеваний, в том числе и в качестве адъювантной терапии ВП [5, 7, 8, 10].

Фотоферез или экстракорпоральная фотохимиотерапия - метод, который с успехом применяется с конца 80-х годов в терапии аутоиммунных и онкологических заболеваний. Его действие основано на сочетании лейкофереза с облучением предварительно сенсibilизированных 8-метоксипсораленом лимфоцитов ультрафиолетовым светом - А (УФА). Действие ФФ на организм до конца не изучено, предполагается, что метоксипсорален при активации ультрафиолетовым излучением ковалентно связывает пиримидиновые основания ДНК и некоторые молекулы клеточной мембраны. Клетки, подвергнутые подобному воздействию, не способны к воспроизводству и элиминируются естественным путем из кровеносного русла в течение 1-2 недель. Так как только от 10 до 15% циркулирующих мононуклеаров подвергаются облучению УФА в процессе одного сеанса фотофереза, механизм его действия определяется не только уменьшением количества лимфоцитов. Предполагается, что реинфузированные клетки стимулируют аутогенный супрессивный ответ на Т-клетках того же клона, не подвергшихся воздействию ФФ [20]. Vowels B.R. et al. (1992) обнаружили увеличение продукции фактора некроза опухоли моноцитами, взятыми от пациентов со склеродермией и Т-клеточной злокачественной лимфомой кожи после ФФ [19]. Кильдюшевский А.В. и Голенков А.К. с соавторами (1995) впервые сообщали об индукции апоптоза у больных хроническим лимфолейкозом и множественной миеломой в результате проведения ФФ [2]. Atinger M. et al. (1997) подтвердили, что в культуре фотоактивированных лимфоцитов, взятых от пациентов со склеродермией усиливаются процессы индуцированного апоптоза [4].

Попытки применения ФФ в комплексной терапии ВП предпринимались на протяжении всего периода его использования в клинической практике. Однако исследования проводились на небольших группах больных, в связи с чем, оценить эффективность этого метода при пузырчатке было трудно. Rook A.H. et al. (1991) применили ФФ четырем больным ВП, получавшим также кортикостероидную и цитостатическую терапию. Клиническое

улучшение было отмечено у всех больных, однако, несмотря на то, что лечение продолжалось несколько месяцев, титр сывороточных антител к антигену межклеточной склеивающей субстанции шиповатого слоя эпидермиса через 6 месяцев снизился только в 1 из 3 случаев [15]. Gollnick H.P.M. et al. (1993) при лечении больного ВП добились выраженного клинического эффекта после нескольких сеансов ФФ, однако эффективность терапии трудно было оценить в связи с тем, что состояние больного начало улучшаться еще на фоне применения азатиоприна и преднизолона [8]. По данным Liang G. et al. (1992) эффект от ФФ у больного, ранее безуспешно лечившегося кортикостероидными гормонами в сочетании с цитостатиками, наступил после 7 курсов, проводившихся с интервалом в 2 недели [10].

Таким образом, оценить эффективность ФФ на основании данных литературы представляется весьма проблематичным, в связи с тем, что все больные получали кортикостероидные и иммуносупрессивные препараты, а клинический ответ у них был отсрочен на несколько месяцев.

Целью настоящей работы явилось изучение эффективности ФФ в комплексной терапии ВП. Эффективность лечения оценивали по динамике клинической картины, иммунологических показателей, результатам реакции прямой иммунофлюоресценции биоптатов клинически не пораженной кожи, а также данным клинических и биохимических анализов крови.

Материал и методы

Группа больных для изучения эффективности ФФ в комплексном лечении ВП включала 43 больных. Диагноз устанавливали на основании клинических, цитологических, гистологических и иммуногистохимических критериев: наличие дряблых пузырей с тонкой покрывкой и серозным содержимым, положительный симптом Никольского, обнаружение акантолитических клеток в мазках отпечатках с поверхности эрозивных элементов, интраэпидермальная локализация пузырей, фиксация иммуноглобулина класса G в межклеточной склеивающей субстанции шиповатого слоя эпидермиса в криостатных срезах клинически непораженной кожи.

Фотоферез был проведен 15 больным: 5 мужчин и 10 женщин в возрасте от 34 до 72 лет (средний возраст 51 год). Длительность заболевания составляла от 2 месяцев до 8 лет (в среднем 1,2 года). Семеро больных с давностью за-

болевания более 2 лет характеризовались торпидно протекающим патологическим процессом, резистентностью к проводимой гормональной и химиотерапии, частыми обострениями. Восемью больным диагноз был установлен впервые; у 1-го из них заболевание прогрессировало, несмотря на применение высоких доз кортикостероидных гормонов (преднизолон по 200 мг/сут.) в сочетании с иммуносупрессивной терапией.

Группа контроля состояла из 28 больных, получавших стандартное лечение кортикостероидными препаратами (преднизолон в максимальной дозе 100 мг/сут.). В их числе 6 мужчин и 22 женщины в возрасте от 28 до 78 лет (средний возраст 56 лет). Давность заболевания варьировала от 1 месяца до 12 лет (в среднем 1,5 года). В этой группе 8 больных с давностью заболевания более 2 лет были устойчивые к проводимому лечению. 12 больных имели впервые установленный диагноз.

Методика фотофереза

За 1,5-2 часа до процедуры больной принимал 8-methoxypsoralen (оксорален - ультра) в дозе 0,6 мг/кг. Затем больные подвергались прерывистой процедуре лейкофереза, в течение которой выделяли приблизительно 200-250 мл обогащенной лейкоцитами крови, содержащей в среднем $2,4-3,6 \times 10^9$ мононуклеарных клеток. Во избежание перекрытия спектральных полос излучения УФ света белками плазмы, ее удаляли дополнительным центрифугированием. Оставшиеся клетки ресуспендировали в 200,0 мл физиологического раствора NaCl. Подготовленная к реинфузии лейковзвесь имела гематокрит от 2 до 5%. Перед реинфузией ее пропускали через стерильную одноразовую акриловую систему с внутренним просветом в 1 мм, и подвергали облучению ультрафиолетовым светом А ($\lambda=360-420$ нм) в течение 30 мин. Мощность излучения составляла 2 Дж/см². Полная процедура требует приблизительно 2 часа. Курс лечения состоял из 4-х процедур, проводимых через день.

Процедуру фотофереза все больные ВП переносили без осложнений и выраженных побочных явлений, лишь у 4 больных отмечено побочное действие оксоралена - ультра в виде быстро проходящей тошноты.

Результаты

Результаты лечения представлены в таблице 1. В среднем на 3-4 день после начала ФФ у всех пациентов (включая и тех, у кого предыдущее лечение было не эффектив-

Таблица 1. Динамика клинических показателей в процессе лечения у больных вульгарной пузырчаткой

Методы лечения	Уменьшение экссудации эрозий (дни)	Отрицательный симптом Никольского (дни)	Полная эпителизация эрозий (дни)
Кортикостероидные гормоны + фотоферез (n=15)	3-4	4-6	7-10
Кортикостероидные гормоны (n=28)	4-7	6-14	10-20

ным) улучшалось общее самочувствие, прекращалась или значительно уменьшалась эксудация эрозивных поверхностей, прекратилось появление свежих высыпаний. В группе контроля подобные явления наблюдались в среднем на 4-7 день после начала лечения.

В сроки от 4 до 6 дней после первого сеанса ФФ у всех больных симптом Никольского был отрицательный. В контрольной группе аналогичный эффект наблюдался только на 6-14 день. Эпителизация эрозий у всех больных, лечившихся с применением ФФ, наступала между 7 и 10 днями. В группе контроля этот показатель находился между 10 и 20 днями.

Реакция прямой иммунофлюоресценции производилась за 1-3 дня до начала ФФ и на 3-4 день после его последнего сеанса (10-12 день от начала), а также через 4-6 месяцев после процедуры (у 5 пациентов). Результаты приведены на рисунке 1.

До проведения процедуры у 2 больных интенсивность свечения IgG в межклеточной склеивающей субстанции (МСС) шиповатого слоя эпидермиса определялась на 3

балла, у 5 на 2 балла и у 8 на 1 балл. На 3-4 день после последнего сеанса - интенсивность свечения IgG в МСС на 3 балла не отмечена ни у одного больного, на 2 балла у одного больного с упорным течением процесса, на 1 балл у 6. У 8 пациентов после лечения определялась следовая реакция IgG в зоне МСС. В группе контроля в сроки от 11 до 14 дней после начала лечения кортикостероидами интенсивность свечения не изменялась.

Исследование иммунного статуса производили за 1-3 дня до процедуры и через 3-4 дня после последнего сеанса. Каких-нибудь характерных для ВП сдвигов в зависимости от давности заболевания, начавшегося обострения, проводимой ранее терапии, отметить не удалось. Наблюдался дисбаланс иммунологических показателей и некоторое снижение супрессорной функции Т-лимфоцитов (таблица 2).

После проведения ФФ в целом отмечалась тенденция к нормализации основных показателей клеточного иммунитета и иммуноглобулинов сыворотки крови. Так, показатели, отражающие экспрессию антигенов CD3, CD4, CD8 у большинства больных приобрели значения, соответствующие норме (рисунок 2).

Если до лечения экспрессия CD3 и CD8 была в пределах нормы только у 5 больных (33%), то после ФФ - у 10 (66%); CD4 у 6 больных (40%), после ФФ - у 10 (66%). В связи с этим, иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8) нормализовался у 13 человек (86%).

На фоне проведения ФФ, также отмечено значительное снижение уровня IgG сыворотки крови. Если до ФФ он был повышен у 13 человек (86%), то после проведения процедуры у 11 человек (73%) отмечался нормальный уровень IgG сыворотки крови.

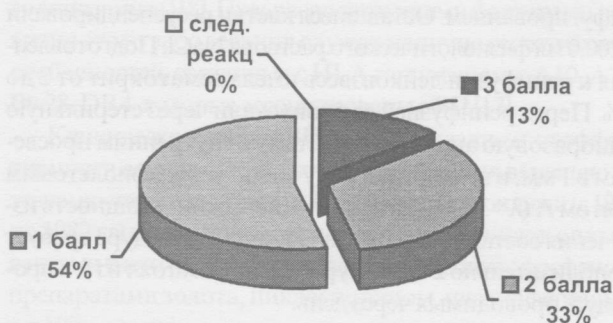
Полученные данные свидетельствуют о том, что у всех больных после проведения курса ФФ было достигнуто заметное улучшение со стороны кожного процесса уже в течение первой недели или в сроки близкие к этому. Такого быстрого и заметного улучшения в группе контроля (при лечении только кортикостероидными гормонами) отмечено не было. Это свидетельствует о высокой клинической эффективности предложенной нами методики ФФ в лечении резистентных к кортикостероидной и цитостатической терапии больных ВП. Фотоферез позволяет купировать обострение кожного процесса, не повышая дозу кортикостероидных и цитостатических препаратов. В связи с этим, представляется целесообразным применение нового экстракорпорального метода в комплексном лечении ВП.

В качестве примера приводим клиническое наблюдение:

Больной В (1938г.р.) поступил в кожную клинику МОНИКИ 20.10.99 с жалобами на высыпание на коже туловища, верхних и нижних конечностей, волосистой части головы, ранимость кожных покровов.

Из анамнеза: страдает ВП с 1991г. С 1994г находился на поддерживающей дозе преднизолона 5мг/сут. В январе 1998г самовольно прекратил прием поддерживающей дозы. Через 5-6 месяцев развилось сильное обострение. Лечился стационарно, отмечалось упорное течение процесса, резистентное к кортикостероидным препаратам, получал 120 мг преднизолона, метотрексат 25мг в/м 1 раз

Интенсивность свечения IgG в межклеточной склеивающей субстанции эпидермиса (в баллах) до фотофереза у больных ВП (%)



Интенсивность свечения IgG в межклеточной склеивающей субстанции эпидермиса (в баллах) после фотофереза у больных ВП (%)

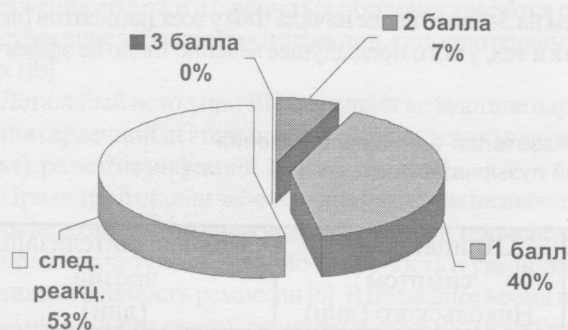


Рис. 1. Интенсивность свечения IgG в межклеточной склеивающей субстанции эпидермиса в процессе проведения фотофереза у больных вульгарной пузырчаткой.

Таблица 2. Динамика иммунологических показателей до и после фотофереза у 15 больных вульгарной пузырчаткой ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (n=20)	До ФФ (n=15)	После ФФ (n=15)	P до и после ФФ
CD3(%)	67,5 $\pm$ 7,5	63,5 $\pm$ 13,3	58,2 $\pm$ 8,53	>0,05
CD4(%)	40,5 $\pm$ 5,5	37,4 $\pm$ 11,87	35,48 $\pm$ 6,64	>0,05
CD8(%)	27,5 $\pm$ 2,5	23,39 $\pm$ 9,26	26,67 $\pm$ 5,11	>0,05
CD95(%)	41,5 $\pm$ 18,5	38,66 $\pm$ 3,76	26,59 $\pm$ 16	>0,05
CD4/CD8	1,8 $\pm$ 0,6	1,91 $\pm$ 0,41	1,37 $\pm$ 0,4	>0,05
IgG(МЕ/мл)	145 $\pm$ 5	174,9 $\pm$ 8,38	144,5 $\pm$ 31,22	>0,05

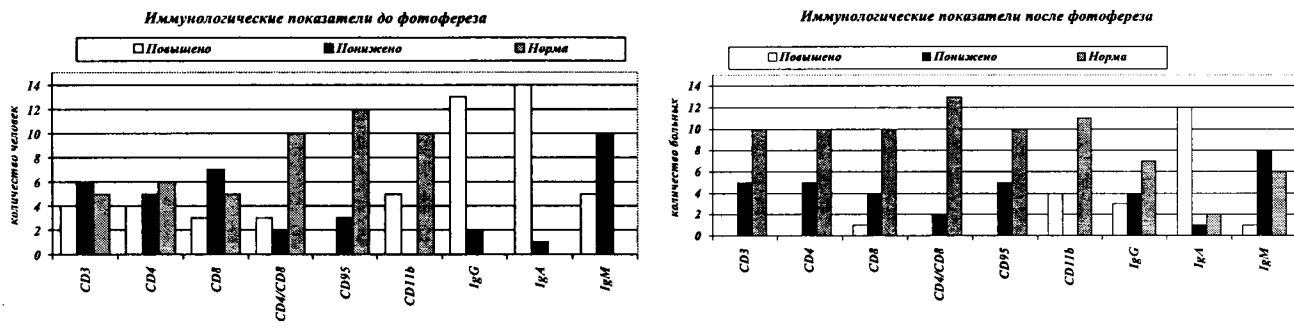


Рис. 2. Динамика иммунологических показателей в процессе фотофереза у больных вульгарной пузырчаткой.

в 5 дней (3 курса), плазмаферез (5 процедур). В течение последующих 1,5 лет неоднократно развивалось обострение, в связи с этим 7 раз проходил стационарное лечение с применением высоких доз преднизолона в сочетании с метотрексатом. Поддерживающую дозу преднизолона не удавалось снизить ниже 30-35 мг в сут. Настоящее обострение развилось на поддерживающей дозе преднизолона 30 мг/сут., после перенесенного ОРВИ.

Объективно: На коже волосистой части головы, груди, спины, живота множественные пятна бурого цвета с чешуйко-корками на поверхности размером от 2,5 см до 6 см в диаметре, единичные эрозии покрытые серозно-геморрагическими корками размером от 2,5 см до 4 см в диаметре. Симптом Никольского краевой - положительный, с клинически не пораженной кожи - отрицательный.

При обследовании: фиксация иммуноглобулина класса G в межклеточной склеивающей субстанции шиповатого слоя эпидермиса на 2 балла; Дисциркуляторная энцефалопатия, ангиопатия сетчатки. Сахарный диабет 2-го типа (стероидный) в стадии компенсации.

Проведенное лечение: преднизолон 30 мг/сут, аспаркам 1 таблетка в день, оротат калия 1 таб/3р в день, глицерам 1 таблетка в день, ретаболил 1,0 в/м 1 раз в мес., фотоферез 4 процедуры.

На 3-4 день после проведения первого сеанса фотофереза прекратилась экссудация с поверхности высыпаний, констатирован отрицательный краевой симптом Никольского. Через 12 дней после начала лечения произошла полная эпителизация эрозий, в реакции прямой иммунофлюоресценции отмечено уменьшение интенсивности свече-

ния иммуноглобулина класса G в МСС эпидермиса до следовой реакции. На 17 день от начала лечения больному была снижена доза преднизолона до 25 мг/сут. За прошедшие 1,5 года рецидивов заболевания не отмечено, больной находится на поддерживающей дозе преднизолона 12,5 мг/сут.

Механизм положительного действия ФФ при аутоиммунных заболеваниях в настоящее время до конца не выяснен. Описанный нами ранее механизм действия ФФ у больных хроническим лимфолейкозом через индукцию апоптоза [2] не нашел своего подтверждения у больных ВП, так как у большинства пациентов количество клеток, экспрессирующих CD95 антиген в процессе лечения, существенно не изменялось (таблица 2). Очевидно это связано с тем, что процессы апоптотического регулирования при этом заболевании не подвержены патологическим изменениям. Клиническая эффективность ФФ коррелирует с восстановлением соотношения хелперной и супрессорной функций Т-лимфоцитов, уменьшением уровня IgG в сыворотке крови и отложений его в межклеточной склеивающей субстанции эпидермиса.

Следует отметить, что если методы лечения пузырчатки, основанные на применении иммуносупрессивных препаратов, достаточно хорошо изучены, то метод экстракорпорального фотохимического воздействия на иммунокомпетентные клетки требует дальнейшего более углубленного изучения, как перспективное направление в лечении тяжелых аутоиммунных процессов в дерматологической клинике.

