

- absolute lymphocyte count and clinical outcome after autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 2004; 33: 291-8.
- Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002; 99: 3838-43.
- Krampera M., Glennie S., Dyson J., et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* 2003; 101(9): 3722-9.
- Bocelli-Tyndall C., Bracci L., Schaeren S., et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the in vitro proliferation of lymphocytes stimulated by interleukins 2, 7 and 15. *Ann. Rheum. Dis.* 2009; 68: 1352-9.
- Le Blanc K., Tammik L., Sundberg B., Haynesworth S.E., Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.* 2003; 57: 11-20.
- Judres M., Norol E., Trenado A., et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J. Immunol.* 2006; 176(12): 7761-7.
- Sergeevicheva V.V., Shevela E.Ya., Kruchkova I.V. et al. Use of combined transplantation of mesenchymal stromal stem cells and hematopoietic stem cells in patients, and autoimmune diseases. Resolution Roszdravnadzor on the application of new medical technologies FS №2008/014 30.01.2008 (in Russian).
19. Sergeevicheva V.V., Shevela E.Ya., Sizikova S.A., et al. Autologous mesenchymal stromal cells of hemoblastosis patients efficiently support hematopoietic recovery after stem cell transplantation. *Cellular Therapy & Transplantation.* 2010; 1(4): 98-105.
20. Peggs K.S., Verfuerth S., Pizzey A., et al. Reconstitution of T-cell repertoire after autologous stem cell transplantation: Influence of CD34 selection and cytomegalovirus infection. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2003; 9(3): 198-205.
21. Williams K., Hakim F.T., Gress R.E. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin. Immunol.* 2007; 19(5): 318-30.
22. Mitra D.K., Singh H.P., Singh M., et al. Reconstitution of naive T cells and type 1 function after autologous peripheral stem cell transplantation: impact on the relapse of original cancer. *Transplantation.* 2002; 73(8): 1336-9.
23. Itoi M., Tsukamoto N., Yoshida H., Amagai T. Mesenchymal cells are required for functional development of thymic epithelial cells. *Int. Immunol.* 2007; 19: 953-64.
24. Suniara R.K., Jenkinson E.J., Owen J.J.T. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J. Exp. Med.* 2000; 191(6): 1051-6.

Поступила 13.09.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 615.276.4.03:618.19-006.04].015.46

Ф.А. Шамилов¹, Г.А. Ельшина², Д.А. Буров³, Я.В. Вишневская³, Н.В. Чхиквадзе³, Д.И. Зернов³,
В.В. Тимошенко³, В.Ю. Сельчук¹, Н.Н. Тупицын³

ВЛИЯНИЕ ПОЛИОКСИДОНИЯ НА СУБПОПУЛЯЦИИ ИНТРАТУМОРАЛЬНЫХ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ Кафедра онкологии Московского государственного медицинского стоматологического университета, 127473, г. Москва; ² ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России; ³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» РАМН, 115478, г. Москва

В работе представлены результаты изучения влияния полиоксидония, применяемого у 20 больных раком молочной железы в неoadъювантном режиме, на субпопуляции интрапутоморальных лимфоцитов. Лимфоидные клетки изучали в гейте CD45 на материале кор-биопсии (до применения полиоксидония) и затем на материале удаленной опухоли (после применения полиоксидония). Для окраски клеток использовали две 4-цветные пробы моноклональных антител: CD45/CD3/CD4/CD25 и CD45/CD3/CD8/CD56, последующий анализ проводили методом проточной цитометрии. Среднее количество большинства субпопуляций интрапутоморальных лимфоцитов не изменилось после иммунотерапии, достоверно снижалась только NK-клетки (CD3-CD56⁺), однако их содержание было крайне низким: 1,68 ± 0,3 и 1,16 ± 0,3% ($p < 0,05$). Субпопуляционный состав интрапутоморальных лимфоцитов 6 больных с наличием патоморфоза опухолевой ткани после применения полиоксидония отличался достоверно более высокими уровнями CD4⁺ лимфоцитов: 50,9 ± 2,0 и 42,1 ± 2,0%, $p = 0,009$.

