

Е.А. Шкапова, Л.М. Куртасова, А.А. Савченко

ОЦЕНКА КЛЕТОЧНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ К ИНТЕРФЕРОНУ *IN VITRO* У БОЛЬНЫХ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫМ РАКОМ

ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, Красноярск

Красноярский краевой онкологический центр, Красноярск

ГОУ ВПО Красноярская государственная медицинская академия, Красноярск

Проведены наблюдения за 132 больными почечно-клеточным раком (ПКР) ($T_3N_0M_0$) в период до хирургического лечения и в динамике через 14 дней и 1,5 месяца после радикальной нефрэктомии. С помощью хемилюминесцентного анализа реактивности лейкоцитов при воздействии интерферона *in vitro* установлено, что оптимальное время для начала интерферонотерапии у больных ПКР — через 1,5 месяца после операции, когда наиболее широк диапазон клеточной чувствительности к интерферону.

Ключевые слова: интерферон, почечноклеточный рак, лейкоциты, хемилюминесценция

Перспективным направлением в терапии почечно-клеточного рака (ПКР) является сочетание хирургического лечения и иммунотерапии препаратами интерферона (ИФН) [5, 6]. В то же время необоснованное или несвоевременное применение препаратов ИФН может снизить эффективность терапии или даже оказать негативное воздействие на организм в целом [1, 7]. Хорошо известно, что лейкоциты несут на своей поверхности богатый набор рецепторов и характеризуются высокой мобилизационной активностью и способностью к быстрому и точному отражению изменений организменного гомеостаза [2, 4]. Это делает возможным с помощью хемилюминесцентного (ХЛ) анализа оценить прямое воздействие ИФН на функциональную активность лейкоцитов крови, что позволит определить чувствительность клеток к данному препарату и в дальнейшем судить об эффективности интерферонотерапии. Таким образом, целью работы явилось изучение влияния различных доз рекомбинантного интерферона- $\alpha 2a$ *in vitro* на реактивность лейкоцитов крови больных ПКР в период до и в динамике после хирургического лечения.

Методика

На базе Красноярского краевого онкологического центра проведены динамические наблюдения за больными ПКР ($T_3N_0M_0$) в возрасте 40-55 лет до хирургического лечения ($N=132$), через 14 дней после оперативного вмешательства ($N=45$) и через 1,5 месяца после радикальной нефрэктомии ($N=12$). У всех наблюдаемых пациентов диагноз ПКР подтвержден гистологически. В качестве контрольной группы были обследованы

30 здоровых доноров аналогичного возрастного диапазона. Исследования проводились в строгом соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (WMA, 1964).

Исследование спонтанной и индуцированной ХЛ лейкоцитов периферической крови проводили по методу De Sole et al. [3]. Параметры ХЛ-ответа лейкоцитов оценивали с помощью хемилюминометра «CL 3606M» (Россия) с использованием следующих реактивов: донорская сыворотка, раствор Хенкса (без фенолового красного), люминол в концентрации 100 мкг/мл, зимозан в концентрации 2 мг/мл и реаферон (рекомбинантный ИФН- $\alpha 2a$) в концентрации 100000 МЕ/мл. Концентрация реаферона в пробах рассчитывалась исходя из количества клеток в пробе и терапевтических доз 3, 5 и 8 млн МЕ. Результаты ХЛ-анализа характеризовали по следующим параметрам: времени выхода на максимум интенсивности (T_{max}), максимальному значению интенсивности (I_{max}) и площади (S) под ХЛ-кривой. Усиление ХЛ, индуцированной зимозаном, оценивали соотношением площади индуцированной (S_2) к площади спонтанной (S_1) и определяли как индекс активации.

Для всех полученных данных определяли среднее арифметическое значение (M) и ошибку средней арифметической (m). Проверку гипотезы о статистической достоверности величин исследуемых показателей в независимых выборках проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Достоверность изменения величин исследуемых ХЛ-показателей в зависимости от дозы реаферона в пробах оценивали по критерию Вилкоксона. Статистическую обработку результатов осуществ-

вляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.).