Литература

1. Беренбейн Б.А. Руководство по кожным и венерическим болезням в 4-х томах под ред. Ю.К. Скрипкина и В.И. Мордовцева, Т.2, М., 1996
2. Кильдюшевский А.В., Шабалин В.Н., Голенков А.К., Барышников А.Ю., и соавт. Опыт применения экстракорпоральной фотохимиотерапии при лечении хронического лимфолейкоза. Актуальные вопросы службы крови и трансфузиологии. Тезисы докладов Российской Конференции. С.-Петербург, 1995, стр. 396-397.
3. Anhalt G.J. Pemphigus vulgaris, foliaceus and paraneoplastic. In: Fine J.D. (ed.) Bullous Diseases.- New York, Igaki-Shoin. 1993, P.52-74.
4. Aringer M, Graninger W.B., Smolen J.S., et al: Photopheresis treatment enhances CD95 (fas) expression in circulating lymphocytes of patients with systemic sclerosis and induces apoptosis. *Br J Rheumatol*, 1997, 36: pp1276-1282,
5. Bystryj N.C., Steinman M.N. The adjuvant therapy of pemphigus. *Arch Dermatol* 1996;132: pp203-211.
6. Carson P.J., Hameed A., Ahmed A.R. Influence of treatment on the clinical course of pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol*, 1996, 34: pp 645-652.
7. Edelson R.L., Perez M., Heald P., Berger C. Extracorporeal photochemotherapy. *Biol Ther Cancer Updates* 1994;4: pp 1-12.
8. Gollnick H.P.M., Owsianowski M., Taube K.M., et al. Unresponsive severe generalized pemphigus vulgaris successfully controlled by extracorporeal photopheresis. *J Am Acad Dermatol*, 1993, 28: p121
9. Jolles S., Hughes J., Whittaker S. Dermatologic use of high dose intravenous immunoglobulin. *Arch Dermatol*, 1998, 134: pp 80-86.
10. Liang G., Nahass G., Kerdell FA. Pemphigus vulgaris treated with photopheresis. *J Am Acad Dermatol*, 1992, 26: p 779.
11. Owsianowski M., Garbe C., Ramaker J., et al: Therapeutic experiences with extracorporeal photopheresis. Technical procedure, follow-up and clinical outcome in 31 skin diseases [German]. *Hautarzt*, 1996, 47: pp114-123
12. Prussick R., Plott R.T., Stanley J.R. Recurrence of pemphigus vulgaris associated with interleukin 2 therapy. *Arch Dermatol* 1994; 130: 890-3.
13. Pye R.J., Bullous eruptions. In Champion RH, Burton JL, Ebling FJG (eds): *Rook/Wilkinson/Ebling Textbook of Dermatology*, ed 5. Oxford, Blackwell Scientific, 1992, pp 1638-1665
14. Rook A.H., Jegasothy B.V., Heald P., et al. Extracorporeal photochemotherapy for drug-resistant pemphigus vulgaris. *Ann Intern Med*, 1990, 112:pp303-305,
15. Rook A.H.: Photopheresis in the treatment of autoimmune disease: Experience with pemphigus vulgaris and systemic sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1991, 636:p209
16. Schoen H., Foedinger D., Derfler K., et al. Immunoapheresis in paraneoplastic pemphigus. *Arch Dermatol*, 1998, 134:p706-709
17. Stanley J.R., Yaar M., Hawley-Nelson P. et al. Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. *J. Clin. Invest.*, 1982, - Vol.70. P.281-288
18. Stanley J.R., Koulu L., Klaus-Kovtun V. et al. A monoclonal antibody to the desmosomal glycoprotein desmoglein - 1 binds the same polipeptide as human autoantibodies in pemphigus foliaceus. *J. Immunol.*, 1986, Vol. 136, p1227-30
19. Vowels B.R., Cassin M., Boufal M.H., et al: Extracorporeal photochemotherapy induces the production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes: Implications for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and systemic sclerosis. *J Invest Dermatol*, 1992, 98: pp 686-692
20. Wolfe J.T., Lessin S.R., Singh A.H., et al: Review of immunomodulation by photopheresis: Treatment of cutaneous T-cell lymphoma, autoimmune disease, and allograft rejection. *Artif Organs* 1994, 18: pp888-897

Значение экспрессии дифференцировочных антигенов, молекул адгезии и FAS/APO в оценке клинического течения множественной миеломы и хронического лимфолейкоза. (Обзор)

Т.А. Митина
МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского

Изучение иммунологического фенотипа опухолевой клетки при лимфопролиферативных заболеваниях (ЛПЗ), которые включают в себя ряд нозологических форм (множественная миелома - ММ, хронический лимфолейкоз - ХЛЛ - неходжкинские лимфомы (НХЛ)), представляется важной проблемой для клинической гематологии. Биологический аспект этой проблемы позволяет более глубоко понять вопросы патогенеза ЛПЗ, оценить связь иммунологического фенотипа опухолевой клетки с изменениями клеточного генома и уточнить характер межклеточного взаимодействия. Клиническое значение этого направления исследований заключается в важности иммунофенотипической характеристики опухолевых клеток для совершенствования классификаций ЛПЗ и клинической диагностики.

Анализ данных литературы, опубликованных в основном за период 1998-2000 гг. показал, что интерес к этой проблеме остается высоким. Это касается характеристики ряда новых дифференцировочных антигенов, антигена апоптоза, отражающего специфическую функцию генома запрограммированную гибель опухолевой клетки и клинико-биологических аспектов экспрессии молекул адгезии на опухолевых клетках.

1. Роль дифференцировочных антигенов в процессах внеклеточного взаимодействия при лимфопролиферативных заболеваниях.

Характеристика дифференцировочных антигенов (CD), проводимая согласно данным «5-th International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Boston USA» [143] в последние годы пополнилась новыми сведениями. Появилась достаточно важная информация о дифференцировочных антигенах, свидетельствующая об их участии в процессах межклеточного взаимодействия. Так, при ХЛЛ установлено взаимодействие циркулирующих опухолевых клеток с эндотелием сосудов [35]. При этом высказано достаточно важное предположение

о том, что трансэндотелиальная миграция лимфоцитов и их выход в ткани сопровождается потерей клеточных рецепторов, которые остаются в циркуляции в виде растворимых форм селектина и SCD23. Следовательно, высокие уровни селектина и SCD23 могут указывать на активность процесса инфильтрации опухолевыми клетками различных органов. На гомотипическое и гетеротипическое взаимодействие миеломных клеток со стромальными элементами тканей указано в исследованиях [6, 160], показавших, что это взаимодействие происходит между CD38 и CD31, являющимся лигандом CD38. При этом возникающий сигнал передается на опухолевую клетку, вызывая сдерживание клеточного роста. В то же время отсутствие CD31 экспрессии сопровождается активацией опухолевого роста и CD31(-) фенотип отмечен при более агрессивном течении ММ с наличием в цитологическом субстрате плазмобластов. Известно, что ИЛ-6 является аутокринным и паракринным фактором роста ММ. Действие ИЛ-6 на миеломную клетку опосредуется через мембранный лиганд CD126 и молекулу сигнала трансдукции CD130 [9]. Было показано, что их коэкспрессия встречается в 22% случаев в момент диагноза ММ и возрастает при рецидиве (42%). При рецидиве экспрессия CD126 менялась мало, а CD130 увеличивалась с 43% до 88%. Следовательно, экспрессия CD130 может расцениваться как фактор неблагоприятного клинического прогноза. Большая роль в стимуляции продукции ИЛ-6 миеломными клетками отводится CD40, который является лигандом соответствующих маркеров, инициирующих этот процесс [141].

Хорошо известный дисбаланс иммунорегуляторных клеток при ММ (CD4/CD8) исследован в соответствии с количеством CD57 [64]. Было установлено, что при отношении CD4/CD8 <1 увеличивается количество CD57, которые подавляют PWM и ФГА стимулированную пролиферацию, продукцию Ig, и повышают чувствительность к апоптозу лимфоцитов периферической крови. Эти данные более точно объясняют патогенез иммунодефицита

ного синдрома, который является ведущим в клинической картине болезни. Показано также [31, 132], что (CD45+, VLA5-), циркулирующие предшественники опухоли при ММ имеют более ранний фенотип чем плазматические клетки костного мозга (CD45-, VLA5+). Важно отметить, что миеломные клетки связываются с эндотелием костного мозга через CD31, который, как известно, является лигандом CD38. Кроме того, указанное взаимодействие может происходить за счет экспрессии молекул адгезии VLA-4 и VCAM-1, N-CAM, CD44. В свою очередь стромальные элементы костного мозга влияют на активность миеломной клетки через ИЛ-6, CD126 и CD130 взаимодействие. Авторы также отмечают, что при диссеминации плазмодитоза плазматические клетки теряют адгезивные молекулы LFA-3, N-CAM, LFA-1, VLA-5. Незрелые циркулирующие предшественники при ММ [CD45+ CD49e- (VLA-5)] могут пролиферировать в ответ на действие ИЛ-6 [65]. Очень важно подтверждение роли антигенов клеточной дифференцировки в межклеточном взаимодействии и влиянии на рост опухоли при ХЛЛ. Установлено [99], что на нормальной лимфоидной ткани экспрессия CD27 (семейство рецепторов фактора некроза опухоли) и его лиганда CD70 представлена достаточно редко. Козэкспрессия CD27 и CD70 на В-клетках при лимфопролиферативных болезнях расценивается как дисрегуляция, что приводит к подобной aberrантной экспрессии. Так, CD70 найден в 50% В-ХЛЛ, 33% фолликулярной лимфомы, в 71% крупноклеточной В-лимфомы и в 25% случаев лимфомы мантийной зоны. Взаимодействие CD27 и CD70 антигенов между собой и с CD40 влияло на прогрессию этих В-клеточных новообразований [170].

Новые данные о функции HLA антигенов I и II классов [9, 166] показывают, что в 2% случаев В-клеточных лимфом с агрессивным клиническим течением не было экспрессии HLA-антигенов I и II классов.

Связь между этими явлениями закономерна, так как через HLA-антигены реализуется противоопухолевое действие аутологичных натуральных киллеров (NK) и Т-лимфоцитов, инициирующих апоптотические сигналы. Следовательно, при потере экспрессии этих антигенов опухолевой клеткой, последняя уходит из-под контролирующего влияния противоопухолевого иммунитета. Важно отметить, что описанное биологическое явление имеет клиническое значение. Эти результаты подтверждаются и другими исследованиями [154], где подчеркивается связь экспрессии HLA-антигенов II класса и гибели селезеночных В-лимфоцитов через механизм FAS/FAS-лиганд взаимодействия. Этот феномен подтверждается так же морфологическими исследованиями, в которых обнаруживается инфильтрация опухолевой ткани при фолликулярной лимфоме аутологичными цитотоксическими Т-лимфоцитами, опосредованная HLA-антигенами [145].

Пан-В клеточный антиген CD40, который представлен на опухолевых лимфоцитах при ХЛЛ, в настоящее время рассматривается не только как часть иммунофенотипического стандарта при подтверждении диагноза заболевания [25, 89, 96, 108]. Установлена его роль в процессах межклеточного взаимодействия через CD40- лиганд (CD154 на Т-лимфоцитах), в результате чего возникает сигнал на клеточное выживание, что защищает клетку от активации апоптоза FAS-L и флюдарбином.

Показано так же, что связывание CD40 индуцирует BCL-2 экспрессию и блокирует апоптоз в BCL-2 (-) лимфоцитах зародышевых центров. Опухолевый фенотип при ЛПЗ, который часто характеризуется aberrантной экспрессией дифференцировочных антигенов, по-видимому, является отражением генетических нарушений опухолевой клетки [113]. В этой связи иммунодефицит и аутоиммунные реакции при ХЛЛ могут быть связаны экспрессией дефектного CD79b и коэкспрессией CD5, что снижает функцию антигенпрезентирующих клеток, в то же время взаимодействие CD40-CD40-L - их активизирует [27]. Исследования с использованием двух и трехцветной иммунофлюоресценции показали, что при ХЛЛ выявлялась двойная aberrантная экспрессия на опухолевых В-лимфоцитах (CD19, CD20) Т-клеточных антигенов CD8 и CD5 [111]. Исследования, уточняющие взаимосвязь между экспрессией дифференцировочных антигенов и трисомией-12 при ХЛЛ показали, что данное хромосомное нарушение встречается в атипичных случаях ХЛЛ и связаны с высокой экспрессией CD11a, CD20, FMC7 и CD38 и хорошей экспрессией Ig. При такой иммунофенотипической картине возможен диагноз лимфомы из клеток мантийной зоны [152, 62, 42]. При ММ отсутствие PAX-5 гена сопровождалось отсутствием экспрессии CD19 и усилением опухолевого роста [84].

При сравнительном анализе функции нормальных CD5+ и CD19+ лимфоцитов и лимфоцитов при ХЛЛ с коэкспрессией CD19+, CD5+, показано, что в опухолевых лимфоцитах при контакте со стромой костного мозга угнетается апоптоз, что играет главную роль в накоплении клеток в костном мозге при этом заболевании [95].

Интересен вопрос об уровнях поражения кроветворных предшественников при ХЛЛ. Одновременный иммунофенотипический и генотипический анализы [66] показали, что на CD34 лимфоцитах не выявлено маркеров ХЛЛ. Однако при ХЛЛ с трисомией-12, часть CD34+ клеток имели этот генетический маркер опухоли [142]. Изучение и систематизация дифференцировочных антигенов на опухолевых клетках при ЛПЗ имеет большое практическое значение, так как они могут служить мишенью для применения антител против них с лечебной целью. В этой связи важно отметить, что при взаимодействии антител на клеточные линии фолликулярной лимфомы лизис клеток усиливается при добавлении ингибиторов комплемента CD55 или CD59, что может учитываться в клинической практике [97].

Таким образом, проведенный анализ показал, что дифференцировочные антигены при ЛПЗ являются не только маркерами клеточных линий, но более широко отражают функцию опухолевых клеток. Установлено их участие в процессах межклеточного взаимодействия и связи со стромой костного мозга. При ХЛЛ у опухолевых лимфоцитов с фенотипом CD19+, CD5+ при контакте со стромой угнетается апоптоз, а SCD23 принимает участие в трансэндотелиальной миграции лимфоцитов. Показано, что CD40 отражает достаточно широкий спектр клеточных функций. Определена роль CD40 и его лиганда CD154 в формировании сигнала на выживание опухолевых клеток при ХЛЛ, а так же в индукции BCL-2 экспрессии в лимфоцитах зародышевых центров.

Взаимодействие CD40, CD27 и его лиганда CD70 является биологической основой для прогрессии ЛПЗ. Стимулирование продукции ИЛ-6 миеломной клеткой происходит при опосредуемом влиянии CD40 и через мембранные лиганды ИЛ-6 CD126 и CD130. Интересно, что циркулирующие предшественники при ММ, имеющие более ранний фенотип (CD45+, VLA5-) более чувствительны к стимулирующему влиянию ИЛ-6.

Взаимодействие CD38 и его лиганда CD31 обеспечивают связь опухолевой клетки с эндотелием и стромой костного мозга, что влияет на особенности клинических проявлений опухолевого роста при ММ.

Изучение иммунологического фенотипа опухолевых клеток при ЛПЗ позволило установить двойную коэкспрессию Т-клеточных антигенов CD8 и CD5 на опухолевых В-лимфоцитах при ХЛЛ. Отношение CD4/CD8 < 1 совпадает с повышением количества CD57, что активирует апоптоз в иммунокомпетентных клетках, вызывая иммунодефицит.

Прослежена связь экспрессии дифференцировочных антигенов с геномом опухолевой клетки. Так трисомия-12 при ХЛЛ совпадает с высокой экспрессией CD11a, CD20, FMC7 и CD38, а отсутствие PAX-5 гена при ММ сочетается с отсутствием экспрессии CD19.

2. Иммунофенотипический диагноз лимфопролиферативных заболеваний.

Стабильно воспроизводимый признак опухолевой клетки, каким является иммунологический фенотип, имеет большое значение не только для понимания патогенеза опухолевого роста, но так же для клинической практики. Результаты изучения проблемы иммунофенотипического диагноза [12, 26, 40, 16, 105, 102] свидетельствуют о том, что в настоящее время сформулированы диагностические принципы, позволяющие в клинической практике точно проводить дифференциальную диагностику. Согласно этим данным иммунологический фенотип соответствует различным ЛПЗ:

ХЛЛ –	SlgM ⁺ , IgD ⁺ , panB ⁺ , CD5 ⁺ , CD23 ⁺ , CD43 ⁺ , FMC7 ⁺ ;
ХЛЛЛ –	CD2 ⁺ , CD3 ⁺ , FMC7 ⁺ ;
Иммуноцитомы –	Slg ⁺ , panB ⁺ , CD5 ⁺ , CD10 ⁺ , CD23 ⁺ , CD43 ⁺ ;
лимфома из клеток	SlgM ⁺ , D ⁺ , λ>κ, panB ⁺ , CD5 ⁺ , CD10 ⁺ , CD23 ⁺ , CD43 ⁺ ,
мангитной зоны –	CD11c ⁺ , BCL-2 ⁺ , циклин D ⁺ (причем может быть атипичный вариант с фенотипом CD5 ⁺ , CD23 ⁺);
ВКЛ –	CD19 ⁺ , CD25 ⁺ , CD11c ⁺ , CD103 ⁺ , Slg ⁺ ;
Фолликулярная лимфома –	Slg ⁺ , panB ⁺ , CD10 ⁺ , CD5 ⁺ , CD43 ⁺ , CD23 ⁺ ;
лимфома из клеток маргинальной	Slg ⁺ , panB ⁺ , CD5 ⁺ , CD10 ⁺ , CD23 ⁺ , CD43 ⁺ ,
зоны (чаще MALT, реже nodальная или селезеночная) –	BCL-2 ⁺ , C4D1 ⁺ .

Приводится так же иммунофенотипический стандарт, позволяющий провести дифференциальный диагноз между типичным ХЛЛ (Slg+/-, CD5+, CD23+, FMC7-, CD79b-) и другими ЛПЗ (Slg+, CD5-, CD23-, FMC7+, CD79b+) [34]. Отмечена важность экспрессии CD22, который имеет низкие значения при ХЛЛ, но высокие при В-клеточных НХЛ [38]. Иммунофенотипический стандарт для дифференциальной диагностики ХЛЛ и других ЛПЗ, предложенный другими авторами [104, 45], по существу идентичен изложенным данным [33], причем автор указывает на диагностическую ценность CD79b (SN8), представляющего собой антитело к мембранному протеину В-29. Замена в этом стандарте CD22 на CD79b повышает его диагностические возможности с 91% до 96%.

В дополнение к уже описанным антигенам, применяемым в дифференциальной диагностике ЛПЗ, изучается экспрессия циклин D1 (cyclin D1) и ее клиническое значение при этих заболеваниях. При типичном ХЛЛ с иммунологическим фенотипом CD5+, CD23+, CD79b- в 30% наблюдений выявлена экспрессия суD1, хотя этот антиген является маркером НХЛ из клеток мангитной зоны. Исследования показали, что в случаях суD1+, ХЛЛ безрецидивная выживаемость была ниже, чем в случаях ХЛЛ с отрицательными значениями суD1 [107]. Изучение иммунофенотипических различий между селезеночной лимфомой из клеток маргинальной зоны (MZCL), селезеночной лимфомой из ворсинчатых клеток (SLVL) и лимфомой из клеток мангитной зоны [41, 109] по двойной флуоресцентной метке показало, что иммунологический фенотип селезеночных лимфом был практически идентичен: CD5-, CD23-, CD43-/+ . В 30% случаев была выявлена CD5 позитивность, а CD11c+ фенотип встречался при SLVL.

В то же время иммунологический фенотип при НХЛ из клеток мангитной зоны отличался от такового при SLVL и MZCL: CD5+, CD10-, CD19+, CD23-. Важное диагностическое значение имеют данные тканевого иммунофенотипирования, позволяющие выделить особый вариант В-клеточных лимфом с Т-клеточным обогащением (CD45RO, CD3)+ и (CD20, CD79a)+ и (CD15, CD30) [161], а также исследования установившие иммунологический фенотип (CD20+, clgM/k, CD38+/-) плазмобластного варианта диффузной крупноклеточной лимфомы имеющей тяжелый клинический прогноз [76].

В качестве важного диагностического антигена следует рассматривать CD10 [106], который разделяет НХЛ на 2 группы: фолликулярного центра и другие. Иммунофенотипическая диагностика распространенности опухолевого процесса является важной для клиники, так как позволяет предпринять более эффективное лечение. Иммунофенотипическое исследование СМЖ у больного с симптомами нейрорлейкоза позволило выявить клоновый лимфоцитоз [60]. В данном наблюдении лимфоцитоз был представлен CD19 и CD20 лимфоцитами, с отношением κ/λ=0.3, что соответствовало фенотипу опухолевых В-лимфоцитов в периферической крови. Данное исследование позволило исключить вирусный лимфоцитоз и диагностировать опухолевое поражение нервной системы.

Аналогичные результаты получены другими авторами [103] при диагностике лейкемического менингита у больного с В-ХЛЛ. Опухолевый цитоз в СМЖ подтвержден данными иммунофенотипического анализа: CD23+, CD22+, CD5+, κ+, который в дальнейшем служил основанием для назначения интратекальной химиотерапии метатрексатом.