Ключевые слова: рак молочной железы, неoadъювантная иммунотерапия, интрапутоморальные лимфоциты

F.A. Shamilov¹, G.A. Elshina², D.A. Burov³, Ya.V. Vishnevskaya³, N.V. Chkhikvadze³, D.I. Zernov³, V.V. Timoshenko³, V.Yu. Selchuk¹, N.N. Tupitsyn³

¹ Department of oncology Moscow State Stomatology University, Moscow; ² Federal State Budgetary Enterprise «Scientific Centrum of Medical Expertise of Facilities of Medical Use» Ministry of Health, Russia; ³ Federal State Budgetary Institute «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» RAMS, Moscow

The work presents the results of studying the impact of polyoxidonium, used in 20 patients with breast cancer in neoadjuvant mode, on a subpopulation intratumoral lymphocytes. The lymphoma cells studied in the gate CD45 on the material of the core-biopsy (before application of polyoxidonium) and then on the material of the removed tumor (after the application of polyoxidonium). For the painting of the cells used two 4-color samples monoclonal antibodies: CD45/CD3/CD4/CD25 and CD45/CD3/CD8/CD56, the following analysis was performed by flow cytometry. The average number of subpopulations most intratumoral lymphocytes did not change after immunotherapy, authentically decreased only NK-cells (CD3-CD56⁺), but their content was extremely low: 1,68±0,3% and 1,16 ± 0,3% ($p < 0,05$). Subpopulation structure of intratumoral lymphocytes 6 patients with the presence of disease variability of tumor tissue after application of polyoxidonium differed significantly higher levels of CD4⁺ lymphocytes: 50,9±2,0% and 42,1±2,0%, $p=0,009$.

Ключевые слова: breast cancer, adjuvant immunotherapy, intratumoral lymphocyte

ВВЕДЕНИЕ

В последние два года наметился явный прорыв в области клинической иммунологии рака молочной железы. Авторитетнейшие фундаментальные американские журналы PNAS (Proceedings of National Academy of Sciences of the USA) и Cancer Discovery опубликовали статьи, доказывающие главенствующую роль иммунной системы человека в прогнозе рака молочной железы [1, 2]. Открытия эти сделаны при изучении тонких взаимодействий между Т-хелперными (CD4), Т-цитотоксическими (CD8) лимфоцитами и макрофагами, присутствующими в ткани опухоли, т. е. интрапатоморальными клетками иммунной системы. К аналогичным результатам пришли и российские ученые, убедительно доказавшие важную прогностическую роль количественного и качественного состава интрапатоморальных лимфоцитов, в особенности CD8⁺ Т-цитотоксических клеток в прогнозе рака молочной железы [3, 4]. Результаты этих работ проливают свет на то, какие клетки иммунной системы являются наиболее важными с точки зрения противоопухолевого иммунитета, и открывают перспективы поиска иммунологических путей воздействия для активации данных клеточных типов.

При длительном наблюдении (7–15 лет) за больными после радикального хирургического лечения выявлено, что высокие уровни инфильтрации опухоли цитотоксическими Т-лимфоцитами (CD8⁺) являются важным фактором благоприятного прогноза, в особенности, у пациенток, не имеющих метастазов в регионарные лимфатические узлы – N0 [3]. При отсутствии выраженной инфильтрации рака молочной железы CD8⁺ клетками CD4⁺-лимфоциты способствуют опухолевой инвазии и развитию отдаленных метастазов рака молочной железы путем влияния на протуморальную активность опухолесассоциированных макрофагов [5].

Учитывая то, что три клеточных типа – CD4⁺ и CD8⁺-лимфоциты, а также CD68⁺-макрофаги играют главную роль в прогнозе рака молочной железы, предложена трехмаркерная иммунная сигнатура для более точной оценки прогноза у больных раком молочной железы [1]. Иммунный профиль CD68^{Low}-CD4^{Low}CD8^{High} характерен для первичного рака молочной железы, который даже в случаях только хирургического лечения, характеризуется высокими показателями общей и безрецидивной выживаемости. Напротив, иммунные ответы CD68^{High}-CD4^{High}CD8^{Low} соответствуют группе больных с риском развития отдаленных метастазов и сниженной выживаемостью.