Результаты

Для объективной оценки чувствительности к ИФН лейкоцитов крови больных ПКР предварительно необходимо охарактеризовать клеточный ответ на воздействие ИФН *in vitro* в контрольной группе. Полученные данные свидетельствуют о том, что воздействие исследуемых доз реаферона на кинетику спонтанного ХЛ-ответа, а также на уровни интенсивности и площади спонтанной ХЛ-кривой лейкоцитов крови здоровых доноров выражается в снижении этих параметров относительно контрольного уровня (без присутствия реаферона в реакционной среде) (Таблица 1). Так, статистически достоверное ускорение времени достижения максимума интенсивности спонтанного ХЛ-ответа лейкоцитов здоровых доноров наблюдается при воздействии реаферона в дозе 10000 МЕ в 69,1% случаев относительно соответствующего параметра при воздействии реаферона в дозе 4000 МЕ. Статистически значимо снижается максимальный уровень свечения относительно контрольных параметров при воздействии реаферона не только при высокой дозе (10000 МЕ), но и в средней концентрации, составляющей 4000 МЕ, в 73,2 и 77,8% случаев соответственно. В то время как низкая доза реаферона 2000 МЕ достоверно снижает величины интегрального показателя спонтанной ХЛ-реакции лейкоцитов, а именно площади ХЛ-кривой, по сравнению с контрольными параметрами.

При анализе параметров индуцированной ХЛ установлено, что после дополнительной функци-

ональной нагрузки лейкоциты крови здоровых людей проявляют чувствительность к реаферону в концентрации 2000 МЕ и 4000 МЕ. При этом воздействие реаферона в концентрации 2000 МЕ проявляется в тенденции к снижению (у 69,5% обследованных), а в концентрации 4000 МЕ реаферон достоверно снижает площадь ХЛ-ответа лейкоцитов относительно исходного уровня в 73,2% случаев. Кроме того, обнаружено, что воздействие реаферона в концентрации 10000 МЕ на стимулированные опсонизированным зимозаном лейкоциты приводит в 73,5% случаев к повышению площади ХЛ кривой относительно соответствующего параметра при наличии реаферона в реакционной среде в концентрации 4000 МЕ. Необходимо отметить, что статистически значимого влияния на индекс активации лейкоцитов не наблюдалось. По-видимому, рецепторный аппарат клеток здоровых доноров находится в функционально адекватном состоянии, поскольку чувствительность наблюдается ко всем исследуемым дозам реаферона.

Исследование ХЛ-ответа лейкоцитов крови больных ПКР до операции при воздействии различных доз реаферона *in vitro* показало, что ни одна из исследуемых доз реаферона статистически значимо не изменяет параметры ХЛ-анализа. Вероятно, такая клеточная резистентность объясняется отсутствием на поверхности лейкоцитов больных ПКР до операции достаточного количества соответствующих рецепторов или нарушением сигнал-передающего аппарата клетки в целом, что, в свою очередь, может быть обусловлено наличием опухоли в организме.

Таблица 1

Параметры хемилюминесценции лейкоцитов крови здоровых доноров при воздействии различных доз реаферона ($M \pm m$)

Параметры	Здоровые доноры (n=26)			
	Контроль 1	Дозы реаферона		
		2000 МЕ 2	4000 МЕ 3	10000 МЕ 4
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax (сек.)	1176,08±159,21	1134,96±160,12	1067,23±156,27	1167,69±164,99 P ₃ <0,05
Imax (о.е.*10 ³)	32,29±7,24	19,14±2,53	18,81±2,76 P ₁ <0,05	24,27±4,63 P ₁ <0,05
S ₁ (о.е.*10 ⁵)	7,91±1,64	6,46±1,01 P ₁ <0,05	6,50±0,94	7,57±1,37
Индуцированная хемилюминесценция				
Tmax (сек.)	834,42±54,12	843,33±44,73	821,58±47,03	780,14±34,85
Imax (о.е.*10 ³)	133,24±21,31	105,84±15,88	106,61±16,83	111,29±22,00
S ₂ (о.е.*10 ⁵)	34,39±5,07	28,28±3,88 0,1>P ₁ >0,05	25,38±3,96 P ₁ <0,01	32,49±5,36 P ₃ <0,05
Индекс активации				
S ₂ /S ₁	5,74±0,86	5,50±0,70	4,33±0,55	5,49±0,70

Примечание: P₁ — статистически достоверные различия с контрольными показателями; P₂ — статистически достоверные различия с показателями при наличии в реакционной среде реаферона в концентрации 2000 МЕ; P₃ — статистически достоверные различия с показателями при наличии в реакционной среде реаферона в концентрации 4000 МЕ.