Клиническое значение экспрессии дифференцировочных антигенов при ХЛЛ можно оценивать не только по факту экспрессии или по факту ее отсутствия, но так же по степени ее выраженности [68, 158]. Так уровень экспрессии CD19 и CD20 был очень низким при ХЛЛ. При высоком проценте CD20+ снижается вероятность диагноза типичного ХЛЛ. Диагностическая ценность CD23 наиболее высокая, а CD20 выше, чем CD19. При неблагоприятном прогнозе и атипичной картине ХЛЛ интенсивность экспрессии Slg и CD20 была более высокой. Так же было

отмечено [100], что количество CD23 и его лиганда CD21 при ХЛЛ было более высоким на пролимфоцитах, чем на малых лимфоцитах, хотя четких клинических корреляций не было.

Анализ количественной экспрессии CD37 при ЛПЗ показал, что при ХЛЛ выявлены меньшие значения этого антигена, чем при других ЛПЗ.

Таким образом, проведенный анализ опубликованных исследований, касающихся иммунофенотипической диагностики ЛПЗ, показал, что данная проблема достаточно активно разрабатывается.

Следует отметить широко используемые в клинической практике иммунофенотипические стандарты для дифференциальной диагностики ХЛЛ и В-НХЛ. Так, хорошо разработана иммунофенотипическая дифференциация ХЛЛ, лимфомы из клеток мантийной зоны, волосатоклеточного лейкоза, селезеночных лимфом из ворсинчатых клеток и клеток маргинальной зоны, В-клеточной лимфомы, обогащенной Т-лимфоцитами. Введено в клиническую практику понятие количественной экспрессии отдельных дифференцировочных антигенов. Это очень важно для широко используемого метода одноцветной иммуофлюоресценции. За экспрессию какого-либо антигена обычно принимаются его значения выше нормальных показателей или контроля. Однако превышение этих значений может быть минимальным или достаточно выраженным. В связи с этим установлено, что минимальные значения экспрессии CD22 характерны для ХЛЛ, а максимальные значения характерны для НХЛ. Аналогичная закономерность обнаружена для CD37. В настоящее время в практику иммунофенотипического диагноза ЛПЗ достаточно широко вошли такие антигены как CD79b, CD11c, CD11b и CD10.

3. Иммунологический фенотип и клинический прогноз при лимфопролиферативных заболеваниях

Клиническое значение иммунофенотипирования заключается не только в диагностической ценности данного метода, но так же в определении прогностического риска при экспрессии отдельных дифференцировочных антигенов. Экспрессия CD20 при ММ ассоциировалась с низкой выживаемостью [138], а CD14+ ММ характеризовалась более тяжелым течением, что объясняется повышенной продукцией ИЛ-1 [73]. При В-ХЛЛ отмечена взаимосвязь между количеством CD14+ и выживаемостью больных. Количество CD14+ лимфоцитов больше чем $5 \cdot 10^9/\text{л}$ соответствовало выживаемости 63 месяца, при меньшем количестве выживаемость составила 136 месяцев [28].

Анализ клинических данных показал, что при типичном ХЛЛ с иммунологическим фенотипом CD19+, CD5+, CD23+ в определенном числе наблюдений отмечается экспрессия CD11b, CD14, CD25, FMC7. Однако клинически значимой является экспрессия CD14, которая связана с более тяжелым течением болезни [29].

Анализ количества CD4 лимфоцитов крови при ММ показал, что превышение уровня 395 кл/мкл связано с большей выживаемостью. При этом отмечен достаточно высокий уровень CD19, что указывает на сохранность иммунитета и коррелировало с большой выживаемостью. Кроме того, CD45RA+, являясь подклассом хелперов, про-

дуцирует интерферон-гамма и ИЛ-2. Химиотерапевтическое лечение, направленное на подавление опухолевого клона, угнетает так же иммунитет, что может способствовать не только присоединению инфекций, но и прогрессированию болезни [82, 83, 114, 159]. Повышение уровня растворимого (SCD23) при ХЛЛ (А-стадия) связано с высоким риском прогрессии заболевания [54, 148]. Так же как и при ММ CD20 имеет важное прогностическое значение при ХЛЛ. Причем для клинического прогноза важен не только сам факт экспрессии этого антигена на опухолевых клетках, но и его плотность (количество молекул на клеточной поверхности). Было установлено [47], что при плотности CD20 $> 17.9 \cdot 10^3$ молекул 8-летняя выживаемость составляла 43%, при меньшей плотности аналогичные показатели были зафиксированы в 73% наблюдений.

Примерно 25% случаев ХЛЛ имеет атипичный фенотип (CD5- или Slg++ или FMC-7+) и в этих случаях выживаемость была достоверно короче [46, 67]. Причем хромосомные аномалии (трисомия-12) были выявлены в обеих группах, что указывает на их невысокую прогностическую значимость. Более агрессивное течение В-ХЛЛ было связано с коэкспрессией CD8+CD57+, где с помощью PCR была доказана олигоклональность Т-лимфоцитов [149]. В то же время, различая два варианта ХЛЛ типичный и атипичный по иммунологическому фенотипу, не было установлено существенных клинических различий [43]. Выживаемость при типичном ХЛЛ составляла 7 лет (Me), при атипичном варианте (FMC-7+, Slg++, CD72+, CD11a+, CD11c+, CD49d+) - 8,2 года (Me).

Сосуществование двух клеточных популяций, различных по иммунологическому фенотипу, (CD56+ TCR $\gamma\delta$ + и CD56+ TCR $\gamma\delta$ -) выявлено у больного с агрессивным течением лимфомы [30]. Растворимый CD38 в костном мозге при ММ может рассматриваться как прогностический фактор тяжелого течения заболевания, так как выявлена обратная корреляция с уровнем гемоглобина [63, 118].

Идентичные результаты, касающиеся прогностического значения CD38 при ММ, получены и другими авторами [133]. Была установлена обратная корреляционная зависимость между CD38+ лимфоидными и миеломными клетками костного мозга и выживаемостью. Сильная экспрессия на миеломных клетках CD38 может прогнозировать развитие неврологических осложнений при ММ (периферическая полинейропатия и радикулопатия). Интересно, что при этом отсутствует экспрессия нейрорадегизивной молекулы CD56 [117, 162]. Известно так же, что CD38 при ММ экспрессирован на CD8 Т-лимфоцитах, которые имеют фенотип хронических активированных Т-клеток памяти (CD38+, HLA-DR+, CD25-, CD45RO, CB28-). При этом CD38+ лимфоциты имеют сниженную киллерную активность, за счет частичного блокирования активных рецепторов, что ведет к прогрессированию болезни [15].

Как известно [1, 2, 3, 6] CD38 рассматривается как лимфоплазмочитарный антиген и является достоверным диагностическим и прогностическим маркером ММ. В то же время он может быть экспрессирован на активированных Т-лимфоцитах. Оценка экспрессии CD38 на Т-лимфоцитах как активационного антигена имеет важное клиническое значение. Так при спокойном течении ХЛЛ коли-

чество Т-лимфоцитов с фенотипом CD25+ CD38+ HLA-DR+ было значительно меньше, чем при ХЛЛ с прогрессированием [124]. Установлена сильная отрицательная корреляция между CD25, CD38 экспрессией и временем без прогрессии.

Низкий риск прогрессии (15%) установлен при количестве CD25+ лимфоцитов < 15% и CD38+ лимфоцитов < 30%. Длительность времени без прогрессии (Ме) составляла 50 месяцев против 12 месяцев в контроле. Важное клиническое значение имеет экспрессия CD25 и λ легкой цепи Ig у больных с лимфомой мантийной зоны [57]. При этом установлено, что экспрессия указанных маркеров совпадала с короткой выживаемостью.

Большое прогностическое значение при ХЛЛ имеет экспрессия циклин D1, который является маркером лимфомы из клеток мантийной зоны. Однако этот антиген может быть экспрессирован в 32% случаев ХЛЛ [107]. При этом выживаемость без прогрессирования была значительно короче, чем в случаях ХЛЛ с типичным иммунологическим фенотипом, где нет экспрессии циклин D1.

Таким образом, анализ экспрессии часто используемых в гематологической практике дифференцировочных антигенов в аспекте клинического прогноза, показал высокую ценность этого направления исследований.

Проанализированные дифференцировочные антигены при ХЛЛ, ММ, НХЛ: CB20, CD14, CD19, CD4, CD23, CD5, Slg, FMC-7, CD8, CD57, CD25, CyD1 во многом определяют особенности клинического течения заболеваний. Высокие значения CD20 при ММ и ХЛЛ выявляются у больных с низкими показателями выживаемости. Повышенное количество CD14 клеток при ММ и ХЛЛ свидетельствует о плохом клиническом прогнозе, который заключается в тяжелом клиническом течении и короткой выживаемости. Важное диагностическое значение имеет количество CD4 позитивных клеток (>395 в/мкл), что соответствует о более длительной выживаемости при ММ.

Прогрессирующее течение ХЛЛ связано так же с повышенной концентрацией SCD23 и экспрессией CyD1 опухолевыми лимфоцитами и коэкспрессией CD8+ и CD57+. Важным для клинической практики является определение CD38 и CD25 при ММ и ХЛЛ. Так, высокий процент CD38+ лимфоцитов с высокой вероятностью может прогнозировать короткую выживаемость и развитие неврологических осложнений при ММ, а высокая экспрессия CD25 и CD38 маркеров при ХЛЛ связана с короткой безрецидивной выживаемостью. При НХЛ из клеток мантийной зоны экспрессия CD25 и λ на лимфоцитах выявляется у больных с короткой выживаемостью. Такая же закономерность наблюдается при ХЛЛ с атипичным (CD5- или Slg++ или FMC-7+) фенотипом.

4. Иммунофенотипическая характеристика остаточной опухоли при лимфопролиферативных заболеваниях.

Изучение иммунологического фенотипа при ЛПЗ имеет важное значение не только для понимания патогенеза опухолевого роста, проведения дифференциального диагноза и определения клинического прогноза, но и для точной характеристики объема остаточной опухоли в процессе химиотерапевтического лечения.

При ММ количество циркулирующих в крови В-предшественников опухолевых плазмочитов может служить критерием эффективности противоопухолевой химиотерапии. С помощью PCR-анализа показано [126][127], что при ММ 30% циркулирующих CD19+ лимфоцитов принадлежала к опухолевому клону. После аутологичной трансплантации стволовых клеток количество CD19+ лимфоцитов снизилось до 14%. При этом большая часть их была нормальной. Только около 1% этих клеток имела RCR-характеристики опухолевого клона. Очень важным фактом в этом наблюдении является отсутствие признаков опухолевого клона на CD34 лимфоцитах, что фактически делает возможным аутологическую пересадку стволовых клеток.

По существу аналогичные результаты были получены и другими авторами [135]. С помощью количественного аллель - специфического олигонуклеотидного RCR-анализа, основанного на лимитирующих разведениях, изучали наличие лимфоцитов опухолевого клона в CD20+ и CD19+ фракциях лимфоцитов крови при ММ.

Исследования провели у больных в ремиссии и рецидиве после высокодозной химиотерапии и пересадки стволовых клеток периферической крови. Было установлено, что в ремиссии во фракции CD20+ лимфоцитов было мало опухолевых клеток (0-7 в 1 мл), но несколько больше чем в CD20- фракции. При рецидиве число опухолевых клеток повышалось во фракциях CD20+ и CD20-.

Анализ неклоновой популяции CD19+, CD38- предшественников антителопродуцентов при ММ [128] показал, что их количество было снижено при рецидиве и повышалось в фазе ремиссии. Приведенные результаты свидетельствуют об иммуносупрессии, связанной с опухолевым процессом, а проводимая противоопухолевая химиотерапия снимает супрессивное влияние опухоли на иммунитет. В то же время противоопухолевые препараты могут избирательно подавлять определенные звенья иммунитета. Это касается флюдарабина и CDA, применение которых при ХЛЛ сопровождается значительным снижением CD4+ лимфоцитов и повышением частоты инфекций [54, 81, 90, 74, 72], что служит основанием для применения в этих случаях ингаляций с IgA [16].

Противоопухолевая химиотерапия при ММ и МГВ подавляет Т-лимфоциты. Установлено [131], что при этом угнетаются наивные (CD4+, CD45RA+) и клетки памяти (CD4+, CD45Ro+). Лечение ММ Talidomidi сопровождается повышением CD8+ в крови и костном мозге, что совпадало со снижением CD38/CD138 и CD20/CD138. Изменялись так же CD3/CD69, CD3/HLA-DR [55].

Для пересадки аутологичных стволовых клеток при ММ важно чтобы маркеры опухолевого клона отсутствовали не только в CD34+ стволовых клетках, но и в продуктах афереза, что определяется с помощью иммунофенотипического исследования [98]. Было установлено [110], что при истощении продуктов афереза мышиными антителами против CD10, CD19, CD20, CD22, CD37 антигенов в них обнаруживались лимфоциты опухолевого клона по данным PCR-анализа. Клинический анализ показал, что при пересадке с достаточно большим количеством лимфоцитов опухолевого клона достигалась частичная ремиссия с ранним рецидивом. При пересадке чистой фракции ство-

ловых клеток с минимальным количеством лимфоцитов опухолевого клона достигались полные и частичные ремиссии. Это очень важный факт, подтверждающий существующее положение о генерализации ММ, которая обусловлена циркулирующим клоновыми В-лимфоцитами.

Иммунофенотипическая идентификация CD34 является важным фактором развития проблемы аутотрансплантации стволовых клеток при ММ. Было установлено [127], что у больных предлеченных мелфаланом резко снижено количество стволовых (CD34+) клеток, что ограничивает возможность применения аутологичной трансплантации в этих случаях. Частое развитие неврологической симптоматики при ЛПЗ обусловило интерес к иммунофенотипической диагностике клеток СМЖ, которое позволяет идентифицировать там лимфоциты опухолевого клона. На этом основании осуществляется диагностика опухолевого поражения ЦНС при ММ и ХЛЛ и оценка остаточной опухоли при интратекальной химиотерапии [4, 70, 60, 103]. Применение иммунофенотипического анализа в процессе лечения ХЛЛ цитостатиками и антителами против В-лимфоцитов позволило установить важность количественного определения CD5, CD20 [60, 32, 155], а так же отношение CD5+, CD19+ (по двойной метке) к CD19+ - общим [104] для идентификации остаточной опухоли. На основании полученных данных была выявлена зависимость между объемом остаточной опухоли и клиническим течением болезни. Следует отметить, что полученная ремиссия на стандартной противоопухолевой химиотерапии характеризовалась достаточно большой остаточной опухолью по CD5+, CD19+/CD19- отношению, а после трансплантации опухолевых клеток не было. Это соответствовало клиническим результатам по длительности ремиссии: 6 и 33 месяца. Аналогичные результаты приводятся и другими авторами [21, 88]. Было установлено, что клиническая ремиссия при ХЛЛ сопровождалась снижением CD19+/CD5+ и повышением CD19-/CD5+ лимфоцитов, а при лечении ИЛ-4 увеличивалось количество CD95 лимфоцитов. Подтверждение супрессивного эффекта реактивного Т-клеточного клона при рефракторной анемии В-ХЛЛ [169] позволило обосновать назначение циклоспорина с хорошим клиническим результатом.

Таким образом, проблема иммунофенотипической идентификации остаточной опухоли имеет важное значение для понимания патогенеза и оптимальной терапии ЛПЗ, включая использование антител против В-лимфоцитов [85]. Показано, что количество CD20+ и CD19+ лимфоцитов крови отражает величину остаточной опухоли при ММ и связано с длительностью ремиссии. Наступление ремиссии сопровождается так же повышением CD19+ и CD38+ лимфоцитов, не относящихся к опухолевому клону.

При проведении аутологичной пересадки стволовых клеток при ММ необходимо очищение продуктов афереза антителами к В-линейным антигенам, что позволяет исключить примесь опухолевых клеток и улучшить результаты лечения. Исключительно важными для проблемы аутологичной пересадки при ММ являются данные, свидетельствующие об отсутствии иммунофенотипических и генетических признаков опухолевого клона у CD34 клеток. Кроме того, у больных ММ леченых мелфаланом количество стволовых CD34 клеток значительно снижено, что

делает невозможной аутологичную пересадку стволовых клеток, а лечение флударабином и CDA ХЛЛ избирательно подавляет CD4, что создает предпосылки для развития тяжелых инфекций.

Оценка остаточной опухоли при ХЛЛ с помощью CD5+, CD19+/CD19- общим более информативна, чем анализ по одному антигену. Иммунофенотипическая характеристика клеток СМЖ при ММ и ХЛЛ, осложненных внутриспинальным опухолевым ростом, позволяет уточнить диагноз и оптимизировать интратекальную химиотерапию этих осложнений.

II. Молекулы адгезии, биологическая роль и клиническое значение при лимфопролиферативных заболеваниях

Изучение экспрессии молекул адгезии при ЛПЗ одно из важных аспектов патогенеза опухолевого роста представляет исключительный интерес для клинической гематологии. В настоящее время разработаны их классификации с учетом биологической функции, обозначения в системе CD и взаимодействия с предполагаемыми лигандами [24, 39, 91, 134, 139, 168, 121].

Выделяются несколько групп молекул клеточной адгезии (CAM) [156, 7, 147]. К группе семейства генов Ig относятся ICAM-1 (CD54), PECAM-1 (CD31), LFA-3 (CD58). Для CD54 предполагаемыми лигандами могут быть LFA-1, MAC-1 (CD11b/CD18), а для CD58 - LFA-2. К семейству интегринов относятся VLA-4 (a4b1) - CD49d/CD29, VLA-5 (a5b1), LFA-1 (a4b2) - CD11a/CD18, Vn - рецептор (a4b3) - CD51/CD61. Для CD49d/CD29 предполагаемыми лигандами могут быть фибронектин, VCAM-1. Для CD11a/CD18 лигандами считаются ICAM-1. Кроме этого выделяется L-селектин - CD62L с лигандами CD15 и CD65, протеогликан (HCAM-CD44) с лигандной активностью к коллагену и гиалуроновой кислоте.

Более подробная классификация в системе CD семейства интегринов представлена в материалах «5-th - International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens» [143]. К семейству интегринов относятся антигены VLA1-6 с L1-6 цепями, что соответствует CD49a-f. В данной классификации к молекулам адгезии отнесены CD15s, CD44, CD44R (эпитоп CD11), CD50 (ICAM-3), CD102 (ICAM-2), CD103, CD104 (b4 интегрин), CD51/61, CD62e (E-селектин), CD62L и P.

Изучение взаимодействия дифференцировочных антигенов и молекул адгезии при ЛПЗ позволяет получить новые данные о межклеточном взаимодействии при этих заболеваниях. Так при ХЛЛ ключевой диагностический дифференцировочный антиген CD23 через систему лигандов взаимодействует с семейством β_2 - интегринов. В культуре лимфоцитов показано, что взаимодействие CD23 и CD18 (LFA-1) регулирует гомо и гетероклеточную агрегацию, что может контролировать клеточный рост при ХЛЛ [13].

При ММ, осложненной почечной недостаточностью, показана высокая экспрессия рецепторов ламинина (CD49b,f) и дефицит рецепторов фибронектина (CD49d,e). Поражение почек может быть обусловлено взаимодействием β_1 цепей интегрин плазматических клеток и белками экстрацеллюлярного матрикса почек [77, 59].