Накопленные факты относительно влияния различных популяций интрапатоморальных лимфоцитов на прогноз рака молочной железы ставят со всей определенностью вопрос относительно того, может ли быть проведена иммунокоррекция субпопуляционного состава интрапатоморальных лимфоцитов. В настоящее время подобных работ нет. Одним из перспективных и разрешенных к клиническому использованию в онкологии иммуномодуляторов является полиоксидоний (азоксимера бромид). Это сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбокси)-1,4-этиленпиперазина бромида. Он обладает выраженной иммуномодулирующей активностью и прежде всего воздействует на систему врожденного иммунитета, усиливая функциональную активность как клеточного, так и гуморального иммунитета. В конечном итоге под действием полиоксидония активируется вся иммунная система организма. Данная активация аналогична формированию иммунной реакции в ответ на антигенный (патогенный) фактор [6]. В условиях *in vivo* препарат обладает выраженной способностью стимулировать гуморальный иммунный ответ [7, 8].

В работе представлены данные по влиянию полиоксидония (неоадьюванная иммунотерапия) на субпопуляции интрапатоморальных лимфоцитов у больных раком молочной железы.

Тупицын Николай Николаевич (Tupitsyn Nikolai Nikolaeivich), e-mail: nntca@yahoo.com

Материал и методы. Клиническая характеристика больных.

20 больным в возрасте от 32 до 78 лет (медиана – 53,5) проводилась кор-биопсия опухоли, последующее лечение полиоксидонием, радикальная операция. Полиоксидоний применяли внутримышечно в дозе 12 мг в 1, 2, 3, 5, 7-й дни (1-й день – день кор-биопсии). Операцию выполняли на следующий день после последнего введения полиоксидония.

Инфильтративный протоковый рак установлен у 14 пациенток (70,0%), инфильтративный дольковый – у 4 (20%), тубулярный – у 1 (5%), медуллярный – у 1 (5%). Рецепторы эстрогенов были положительны в 16 случаях из 20 (80%), рецепторы прогестерона – в 14 из 20 (70%). Статус по Her2/neu: 0–9 (45%), 1 ± 7 (35,0%), 2 ± 3 (15,0%), 3 ± 1 (5,0%). В одном из трех случаев, расцененных как 2+, экспрессия рецептора характеризуется как положительная на основании результатов FISH-реакции. Таким образом, положительный статус по Her2/neu имел место у 2 больных (20%). Пролиферативный индекс (Ki-67) находился в диапазоне от 7 до 75% (среднее – 33,9 ± 17,4%). У 12 больных установлена 2-я степень злокачественности (70,6%), у 5 – 3-я (29,4%).

Размеры опухоли у 19 больных (95%) в основном соответствовали индексу pT2, лишь в 1 (5,0%) случае – pT1. Метастазы в регионарные лимфатические узлы отмечены у 14 (70,0%) больных (N1 – 7 /35%, N2 – 7 /35%), у 6 (30%) больных метастазы отсутствовали. Отдаленных метастазов у больных анализируемой группы не было. В соответствии с клиническими стадиями заболевания больные распределились следующим образом: I стадия – 1 (5%), II стадия – 5 (25%), III стадия – 7 (35%), IIIa – 7 (35%).

Иммунологические исследования. Иммунологическое исследование материала кор-биопсии и удаленной опухолевой ткани проводили методом 4-цветной проточной цитометрии с использованием следующих комбинаций антител: 1-я проба – CD4/CD3/CD25/CD45, 2-я проба – CD8/CD3/CD56/CD45. Анализ данных выполняли с использованием программы WinMDI или (в случаях, требующих дополнительной компенсации параметров флуоресценции) – программы FCS, версия 3. Статистическую обработку осуществляли с использованием программы SPSS.