Анализ параметров ХЛ-ответа лейкоцитов при воздействии реаферона *in vitro* в группе больных ПКР через 14 дней после радикальной нефрэктомии позволил выявить тенденцию к восстановлению клеточной чувствительности к ИФН *in vitro* (Таблица 2). Так, при наличии реаферона в реакционной среде в концентрации 10000 МЕ отмечается тенденция к снижению времени выхода на максимум спонтанной ХЛ-кривой в 55,5% слу-

чаев относительно соответствующего параметра при воздействии дозы 4000 МЕ, что совпадает с направлением реакции в контрольной группе. Время выхода на максимум стимулированной ХЛ-кривой увеличивается относительно контрольного значения при воздействии реаферона в концентрации 4000 МЕ в 64,4% случаев. Обнаружена тенденция к увеличению площади стимулированной ХЛ лейкоцитов в ответ на присутствие

Таблица 2

Показатели хемилюминесценции лейкоцитов крови у больных ПКР через 14 дней после операции при воздействии различных доз реаферона *in vitro* ($M \pm m$)

Показатели	Больные ПКР (n=42)			
	Контроль 1	Дозы реаферона		
		2000 ME 2	4000 ME 3	10000 ME 4
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax (сек.)	1168,67±114,50	1101,05±112,02	1214,50±117,77	1073,59±105,50 0,1>P ₃ >0,05
I _{max} (о.е.*10 ³)	49,42±6,06	54,39±7,11	53,78±7,16	53,83±7,13
S ₁ (о.е.*10 ⁵)	22,74±3,05	20,45±2,48	18,59±2,12	23,50±3,055
Индукцированная хемилюминесценция				
Tmax (сек.)	907,98±47,09	834,95±36,47	972,44±64,27 P ₂ <0,05	996,56±61,37
I _{max} (о.е.*10 ³)	205,28±16,52	197,69±16,19	198,28±16,66	211,56±16,71
S ₂ (о.е.*10 ⁵)	107,85±15,58	120,14±18,28	94,66±13,11	102,31±13,55 0,1>P3>0,05
Индекс активации				
S ₂ / S ₁	5,09±0,63	7,73±1,22	5,22±0,67	5,64±0,65

Примечание: P₂ — статистически достоверные различия с показателями при наличии в реакционной среде реаферона в концентрации 2000 МЕ; P₃ — статистически достоверные различия с показателями при наличии в реакционной среде реаферона в концентрации 4000 МЕ.

Таблица 3

Показатели хемилюминесценции лейкоцитов крови у больных ПКР через 1,5 месяца после операции при воздействии различных доз реаферона *in vitro* ($M \pm m$)

Показатели	Больные ПКР (n=12)			
	Контроль 1	Дозы реаферона		
		2000 МЕ 2	4000 МЕ 3	10000 МЕ 4
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax (сек.)	1866,58±232,77	1580,50±255,03	1391,42±207,26 0,1>P ₁ >0,05	1188,91±154,88 0,1>P ₁ >0,05
I _{max} (о.е.*10 ³)	56,14±6,93	54,16±12,25 P ₁ <0,05	60,66±11,81 P ₂ <0,05	69,69±13,85 P ₂ <0,05
S ₁ (о.е.*10 ⁵)	22,62±5,39	19,41±5,31 P ₁ <0,05	21,64±5,58 0,1>P ₂ >0,05	20,92±5,33 P ₂ <0,05
Индукцированная хемилюминесценция				
Tmax (сек.)	919,50±114,23	849,75±79,85	925,36±88,31 0,1>P ₂ >0,05	980,27±52,10
I _{max} (о.е.*10 ³)	179,58±38,55	171,35±39,72	178,93±38,18 0,1>P ₂ >0,05 P ₂ <0,05	175,76±39,65 0,1>P ₂ >0,05
S ₂ (о.е.*10 ⁵)	80,33±29,05	91,89±29,23	27,51±2,99 P ₁ <0,05	31,28±8,86 0,1>P ₃ >0,05
Индекс активации				
S ₂ / S ₁	3,13±0,60	3,66±0,75 P<0,05	3,63±0,67 P<0,01	4,31±1,07