Изучение широкого спектра молекул адгезии на лимфоцитах крови и лимфоидных элементах костного мозга при плазмноклеточной лейкемии, включающих CD11a (LFA-1a), CD18 (LFA-1b), CD11b, CD29, CD49d, CD44 (H-CAM), CD54 (ICAM-1), CD56 (N-CAM), позволило выявить отличия от типичной ММ. При Плазмноклеточной лейкемии были повышена экспрессия CD38, CD54, CD138 и снижена CD18 и CD11 [146, 92]. На наш взгляд это очень важное положение, позволяющее понять сущность диссеминации опухолевых процессов вообще. Для ХЛЛ доказано [36, 136], что экспрессия ICAM-1 (CD54) и VCAM (CD106) отсутствует на лимфоцитах и достаточно отчетливо представлена в сосудах и строме селезенки. На основании этих данных можно предполагать, что накопление клеток в тканях (органомегалия) происходит за счет взаимодействия стромальных молекул адгезии и их лигандов на опухолевых клетках (CD11, CD18), что вызывает блокирование апоптоза [95]. В соответствии с этими рассуждениями при плазмноклеточной лейкемии снижение экспрессии CD18 и CD11 на опухолевых клетках, являющимися лигандами тканевых ICAM-1 (CD54), может обуславливать их слабую адгезию к строме костного мозга и выход в циркуляцию.

Сравнительное изучение молекул адгезии на лимфоидных элементах крови и костного мозга у больных ММ и здоровых лиц выявило существенные различия [123]. Количество CD54 и CD56 было больше, чем в контроле и в костном мозге и в крови, а CD18 снижены и в костном мозге и в крови. Это указывает на имеющиеся нарушения экспрессии CD44 (H-CAM), CD54 (ICAM-1), CD11a (LFA-1a), CD18 (LFA-1b), CD56 (N-CAM), что предполагает **нарушение взаимодействия между опухолевыми клетками и стромой. Отмечено так же, что Т-клеточный лимфопозз зависит от взаимодействия адгезивных молекул со стромой костного мозга и адгезия CD4+ CD8+ происходит за счет CD11a, CD49d, CD90 [167].**

Исследования экспрессии молекул интегрина на опухолевых клетках при диффузной крупноклеточной лимфоме выявило четкую зависимость с клиническими данными [153]. Отсутствие экспрессии α_2 - α_4 и β_1 цепей интегрина было связано с достоверно большей 5-летней выживаемостью.

Очень важные клинические характеристики были получены при изучении острого миелобластного лейкоза в зависимости от степени экспрессии CD11b, CD54, CD31, CD58 [17, 53, 140, 119]. Экспрессия CD11b на опухолевых клетках была характерна для моноцитоидных вариантов ОМЛ и была связана с более короткой выживаемостью, а экспрессия CD54 в ремиссии свидетельствовали о минимальной остаточной опухоли.

Большое клиническое значение имеет определение в сыворотке крови растворимых молекул адгезии при ЛПЗ [75]. Изучение сывороточной концентрации SICAM и SVCAM у больных с НХЛ установило повышение уровня этих показателей (753 ng/ml и 1792 ng/ml - при норме 157 и 378 - соответственно). У больных с промежуточной или высокой степенью злокачественности эти уровни значительно выше, чем в группе низкого малигнитета, и зависели от ответа на терапию и коррелировали с уровнем ЛДГ [137, 165].

При ХЛЛ концентрация SVCAM-1 достоверно различалась по стадиям А, В, С, и составляла 2079 ± 1383 , 2826 ± 1577 , 3882 ± 1067 (ng/ml). Корреляционный анализ (Sperman) показал высокую корреляцию SVCAM-1 и SICAM-1, которая составляет 0,58. Корреляции так же отмечены между ЛДГ и SICAM-1 (0,3). Учитывая изложенные данные, очевидно, что растворимые молекулы адгезии, которые являются, по-видимому, продуктом протеолиза клеточных молекул, могут служить интегральным критерием массы опухоли при ХЛЛ. Экспрессия адгезивных молекул на опухолевых клетках при ХЛЛ может сочетаться с делецией 11g и 6q и массивной лимфоаденопатией [115, 56]. Следует подчеркнуть, что при ХЛЛ адгезия опухолевых клеток к строме костного мозга была значительно ниже, чем у здоровых лиц. Полученные результаты могут объяснять лейкемические варианты болезни [86]. Большой интерес для клиники представляют работы, изучающие влияние преднизолона на экспрессию молекул адгезии на циркулирующих моноцитах [52]. После назначения преднизолона значительно снижалась экспрессия ICAM-1 (CD54), VLA-4 (CD49d), LFA-3 (CD58). Этим объясняется противовоспалительное действие преднизолона, прерывающего контакты клеточных элементов, принимающих участие в воспалительных процессах.

Установлено, что при ММ экспрессия адгезивных молекул на опухолевых клетках CD44-9v (изоформа CD44) является важным прогностическим фактором, регулирующим адгезию к стромальным клеткам костного мозга [87]. Это связано с тем, что адгезивные молекулы влияют на продукцию ИЛ-6, который является аутокринным и паракринным фактором роста миеломы. Экспрессия данного маркера коррелирует с 3 стадией, низким уровнем Hb, прогрессирующем течение болезни [151, 164].

Интегрин VLA-4, который экспрессируется плазматическими клетками при ММ, прикрепляется к своим лигандам стромы костного мозга VCAM-1 и фибронектину. Это взаимодействие обеспечивает локализацию процесса в костном мозге и активизирует рост опухоли через продукцию ИЛ-6 [140]. В то же время экспрессия нейроадгезивной молекулы CD56 на опухолевых плазмочитах не является специфической для ММ [78].

При сравнении экспрессии адгезивных молекул на плазматических клетках при ММ (CD138 - синдиан-1, β_1 - β_2), CD56 и CD38, которые опосредует взаимодействие с эндотелиальными клетками, установлено, что низкая экспрессия CD56 коррелировала с большей инфильтрацией костного мозга по трепану и повышенным количеством плазматических клеток в крови [44, 129, 131]. Важной особенностью экспрессии синдикана-1 является его свойство присутствовать только на клетках с заблокированным апоптозом, что имеет большое клиническое значение [80].

Стромальные элементы костного мозга при ММ продуцируют более высокий уровень стромальных молекул (фибронектин), которые связывают опухолевые плазмочиты и стимулируют их рост [61]. Процесс перехода лимфоцитов в миеломные плазматические клетки регулируется многими поверхностными маркерами, в том числе молекулами адгезии (CD11a, CD11c, CD103) [129].

Убедительным подтверждением регулирования опухолевого роста при ММ за счет взаимодействия адгезив-

ных молекул и стромы костного мозга является действие антител к LFA-1, VLA-4, CD44 в культурах костного мозга. Было показано [22], что при этом блокируется синтез ИЛ-6, который является фактором роста миеломы.

При изучении экспрессии молекул адгезии и клинического течения ХЛЛ были выявлены определенные корреляции [50, 49]. Так неблагоприятное клиническое течение ХЛЛ было связано с экспрессией молекул адгезии суперсемейства Ig (CD54 и CD58 и CD11/CD18+), а так же хоминг-рецептора (CD44). Благоприятное течение заболевания в этих наблюдениях отмечено при отсутствии экспрессии адгезивных молекул семейства интегринов (β_1 , β_2 , β_3).

Интеграция цитоскелета опухолевой клетки с экстрацеллюлярным матриксом при ХЛЛ влияет на клиническое течение болезни. Изучение экспрессии различных молекул адгезии CDW 49C (VLA-3), CDW 49d (VLA-4), CD11a/CD18 (LFA-1), CD50 (ICAM-3), CD54 (ICAM-1) показало обратную зависимость между экспрессией указанных маркеров и стадией болезни [23]. При ХЛЛ увеличение размеров печени и селезенки ассоциировалось с низкой экспрессией адгезивных молекул группы селектина (CD26L - <50%), а спленомегалия сочеталась с высокой экспрессией CD54 и CD11a (>50%).

При изучении прогностического значения экспрессии молекул адгезии при В-ХЛЛ были выявлены корреляции с клиническими проявлениями болезни [111]. Установлено, что экспрессия CD44 выявлена у больных с увеличением печени, лимфоаденопатией, CD54 коррелировала со стадией, прогрессированием болезни, увеличением лимфатических узлов, а экспрессия VLA выявлена при гепатомегалии. При «А» стадии В-ХЛЛ была высокая экспрессия CD11b (MAC-1), что может быть связано с апоптозом, а атипичная морфология и повышение CD20 отмечены при высокой экспрессии LFA-1 и VLA-4 интегринов [11].

Большой интерес представляет проблема экспрессии молекул адгезии на стволовых кроветворных клетках, в связи с тем, что их оптимальное взаимодействие со стромой костного мозга обеспечивает нормальный морфологический состав и функцию кроветворных элементов. Известно [93, 71, 125], что β_1 интегрины (VLA-4) и CD62L играют основную роль в мобилизации и хоминге CD34. Кроме адгезивной функции VLA-4 может усиливать пролиферацию CD34 клеток. Кроме этого антитела к VLA-4 служат для мобилизации и концентрации CD34 клеток, что очень важно для решения проблемы трансплантации стволовых клеток при высокодозной противоопухолевой химиотерапии. При ОМЛ и В-ОЛЛ CD34 клетки имели низкую экспрессию VLA-2, VLA-3, но молекулы ICAM-1 были представлены с большей частотой по сравнению с контролем. Следовательно, эти антигены могут быть использованы для идентификации минимальной резидуальной болезни. Исследование α и β интегринов, опосредующих адгезию CD34+ клеток со стромальными лигандами при ХЛЛ, показало, что этот процесс происходит под влиянием ИЛ-3 [144].

III. Клиническое значение экспрессии FAS/APO (CD95) при лимфопролиферативных заболеваниях.

Программированная клеточная гибель (апоптоз) является фундаментальным биологическим процессом и в

настоящее время активно изучается при заболеваниях лейкемической природы [1, 2, 5, 150]. Рассмотрение патогенеза хронических лейкозов с позиций блокирования апоптоза позволяет считать кумулятивные процессы одними из ведущих в прогрессировании этих болезней. Вполне понятно, что такой важный признак опухолевой клетки, каким является стабильно воспроизводимый мембранный антиген CD95/FAS-APO, ассоциированный с апоптозом, имеет большое клиническое значение. Если полагать, что нарастание массы опухоли связано с уменьшением активности апоптоза, то изучение экспрессии CD95 является важным направлением в прогнозировании течения болезни. Динамика экспрессии CD95 в процессе противоопухолевого лечения может представлять достаточный интерес с точки зрения эффективности воздействия на опухоль или определения формирующейся лекарственной устойчивости. Это подтверждается результатами исследований [5], где было установлено отсутствие экспрессии CD95 на опухолевых плазмочитах костного мозга у больных с ММ в фазе сформировавшейся лекарственной устойчивости. О связи экспрессии CD95 с лекарственной устойчивостью свидетельствуют так же исследования, где установлены различия между CD95+ и CD95- миеломными клеточными линиями. При CD95+ фенотипе отмечена более высокая пролиферативная активность и более высокая чувствительность опухолевых клеток к мелфалану (по LD50 более чем в 50 раз), экспрессия - Вах, более высокая экспрессия FAS/APO-1 при индукции доксорубицином [94]. В то же время у больных с первично установленным диагнозом ММ, опухолевые лимфоциты костного мозга экспрессировали CD95 [5], а индукция апоптоза дексаметазоном сопровождалась исчезновением синди-кан-1 с поверхности миеломной клетки [80]. Аналогичные исследования, проведенные у больных ХЛЛ, показали, что нарастание массы опухоли сопровождалось повышением экспрессии CD95. Однако это могло свидетельствовать лишь о неэффективной компенсаторной активации апоптоза. При анализе парной экспрессии: CD95 и CD20, CD95 и CD23, CD24 и CD95, CD5 и CD95, CD95 и HLA-DR, CD19 и CD25, выявлены достоверные обратные корреляции, что позволяет расценивать нарастание массы опухоли как кумулятивный процесс.

Более глубокие исследования механизма накопления опухолевых клеток при ХЛЛ показали, что ингибирование апоптоза в CD19+ CD20+ лимфоцитах связано с их адгезией к строме костного мозга [95, 122, 120]. Показана так же роль в этом процессе взаимодействия CD40, BCL-2, CD95 [96, 60]. На регуляцию апоптоза при ХЛЛ индуцируемого анти-IgM влияет так же BCL-2/BAH отношение [116]. При этом отмечено, что FAS-FAS-лиганд взаимодействие является индуктором апоптоза.

Активация апоптоза при ХЛЛ возможна при воздействии верапамила и ИЛ-4, что сопровождалось появлением CD10 [14, 88, 79, 101], а так же при УФО лимфоцитов *ex vivo*, когда FAS/APO-1 активируется в CD4 и CD8 лимфоцитах [18, 118, 20]. Показано так же [51], что флюора индуцирует апоптоз через CD40-CD40L взаимодействие. Изучение клинического значения растворимого FAS/APO-1 (CD95) в сочетании с CD38 при ХЛЛ показало, что экспрессия этих маркеров коррелировала с плохим клиничес-

ким прогнозом. При SCD95+ и CD38+ фенотипе отмечены В и С стадии болезни, короткое время удвоения массы опухоли, на 30% меньше полных ремиссий, на 38% меньше случаев с 8 летней выживаемостью [48].

Таким образом, вышеизложенное свидетельствует о том, что проблема иммунофенотипирования лимфоцитов при лимфопролиферативных заболеваниях является одним из основных направлений изучения данной патологии. Очевидный прогресс этих исследований заключается в том, что получены новые результаты, касающиеся функции дифференцировочных антигенов. Последние определяют не только линейную принадлежность опухолевых клеток, но и участвуют в процессах межклеточного взаимодействия, что оказывает существенное влияние на формирование основных синдромов ЛПЗ. Важная научная информация получена при изучении роли молекул адгезии в развитии лейкоемизации, органомегалии, неврологических осложнений при ЛПЗ, что обусловлено взаимодействием опухолевых клеток с элементами стромы костного мозга и лимфоидных органов. Важным является положение о том, что при взаимодействии молекул адгезии опухолевых клеток со своими лигандами в строме органов возникают сигналы, блокирующие апоптоз, что приводит к накоплению опухолевых клеток с развитием соответствующей клинической симптоматики.

Следует подчеркнуть, что иммунофенотипирование ЛПЗ имеет очень большое клиническое значение, так как экспрессия дифференцировочных антигенов, молекул адгезии, антигена апоптоза на опухолевых клетках может являться важным фактом прогнозирования течения болезни. Вместе с тем, в интересной проблеме иммунофенотипирования ЛПЗ имеется много противоречивых и недостаточно достоверных сведений, что служит убедительной предпосылкой для продолжения исследований в этом направлении.

Литература

- Барышников А.Ю., Заботина Т.Н., Седыхина Н.П., Хорошко Н.Д., Туркина А.Г., Палкина Т.Н. и др. Кокспрессия антигена CD34 ранних гемопатических предшественников и антигена FAS/APO-1, опосредующего апоптоз. Экспериментальная онкология 1994, 16, 4-6, с. 343-347.
- Барышников А.Ю., Шелепов В.П., Кузнецов С.В., Шишкин Ю.В. и др. Экспрессия и проявление функциональной активности FAS/APO-1/CD95 антигена, опосредующего апоптоз при гемобластозах у человека. Гематол. и трансфузиол. 1996, 5, 42-44.
- Голенков А.К., Митерев Г.Ю., Попов В.М., А.Л. Шахер. Клиническое значение иммунологического фенотипа Неходжкинских лимфом. Тер. архив, 1995, 7, 30-31.
- Голенков А.К., Кисилев А.М., Кедров А.В., Седов К.В., Луцкая Т.Д., Полосухина Е.Р. Корпородез грудного позвонка графитовым эндопротезом у больной множественной миеломой с опухолевой компрессией спинного мозга с последующей интратекальной профилактикой нейрорецидива циклофосфаном. Труды участников конференции по противоопухолевой химиотерапии. М. 1996, с. 50-51.
- Шишкин Ю.В. CD95 опосредованный апоптоз в лейкозных и нормальных кроветворных клетках. Автореферат дисс. докт. М. 2000, с. 58.
- Ajdukovic R., Svoboda-Beuson I., Bendeljak K., Kusec R. et al CD31 overexpression is associated with poor prognosis in Multiple Myeloma. The Hematology journal 2001, v1, s1, p.36.
- Aladle D.A., Jawisch H.E., Awad M.A. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 (SVCAM-1) is it a marker of microvascular complications in diabetes? Haematologica 1999, 84, EHA-4, abst. beon p. 42.
- Amiot L., Onno M., Lamy T., Dauriac C., Le Prise P.-G., Fauchet R., Dremont. Loss of HLA molecules in B Lymphomas is associated with an aggressive clinical course. Brit. j. Haematology 1998, 100, p 655-663.
- Barille S., Thabard W., Robillard N., Moreau Ph., Pineau D., Garoussean J.-L., Bataille R., Amiot M. CD130 rather than CD126 expression is associated with disease activity in multiple myeloma. Brit. j. Haematol, 1999, 106, p 532-535.
- Bandonin F., Philip P. J. M., Ducaillar A., Sudaka I., Alterescu R., Bayle J., Goguel A. Quantitative expression of CD37 in lymphoproliferative disorders: a correlative study with the Matutes scoring system. Hematol. Cell Ther., 1997, 39, SI p. 567.
- Benet I., Marugan I., Martinez-Climent J.A., Terol M. Jetal. Adhesion molecules (MA) in B-cell clinical, biological and cytogenetic correlations. The Hematology journal, 2000, VI, SI, p. 89.
- Berger F. Indolent lymphomas. Different entities and diagnostic problems. EHA-5-Ed. Book 5-th Congress 2000, h. 1-6.
- Berger R., Hilgarth M., Hubmann R., Jruher J., Shehatam M. Down regulation of CD23 expression in B-cell by counterreceptor blockade. Haematologica, 1999, 84 EHA-4, abstr. book, p. 25-25.
- Berrebi A., Bassons L., Shvidel. Spontaneous apoptosis in B-cell variations according to maturation stages and enhancement with verapamil. Hematol. Cell Ther., 1997, 39, SI p. 581.
- Besostri B., Beggiato E., Bianchi A., Mariani S., Coscia M., Peola S., Foglietta M., Boccadoro M., Pileri A., Moretta L., Massaia M. Britt. Haematol., 2000, 109, 1, 46-53.
- Bezares R.F., Murro H.H., Diaz A.F., Saidon J. Prevention of infections events with immunoglobulin A (IgA) nebulisations in patients with chronic lymphoproliferative disorders treated with purine analogues. Hematol Cell Ther, 1997, 39, SI p. 583-584.
- Bila J., Kraguljak N., Boskovic D., Jankovic J. Prognostic value of CD11b expression in acute myeloid leucemia. Haematologica, 1999, 84, p. 147.
- Bladon I., Taylor P.C. CD4+ helper and CD8+ cytotoxic T lymphocytes are equally sensitive to apoptosis induced by extracorporeal photopheresis. The Hematology, 2000, I, 1, 11.
- Bladon J., Taylor P.C. The apoptotic effect of extracorporeal photopheresis using the XTS versus NVAR system. Haematologica, 1999, 84, p. 105.
- Bladon I., Taylor P.C. CD4+ helper and CD8+ cytotoxic T-lymphocytes are equally sensitive to apoptosis induced by extracorporeal photopheresis. The Hematol. j, 2000, IV, SI, p. 14.
- Blasinska-Morawiec M., Blonski J., Robak T. Serum cytokines and immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in patients with B-cell treated with. The Hematol. j. 2000, VI, SI, p. 92.
- Blom A.C., Lamme T., De Smet M., Kok H., Vooijs W., Wijdenes J., Boom S.E., Lokhorst H.M. Long-term bone marrow cultured stromal cells regulate myeloma tumour growth in vitro: studies with primary tumour cell and LTBMK-dependent cell lines. Brit. j. Hematol., 1998, 100, 166-175.
- Blonski J.Z., Niewiadomska H., Najder M., Fronzak A., Krykowski E. Expression of surface adhesion molecules and clinical staging in B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-cell). Hematol Cell Ther, 1997, 39, SI, p. 76.
- Brouwer R.E., Zwinfeman A.H., Klin-Nelemans H.C. The expression of co-stimulatory and adhesion molecules on acute myeloid leukaemia: implications for immunotherapy. Haematologica, 1999, 84, p. 135.
- Brugnoni D., Rossi I., Tucci A., Cattaneo R., Airo P. Study of CD40 ligand expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Haematologica, 1995, 40, 440-42.