Оценены следующие иммунологические показатели интрапатоморальных лимфоцитов:

- общий уровень лимфоидной инфильтрации – количество CD45⁺ лимфоцитов по отношению к общему числу событий, набранных при проточной цитометрии;
- процент зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺) среди лимфоцитов (CD45⁺);
- процент зрелых CD4⁺CD3⁺ Т-лимфоцитов;
- процент зрелых Т-цитотоксических лимфоцитов CD3⁺CD8⁺;
- соотношение CD8/CD4;
- процент активированных (регуляторных) CD4⁺CD25⁺ клеток;
- процент NK-клеток – CD3⁻CD56⁺;
- процент TNK клеток – CD3⁺CD56⁺.

Результаты. Все больные хорошо переносили введение полиоксидония. Осложнений нами не отмечено. Ни у кого из больных во время проведения иммуномодулирующей терапии и в послеоперационном периоде не было инфекционных заболеваний.

По результатам морфологического исследования хирургически удаленной опухоли у 6 из 20 больных (30%), получавших в неоадьювантом режиме только полиоксидоний, отмечен лечебный патоморфоз: у 3 больных – I степени, у 2 больных – II степени, у 1 больной – IV степени.

Провели попарное сравнение среднего содержания процента интрапатоморальных лимфоцитов различных субпопуляций у больных до применения полиоксидония (материал кор-биопсии) и после проведения неоадьюванной иммунотерапии (материал удаленной опухоли), табл. 1.

После лечения полиоксидонием по большинству изученных показателей не отмечено достоверного увеличения или снижения среднего процентного содержания интрапухоморальных лимфоцитов в опухолевой ткани ($p > 0,05$). Изменения носили разнонаправленный характер. Снижение процента CD4⁺ клеток отмечено в 5 случаях (26,3%), в 8 случаях (42,1%) процент CD4 клеток практически не изменялся, в 6 наблюдениях выявлено повышение процентного содержания CD4⁺ лимфоцитов (31,6%). При анализе динамики CD8-позитивных клеток у 19 больных отсутствие изменений в проценте CD8+ лимфоцитов установлено в 3 случаях (15,8%), снижение – в 7 случаях (36,8%) и повышение – в 9 случаях (47,4%).

Вместе с тем, средние уровни NK-клеток были достоверно более низкими как до, так и после лечения полиоксидонием – $1,68 \pm 0,3$ и $1,16 \pm 0,3\%$ соответственно ($p < 0,05$).

У 6 из 20 (30%) больных раком молочной железы применение полиоксидония в неоадьювантном режиме привело к развитию явлений патоморфоза опухолевой ткани. Развитие подобных явлений после проведения неоадьювантной химиотерапии носит название лечебного патоморфоза. Поскольку полиоксидоний не обладает прямым цитотоксическим действием на нормальные и опухолевые клетки, есть основания расценивать наблюдаемые проявления как иммунологически опосредованный патоморфоз.

Сравнили субпопуляционный состав интрапухоморальных лимфоцитов у больных с явлениями патоморфоза и без такого (табл. 2). Все пациенты получали полиоксидоний в неоадьювантном режиме.

Как видно из представленных данных, только два показателя интрапухоморальных лимфоцитов имеют связь с патоморфозом опухоли после терапии полиоксидонием – уровень интрапухоморальных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и соотношение CD8/CD4 в опухолевой ткани. Уровень CD4⁺ лимфоцитов при патоморфозе выше, чем в группе сравнения (без патоморфоза). Именно это, также как и более низкое

(не достоверно) количество CD8⁺ лимфоцитов в опухолевой ткани при наличии патоморфоза отражается на соотношении CD8/CD4 интрапухоморальных лимфоцитов, которое значимо снижается.

Обсуждение. В нашей работе оценено влияние полиоксидония, применяемого в неоадьювантном режиме, на субпопуляционный состав интрапухоморальных лимфоцитов у больных раком молочной железы. Препарат не имел побочных эффектов. Клиническая эффективность полиоксидония заключалась в индукции у 30% больных патоморфоза опухолевой ткани.

Иммунологические данные указывают на снижение уровня интрапухоморальных NK-клеток (CD3⁺CD56⁺) после терапии полиоксидонием. Следует отметить однако, что уровни NK-клеток как до, так и после иммунотерапии были крайне низкими ($1,68 \pm 0,3$ и $1,16 \pm 0,3\%$ соответственно), и для суждения о клинической значимости данных показателей потребуются более подробные исследования.