Примечание: P₁ — статистически достоверные различия с контрольными показателями; P₂ — статистически достоверные различия с показателями при наличии в реакционной среде реаферона в концентрации 2000 МЕ; P₃ — статистически достоверные различия с показателями при наличии в реакционной среде реаферона в концентрации 4000 МЕ.

в реакционной среде реаферона в концентрации 10000 МЕ относительно соответствующего параметра при воздействии реаферона в дозе 4000 МЕ. Следовательно, через 14 дней после хирургического лечения у больных ПКР наблюдается относительное восстановление клеточной чувствительности лейкоцитов к ИФН.

Изучение параметров ХЛ-ответа лейкоцитов периферической крови больных ПКР через 1,5 месяца после хирургического лечения позволило установить тенденцию к ускорению времени выхода на максимум спонтанной ХЛ-кривой у 75,5% обследуемых при воздействии реаферона *in vitro* в концентрации 4000 МЕ и 10000 МЕ по сравнению с контрольным диапазоном (Таблица 3). Наблюдается снижение уровня свечения относительно контроля при воздействии на лейкоциты реаферона в дозе 2000 МЕ (у 83,6% пациентов). В то же время обнаружено статистически значимое увеличение интенсивности спонтанной ХЛ при воздействии реаферона в концентрации 4000 МЕ и 10000 МЕ по сравнению с уровнем ответа при наличии в реакционной среде реаферона в концентрации 2000 МЕ (у 67,7 и 75,9% обследуемых пациентов соответственно). Кроме того, выявлено снижение площади спонтанной ХЛ-реакции лейкоцитов периферической крови при воздействии реаферона *in vitro* в концентрации 2000 МЕ относительно контроля (у 85,5% обследуемых). Дозы реаферона 4000 МЕ и 10000 МЕ повышают уровень спонтанного ХЛ ответа клеток относительно соответствующего показателя при воздействии реаферона в дозе 2000 МЕ в данной группе больных ПКР.

Анализ индуцированного ХЛ-ответа лейкоцитов крови у пациентов через 1,5 месяца после хирургического лечения позволил установить тенденцию (в 75,6% случаев) к замедлению времени выхода на максимум ХЛ кривой при воздействии реаферона в концентрации 4000 МЕ относительно соответствующего параметра, зарегистрированного при наличии в реакционной среде реаферона в дозе 2000 МЕ. При воздействии реаферона в дозах 4000 МЕ и 10000 МЕ также отмечена тенденция к понижению максимальной интенсивности свечения относительно контрольного уровня и увеличение данного параметра относительно уровня ХЛ в пробах с реафероном в дозе 2000 МЕ (у 75,6% обследуемых). Значительно снижается площадь индуцированной ХЛ-кривой по сравнению с контрольными значениями при наличии 4000 МЕ реаферона в реакционной среде (у 67,5% пациентов). Доза реаферона 10000 МЕ определяет тенденцию к увеличению площади ХЛ-кривой, относительно соответствующего параметра, зарегистрированного при наличии в реакционной сре-

де реаферона в дозе 2000 МЕ (в 75,3% случаев).