26. Bumbea H., Vladareanu A.M., Cisleanu D., Barbu D. et al. The variable expression of CD23 in CD5 positive lymphoproliferative disorders a clue in diagnosis and prognosis. *The Hematology journal* 2001, v7, s1, p.48.
27. Caligaris-Cappio F. Relationship between autoimmunity and immunodeficiency in CLL. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. 13-16.
28. Callea V., Stelitano C., Oliva B.M., Filanqueri M., Musolino C., Morabito F., Iacopino P., Nobile ., Brugiattelli M. Surface CD14 positivity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is related with the clinical outcome. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. 590.
29. Callea V., Morabito F., Oliva B.M., Levato D., Dattilo A., Gangemi F., Gorfida A., Iacopino P., Nobile F., Molica S., Brugiattelli M. Surface CD14 positivity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is related to clinical outcome. *Brit. j. Haematology*, 1999, 107, 347-352.
30. Camera A., Pezzullo L., Villa M.R., Luciano L. Coexistence of two distinct cell population (CD56+ TCRgd+ and CD56+ TCRgd-) in a case of aggressive CD56+ lymphoma/leukaemia. *Haematologica*, 2000, 85, p.496 - 501.
31. Camp B.V., Vanderkerken, Bakkus M., Riet I.V. New insights into myeloma biology. 5-th Congr. of the EHA. Ed. book, 2000, Birmingham, p. 36-41.
32. Catovsky D., Pawson R., Dyer M.j.S., Barge R., Matutes E., Thornton P.D., Emmett E., Kluin-elemans J.C., Fibbe W.E., Willemsen R. Successful treatment of T-cell prolymphocytic leukaemia with human CDw52 antibody, CAMPATH-1H. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. 599.
33. Catovsky D. How do we recognise and manage B-cell leukaemias and lymphomas? *Leukaemia and Lymphoma*, 1998, VI, ISS-1, p. 11.
34. Catovsky D. Morphology, atypical chronic lymphocytic leukaemia and prognostic features affecting choice of therapy. *Haematologica*, 1999, 84 (EHA-4 ed. book), p. 92-93.
35. Chen J.R., Yin B.J., Lan-Phuong Dao, Bradley C.J., Mulligan S.P., Wiley J.S. Transendothelial migration lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia is impaired and involves down-regulation of both L-selection and CD23. *Brit. j. Haematology*, 1999, 105, 1, 181-189.
36. Christiansen I., Sundstrom C., Torremans T. Elevated serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (SVCAM-1) closely reflect tumor burden in chronic B-lymphocytic leukaemia. *Brit. j. Haematology*, 1998, 4, 103, 1129-1137.
37. Clark P., Boswell F., Pearson C., Walker I.D., Grur I.A. Thrombin induction of ICAM-1 on monocytes and the relationship between monocytes ICAM-1 and plasma ICAM-1 in pregnancy. *Haematologica*, 1999, 84, p. 184.
38. Clark E.A. Regulation of signalling the B-lymphocyte antigen receptor complex. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39 S1, p. 555.
39. Clementson K.J., Clementson J.M. Hereditary disorders of platelet receptors for adhesive proteins: collagen and von Willebrand factor. *Hematologica*, 1999, 84, p. 129.
40. Cohen P.L., Kurtin P.J., Donovan K.A., Hanson C.A. Bone marrow and peripheral blood involvement in mantle cell lymphoma. *Brit. j. Haematology*, 1998, 101, 302-310.
41. Corin D., Vasilica M., Dumitrescu A., Dobrea C. Clinical and biological analysis of mantle cell lymphoma. A single centre experience. *The Hematol. j.*, 2000, VI, S1, p. 176.
42. Criel A., Verhoef G., Vlietinck R., Meccucci C. Further characterisation of morphologically defined typical and atypical CLL: a clinical, immunophenotypic, cytogenetic and prognostic study in 390 cases. *Brit. j. of Haematol.*, 1997, 97, 383-391.
43. Criel A., Verhoef G., Vlietinck R., Meccucci C., Billiet J., Michaux L., Van Hoof A., Boogaerts M., Van den Berghe H., De Wolf-Peters C. Typical and atypical cell: two different entities. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p.93.
44. Daniels J.T., Davis B., McGrail L.H., Byrd C. Clonal selection of CD56+ t(8:21) AML blast: further suggestion of the adverse clinical significance of this biological marker? *Brit. j. Haematology*, 1999, 107, 381-383.
45. D'Arena G., Cascavilla N., Musto P., Bisogno R.C. CD79b expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Haematologica*, 2000, 85, p.556-557.
46. D'Arena G., Nunziata G., Cascavilla N., Colella-Bisogno R. et al. Antigenic density of surface antigens in B-ctll chronic lymphocytic leukemia evaluated by means of quantitative flow cytometry. *The Hematology journal* 2001, v1, s1, p. 42.
47. Dattilo M.S., D. Levato. Clinical relevance of the intensity of CD20 antigen in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. 565-566.
48. Del Poeta G., Maurillo L., Suppo G., Venditti A. Both high CD38 and soluble APO-1/FAS (CD95) correlate with advanced stages and a poor outcome in B chronic lymphoid leukaemia (B-cell). *The Hematol. j.*, 2000, VI, S1, p. 91.
49. De Rossi G., Zarcone D., Mauro F., Cerruti G. Adhesion molecule expression on B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-cell). A study of 74 cases. *Leukaemia and Lymphoma*, 1994, V13, S-1, p. 124.
50. De Rossi G., Zarcone D., Mauro F.R., Cerruti G., tenca C., Molica S., Grossi C.E. Adhesion molecule expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p.575.
51. De Toter D., Tazzari P.L., Clavio M., Catellani S. Modulation of Fludarabine - induced apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) B-cell following CD40- CD40L interaction. *The Hematol. j.*, 2000, VI, S1, p.90.
52. Dettke M., Dreer M., Horvath, Leither G., Hocker P. Treatment with prednisolone reduces the monocytes in healthy men. *Haematologica*, 1999, 84, p.255.
53. De Waele M., Reumans W., Jochmans K., Schots Abberant expression of adhesion molecules on CD34+ cells of acute leukaemia. *Brit. j. Haematology*, 1998, 102, 1, ISH-EHA, p.161.
54. Dighiero G. Chronic lymphocytic leukaemia treatment. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. 531-540.
55. Dmoszynska A., Domanski D., Rolinski J., Bojarska-Junak A. Immunophenotype changes in multiple myeloma patients during thalidomide treatment. *The Hematol. j.*, 2000, VI, S1, p.167.
56. Dohner H., Stilgenbauer S., Fischer K., Bentz M., Lichter P. Cytogenetic and molecular cytogenetic analysis of B-cell chronic lymphocytic leukaemia: specific chromosome aberration identify prognostic subgroup of patients and point to loci of candidate genes. *Leukaemia*, 1997, 11, S2, p. 19-24.
57. Donfrid M., Jankovic G., Cemerik V., Kraguljac N. CD25 and Lambda expression in mantle cell lymphoma. *The Hematol. j.*, 2000, VI, S1, p.173.
58. Dyer M.j.S., Siebert R., Willis T.G., Schlegelberger B. The molecular pathogenesis of high grade non-Hodgkin's lymphoma. 5-th Congr. of the EHA, ed. book Birmingham, 2000, p. 31-35.
59. Ekblom M., Yu J. Laminins containing $\alpha 5$ chain are expressed in bone marrow and are adhesive to multipotent haematopoietic FDCP-mix cell. *Haematologica*, 1999, 84, p.255.
60. Elliot M.A., Letendre L., Chin-Yang Li, Hoyer J.D., Hammack J.E. Chronic lymphocytic leukaemia with symptomatic diffuse central nervous system infiltration responding to therapy with systemic fludarabine. *Brit. j. Haematology*, 1999, 4, 104, 689-694.
61. Fernandes M., Alarcon G. Alternations in bone marrow stromal cells function in multiple myeloma. *Brit. j. Haematology*, 1998, 102, 1, ISH-EHA, p.350.
62. Finn W.G., Thanagavelu M., Gelavarthi K.K., Goolsby C.L. Karyotype correlates with peripheral blood morphology and

immunophenotype in chronic lymphocytic leukaemia. American j. of Clinical Pathology, 1996, 105, 458-467.

63. Fossa A., Brandhorst D., Seeber S., Nowrousian M.R. Relation between anemia tumor cell cycle activity in multiple myeloma. Acta Haematologica, 1997, 98, S1, p.71.

64. Frassanito M.A., Silvestis F., Cafforio P., Dammacco F. CD8+/CD57+ cells and apoptosis suppress T-cell function in multiple myeloma. Brit. j. Haematology, 1998, 100, 469-477.

65. Fujii R., Ishikawa H., Mahmood M.S., Asaoku H., Kawano M.M. MPC-1- CD49e- immature myeloma cells include CD45+ subpopulations that can proliferate in response to IL-6 in human myelomas. Brit. j. Haematology, 1999, 105, 1, 131-140.

66. Gahn B., Wenderburg B., Troff C., Neef J., Grove D., Haeflrich T., Hindemann W., Wormann B. Analysis of progenitor cell involvement in B-cell by simultaneous immunophenotypic and genotypic analysis at the single cell level. Brit. j. Haematology, 1999, 105, 955-959.

67. Geister C.H., Philip P., Egelund Christensen B., Hou-Jensen K. Trisomy-12 is found in cell with both typical and atypical immunophenotype and has no prognostic significance. Hematol. Cell Ther., 1997, 39, S1, p. 568.

68. Ginaldi L., Dastino A., De Martinis M., Loreto M.F., Marini L., Martorelli V., Quaglino D. The value of immunophenotypic analyses in the characterization of B-cell. Brit. j. Haematology, 1999, S1, 105, p.83-83.

69. Gonzalez-Barca E., Domingo-Claras A., Fernandez-Sevilla A., Salar A., De La Banda E., Alouso J., Granena A. Expression of **adhesion molecules in peripheral B-lymphocytes from patients with chronic lymphoproliferative disease: relationship with clinical features.** Hematol. Cell Ther., 1997, 39, S1, p. 76-77.

70. Golenkov A.K., Sedov K.V., Mitina T.A., Polosukhina E.R., Baryshnikov A.G., Zabolina T.N., A.-L. Shacher, A Khal Q. **Immunophenotypic identification of residual disease in extranodal non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma.** Experimental Haematol., 1995, 23, 8, p.763.

71. Gordon M.G., Marley S.B., Davidson R.J., Lewis J.L. CD34 - an adhesion and signalling molecule for haemopoietic progenitor cell. Brit. j. Haematology, 1998, 102, 1, ISH-EVA, p.161.

72. Greil R., Gruber J., Hausmaninger H., Hohenbalken M., Lang A., Fudrik M., Seewann H., Michemayr G., Oberaiger W., Guste G. Fludarabine monophosphate (Fludara) induction and interferon- α 2b (Intron?A) maintenance therapy in patients with B-cell and immunocytic lymphoma: an Austrian multicentre phase II trial. Hematol. Cell Ther., 1997, 39, S1, p.97.

73. Grogan T.M., Durie B.G.M., Spier C.M., Richter L., Vela E. Myelomonocytic antigen positive multiple myeloma. Blood, 1989, 73, 763-769.

74. Hamblin T.J. Autoimmune haemolytic anaemia in patients treated with purine analogues. Hematol. Cell Ther., 1997, 39, S1, p. 559.

75. Hatzimichael E., Makis A., Chaidos A., Christou L. Soluble adhesion molecules in plasma cell leukaemia. The Hematol. j., 2000, VI, S1, p.163.

76. Hausor I., Simonitsch I., Ott G., Weltermann A. The plasmablastic variant of diffuse large B-cell lymphoma is associated with very poor clinical outcome. The Hematol. j., 2000, VI, S1, p.182.

77. Javniak D., Dmoszynska A., Goracy A. The role of b1-integrins in pathogenesis of renal failure in patients with multiple myeloma. Haematologica, 1999, 84, EHA-4, abst. book, p. 28-28.

78. Javniak D., Dmoszynska A., Goracy A., Krawczyk P. Is antigen CD56 (neural cell adhesion molecule N-CAM) characteristic of malignant plasma cell? Brit. j. Haematology, 1998, 102, 1, ISH-EHA, p.350.

79. Jones D.L., Wickzemasinghe R.G., Mehta A.B., Prentice H.G. The role of induced FAS expression in the killing of B-chronic lymphocytic leukaemia cells by DNA damaging agents. Haematologica, 1999, 84, p. 106.

80. Jourdan M., Ferlin M., Legouffe E., Horvathova M., Liantard J., Rossi J.F., Wijdenes J., Brochier J., Klein B. The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cell. Brit. j. Haematology, 1998, 100, 637-646.

81. Julinsson G. Complications in the treatment of CLL with purine analogues. Hematol. Cell Ther., 1997, 39, S1, p. 41-44.

82. Kay N.E., Leong T., Bone N., Kyle R., Greipp P.R., Van Ness B., Oken M.M. T-helper phenotypes in the blood of myeloma patients an ECOY phase III trials E948/E3A93. Brit. j. Haematology, 1998, 100, 459-463.

83. Kay H.E., Leong T., Kyle R.A., Greipp P., Billadeau D., Van Ness B., Bone N., Oken M.M. Circulating blood B-cells in multiple myeloma: analysis and relationship to circulating clonal cells and clinical parameters in a cohort of patients entered on the Eastern Cooperative oncology Group phase III E9486 clinical trials. Blood, 1997, 90, 340-345.

84. Kowano M.M., Mahmoud M.S., Ishikawa H. Loss of PAX-5 expression is possibly involved in growth of human myeloma cells. Acta Haematologica, 1997, 98, S1, p.89.

85. Keating M.J. What is the best salvage approach in relapsed B-cell patients? Leukaemia and lymphoma, 1998, vol.1, issue1, p.10.

86. Kibaroglu A., Eksioglu-Demiralp E., Ratp S., Autan M. Increased adhesion of B chronic lymphocytic cells to the bone marrow: role of bone marrow microenvironment. Haematologica, 1999, 84, p. 163.

87. Kilber C., Schermutzki F., Woller H.D., Timpl R., Muller C.A., Klein G. Adhesive interaction of human multiple myeloma cell lines with different extracellular matrix molecules. Cell Adhes. Commun., 1998, 5(4), 307-323.

88. Kimby E., Osterborg A., Mellstedt H. Interleukin-4 (IL-4) therapy in patients with chronic lymphocytic leukaemia of B?cell type (BCLL): clinical and biological effects. Hematol. Cell Ther., 1997, 39, S1, p.597.

89. Kipps T.J., Cantwell M., Sharma S., Kato K. Gene therapy of chronic lymphocytic leukaemia. Hematol. Cell Ther., 1997, 39, S1, p.562.

90. Knauf W.U., Hingenfeld E.I., Schutte H.I., Schroder J., Kath R., Thiel E. Hematol. Cell Ther., 1997, 39, S1, p.88.

91. Koh M.B.C., Lowdel M.W., Prentice H.G. The GvH reaction: the cytokine storm and its effect on lymphocyte alloreactive responses. Haematologica, 1999, 84, EHA-4, abst. book, p.62-62.

92. Krai M., Kopec-Szlezak J., Poglod R. Expression of cytoadhesion molecules in plasma cell leukaemia. Haematologica, 1999, 84, EHA-4, abst. book, p.30-30.

93. Kronenwelt R., Lichterfeld M., Zoller M., Haas R. Mobilisation of CD34+ haemopoietic progenitor cells in vitro by VLA-4 directed antisense oligonucleotides. Haematologica, 1999, 84, p.256.

94. Kuribayashi N., Hata H., Yoshida M., Sonoki T., Nagasaki A., Kimura T., Harada N., Matsuzaki. Establishment and characterization of CD95 (FAS/APO-1) - negative myeloma cell line. Acta Haematologica, 1999, 101, 113-118.

95. Lagneaux L., Delforge A., Bron D., De Bruyn C., Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) CD19+ CD5+ lymphocytes but not normal CD19+ CD5+ lymphocytes are rescued from apoptosis by contact with bone marrow (BM) stromal cells. Hematol. Cell Ther., 1997, 39, S1, p.574-575.

96. Laytragoon-Lewin N., Mellstedt H. Down-regulating the apoptosis-mediated CD95 receptor and altered signal transduction through the CD40 receptor in B-chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells. Hematol. Cell Ther., 1997, 39, S1, p. S75.