В настоящее время отношение к роли NK-клеток не столь однозначное. Помимо позитивной роли в противовирусной и противораковой защите эти клетки могут также угнетать CD8⁺ Т-цитотоксический иммунитет [9]. Установлена регуляторная роль NK-клеток в адаптивном иммунитете. После удаления NK-клеток усиливается антигенная презентация в ходе инфекции вирусом лимфоцитарного хориоменингита [10]. Удаление NK-клеток улучшает формирование Т-клеток памяти [11]. Активация NK-клеток ведет к продукции ими интерлейкина-10, который способствует вирус-индукированному подавлению CD8⁺-клеток [12, 13]. Следует отметить, что полиоксидоний оказывает иммуномодулирующее действие, т. е. конечный эффект (снижение или повышение уровня тех или иных субпопуляций лимфоцитов) зависит от исходного содержания этих клеток. У больных раком молочной железы с исходно сниженными показателями иммунного статуса полиоксидоний обеспечивал нормализацию содержания CD3⁺, CD4⁺ и CD16⁺ лимфоцитов [14]. Уменьшение уровня CD16⁺ клеток выявлено у 35% больных (11 из 31) с $20,8 \pm 1,4$ до $11,8 \pm 1,3\%$ [15].

Таблица 1

Сравнение средних показателей содержания различных субпопуляций интрапухоморальных лимфоцитов до (материал кор-биопсии) и после (материал хирургически удаленной опухоли) проведения иммуномодулирующей терапии полиоксидонием

Показатель	Материал	Среднее	N	Стандартная ошибка среднего	p
CD3	Кор-биопсия	88,0179	19	1,50399	0,92
	Операция	87,8700	19	1,17931	
CD8	Кор-биопсия	40,8747	19	1,97051	0,28
	Операция	43,7605	19	2,10466	
CD4	Кор-биопсия	45,1832	19	2,24229	0,92
	Операция	44,9042	19	1,77561	
CD8/CD4	Кор-биопсия	0,9579	19	0,06856	0,5
	Операция	1,0195	19	0,08339	
CD4 ⁺ CD25 ⁺	Кор-биопсия	4,0327	15	0,72341	0,30
	Операция	3,2007	15	0,45375	
CD3 ⁺ CD56 ⁺	Кор-биопсия	4,5412	17	1,55849	0,41
	Операция	3,2541	17	0,59454	
CD3 ⁺ CD56 ⁺	Кор-биопсия	1,6829	17	0,32857	0,029
	Операция	1,1635	17	0,25660	
% лимфоцитов	Кор-биопсия	2,0470	20	0,64825	0,13
	Операция	3,2155	20	0,95008	

Таблица 2

Сравнительная характеристика субпопуляционного состава интрапухоморальных лимфоцитов после неоадьювантной иммунотерапии полиоксидонием в группах больных с наличием и отсутствием патоморфоза опухолевой ткани

Популяция клеток, CD	Патоморфоз	N	Среднее	Стандартная ошибка среднего	p
CD3	нет	13	88,4962	1,64635	0,45
	есть	6	86,5133	1,10560	
CD8	нет	13	45,7462	2,65320	0,17
	есть	6	39,4583	2,91237	
CD4	нет	13	42,1338	2,01980	0,009
	есть	6	50,9067	2,04850	
CD8/CD4	нет	13	1,1262	0,10369	0,025
	есть	6	0,7883	0,08799	
CD4 ⁺ CD25 ⁺	нет	13	3,5338	0,55121	0,66
	есть	6	3,1333	0,55890	
CD3 ⁺ CD56 ⁺	нет	12	2,8250	0,68726	0,27
	есть	6	4,1833	0,94145	
CD3 ⁺ CD56 ⁺	нет	12	1,3125	0,33318	0,84
	есть	6	1,1950	0,47923	
% лимфоцитов	нет	14	3,8379	1,29435	0,33
	есть	6	1,7633	0,81694	

