

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО

Заместитель начальника
Главного управления кадровой политики,
учебных заведений и науки Н.И. Доста

4 декабря 2000 г.

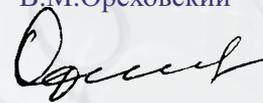


УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель
министра здравоохранения
В.М.Ореховский

4 декабря 2000 г.

Регистрационный № 140-0011



**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ОЦЕНКЕ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА
ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ У ДЕТЕЙ**

Минск 2001

[Перейти к оглавлению](#)

Основное учреждение-разработчик: Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии

Учреждение-соисполнитель: Институт биоорганической химии НАН РБ

Авторы: д-р мед. наук М.П. Потапнев, канд. мед. наук С.Е. Буглова, канд. мед. наук М.А. Черновецкий, канд. хим. наук С.П. Марцев, канд. хим. наук З.И. Кравчук, канд. хим. наук Н.В. Петевка, В.В. Гринев, М.В. Белевцев, Н.В. Мигаль

Рецензент: д-р мед. наук, проф. А.И. Свирновский

В методических рекомендациях рассмотрены методы оценки состояния гуморального иммунитета при острых лейкозах у детей. Наряду с общепризнанными способами определения концентрации иммуноглобулинов, антител к бактериальным токсинам, компонентов комплемента и цитокинов, а также бактерицидной активности сыворотки крови, предлагаются новые методы: выявление противоопухолевых антител методом клеточного иммуноферментного анализа, выявление гомогенности молекул иммуноглобулинов класса G. Представлены данные, свидетельствующие о целесообразности определения перечисленных выше показателей при острых лейкозах в качестве факторов, влияющих на патогенез заболевания.

Методические рекомендации предназначены для онкогематологов, иммунологов, научных работников, врачей-лаборантов клиник и научно-практических учреждений онкогематологического профиля.

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
1. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА	6
1.1. Забор и обработка крови для исследования	6
1.2. Определение концентрации иммуноглобулинов классов М, G, А в сыворотке крови	6
1.3. Определение содержания противоопухолевых антител в сыворотке крови	7
1.4. Определение концентрации антител к столбнячному и дифтерийному анатоксину в сыворотке крови	8
1.5. Определение бактерицидной активности сыворотки крови	9
1.6. Иммуноферментный метод определения фактора некроза опухолей альфа	10
1.7. Оценка конформационных нарушений иммуноглобулинов класса G в сыворотке крови	12
1.8. Определение компонентов комплемента С3с и С4 в сыворотке крови	14
2. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ И ИХ КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ	16
2.1. Связь концентрации иммуноглобулинов класса G с частотой инфекционных осложнений у детей с ОЛЛ	16
2.2. Содержание компонентов комплемента, фактора некроза опухолей альфа и уровень бактерицидной активности сыворотки крови у детей с ОЛЛ	19
2.3. Содержание антитоксических и противоопухолевых антител в сыворотке крови больных с ОЛЛ	21
2.4. Структурно-функциональные нарушения молекул IgG в сыворотке крови у детей с ОЛЛ	24
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	25

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным научным представлениям, специфический противоопухолевый иммунитет является Т-клеточным, то есть определяется наличием и активностью Т-лимфоцитов. В то же время у больных с онкологической и онкогематологической патологией часто выявляются изменения со стороны других звеньев иммунитета. Реакции гуморального иммунитета проявляются прежде всего отклонениями от нормы содержания иммуноглобулинов или антител к микробным и опухолевым антигенам в сыворотке крови. Противоопухолевые антитела распознают множество антигенов опухолевой клетки, включая те, которые распознаются и специфическими Т-клетками-киллерами. Биологическая функция выявляемых противоопухолевых антител окончательно не установлена. Изменения концентрации неспецифических иммуноглобулинов, противомикробных антител и других факторов противoinфекционного иммунитета на ранних этапах заболевания, а также развитие нейтропении, индуцированной лейкозным процессом и/или интенсивной полихимиотерапией, определяют высокую (до 83%) частоту инфекционных осложнений у больных с онкогематологической патологией. Низкая концентрация иммуноглобулинов и высокая концентрация фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α) влияют на исход заболевания и в значительной степени отражают клиническое состояние больных. Важность оценки гуморального иммунитета у больных с острым лейкозом определяется также тем, что использование высокодозной химиотерапии приводит к формированию иммуносупрессивного состояния, обусловленного отсутствием лейкоцитов в периферической крови. В связи с этим роль факторов гуморального иммунитета резко возрастает на протяжении первых 2–3 месяцев интенсивной химиотерапии.

Таким образом, изучение гуморального иммунитета больных острым лейкозом имеет значение для оценки тяжести заболевания, а также для выявления резервных возможностей организма, способствующих предупреждению прогрессирования заболевания и развития осложнений, прежде всего в период проведения химиотерапии. В данных методических рекомендациях нами предлагается комплекс методов оценки гуморального иммунитета, представляющих интерес при характеристике состояния больных с онкогематологическими заболеваниями.

1. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

1.1. Забор и обработка крови для исследования

Венозную кровь у больных берут стерильно утром натощак до начала химиотерапии. Для получения сыворотки кровь забирают в пробирку без консерванта, для получения плазмы — в пробирку с ЭДТА. Обследование детей проводится в комплексе со стандартным набором гематологических, иммунологических и других видов лабораторных исследований, предусмотренных выбранным протоколом лечения пациентов. В некоторых случаях образцы сыворотки крови предварительно термоинактивируют при 56° С в течение 30 мин.

1.2. Определение концентрации иммуноглобулинов классов М, G, А в сыворотке крови

Исследования проводят турбидиметрическим методом с использованием тест-системы « Turbiquant» (Behring, Германия). Учет результатов выполняют на анализаторе « Turbitimer» (Behring) при длине волны 340 нм. Концентрация иммуноглобулинов рассчитывается в автоматическом режиме с учетом параметров калибровки стандартного образца, включаемого в комплект тест-систем.

Для проведения исследований сыворотку крови предварительно разводят изотоническим раствором хлористого натрия в соотношении 1:21. Затем необходимый объем разведенного образца (для IgG — 20 мкл, IgM — 200 мкл, IgA — 50 мкл) вносят в кювету анализатора при комнатной температуре. После учета фонового уровня оптической плотности к образцам добавляют по 500 мкл специфических антисывороток к IgM, IgG, IgA. Через 30 с проводят повторное определение оптической плотности. На основании градиента величины оптической плотности автоматически рассчитывается показатель концентрации иммуноглобулинов в исследуемом образце (в г/л).

Кроме турбидиметрического, может быть использован метод иммунодиффузии в агаровом геле со специфическими антисыворотками (по Манчини).

1.3. Определение содержания противоопухолевых антител в сыворотке крови

Исследования проводят методом клеточного иммуноферментного анализа (CELISA) по модифицированному методу В. Arunachalam et al. (1990). Для этого культивируемые *in vitro* В-лимфобластоидные клетки линий Raji или IM-9 отмывают 0,1 моль забуференным физраствором (ЗФР) (рН 7,4), вносят в лунки плоскодонных 96-луночных микропланшет, предварительно покрытых 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА, Serva). Для осаждения клеток планшету центрифугируют при 1500 об./мин в течение 5 мин, супернатант замещают разведенными (1:100) образцами исследуемых сывороток. Микропланшету инкубируют в течение 1 ч при 37°С во влажной атмосфере. Супернатант удаляют многоканальной автоматической пипеткой, несвязавшиеся и неспецифически связавшиеся антитела/иммуноглобулины отмывают трехкратно 0,1 моль ЗФР с 0,05% Tween-20 (Serva). Затем в лунки вносят по 100 мкл рабочего разведения конъюгата (меченные пероксидазой хрена козы антитела против иммуноглобулинов М + G + А человека), микропланшету вновь инкубируют 1 ч при 37°С. После окончания инкубации клетки на дне лунок отмывают 4–5 раз 0,1 моль ЗФР с 0,05% Tween-20, затем вносят 100 мкл субстратной смеси, содержащей ортофенилендиамин (ОФД), цитратный буфер и H₂O₂, и инкубируют до 30 мин в темноте. Ферментативную реакцию останавливают путем добавления 100 мкл 10% H₂SO₄. Учет реакции проводят на спектрофотометре при длине волны 492 нм. Результаты реакции выражают в единицах оптической плотности OD₄₉₂. Исследования каждого образца сыворотки крови проводят в двух повторах.

1.4. Определение концентрации антител к столбнячному и дифтерийному анатоксину в сыворотке крови

Определение проводят в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) с использованием диагностических тест-систем НПК «Микроанализ» (г. Москва, Россия) в соответствии с «Инструкцией по применению диагностикумов эритроцитарных дифтерийного и столбнячного антигенных (анатоксинных) концентрированных консервированных жидких» (Утверждена Департаментом Государственного санэпиднадзора Минздрава РФ 22 апреля 1997 г.).

Для этого в лунки круглодонных полистирольных 96-луночных планшет с помощью микротитратора Такачи вносят по 25 мкл разведенной термоинактивированной сыворотки, получая ряд двукратных ее разведений от 1:100 до 1:51200 при определении антител к дифтерийному анатоксину и от 1:40 до 1:20480 – при определении антител к столбнячному анатоксину. Затем в лунки добавляют по 25 мкл индикаторных консервированных эритроцитов, покрытых соответственно дифтерийным или столбнячным анатоксином. Микропланшеты покачивают для перемешивания ингредиентов, инкубируют при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакцию оценивают как положительную при формировании «кольца» агглютинированных эритроцитов на дне лунок микропланшет, соответствующего не менее ++ по шкале ++++ учета результатов РПГА согласно инструкции.