97. Lazzari M., Borleri G., Dastoli G., Barbui T. Heterogeneous susceptibility of different, freshly isolated B non-Hodgkin's lymphoma cell to Rituximab and complement. *The Hematol. j.*, 2000, VI, S1, p.185.
98. Lemoli R.M., Martinelli G., Oliveri A., Motta M.R., Rizzi S., Terragna C., Leopardi G., Benni M., onconi S., Cantori I., Rondelli D., et. al. Selection and transplantation of antologous CD34+ B-lineage negative cell in advanced multiple myeloma patients: a pilot study. *Brit. j. Haematology*, 1999, 107, 419-428.
99. Lens S.M.A., Drillenburt P., Drijver B.F.A., Gijsvan Schijndel, Pals S.T., Van Lier R.A.W., Van Oers M.H.J. Aberrant expression and reverse signalling of CD70 on malignant B-cells. *Brit. j. Haematology*, 1999, 106, 491-503.
100. Lopez-Matas M., Rodrigues-Justo M., Morilla R., Catovsky D., Matutes E. Quantitative expression of CD23 and its ligand CD21 in chronic lymphocytic leukaemia. *Haematologica*, 2000, 11, p. 1140-1145.
101. Magiola M., Oliva B., Cuzzola M., Cuzzerea, et. al. Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) B-cells express CD10 when undergoing spontaneous apoptosis. *The Hematol. j.*, 2000, VI, S1, p. 90.
102. Maloun K., Magnac C., Azgui Z., Can C., et. al. VH gene expression in hairy leukaemia. *Brit. j. Haematology*, 1998, 101, 171-178.
103. Marmont A.M. Leukaemic meningitis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Resolution following intrathecal methotrexate. *The Hematol. j.*, 2000, VI, S1, p.93.
104. Matutes E., Cabezudo E., Morilla R., Catovsky D. Analysis of residual disease in chronic lymphocytic leukaemia by flow cytometry. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p.98.
105. Matutes E., Moreau E., Zomas A.P., Morilla A., Morilla R., et. al. Revised CLL scoring system including the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. S67.
106. Mecuci C., Van den Berghe H. Cytogenetic and immunophenotype. *Leukaemia and lymphoma*, 1994, 13, S1, p.49-51.
107. Molica S., Dattilo A., Ginlino C., Levato D. Flow cytometric expression of cyclin D1 in typical B-cell CLL allows identification of patients at high risk of disease-progression. *The Hematol. j.*, 2000, VI, S1, p.91.
108. Monserrat E. New therapeutic issues in CLL. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. S45-S49.
109. Morel D., Pages J., Callet-Bauchu E., Baseggio L., et. al. Splenic marginal cell lymphomas in peripheral blood: arguments for the existence of a common type beside SLVL. *The Hematol. j.*, 2000, VI, S1, p. 176.
110. Mitterer M., Oduncu F., Lanthaler A.J., Drexler E., Amaddi G., Fabris P., Emmerich B., Coser P., Strava C. The relationship between monoclonal myeloma precursor B-cells in the peripheral blood stem cell harvests and the clinical response of multiple myeloma patients. *Brit. j. Haematology*, 1999, 106, 737-743.
111. Mulligan S.P., Dao L.P., Walls R.S. Diagnostic and prognostic potential of cell adhesion molecule expression in chronic B-cell leukaemias. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. S77.
112. Mulligan S.P., Dao L.P. A cytokine cascade mediated spontaneous «cycle» phenomenon with fever in a B?cell chronic lymphoid leukaemia. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. 92.
113. Mulligan S.P., Dao L.P., Francis S. B-cell chronic lymphocytic leukaemia with aberrant expression of the CD8 antigen. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. 66.
114. Murasko D.M., Nelson B.J., Silver R., Motour D., Kay D. Immunologic response in an elderly population with a mean age of 85. *m. j. of Medicine*, 1986, 81, 612-618.
115. Osier D.G. Cytogenetic and molecular genetic of chronic lymphocytic leukaemia. *Haematologica*, 1999, 84 (EHA-4 ed. book), p. 88-91.
116. Osorio L.M., Aquilar-Santelises M., de Santiago A., Mellstedt H., Jondal M. Potential role of the BCL-2 gene family in apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. S81-S82.
117. Pagnucco G., Bragotti L.L., Cabrlon S., Corso A., Vane-Ili L. et al. Multiparametric immunophenotyping of bone marrow plasma cells in Multiple Myeloma and MGUS. *The Hematology journal* 2001, v1, s1, p. 102.
118. Pagnucco G., Ardizzone F., Maiocchi M., Vanelli L. et al. Prognostic significance of CD38 and FMC7 expression in chronic lymphocytic leukemia (B-cell). *The Hematology journal* 2001, v1, s1, p. 47.
119. Paietta E., Andersen J., Yunis J., Rowe J.M., Cassileth P.A., Tallman M.S., Bennet J.M., Wiernik P.H. Acute myeloid leukaemia expressing the leucocyte integrin CD11b- a new leukaemic syndrome with poor prognosis: result of an ECOG database analysis. *Brit. j. Haematology*, 1998, 100, 265-272.
120. Panayiotidis P., Ganeshaguru K., Foroni L., Hoffbrand A.V. Expression and function of the FAS antigen in B-chronic lymphocytic leukaemia and hairy cell leukaemia. *Leukaemia*, 1995, 9, 1127-1232.
121. Perutelli P., Cevasco M., Dini G., Comaglia-Ferraris P. Adhesion of cord blood leucocytes to extracellular matrix: a comparative approach to graft-vs-host disease. *Haematologica*, 1999, 84, EHA-4, abst. book, p. 61-61.
122. Pettitt A.R., Griffiths S.D., Cawley J.C. Spontaneous apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is inhibited by homotypic cell-cell contact involving a sialic acid-containing ligand. *Brit. j. Haematology*, 1998, V101, S1, p. 41-41.
123. Poglod R., Kraj M., Kopec-Szlezak J., Kruk B. Patterns of H-CAM, I-CAM, N-CAM and LFA-1 expression on lymphoid cells in multiple myeloma. *Haematologica*, 1999, 84, EHA-4 abstr. book, p. 31-31.
124. Prieto A., Garcia Suarez J., Henander M.P. reyes E., et. al. Expression of CD25 and CD38 by leukaemic B-cells improves the definition of risk of patients on early stage B-CLL patients. *The Hematol. j.*, 2000, VI, S1, p. 91.
125. Pruijt J.F.M., Figdor C.G., Van Kooyk G., Willemze R., Fibbe W.E. Murine haemopoietic progenitor cells do not express LFA-1. *Brit. j. Haematology*, 1998, 102, 1, ISH-EHA, p. 160.
126. Rasmussen T., Kastrop J., Knudsen L.M., Johnsen H.E. High number of clonal CD19+ cells in the peripheral blood of patient with multiple myeloma. *Brit. j. Haematology*, 1999, 105, 1, 265-267.
127. Rasmussen T., Jensen L., Hohore L., Andersen H., Johnsen H.E. Circulating clonal cells in multiple myeloma do not express CD34 in RNA, as measured by single-cell and real-time RT-PCR assays. *Brit. j. Haematology*, 1999, 107, 818-824.
128. Rawstorn A.C., Davies F.E., Owen R.G., English A., Pratt G., Child A., Jack A.S., Morgan G.J. B-lymphocyte suppression in multiple myeloma is a reversible phenomenon specific to normal B-cell progenitors and plasma precursors. *Brit. j. Haematology*, 1998, 100, 176-183.
129. Rawstorn A.C., Barrans S.L., Blythe D., Davies F.E., English A., Pratt G., Child J.A., Jack .S., Morgan G.J. The degree of blood and marrow plasma cell infiltration depend on CD56 expression. *Brit. j. Haematology*, 1998, 101, p. 48-48.
130. Rawstorn A.C., Barrans S.L., Blythe D., Davies F.E., English A., Pratt G., Child J.A., Jack A.S., Morgan G.J. Proliferative myeloma plasma cells are at the latest stage of differentiation. *Brit. j. Haematology*, 1998, V101, S1, p. 23-23.
131. Raya J.M., Brito M.L., Gonzales-Brito G., Caballero M.M., et. al. Blood T-helper lymphocyte subsets in patients with monoclonal gammopathies: correlations with treatment status and clinical stage. *The Hematol. j.*, 2000, V1, S1, p. 165.
132. Raya J.M., Brito M.L., Gonzales-Brito G., Caballero M.M., et. al. Plasma cells of patients with «smolderig» myeloma show intermediate phenotypic features between mesus and multiple myeloma. *The Hematol. j.*, 2000, VI, S1, p. 165.

133. Retter W.W., Hopp C., Murr M. A simple staging system for multiple myeloma based on the relations of CD38 positive lymphoid and myeloma cell subpopulations to predict the necessity of chemotherapy. *Acta Haematologica*, 1997, 98, S1, p. 91.
134. Rigolin G.M., Sneddon C., Castoldi G., Mufti G.J. MDS dendritic cells are phenotypically and functionally different from those obtained in healthy subjects. *Haematologica*, 1999, 84, EHA-4, abstr. book, p. 79-79.
135. Rottenburger C., Kiel K., Bosing T., Cremer W., Moldenhauer G., Ho A.D., Goldschmidt H., Moos M. Clonotypic CD20+ and CD19+ B-cells in peripheral blood of patients with multiple myeloma post high-dose therapy and peripheral blood stem cell transplantation. *Brit. j. Haematology*, 1999, 106, 545-552.
136. Sadek I., Layed E., fernandez L.A. Difference in the expression of adhesion molecules on stimulatory normal CD5-B?cells, normal CD5+ B-cells and chronic lymphocytic leukaemia B-cells involved in the antologous mixed lymphocyte reaction. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. S77.
137. Salem M., Elbaz O., Alwady M., Mabel M., et. al. Serum levels of soluble adhesion molecules (ICAM and VCAM-1): efficient biomarkers of disease status and response to therapy in non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *aematologica*, 1999, 84, p. 155.
138. San Miguel J.E., Gonzalez M., Gascon A., Moro M.J., Hernandez J.M., Ortega F., et. al. Immunophenotypic heterogeneity of multiple myeloma: influence on the biology and clinical course of the disease. *Brit. j. Haematology*, 1997, 77, 185-190.
139. Santini V., Gozzini A., Scappini B., Rossi-Ferrini P. TNF- α induced maturation and apoptosis are exclusively mediated by CD120a in primary acute myeloid leukaemia blast. *Haematologica*, 1999, 84, EHA-4, abstr. book, p. 60-60.
140. Sanz-Rodriguez F., Ruiz-Velasco N., Pascual-Salcedo D., Teixido J. Characterization of VLA-4-dependent myeloma cell adhesion to fibronectin and VCAM-1. *Brit. j. Haematology*, 1999, 107, 825-834.
141. Satin H.I.A., Apperley J.F., Greaves M., Lawry J., Gooding R., Graham R., Russel G., Croucher P.I. Interleukin-6 is expressed by plasma cells from patients with multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Brit. j. Haematology*, 1998, 101, 287-295.
142. Schafer G.B., Neef C., Troff C., Feuring-Buske M., Hiddeman W., Wormann B. Detection of leukaemia-associated genetic markers in CD34 positive progenitor cells of patients with B-cells. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. 67.
143. Schlossman S.F., Boumsell L., Gilks W., Harlan J.M., et. al. CD antigens, 1993. 5-th International Workshop on Human leukocyte Differentiation antigens, Boston, USA. *Leukemia and lymphoma*, 1994, 13, S1, p. 59-60.
144. Schofield K.P., Duering J., Rushton G., Testa N., et. al. $\alpha 4 \beta 1$ integrin-mediated adhesion of CD34+ cells from patients with chronic leukaemia: influence of IL-3. *Brit. j. Haematology*, 1998, 102, 1, ISH-EHA, p. 162.
145. Schultze J.L., Seamon M.J., Michalak S., Gribben J.J., Nadler L.M. Antologous tumor infiltrating T-cells cytotoxic for follicular lymphoma cells can be expanded in vitro. *Blood*, 1997, 89, 3806-3816.
146. Schuster-Kolbe J., Ludwig H., Adolf G.R., Heider K.H. Expression of CD44 isoform on isolated bone marrow plasma cells and peripheral CD19+ B-cells of patients with multiple myeloma and healthy individuals. *Lenk lymphoma (Switzerland)* 1999, 34, 1-2, 95-103.
147. Shehata M., Hilgarth M., Berger R., Berer A., et. al. Hairy cell adhesion to bone marrow fibroblasts via VLA-4/VCAM-1 is regulated by TGF- β . *Haematologica*, 1999, 84, p. 257.
148. Schwarzmaier J.D., Shehata M., Hilgarth, Hubman R., Treil R. The role of soluble CD23 in differentiation between stable and progressive forms of B-CLL. *The Hematology journal* 2001, v1, s1, p. 102
149. Serrano D., Monteiro J., batliwala F., Chiorazzi N., Gregersen P.K. Clonal expansion within the CD4+ CD57+ and CD8+ CD57+ T-cell subjects in B?cell. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39S1, p. S72-S73.
150. Skov S., Bregenholt S., Claesson M.H. Class I ligation of human T-cells activates the ZAP 70 and p56lck tyrosine kinases leads to an alternative phenotype of the TCR/CD3 S-chain and induces apoptosis. *Journal of Immunology*, 1997, 158, p. 3189-3196.
151. Stauder R., Bechter O., van Driel N., Thaler J., et. al. CD44-9v - expression represents a new independent prognostic parameter in multiple myeloma. *Brit. j. Haematology*, 1998, 102, 1, ISH-EHA, p. 345.
152. Suut L., O'Connor S.J.M., Richards S.J., Jones R.A., Roberts B.E., et. al. Trisomy 12 is seen within a specific subtype of B-cell chronic lymphoproliferative disease affecting the peripheral blood/ bone marrow and co-segregates with elevated expression of CD11a. *Brit. j. Haematology*, 1998, 101, 165-170.
153. Terol M., Lopez_Guillermo A., Bosch F., Montoto S., et. al. Expression of b-integrin (b ITG) adhesion molecules in diffuse large-cell lymphoma (DLCL). Correlation with initial characteristics and outcome. *Haematologica*, 1999, 84, p. 119.
154. Truman J.P., Choqueux C., Tchopp J., erdenne J., Le Deist F., Charron D., Mooney N. HLA class II mediated death is induced via FAS/FAS ligand interaction in human splenic B-lymphocytes. *Blood*, 1997, 89, p. 1996-2007.
155. Tsekouras C., Angelopoulou M.K., Pangalis G.A. Treatment of B-chronic lymphocytic leukaemia with monoclonal antibodies. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. S102.
156. Turner M., Masek L.C., Hardy C.L., Parker C., Sweetenham W. Comparative adhesion of human haemopoietic cell lines to extracellular matrix components, bone marrow stromal and endothelial cultures. *Brit. j. Haematology*, 1998, 100, 112-122.
157. Vallespi T., Miguel R., Villamor N., Rozman M., Bosch F., Aquilar J.L., Montserrat E., Campo E. *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. S90.
158. Vant Veer M.B., Gratama W. Quality assesment for immunophenotyping of leukaemia and lymphomas: the Dutch experience. *Leukaemia and lymphoma*, 1994, V13, S1, p. 77-79.
159. Vassilakopoulos T.P., Angelopoulou M.K., Gribabis D.A., Ronsson P.A., Pangalis G.A. The evolution of immunoglobulin disorders in B-chronic lymphocytic leukaemia (B?cell). *Hematol. Cell Ther.*, 1997, 39, S1, p. S72.
160. Villario A., Chilosi M., Adami F., Montagna I., Deaglio S., Malavasi F., Caligaris?Cappio F. Human myeloma cells express the CD38 ligand CD31. *Brit. j. Haematology*, 1999, 105, p. 441-444.
161. Vidovic A., Cemerikic V., Petrovic M., Colovic M. T-cell-rich B-cell lymphoma. A clinicopathological study of eleven cases. *The Hematol. j.*, 2000, VI, S1, p. 177.
162. Vladareanu A.M., Gherasim R., Bajenaru O., Mut Popescu D., et. al. Neurological disorders in multiple myeloma. *The Hematol. j.*, 2000, VI, S1, p. 166.
163. Werda L., Zdzilowska E., Mensah P., Skotnicki A.B. The role of BCL-2 in apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia. *The Hematol. j.*, 2000, VI, S1, p. 11-12.
164. Wierbowska A., Urbanska E., Rys H., Robak T. Circulating IL-6 type cytokines and SIL-6R in patients with multiple myeloma. *Brit. j. Haematology*, 1999, 105, 412-419.
165. Wolowiec D., Frydecka I., Kopelko-Slowic K., Potocrek S. et al. Concentration of serum soluble form of ICAM-1 and e-selectin in patients with different phases of non-Hodgkins lymphoma. *The Hematology journal* 2001, v1, s1, p. 140.

166. Woodle E.S., Smith D.M., Bluestone J.A., Kirkman W.M., Green D.R., Skowronski E.W. Anti-human class I MHC antibodies induce apoptosis by a pathway that is distinct from the AS antigen-mediated pathway. *Journal of Immunology*, 1997, 158, p. 2156-2164.

167. Lipori D., Barda-Saad M., Ben-Hamo H., Rozenszajn L.A., et al. Regulation of stroma dependent T-cell lymphopoiesis: involvement of novel sets of adhesion molecules. *Brit. j. Haematology*, 1998, 102, 1 ISH-EHA, p. 160-161.

168. Zweegman S., Veenhof M.A., Huijgens P.C., Drager A.M. Adhesion of megakaryocytic progenitors to fibroblasts in an in vitro

stroma model: role of TPO, VLA-4 and VLA-5. *Haematologica*, 1999, 84, EHA-4, abstr. book, p. 56-56.

169. Yamada O., Wang Yun-Hua, Moto J.I.T., Mizoguchi H. Clonal T-cell proliferation causing pure red cell aplasia in chronic B-cell lymphocytic leukaemia successful treatment with cyclosporine following in vitro abrogation of erythroid colony-suppressing activity. *Brit. j. Haematology*, 1998, 101, p. 335-337.

170. Yuones A., Shell V., Consoli U., Clodi K., Zhao S., Palmer J.L., Thomas E.K., Armitage R.J., Andreeff M. Elevated levels of biologically active soluble CD40 ligand in the serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Brit. j. Haematology*, 1998, 100, p. 135-141.

Клиническое значение растворимых молекул адгезии (sCD50 - ICAM - 3), апоптоза (sCD95) и sHLA класса I при лимфопролиферативных заболеваниях

А.К.Голенков, Т.А.Митина, В.В.Новиков, О.Т.Тагиров В.В.Королева,
М.А.Крыжанов, Т.Д.Луцкая, Д.В.Новиков, А.Ю. Барышников
МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Нижегородский госуниверситет
им. Н.И. Лобачевского, Нижегородский НИИ эпидемиологии
и микробиологии

В настоящее время достаточно большое внимание уделяется изучению роли растворимых молекул дифференцировочных лейкоцитарных антигенов в патогенезе лимфопролиферативных заболеваний (множественная миелома - ММ, хронический лимфолейкоз - ХЛЛ, лимфомы - НХЛ). Функция растворимых молекул остается в значительной степени не уточненной, хотя существуют гипотезы, объясняющие их происхождение и участие в процессах межклеточного взаимодействия. [1,5,8].

Основными механизмами, обеспечивающими поступление растворимых молекул в жидкие среды организма является протеолиз или альтернативный сплайсинг м-РНК с образованием S-фрагмента молекулы, содержащий участок, подверженный протеолитическому расщеплению.

Основная роль растворимых молекул в межклеточном взаимодействии, а также взаимодействии между клетками и стромой заключается в регуляции этих процессов [6]. Иммунорегуляторная функция реализуется по гуморально-опосредованному механизму, когда для связи с лигандом не нужен межклеточный контакт и, более того, он становится невозможным после состоявшегося гуморального взаимодействия.

Проблема растворимых молекул, имеющих свои гомологи на поверхностях опухолевых клеток в виде мембранных рецепторов, включает в себя и проблему растворимых лигандов к этим молекулам.

Известно, что FAS-лиганд (FAS-L) и CD40-лиганд (CD40-L) - это трансмембранные протеины, которые экспрессируются преимущественно на активированных Т-лимфо-

цитах. В последнее время идентифицированы их растворимые гомологи. Изучение их функции in vitro показало, что при ХЛЛ CD40/sCD40L взаимодействие блокирует апоптоз в опухолевых клетках, опосредуемый FAS-L или флюдарабином. Добавление в культуру in vitro антител к CD40L или растворимого CD40 индуцировало апоптоз [12].

Очень важна роль растворимых молекул в клинической гематологии в связи с возможностью использования их в качестве интегрального показателя массы опухоли и факторов клинического прогноза. Установлено, что при ХЛЛ и НХЛ sVCAM-I, sICAM-I и sE-селектин находятся в прямой зависимости от массы опухоли и связаны со стадией заболевания [5,8,9,11]. Высокий уровень sAPO-I/FAS (CD95) коррелировал с большой массой опухоли и прогнозом при ХЛЛ [7]. Растворимый CD23 (sCD23) имеет важное значение для дифференциации стабильной и прогрессирующих форм ХЛЛ [10].

В связи с изложенным, представляет большой интерес изучение концентрации растворимых молекул адгезии (sCD50), апоптоза (sCD95) и sHLA-класса I при ММ, ХЛЛ и НХЛ в зависимости от клинических характеристик болезни с учетом проводимой противоопухолевой химиотерапии.

Материалы и методы

В настоящее исследование включено 22 больных, из них у 14 диагностирована ММ, у 5 - ХЛЛ, у 3 - НХЛ (лимфома из клеток мантийной зоны в фазе лейкоемизации - 1, лимфоцитарная лимфома генерализованная - у 2).

У большинства больных с ММ диагностирована III стадия болезни. Предшествующее химиотерапевтическое лечение на протяжении 12-106 месяцев было у двенадцати больных, у двух - заболевание установлено впервые. Первичная резистентность выявлена у шести больных, у двух был первый рецидив, у четырех - ремиссия, у двух - начальная фаза болезни. Большинство больных проводили курсы М2 в качестве индукционного и поддерживающего лечения или в связи с начинающимся рецидивом. При отсутствии ответа на эмпирическую противоопухолевую терапию, проводили детерминированное лечение по чувствительности опухолевых клеток в культуре *in vitro*. Детерминированная терапия в наших исследованиях проводилась препаратами цисплатины и сарколизинном.