Работа была предпринята во многом в связи с открытием благоприятной прогностической роли CD8⁺ лимфоцитов, инфильтрирующих рак молочной железы [11, 20]. Согласно данным этих авторов, выраженная инфильтрация опухолевой ткани рака молочной железы CD8⁺-лимфоцитами является одним из главных факторов благоприятного прогноза, определяющим лучшие показатели общей и безрецидивной выживаемости больных. CD4⁺-лимфоциты в однофакторном анализе не влияют на прогноз, но ухудшают выживаемость за счет стимуляции макрофагов цитокинами, продуцируемыми Th1⁺ клетками. В более ранних работах Онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина также была установлена благоприятная роль CD8⁺ клеточной инфильтрации в прогнозе рака молочной железы, в особенности при отсутствии регионарных метастазов - N0 [4]. При этом случаи выраженной CD4⁺ Т-клеточной инфильтрации также характеризовались более благоприятным прогнозом (различия не достоверны) в сравнении с пациентами без подобной инфильтрации. Логично считать, что Т-клеточная помощь в этих случаях необходима для осуществления противоопухолевого эффекта CD8⁺ Т-цитотоксических лимфоцитов. Следует отметить, что работы как американских, так и российских ученых выполнялись полуколичественным иммуногистохимическим методом оценки содержания субпопуляций интрапатомальных лимфоцитов в опухолевой ткани. Применение пропоточной цитометрии является, несомненно, более точным количественным подходом, позволяющим характеризовать уровни и соотношения между субпопуляциями лимфоцитов в опухолевой ткани.

Нами не установлено достоверного повышения уровней интрапатомальных CD8⁺-лимфоцитов в ходе иммунотерапии поликсидонием. Вместе с тем, изменения количества интрапатомальных лимфоцитов были разнонаправленными. Снижение количества CD4⁺-клеток отмечено в 26,3%, в 42,1% наблюдений динамика отсутствовала, и в 31,6% случаев процент CD4⁺-лимфоцитов повышался. Отсутствие изменений в проценте CD8⁺-лимфоцитов установлено в 15,8%, снижение – в 36,8% и повышение – в 47,4%. Эти данные свидетельствуют о том, что средние величины процента интрапатомальных лимфоцитов при лечении поликсидонием вряд ли, являются информативными при оценке действия данного иммуномодулятора. Более правильно оценивать эффект в зависимости от исходного уровня интрапатомальных лимфоцитов.

Наибольшую информацию при поиске иммунологических критериев действия препарата дают клинические результаты. В анализируемой группе у 6 из 20 больных имел место лечебный патоморфоз. У этих больных применение поликсидония привело к частичной, а в 1 случае – к полной регрессии опухоли. Сопоставление уровней интрапатомальных лимфоцитов различных субпопуляций в опухолях с явлениями патоморфоза и без такового дало неожиданные результаты. Интрапатомальные лимфоциты при наличии патоморфоза характеризовались более высокой пропорцией CD4⁺ Т-клеток и более низким индексом CD8/CD4. Эти данные подтверждают важную положительную роль CD4⁺ лимфоцитов (Т-хеллеров, так как уровни CD4⁺CD25⁺ Т-регуляторных клеток были крайне низкими) в противоопухолевом иммунитете при раке молочной железы.

Опухолеспецифичные CD4⁺ Т-клетки существуют, они мигрируют как в мышиные, так и в человеческие опухоли [16, 17, 18]. CD4⁺ Т-клетки достаточны для элиминации опухолевых клеток в отсутствие CD8⁺ клеток в некоторых опухолевых моделях [17, 19, 20, 21, 22], однако в большинстве случаев для эффективного отторжения опухоли необходимы как CD4, так и CD8 клетки [19]. Частично это обусловлено тем, что значительная часть опухолевых клеток экспрессирует только молекулы МНС I класса, но не МНС II класса, что лимитирует прямое распознавание опухоли CD4⁺ Т-клетками. Более того преобладающим эффекторным механизмом в опухолевом иммунитете является прямой лизис опухолевых клеток CD8⁺

ЦТЛ, распознающими МНС I класса. Роль CD4⁺ Т-клеток в противоопухолевых ответах, как правило, заключается в осуществлении помощи в активации CD8 Т-клеток, ведущей к деструкции опухоли CD8⁺ цитотоксическими Т-лимфоцитами.