Необходимо отметить, что в данной группе отмечается изменение индекса активации лейкоцитов в ответ на воздействие реаферона *in vitro*, чего не наблюдалось ни у здоровых доноров, ни в группе больных ПКР до операции, ни у пациентов через 14 дней после хирургического лечения. Так, концентрации реаферона 2000 МЕ и 4000 МЕ увеличивают индекс активации лейкоцитов у больных ПКР через 1,5 месяца, что, безусловно, является доказательством восстановления клеточной чувствительности и обоснованием для применения данного препарата в комбинированном лечении этой категории больных. Кроме того, учитывая сниженный индекс активации у больных ПКР в данной группе по сравнению с соответствующим показателем здоровых доноров ($3,13 \pm 0,60$ и $5,74 \pm 0,86$; $P < 0,05$), можно констатировать, что реаферон оказывает модулирующее действие на лейкоциты, увеличивая их компенсаторные возможности. Поскольку лейкоциты являются одной из важных составляющих системы противоопухолевой резистентности, то повышение их функционально-метаболических возможностей имеет большое значение в противоопухолевой защите.

Заключение

Результаты проведенных исследований показали, что лейкоциты крови здоровых доноров и пациентов после хирургического лечения реагируют на присутствие реаферона в реакционной среде изменением регистрируемых параметров ХЛ-ответа и, следовательно, изменением кислородзависимого метаболизма. При этом направленность изменений функциональной активности лейкоцитов неодинакова при действии различных доз реаферона. По-видимому, клеточная чувствительность к реаферону подавляется иммуносупрессирующим действием опухоли и восстанавливается после ее удаления. Кроме того, обнаружено, что если через 14 дней после хирургического лечения клетки реагируют на реаферон в концентрациях 4000 МЕ и 10000 МЕ, то через 1,5 месяца после удаления очага иммуносупрессии расширяется диапазон клеточной чувствительности. Так, у пациентов с ПКР через 1,5 месяца после хирургического лечения лейкоциты реагируют изменением параметров ХЛ-ответа при воздействии реаферона не только в дозах 4000 МЕ и 10000 МЕ, но и при наличии в реакционной среде минимальной исследуемой концентрации реаферона, составляющей 2000 МЕ. Данное обстоятельство позволяет рекомендовать курс реаферонотерапии именно в тот период, когда наблюдается максимальное восстановление клеточной чувствительности к данному препарату.

INVESTIGATION OF LEUKOCYTES CELL SENSITIVITY TO INTERFERON IN VITRO IN PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA

E.A. Shkapova, L.M. Kurtasova, A.A. Savchenko

The dynamic supervision of 132 patients with renal cell carcinoma (RCC) before and in 14 days after radical nephrectomy and 1,5 month after surgical treatment was determined. The findings of chemiluminescence analysis of leukocytes reactivity to interferon in vitro has shown, that optimal time for interferonotherapy at the patients with RCC in 1,5 month after radical nephrectomy, then range of cell sensitivity to interferon is extends.

Литература

1. Волкова М.А. Основные представления об интерферонах / М.А. Волкова // Гематология и трансфузиология. — 1999. — № 4. — С. 32-36.

2. Маянский А.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге / А.Н. Маянский, Д.Н. Маянский. — Новосибирск, 1989. — 344 с.

3. De Sole P. Whole blood chemiluminescence: new technical method to value oxygen-dependent microbial activity granulocytes / P. De Sole, S. Lippa, G.P. Litarro // J. Clin. Laboratory Autom. — 1983. — Vol. 3. — P. 391-400.

4. Kuznetsov V.P. Adjunctive immunocorrection therapy (AIT) for solid tumors: questions of tactics / V.P. Kuznetsov // International J. on Immunorehabilitation. — 2000. — Vol. 2. — № 1. — P. 37-47.

5. Mickisch G.N. Tumornephrectomy plus interferon-alpha is superior to interferon-alpha alone in metastatic renal cell carcinoma / G.N. Mickisch, A. Garin // Urology. — 2000. — Vol. 163. — № 5. — P. 176.

6. Pizzocaro G. Interferon Adjuvant to Radical Nephrectomy in Robson Stages II and III Renal Cell Carcinoma: A Multicentric Randomized Study / G. Pizzocaro, L. Piva, M. Colavita // J. Clin. Oncol. — 2001. — Vol. 19. — № 6. — P. 425-431.

7. Uze G. α - and γ -interferons and their receptor and their friends and relations / G. Uze, G. Lutfalla, K.E. Mgenesen // J. Interferon and Cytokine Res. — 1995. — Vol. 59. — № 1. — P. 3-26.