У 8 больных с ХЛЛ и НХЛ заболевание носило распространенный характер, предшествующее цитостатическое лечение было у всех.

Определение концентрации sCD50, sCD95, sHLA-I в сыворотке проводили до и через 1-2 дня после завершения очередного курса ХТ. Концентрацию растворимых форм указанных белков определяли с помощью разработанных авторами иммуноферментных методов с применением отечественных моноклональных антител серии ИКО [2,3,4]. Планшеты для иммуноферментного анализа сорбировали первыми антителами, направленными против исследуемых антигенов, после чего в лунки планшетов вносили исследуемые образцы сыворотки и инкубировали планшеты в течение 60 минут при комнатной температуре. Затем планшеты отмывали от несвязавшихся белков и обрабатывали вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена и направленными против других антигенных детерминант того же антигена. После инкубации в течение 60 минут планшеты вновь отмывали и в лунки планшетов вносили субстратную смесь, содержащую ортофенилендиамин и перекись водорода. Реакцию останавливали с помощью 1М раствора серной кис-

лоты. Результаты реакции учитывали спектрофотометрически и выражали в условных единицах на мл сыворотки.

При анализе концентрации растворимых молекул адгезии sCD50 (ICAM-3) у 14 больных ММ (табл. 1) установлено, что она достоверно снижена непосредственно перед началом курса химиотерапии (152 ± 23 ед/мл против 342 ± 20 в контроле $p < 0,05$). После завершения курса концентрация sCD50 незначительно повышалась до 210 ± 70 ед/мл ($p > 0,05$), но не достигала нормальных значений. Изменение достоверности различий концентрации sCD50 после лечения по сравнению с контролем свидетельствует о закономерности этих изменений.

Изучение концентрации sFAS/APO-I (CD95) при ММ показало, что исходные значения были очевидно выше контрольных, при недостаточной достоверности полученных результатов (845 ± 247 и 401 ± 178 ед/мл, $p > 0,05$).

Однако после проведения курса ХТ концентрация sCD95 возрастала до 1938 ± 410 и различия с контролем становились достоверными.

Исследование концентрации sHLA-I при ММ, гомолог которого экспрессирован на мембране всех лимфоидных элементов и многих других клетках, показало повышенные, по сравнению с контролем, исходные значения (2887 ± 903 и 1021 ± 98 , $p = 0,05$). После курса лечения концентрация растворимых HLA-I существенно не менялась (2739 ± 723 ед/мл), однако при этом достоверность различий с контролем возрастала ($p < 0,05$).

Оценивая изменения концентрации sCD50, sCD95 и sHLA-I в связи с динамикой показателей периферической крови, следует отметить повышение количества гранулоцитов сразу после окончания курса лечения ($48,2 \pm 3$ и $62 \pm 4,7\%$, $p < 0,05$) и в абсолютных значениях ($2,2 \pm 0,3$ и $3,1 \pm 0,7 \times 10^9$ л - $p > 0,05$).

Количество лимфоцитов достоверно снижалось после курса лечения (с $33,1 \pm 3,7$ до $23,1 \pm 3,4\%$ - $p < 0,05$) и в абсолютных значениях (с $1,6 \pm 0,2$ до $1,1 \pm 0,1 \times 10^9$ л - $p < 0,01$).

Таблица 1. Значения концентрации sCD50, sCD95, sHLA-I в сыворотке; показатели гранулоцитов и лейкоцитов крови до и после курса противоопухолевой химиотерапии у 14 больных множественной миеломой

Исследуемая группа (количество больных)	Диаг- ноз	Стадия	Предшествующее лечение (курсы ПХТ)	Концентрация в сыворотке (ед/мл)			Показатели крови			
				sCD ₅₀	sCD ₉₅	sHLA-I	гранулоциты	лимфоциты		
				лечение						
				до/после	до/после	до/после	до/после	до/после		
14*	ММ	III – 9 II – 5	0 – 26	152 ± 23	845 ± 247	2887 ± 903	48,2 ± 3 %	33,1 ± 3,7 %		
				210 ± 70 p > 0,05	1398 ± 410 p > 0,05	2739 ± 723 p > 0,05	62,6 ± 4,7 % p < 0,05	23,1 ± 3,4 % p < 0,05		
							2,2 ± 0,3 x 10 ⁹ /л 3,1 ± 0,7 p > 0,05	1,6 ± 0,2 x 10 ⁹ /л 1,1 ± 0,1 p < 0,01		
Контроль sCD ₅₀ ед/мл				342 ± 20 n=43 P _{и.к} < 0,05 P _{к.п.л.} > 0,05	401 ± 17,8 n=38 P _{и.к} > 0,05 P _{к.п.л.} < 0,05	1021 ± 98 n=35 P _{и.к} = 0,05 P _{к.п.л.} < 0,05				
Контроль sCD ₉₅ ед/мл										
Контроль sHLA-I ед/мл										

* Р_{ик} - достоверность исходных данных и контроля, Р_{к.п.л.} - достоверность данных контроля и после лечения

У 5 больных ХЛЛ и 3 с НХЛ исследование концентрации sCD50, sCD95 и sHLA-I в сыворотке крови проводили в сравнении с количеством лейкоцитов, размерами печени, селезенки, лимфатических узлов до и после курсов противоопухолевой химиотерапии. Полученные результаты свидетельствуют о достаточно выраженных изменениях концентрации исследуемых растворимых молекул по сравнению с контролем и после проведения курсов химиотерапии (табл. 2). При анализе значений sCD50 установлено их достоверное снижение по сравнению с контролем (214 ± 61 и 342 ± 20 ед./мл - $p < 0,05$).

После проведения курсов химиотерапии концентрация sCD50 повышалась по сравнению с исходными значениями, однако была ниже данных контроля (327 ± 116 ед./мл и 342 ± 20 , $p > 0,05$). Следует отметить, что повышение концентрации sCD50 после курса лечения было недостаточно достоверно относительно исходных данных. Однако при этом уходила достоверность различий с контролем, что может указывать на наличие тенденции в изменении концентрации sCD50 до и после курса ХТ.

При анализе изменений концентрации sCD95 установлено достоверное повышение значений по сравнению с контролем (952 ± 222 ед./мл и 401 ± 78 , $p < 0,05$), однако не было выявлено достоверных различий после лечения. Достоверность различий с контролем сохранялась в обоих исследованиях, что является дополнительным свидетельством, подтверждающим отсутствие влияния курса ХТ на концентрацию sCD95 в данном интервале времени.

Показатели sHLA класса I у больных с ХЛЛ и НХЛ перед началом курса ХТ достоверно превышали контроль (2127 ± 393 и 1021 ± 98 ед./мл, $p < 0,05$) и недостоверно снижались после проведения лечения, причем достоверность различий с контролем сохранялась.

По видимому, смысл снижения концентрации sCD95 и sHLA-I после проведения курса химиотерапии при ХЛЛ и НХЛ заключается в связи этих молекул с массой опухоли. Учитывая это, представлялось целесообразным проанализировать выявленные изменения с величиной массы опухоли у исследуемых больных. Массу опухоли оп-

ределяли по сумме баллов в зависимости от количества и размеров зон поражения (табл. 3).

Таблица 3. Концентрация sHLA-I в сыворотке крови у 8 больных хроническим лимфолейкозом и лимфомой в зависимости от массы опухоли

Группы	Количество Больных	Масса опухоли (баллы)*	Концентрация sHLA-I (ед./мл)
I	3	> средней $24 \pm 1,9$	4210 ± 857
средняя по всем больным		15,3	
II	5	< средней $10 \pm 1,1$ $p < 0,05$	1460 ± 90 $p_{\text{нл}} < 0,05$
Контроль			1021 ± 98 , $n=35$

* Сумма баллов

Лимфоузлы: шея, аксиллярные, паховые, брюшные (0 - 8 баллов, максимальные значения при симметричном поражении).

Печень, селезенка: (0 - 5 баллов);

- 0 - не увеличена,
- 1 - 2 см из под реберного края,
- 2 - 4 см,
- 3 - 6 см,
- 4 - 8 см,
- 5 - ≥ 10 см.

Лейкоцитоз:	0 баллов	<	30.000/мкл
	1	=	30 - 49.000
	2	=	50 - 99.000
	3	=	100 - 149.000
	4	=	150 - 200.000
	5	>	200.000

Как видно из табл. 3, выявлена прямая зависимость между величиной массы опухоли и концентрацией sHLA-

Таблица 2. Значения концентрации sCD50, sCD95 и sHLA-I у 8 больных хроническим лимфолейкозом и неходжскиными лимфомами до и после курса противоопухолевой химиотерапии

Количество больных	Диагноз	Стадия	Концентрация в сыворотке крови			Лимфоциты крови х 10 ⁹ /л	Уменьшение размеров лимфоузлов печени, селезенки
			лечение до/после				
			sCD ₅₀	sCD ₉₅	sHLA-I	до/после	
8	ХЛЛ – 5 НХЛ – 3	2 – 3	214 ± 61	952 ± 222	2127 ± 393	58±48	на 70% (в среднем)
			327 ± 116 p > 0,05	885 ± 212 p > 0,05	1516 ± 127 p > 0,05	70±52 p > 0,05	
контроль sCD ₅₀ ед/мл			342 ± 20 n=43 Р _{и.к.} < 0,05 Р _{к.п.л.} > 0,05	401 ± 17,8 n=38 Р _{и.к.} < 0,05 Р _{к.п.л.} < 0,05	1021 ± 98 n=35 Р _{и.к.} < 0,05 Р _{к.п.л.} < 0,05		
контроль sCD ₉₅ ед/мл							
Контроль sHLA-I ед/мл							

* $P_{\text{и.к.}}$ достоверность исходных и данных контроля
 $P_{\text{к.п.л.}}$ достоверность данных контроля и после лечения

I антигенов. Полученный результат имеет важное клиническое значение, так как концентрация sHLA-I в сыворотке может рассматриваться в качестве интегрального показателя массы опухоли при В-клеточных лимфопротиферативных заболеваниях. Это важно еще и потому, что клиническая гематология обладает небольшим перечнем подобных прогностических тестов (PIg, ЛДГ, β_2 -микроглобулин, sCD54). Подобный анализ был проведен у больных с MM (табл. 4).

Таблица 4. Концентрация sHLA-I в сыворотке крови у 13 больных множественной миеломой в зависимости от массы опухоли

Группы	Кол-во Больных	Масса опухоли * (баллы)	Концентрация sHLA-I ед./мл
I	4	> средней 15,5 $\pm$ 0,4	3484 $\pm$ 1057 R _{контроль} < 0,05
средняя масса по всей группе 11,1 балла			
II	9	< средней 10 $\pm$ 0,4	1192 $\pm$ 122
Достоверность		R _{I-II} < 0,05	R _{I-II} = 0,05
Контроль		1021 $\pm$ 98 n=35	

* больные с небольшой массой опухоли соответствовали 5 баллам, с промежуточной – 10, с большой массой – 15 баллам, в соответствии со стадиями MM по Durie and Salmon. Больным с видимыми опухолями добавляли по 1 баллу сверх указанной градации

Как видно из таблицы 4 при MM так же выявлена отчетливая зависимость между концентрацией sHLA-I и массой опухоли.

Таким образом, проведенные исследования концентрации sCD50, sCD95 и sHLA-I класса в сыворотке у 22 больных с MM, ХЛЛ и НХЛ в зависимости от проводимой противоопухолевой химиотерапии, выявили однотипные изменения. Они свидетельствуют о том, что в обеих группах больных исходная концентрация sCD50 была достоверно ниже контрольных значений, а концентрации sCD95 и sHLA-I достоверно ее превышали (табл. 5). Объяснить полученный факт достаточно трудно, так как в настоящее время нет убедительных данных, раскрывающих механизм синтеза и метаболизм растворимых молекул.

Касаясь оценки растворимых адгезивных молекул (sCD50), их следует рассмотреть в связи с экспрессией

Таблица 5. Концентрация sCD50, sCD95, sHLA-I у 22 больных MM, ХЛЛ, НХЛ до и после курса химиотерапии.

Группы (кол-во больных)	Концентрация (ед./мл)			лимфоциты до/после	гранулоциты до/после
	SCD ₅₀ до/после	SCD ₉₅ до/после	sHLA-I до/после		
MM (14)	152 $\pm$ 2,3	845 $\pm$ 247	2887 $\pm$ 903	1,6 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,3
	210 $\pm$ 70	1398 $\pm$ 410	2739 $\pm$ 723	1,1 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,7
	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05
	R _{ник} < 0,05 R _{плк} > 0,05	R _{ник} > 0,05 R _{плк} < 0,05	R _{ник} = 0,05 R _{плк} < 0,05		
ХЛЛ, НХЛ (8)	214 $\pm$ 61	952 $\pm$ 222	2127 $\pm$ 393	58 $\pm$ 48	—
	327 $\pm$ 116	885 $\pm$ 212	1516 $\pm$ 127	70 $\pm$ 52	
	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	
	R _{ник} < 0,05 R _{плк} > 0,05	R _{ник} < 0,05 R _{плк} < 0,05	R _{ник} < 0,05 R _{плк} < 0,05		
Контроль	342 $\pm$ 20 n=43	401 $\pm$ 17,8 n=38	1021 $\pm$ 98 n=35		

мембранных CD50. В наших наблюдениях экспрессия мембранных CD50 на лимфоцитах крови была достаточно высокой как при ХЛЛ, так и при MM. Следовательно, имеет место очевидная диспропорция между экспрессией мембранных адгезивных молекул (CD50) и концентрацией в сыворотке растворимых молекул адгезии (sCD50).

В связи с этим можно высказать предположение, которое заключается в том, что у исследуемых больных нарушен синтез sCD50. Это приводит к их дефициту в гуморальных средах и уменьшению связывания стромальных и клеточных лигандов, что, в свою очередь, увеличивает вероятность непосредственного взаимодействия клеток между собой и стромой. В связи с этим происходит накопление опухолевых клеток или их предшественников (MM) в костном мозге, печени, селезенке или других органах.

Эта концепция сформулирована на основании проведенного настоящего исследования, включая клинические наблюдения. В действительности, у большинства исследованных больных с MM, ХЛЛ и НХЛ отмечена большая масса опухоли с опухолевой инфильтрацией костного мозга, костей, лимфатических узлов, печени, селезенки, желудка.

В то же время следует сделать ряд дополнений к высказыванной точке зрения, так как несколько клинических наблюдений являются исключением из этого положения. В одном наблюдении ХЛЛ низкая концентрация sCD50 в сыворотке сочеталась с гигантской гепато и спленомегалией и гиперлейкоцитозом. Однако гиперлейкоцитоз не мог быть объяснен с точки зрения предложенной концепции. По-видимому, в данном наблюдении избыточное накопление опухолевых клеток в селезенке затрудняло их дальнейшее поступление в орган, и они накапливались в крови.

В другом наблюдении ХЛЛ отмечалась высокая концентрация sCD50 в сыворотке, при этом была значительная лимфоаденопатия, лейкоцитоз, но не было спленомегалии. В этом случае высокая концентрация sCD50 в сыворотке выключала из непосредственного межклеточного взаимодействия опухолевые клетки за счет блокирования их лигандов, что обеспечивало свободную циркуляцию лимфоцитов в крови. По-видимому, сильная экспрессия лигандов в селезенке была нейтрализована избытком sCD50, что предотвратило накопление клеток в этом месте.

В то же время накопление опухолевых клеток в лимфатических узлах не могло быть объяснено с позиций sCD50 лигандного взаимодействия. Вероятно другая адгезивно-лигандная система обеспечивала накопление опухолевых клеток в лимфатических узлах в данном наблюдении.

Следует так же подчеркнуть, что повышение sCD50 после курса лечения относительно данных контроля, представляет собой статистически подтвержденную тенденцию. Она может указывать на переход мембранных CD50 в гуморальные среды после цитостатического разрушения клеток или избирательного воздействия цитостатиков на мембранные CD50.

При анализе концентраций sCD95 в сыворотке крови у больных MM, ХЛЛ и НХЛ, установленные изменения сводились к тому, что исследуемые показатели до проведе-

ния курсов ХТ были выше, чем в контроле. После проведенного лечения у больных с ММ концентрация sCD95 повышалась, и различия с контролем становились достоверными. При ХЛЛ и НХЛ значения sCD95 до и после лечения были достоверно выше контроля и в процессе лечения достоверно не изменялись.

В настоящее время нет объединяющей гипотезы, объясняющей биологическое значение sCD95 при ММ, ХЛЛ и НХЛ. Хотя существует достаточно много точек зрения, высказываемых по этому поводу. На наш взгляд более точно отражает суть проблемы точка зрения, предполагающая, что sCD95 синтезируется опухолевыми клетками и за счет конкурентирования с FAS-L защищает бластные клетки от апоптоза, вызываемого цитотоксическими Т-лимфоцитами.

Применяя данную, экспериментально подтвержденную, гипотезу для объяснения собственных результатов, очевидно, что полученные высокие значения исходных концентраций свидетельствуют о большой массе опухоли, что совпадало с клиническими наблюдениями. Кроме того, блокирование апоптоза в опухолевых клетках за счет высоких концентраций sCD95 по существу позволяет рассматривать ММ, ХЛЛ и НХЛ как болезни, прогрессирование которых связано с накоплением массы опухоли. Это согласуется с ранее полученными результатами, установившими очень низкую пролиферативную активность опухолевых клеток при данных заболеваниях. Отсутствие достоверных изменений концентрации sCD95 после лечения при получении клинического эффекта, по-видимому, связано с переходом мембранных CD95 с разрушенных клеток в сыворотку.

При анализе концентраций sHLA-I, мембранный аналог которого широко экспрессируется на клетках крови, установлено достоверное повышение исходных значений у исследуемых больных. Сопоставление концентрации sHLA-I с клиническими данными показало, что концентрация sHLA-I достоверно коррелирует с массой опухоли при ХЛЛ и ММ и поэтому sHLA-I может рассматриваться как интегральный критерий массы. Этот показатель имеет очень важное значение для клинической гематологии, так как его можно использовать в качестве критерия эффективности терапии и для прогнозирования рисков клинического течения. Совпадение высоких концентраций sHLA-I с большой массой опухоли может указывать на определенную роль sHLA-I в патогенезе опухолевого роста. Возможно, что sHLA могут блокировать соответствующие лиганды на клетках мишенях или супрессорах, предотвращая супрессорный эффект иммунной системы на опухолевые клетки.