Таким образом, проведенное нами исследование свидетельствует о возможности использования поликсидония в неоадьювантной иммунотерапии рака молочной железы. Препарат оказывает положительный эффект (индукция патоморфоза) у 30% больных, который ассоциируется с субпопуляцией интрапатомальных CD4⁺ лимфоцитов и снижением индекса CD8/CD4. Актуальной является задача по дальнейшему поиску критерии отбора больных раком молочной железы для неоадьювантной иммунотерапии поликсидонием.

ЛИТЕРАТУРА

- Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования опухолевых клеток в диагностике и прогнозе рака молочной железы. Иммунология гемопоэза. 2009; 6(1): 8–51.
- Артамонова Е.В., Огнерубов Н.А., Тупицын Н.Н., Летягин В.П. Рак молочной железы: иммунологические факторы прогноза. Воронеж: Издательство Воронежского государственного университета; 2005.
- Дьяконова В.А., Дамбаева С.В. и др. Изучение механизма действия иммуномодулятора Поликсидония на клеточном и молекулярном уровнях на клетках периферической крови человека в условиях *in vitro*. Физиология и патология иммунной системы. 2004; 8(2): 32–6.
- Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хайтов Р.М. Иммуномодулятор поликсидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения. Цитокины и воспаление. 2004; 3(3): 41–7.
- Хайтов Р.М., Пинегин Б.В. Современные представления о механизме действия поликсидония. Иммунология. 2005; 26(4): 197–9.
- Артамонова Е.В., Короткова О.В., Заботина Т.Н. и др. Результаты применения поликсидония у больных раком молочной железы// Российский биотерапевтический журнал. 2005; 4(1): 96–7.
- Манзюк Л.В., Артамонова Е.В., Карадагидзе З.Г. и др. Результаты применения Поликсидония у больных раком молочной железы. Лекарственные препараты и оборудование. 2005; 11: 43.

REFERENCES

- DeNardo D.G. et al. Leucocyte complexity in breast cancer predicts overall survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discovery*. 2011; 1(1): 54–67.
- Ruffel B., Au A., Rugo H.S. et al. Leucocyte composition in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109(8): 2796–801.
- Артамонова Е.В. Immunologiya gemopoeza. 2009; 6(1): 8–51 (in Russian).
- Артамонова Е.В., Огнерубов Н.А., Тупицын Н.Н., Летягин В.П. Breast cancer immunological prognostic factors. Voronezh: Izdatel'stvo Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta; 2005 (in Russian).
- DeNardo D.G., Barret J.B., Andreu P. et al. CD4⁺ T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumour properties of macrophages. *Cancer Cell*. 2009; 16: 91–102.
- Дыаконова В.А., Дамбаева С.В. и др. Fisiologia i patologija immunoj sistemy. -2004; 8(2): 32–6 (in Russian).
- Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хайтов Р.М. Citokini i vospalenie. 2004; 3(3): 41–7 (in Russian).
- Хайтов Р.М., Пинегин Б.В. Immunologiya. 2005; 26(4): 197–9 (in Russian).
- Lang P.A., Lang K.S., Xu H.C. et al. Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8⁺ T-cell immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109(4): 1210–5.
- Su H.C. et al. NK cell functions restrain T cell responses during viral infections. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31: 3048–55.

11. Soderquest K. et al. Cutting edge: CD8⁺ T cell priming in the absence of NK cells leads to enhanced memory responses. *J. Immunol.* 2011; 186: 3304–8.
12. Brooks D.G. et al. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nature Med.* 2006; 12: 1301–9.
13. Lee S.H., Kim K.S., Fodil-Kornu N. et al. Activating receptors promote NK cell expansion for maintenance, IL-10 production, and CD8 T cell regulation during viral infection. *J. Exp. Med.* 2009; 206: 2235–51.
14. Artamonova E.V., Korotkova O.V., Zabotina T.N. et al. Rossiiskiy bioterapevticheskiy zurnal. 2005; 4(1): 96–7 (in Russian).
15. Manziuk L.V., Artamonova E.V., Kadagidze Z.G. et al. Lekarstvenniye preparaty I oborudovanie. 2005; 11: 43 (in Russian).
16. Beck-Engeser G.B., Monach P.A., Mumberg D. et al. Point mutations in essential genes with loss or mutation of the second allele: relevance to the retention of tumor-specific antigens. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 285–300.
17. Monach P.A., Meredith S.C., Siegel C.T. et al. A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution. *Immunity.* 1995; 2: 45–59.
18. Pardoll D.M., Topalian S.L. The role of CD4⁺ T cell responses in antitumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 1998; 10: 588–94.
19. Beatty G.L., Paterson Y. IFN-gamma can promote tumor evasion of the immune system in vivo by down-regulating cellular levels of an endogenous tumor antigen. *J. Immunol.* 2000; 165: 5502–8.
20. Fujiwara H., Fukuzawa M., Yoshioka T. et al. The role of tumor-specific Lyt-1+2⁻ T cells in eradicating tumor cells in vivo. I. Lyt-1+2⁻ T cells do not necessarily require recruitment of host's cytotoxic T cell precursors for implementation of in vivo immunity. *J. Immunol.* 1984; 133: 1671–6.
21. Greenberg P.D., Cheever M.A., Fefer A. et al. Eradication of disseminated murine leukemia by chemoimmunotherapy with cyclophosphamide and adoptively transferred immune syngeneic Lyt-1+2⁻ lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1981; 154: 952–63.
22. Mumberg D., Monach P.A., Wanderling S. et al. CD4⁺ T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects if IFN-gamma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1999; 96: 8633–8.

Поступила 24.10.12

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ АЛЛЕРГОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 615.218.3.03:616-056.43].012

Ю. В. Кузьменко¹, В. В. Тютяева¹, И. В. Андреев², М. Н. Санков², Е. С. Стародубова¹,
О. В. Преображенская¹, А. И. Мартынов², В. Л. Карпов¹.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АЛЛЕРГЕНА BETV2 ПЫЛЬЦЫ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ С ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫМИ СИГНАЛАМИ

¹ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ²ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА, 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, корп. 2)

Для изменения соотношения IgE/IgG-ответа аллерген BetV2 (профилин) пыльцы березы повислой модифицировали иммунорегуляторными пептидами. Для усиления Th1-ответа использовали сигнал деградации на протеасоме орнитиндекарбоксилазы, а для Th2-ответа – сигнал направления в лизосомы инвариантной цепи человека. Разработали систему по наработке препаратов рекомбинантного аллергена BetV2, пригодного для иммунологических тестов. Полученные высокочищенные препараты химерных белков эффективно связывали IgE-антитела сывороток больных аллергией на пыльцу березы.

Ключевые слова: береза повислая, BetV2 профилин, иммунорегуляторные сигналы

Yu. V. Kuz'menko¹, V. V. Tyutyaeva¹, I. V. Andreev², M. N. Sankov², E. S. Starodubova¹, O. V. Preobrazhenskaya¹, A. I. Martynov², V. L. Karpov¹

¹Of V.A. Engelhardt Institute of molecular biology RAS, 119991, Moscow, ² Institute of immunology of Federal medical-biological Agency, 115478, Moscow

SELECTION AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF ALLERGEN BETV2 DROOPING BIRCH POLLEN WITH IMMUNOREGULATORY SIGNALS

To change the ratio of IgE/IgG response allergen Bet V2 (profilin) drooping birch pollen modified immunoregulatory peptides. To strengthen the Th1 response was used signal degradation proteasome ornithinidcarboxilase and Th2 response - signal direction.in lisosoma invariant chains man. Developed a system running preparations of recombinant allergen Bet V2 suitable for immunological tests. Received highly purified preparations of chimeric proteins effectively bound IgE antibodies serum of patients allergic to birch pollen.

Keywords: birch, BetV2 profilin, immunoregulatory signals

Кузьменко Юлия Викторовна – мл. науч. сотр. ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, тел. 8 (499) 135-98-01, e-mail: Kuzmenko-yulia@mail.ru