Литература

1. Новиков В.В. Растворимые дифференцировочные антигены В кн. Иммуноterapia рака. Материалы Европейской школы онкологов 1999, Москва, с. 1-8
2. Птицына Ю.С., Новиков Д.В., Мартынова Т.Г., Барышников А.Ю., Новиков В.В. Повышенное содержание растворимой формы CD50 антигена (ICAM-3) в сыворотке крови больных вирусным гепатитом G. Аллергология и иммунология, 2000, №9, с. 40
3. Vyasmina E.S., Ptsina Yu. S., Matveeva E.M., Komarova V.D., Baryshnikov A.Y Novikov B.B. Soluble form of HLA class I in HIV-infected person and patients with syphilis and/or hepatitis C Russian Journal of HIV/AIDS and related problems, 2001, V. 5, №1, p. 136-137
4. Ptsina Yu.S., Bornyakova L.A., Baryshnikov A.Yu, Martynova T.G., Kryzhanova M.A., Novikov B.B. A soluble form of FAS/Apo-1 (CD95) antigen in the serum of viral hepatitis patients. International Journal on Immunorehabilitation, 1999, №14, p 110-111
5. Christansen I., Sundstrom C., Torremann T. Elevated serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-I (SVCAM-I) closely reflect tumor burden in chronic B-lymphocytes leukaemia. Brit. j. Haematology, 1998, 4, 103, 1129 - 1137.
6. Clark P., Boswell F., Pearson C., Walker I.D., Grur I.A. Trombin induction of ICAM-I on monocytes and the relationship between monocytes ICAM-I and plasma ICAM-I in pregnancy. Haematologica, 1999, 84, p. 184
7. Del Poeta G., Maurillo L., Suppo G., Venditti A. Both high CD38 and soluble APO-I/FAS (CD95) correlate with advanced stages and poor outcome in B chronic lymphoid leukaemia (B-cell). The Hematol. j., 2000, VI, SI p. 91.
8. Hatzimichael E., Makis A., Chaidos A., Christou L. Soluble adhesion molecules in plasma cell leukaemia. The Hematol. j., 2000, VI, SI, p.163.
9. Salem M., Elbar O., Alwady M., Mabel M., et. al. Serum levels of soluble adhesion molecules (ICAM and VCAM-I). Glicient biomarkers of disease status and response to therapy in non-Hodgkins lymphoma. Haematologica, 1999, 84, p.155.
10. Schwarzmaier J.D., Shehate M., Milgardn, Hubman R., Treil R. The role of soluble CD23 in differentiation between stable and progressive forms of B-cell. The Hematol. j., 2001, VI, SI, p.102.
11. Wolowiec D., Frudecka I., Kopelko-Slowic K., Protocrek S., et. al. Concentration of serum soluble form of ICAM-I and E-selectin in patients with different phases of non-Hodgkins lymphoma. The Hematol. j., 2001, VI, SI, p.140.
12. Gnonas A., Shell V., Consoli U., Clodi K., et. al. Elevated levels of biologically active soluble CD40 ligand in the serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia. Brit. j. Haematology, 1998, 100, p.135 - 141.

Сравнительный анализ данных МТТ-пробы у больных хроническим лимфолейкозом с различным ответом на химиотерапию

Е.В.Катаева, А.К.Голенков, Е.В.Трифенова, Т.Д.Луцкая, А.Н.Иншаков,
Н.П.Логачева, Е.Ю.Лысюк, А.Ю.Барышников
МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского, Москва

В последнее время в гематологии уделяется большое внимание проблеме лекарственной резистентности, так как с этим связана неэффективность программной химиотерапии (ХТ). В основе этой многогранной проблемы лежит особое состояние опухолевой клетки, которое определяется гиперфункцией гена множественной лекарственной устойчивости (MDR) и связанного с ним поверхностного протеина (Pgp-170), изменения в системе глутатион S трансферазы, ее изоэнзима (GST), а также другие механизмы [2,3,4,5].

Больные с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) изначально, как правило, отвечают на химиотерапию, но все пациенты через некоторое время становятся рефрактерными к лечению [4]. Учитывая, что применяемые программы противоопухолевой ХТ базируются на эмпирическом принципе, возможно, что действующим фактором в них является только один препарат из многокомпонентной химиотерапевтической комбинации. При этом остальные препараты, оказываясь неэффективными, в значительной степени усиливают токсическое действие программы и приводят к превалированию миелотоксического эффекта над противоопухолевым.

В связи с этим было целесообразно определение лекарственной чувствительности *in vitro* (МТТ-проба) опухолевых клеток к различным противоопухолевым химиопрепаратам.

Целью настоящего исследования было изучение клинического значения теста лекарственной чувствительности опухолевых лимфоцитов к химиопрепаратам *in vitro* (МТТ-проба) у больных ХЛЛ, резистентных и отвечающих на лечение.

Материалы и методы

Под нашим наблюдением находился 21 больной с ХЛЛ (10 мужчин, 11 женщин), средний возраст 60,9 лет (от 43 до 75 лет). Диагноз хронического лимфолейкоза был установлен на основании периферической лимфоаденопатии, абсолютного лимфоцитоза в крови, подтвержден цитологическим или гистологическим исследованием костного мозга. Всем больным проводилось иммунофенотипическое исследование лимфоцитов крови: выявлено превалирование В-клеточной опухолевой популяции (высокая экспрессия СД 5- 56,8±6,1%, СД 19 - 84,6±3,8%), что сочета-

лось с низкой экспрессией Т-клеточных маркеров (СД3 - 9,4±1,5%).

На опухолевых лимфоцитах крови определяли так же экспрессию Pgp, Bcl-2, FAS/APO-1 методом проточной цитофлюориметрии на приборе FAScan («Becton Dickinson», USA).

В первую группу включено 6 больных со II стадией по Rai, которым химиотерапевтическое лечение к моменту обследования не проводилось. Остальным 15 больным проводилось лечение в виде монотерапии лейкораном или стандартных курсов ХТ (СОР, СНОР, ЛВПП, циклофосфан с преднизолоном). Они были разделены на 2-ю и 3-ю группы в зависимости от ответа на лечение. Отвечающие на лечение с длительностью болезни 65,2 месяца в среднем (34-106 месяцев) были 7 пациентов со II-III стадиями по Rai. У 8 больных со II-IV стадиями по Rai с длительностью болезни в среднем 64,0 месяца (24-131 месяцев) была констатирована рефрактерность. Ответ на химиотерапию оценивали в соответствии с критериями National Cancer Institute [9].

Чувствительность опухолевых клеток к химиопрепаратам у больных ХЛЛ определяли с помощью МТТ-пробы [6,7,8]. Для этого выделяли из периферической крови стандартным методом лимфоциты и инкубировали в течение 96 часов с цитостатическими препаратами (преднизолон, винкристин, винбластин, доксорубин, рубомицин, лейкоран, мелфалан, натулан, вепезид, флударабин, цитарабин). Используемые концентрации цитостатиков в культуре соответствовали известным фармакокинетическим данным для каждого препарата, обеспечивающим терапевтический эффект [1,10,11]. На заключительном этапе к культуре клеток добавляли тетразолиевую соль МТТ (3,4,5-dimethyl-thiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), которая метаболизируется жизнеспособными клетками, превращаясь в нерастворимый в воде фармазан, тем самым изменяя оптическую плотность раствора пропорционально количеству выживших клеток. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре МР-5000 («Dynateck», Sweden, длина волны 550 нм). Опухолевые лимфоциты считались чувствительными к исследуемому препарату, если количество погибших клеток в культуре составляло не менее 50%.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1 в результате исследования было установлено, что в группах ранее не леченых, ответивших на лечение и рефрактерных больных число чувствительных опухолевых больных по отношению ко всем исследованным по каждому противоопухолевому препарату было различным.

Таблица 1. Характеристика лекарственной чувствительности в культуре лимфоцитов у больных с В-клеточным хроническим лимфолейкозом с различным ответом на лечение

№	ПРЕПАРАТЫ	I группа (6 чел.) ранее не леченные		II группа (8 чел.) рефрактерные больные		III группа (7 чел.) отвettившие на лечение	
		Чувстви- тельны	Иследо- ваны	Чувстви- тельны	Иследо- ваны	Чувстви- тельны	Иследо- ваны
1	ПРЕДНИЗОЛОН	3	4	4	5	5	7
2	ВИНКРИСТИН	4	6	2	8	3	7
3	ВИНЕБЛАСТИН	4	6	4	8	1	7
4	ДОКСОРУБИЦИН	5	6	5	8	5	7
5	РУБОМИЦИН	5	6	2	3	2	2
6	ЛЕЙКЕРАН	5	6	1	8	3	5
7	МЕЛФАЛАН	2	2	1	4	3	3
8	НАТУЛАН	4	5	1	4	1	3
9	ВЕПЕЗИД	5	5	4	4	2	2
10	ФЛУДАРАБИН	5	6	4	8	5	7
11	ЦИТАРАБИН	5	6	2	3	1	2
Отношение чувствительных/исследованных (M±m)		0.82±0.03		0.5±0.08		0.65±0.09	
Достоверность		I и II группы < 0.05 II и III группы > 0.05 I и III группы > 0.05					

В группе больных, которые ранее не лечились, отношение чувствительных больных ко всем исследованным было достоверно больше ($0,82 \pm 0,03$); чем в группе рефрактерных к лечению ($0,5 \pm 0,08$) ($P < 0,05$). Это свидетельствует о том, что развивающаяся клиническая рефрактерность у больных сопровождалась снижением чувствительности опухолевых клеток в культуре к химиопрепаратам по сравнению с пациентами, которые еще не лечились. Сопоставляя I-ю группу больных и ответивших на химиотерапию ($0,82 \pm 0,03$ и $0,65 \pm 0,09$), мы получили недостоверные различия между отношениями чувствительных больных ко всем исследованным, что можно объяснить сходными биологическими свойствами опухолевой клетки у пациентов этих двух групп.

В связи с тем, что больным в основном проводилась ХТ, состоящая из 3-5 препаратов, которые были тестированы *in vitro* для определения лекарственной чувствительности, можно было определить долю эффективных препаратов, входящих в схемы ПХТ, выраженную в процентах.

Как следует из таблицы 2, в группе рефрактерных больных, у которых было отмечено прогрессирование заболевания, доля эффективных препаратов колебалась от 0 до 50% и составила $16,6 \pm 3,8\%$, у больных с полной и частичной ремиссией (табл. 3) процент эффективных препаратов был значительно выше $-84,0 \pm 4,2\%$ (различия были достоверны $-P < 0,05$).

Таблица 2. Содержание эффективных препаратов по лабораторным данным лекарственной чувствительности в протоколах лечения рефрактерных больных хроническим лимфолейкозом

№	Группа рефрактерных больных		Доля эффективных препаратов в данной программе лечения, %
	Исследуемые больные	Характер ответа на химиотерапию	
1	П.Н.Ф.	Прогрессирование заболевания	33
2	Р.В.И.	Прогрессирование заболевания	25
3	Р.П.Е.	Прогрессирование заболевания	0
4	А.Г.М.	Прогрессирование заболевания	50
5	К.П.И.	Прогрессирование заболевания	0
6	Л.В.В.	Прогрессирование заболевания	25
7	С.А.Г.	Прогрессирование заболевания	0
8	М.Д.Л.	Прогрессирование заболевания	0
Средние величины $M \pm m$			$16,6 \pm 3,8$

Таблица 3. Содержание эффективных препаратов по лабораторным данным лекарственной чувствительности в протоколах лечения ответивших на химиотерапию больных хроническим лимфолейкозом

№	Группа ответивших больных		Доля эффективных препаратов в данной программе лечения, %
	Исследуемые больные	Характер ответа на химиотерапию	
1	Ф.Н.Е.	Полная ремиссия	66
2	Х.Н.С.	Частичная ремиссия	100
3	С.М.С.	Полная ремиссия	50
4	Б.Т.П.	Частичная ремиссия	100
5	У.М.В.	Частичная ремиссия	75
6	Б.А.А.	Частичная ремиссия	75
7	С.М.С.	Частичная ремиссия	100
Средние величины $M \pm m$			$84,0 \pm 4,2$

Основываясь на полученных данных клинической рефрактерности с анализом чувствительности в культуре, было целесообразно проанализировать иммунологический фенотип по маркерам, косвенно свидетельствующим о процессе лекарственной резистентности (Pgp-170, Bcl-2 и FAS/APO-1). Характеристика иммунологического фенотипа опухолевых клеток исследуемых больных представлена в таблице 4.

Как следует из таблицы 4, экспрессия Pgp-170 у рефрактерных больных составила $11,2 \pm 3,6\%$, у отвечающих больных $6,1 \pm 2,4\%$. Минимальные значения были зафиксированы в группе ранее не леченных больных ($3,8 \pm 2,2\%$). Не было выявлено достоверных различий при анализе экспрессии Bcl-2, которая была несколько выше у рефрактерных и не леченных больных ХЛЛ ($57,2 \pm 7,9$ и $59,3 \pm 2,3$ соответственно) по сравнению с отвечающими на терапию ($23,4 \pm 7,5$). Достоверные различия отмечены при анализе FAS/APO-1, экспрессия которого была более выражена в

Таблица 4. Сравнительная характеристика иммунологического фенотипа и лекарственной чувствительности *in vitro* у отвечающих, рефрактерных и не леченных ранее больных хроническим лимфолейкозом

Группа исследования	Количество больных	Pgp-170 (%)	Bcl-2 (%)	FAS/APO-1 (%)	Доля эффективных препаратов в комбинации (%)
I Рефрактерные	8	11.2±3.6	57.2±7.9	7.6±3.2	16.6±3.8
II Отвечающие	7	6.1±2.4	23.4±7.5	30.4±1.9	84.0±3.9
III Не леченные	6	3.8±2.2	59.3±2.3	15.8±5.8	—
		P _{I,II} >0.05 P _{I,III} >0.05 P _{II,III} >0.05	P _{I,II} >0.05 P _{I,III} >0.05 P _{II,III} >0.05	P _{I,II} <0.05 P _{I,III} <0.05 P _{II,III} <0.05	P <0.05

группе больных отвечающих на лечение (30.4±1.9) по сравнению с рефрактерными (7.6±3.2) и не лечеными (15.8±5.8). Установлена обратная корреляция Bcl-2 со значениями FAS/APO-1 в группах исследованных с различным клиническим ответом. Высокая экспрессия Bcl-2 (57.2±7.9) сочеталась с низкими значениями FAS/APO-1 (7.6±3.2) в группе рефрактерных больных ХЛЛ, а в группе отвечающих на химиотерапию низкая экспрессия Bcl-2 (23.4±7.5) сопутствовала высоким значениям экспрессии FAS/APO-1 (30.4±1.9).

Низкие значения экспрессии FAS/APO-1 в рефрактерной группе больных ХЛЛ, а также обратная корреляция значений супрессора апоптоза Bcl-2 и системы, запускающей апоптоз - FAS/APO-1 в обеих группах подтверждают известное положение о том, что онкоген реализует свое влияние на опухолевую клетку путем угнетения апоптоза. Исходя из этого можно предположить, что проводимая терапия у больных осуществляет свой эффект через усиление процессов апоптоза в опухолевых клетках.

Таким образом, проведенные исследования показали, что при ХЛЛ выявляется совпадение между лабораторными тестами исследования лекарственной чувствительности опухолевых клеток *in vitro* и ответом на ХТ с использованием этих препаратов.

Проведенные исследования позволяют сформулировать новые подходы к совершенствованию противоопухолевой химиотерапии ХЛЛ на основе детерминированного принципа по чувствительности *in vitro*.

Литература:

1. Культура животных клеток. Методы. Под редакцией Р. Фрейни, Москва, «Мир», 1989, стр. 264-265.

2. Curt G.A., Clendemann N.I., Chabner B.A. Drug resistance in cancer. *Cancer Treat Rep* 68: 87-99, 1984.

3. Lemoine N., Neoptolemos J., Cooke T. Cancer: a molecular approach. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.

4. Cheson B.D. Chronic Lymphoid Leukemias. *Clinical Oncology-New York*, 1995-P1999-2022.

5. Oscier D. Chronic lymphocytic leukaemia. Brighton: Blackwell Science Ltd, *Brit. J. of Haemat.* 105, suppl. 1-1999-P1-3.

6. Pieters R., Huismens D.R., Leyva A., Veerman A.J. Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye based (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia. *Cancer lett*, 41(3), P323-323, 1988.

7. Twentyman P.R., Fox N.E., Rees J.K. Alternative anthracyclines and resistance modifiers in human leukemias *in vitro* study using the MTT-assay/*Br. j. Haematol.* 71(1)-P 19-24, 1989.

8. Weisental L.M., Dill P.L., Finklestein J.Z. et al. Laboratory detection of primary and acquired drug resistance in human lymphatic neoplasms. *Cancer Treatment Reports* 70:1283-1295, 1986.

9. Cheson et al. Guidelines for clinical protocols for chronic Lymphocytic Leukemia: recommendations of the National Cancer Institute sponsored Working Group *American Journal of Haematology* 29:152-163(1988).

10. Alberts D.S., George Chen H.S., Salmon S.E. (1980) In. Cloning of Human Tumour Stem Cells, Salmon S.E. (ed.), Alan R. Liss, Inc., NY, P. 197.

11. Alberts D.S., George Chen H.S. (1980) In. Cloning of Human Tumour Stem Cells, Salmon S.E. (ed.), Alan R. Liss, Inc., NY, Appendix 4.

Трапезников Николай Николаевич

21.05.1928 - 27.09.2001

27 сентября 2001 г. после тяжелой болезни ушел из жизни один из основоположников отечественной онкологии, крупнейший специалист в области клинических и экспериментальных исследований злокачественных новообразований, директор Российского онкологического научного центра им. Н.Н.Блохина РАМН, академик РАН и РАМН Николай Николаевич ТРАПЕЗНИКОВ.

Почти 50 лет своей научной и врачебной деятельности Н.Н.Трапезников провел в стенах Онкологического Центра, пройдя путь от ординатора до директора. Он принимал самое активное участие в формировании и развитии РОНЦ РАМН как головного учреждения по онкологии в СССР и России и являлся достойным учеником и приемником Н.Н.Блохина.

Наиболее значительные научные результаты Н.Н.Трапезниковым были получены в области лечения опухолей костей и мягких тканей. Под руководством и при непосредственном его участии были разработаны принципы и обоснования к проведению сохраняющих операций при новообразованиях костей, убедительно показаны возможности химиотерапии при лечении метастазов остеогенной саркомы. Внедрение методики экспресс-протезирования после ампутации и эндопротезирования значительно ускорило процесс реабилитации и во многих случаях позволило восстановить полную трудоспособность больных.

Высоко оценены возглавляемые Н.Н.Трапезниковым исследования по разработке принципиально новых возможностей диагностики и лечения опухолей. Под его руководством впервые в нашей стране были внедрены следующие методы: иммунотерапия злокачественных опухолей активированными лимфоцитами больного, специфическая и неспецифическая иммунотерапия, иммунохимиотерапия и профилактика метастазирования при меланоме кожи. Он возглавлял кооперированные исследования по изучению эффективности различных методов лечения меланомы кожи и сарком мягких тканей.

Результаты научных исследований и клинических работ Н.Н.Трапезникова изложены более чем в 400 на-

учных публикаций, в том числе 10 монографий, вышедших в нашей стране и за рубежом. Дважды (в 1977 г. и в 1999 г.) исследования творческих коллективов под его руководством удостоивались Государственных премий в области науки и техники.

Николай Николаевич постоянно уделял большое внимание воспитанию и подготовке специалистов и научных кадров, более 25 лет он заведовал кафедрой онкологии ММА им. И.М.Сеченова. Под его руководством выпол-

нено 25 докторских и более 50 кандидатских диссертаций. Среди его учеников 4 руководителя институтов и 11 профессоров.

Н.Н.Трапезников выполнял большую организационную работу: возглавлял разработку Федеральной целевой программы «Онкология», руководил онкологическим управлением программы «Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении» и Межведомственного научного совета по проблеме «Злокачественные новообразования», был главным онкологом Медицинского центра Управления делами Президента Российской Федерации, президентом Ассоциации онкологических центров и институтов стран СНГ. Он был членом Исполнительного комитета Международного противоракового союза, создателем международного Меланомного комитета ВОЗ, руководителем Координационного центра по онкологии СЭВ, что свидетельствует о высокой международной оценке его заслуг. Николай Николаевич был награжден орденами и медалями нашей Родины и зарубежных стран.

Вся отечественная медицинская наука потеряла не только руководителя крупнейшего академического Центра и признанного лидера в области онкологии, но и одаренного врача, человека большой доброты, внимательного и отзывчивого друга и учителя. Мы глубоко скорбим об уходе из жизни Николая Николаевича, память о котором сохраним всегда в наших сердцах.

Редакция журнала «Российский биотерапевтический журнал»