Данные, полученные в РПГА, представляют как $\log_2 \times 10^{-1}$ содержания антител к анатоксинам в сыворотках крови обследуемых детей.

1.5. Определение бактерицидной активности сыворотки крови

Выявление антибактериальной активности сыворотки крови больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и здоровых детей проводили путем определения прямой бактерицидной активности нативных образцов (бактерицидная активность которых обусловлена иммуноглобулинами и ферментами, вызывающими лизис бактерий) и термоинактивированных (бактерицидная активность обусловлена преимущественно иммуноглобулинами). Исследование выполняют в стерильных условиях по описанной ранее методике. Для этого предварительно выращенную и отмытую физраствором суспензионную культуру *St. aureus* штамм АТСС 25923 (или другой лабораторный штамм) разводят по стандарту мутности до концентрации 1 млн бактериальных тел в 1 мл. Затем в лунке микропланшеты смешивают равные объемы (по 20 мкл) испытуемой сыворотки крови и бактериальной взвеси. Содержимое лунок перемешивают и инкубируют в течение 30 мин при 37° С. Затем содержимое лунок вновь перемешивают и 5 мкл смеси переносят стандартной бактериологической петлей на чашки Петри с мясопептонным агаром, распределяя равномерно по всей поверхности сектора чашки. Посевы выживших бактерий проводят в двух повторах. Чашки Петри инкубируют в течение ночи, затем подсчитывают количество колоний для каждого варианта, включая контроли без сывороток.

Бактерицидность сыворотки в процентах рассчитывают по формуле:

$(\text{БОЕк} - \text{БОЕо}) : \text{БОЕк} \times 100\%$,

где БОЕк — количество выросших колоний (бляшкообразующих единиц) в контроле,

БОЕо — количество выросших колоний в присутствии исследуемых образцов сыворотки крови.

1.6. Иммуноферментный метод определения фактора некроза опухолей альфа

ФНО- α определяют методом иммуноферментного анализа в полистирольных микропланшетах (Sarstedt). Моноклональные антитела (МКА), специфичные для ФНО- α , были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии НИИ гематологии и переливания крови. Для постановки теста МКА против ФНО- α разводят 1:200 в 0,01 моль фосфатном буфере с 0,15 моль NaCl (0,01 моль ЗФР, pH 7,4), вносят по 100 мкл в лунки планшеты, оставляют при + 4° С на ночь (16–18 ч). Затем лунки отмывают 3 раза с помощью ЗФР. Все последующие разведения стандарта и конъюгатов делают в том же буфере с добавлением 1% БСА (ЗФР-БСА). Добавляют во все лунки по 100 мкл ЗФР-БСА для блокирования мест неспецифического связывания и инкубируют при встряхивании в течение 30 мин.

Стандарт рФНО- α (рекомбинантный, лиофилизированный) растворяют непосредственно перед проведением анализа в 50 мкл дистиллированной воды (до концентрации 80 нг/мл), разводят до концентрации 1 нг/мл в ЗФР-БСА и титруют отдельно двукратным шагом до 15 пг/мл (7 шагов). В три лунки вместо стандарта добавляют по 100 мкл ЗФР-БСА (фоновый уровень). К образцам исследуемой плазмы от пациентов добавляют одну двадцатую часть объема буфера образца (БО = 0,2 моль фосфатный буфер pH 7,2–7,4, содержащий 3 моль NaCl), например, 100 мкл плазмы + 5 мкл БО, после чего их вносят в лунки. Затем в лунки микропланшеты вносят готовые разведения стандарта ФНО- α и исследуемых образцов плазмы (обычно 1:2) по 100 мкл и инкубируют при комнатной температуре в течение 40 мин при встряхивании. Лунки отмывают с помощью ЗФР, как описано выше. Биотинилированные вторичные антитела разводят в ЗФР-БСА до рабочего разведения 1:3000, вносят в лунки, инкубируют, как описано выше, затем вновь отмывают.

Конъюгат стрептавидин-полипероксидаза разводят 1:2000 с помощью ЗФР-БСА, инкубируют аналогичным образом, после чего отмывают с помощью ЗФР. Субстратный буфер (состав: 0,4 мг/мл ОФД в 0,1 моль цитратном буфере (рН = 4,7), 0,01% H_2O_2) добавляют на 8–10 мин при 20° С (100 мкл). Не встряхивая, останавливают реакцию добавлением 100 мкл 10% H_2SO_4 и учитывают на спектрофотометре при длине волны 492 нм. Концентрацию ФНО- α в исследуемых образцах плазмы крови определяют с помощью компьютерной программы Microcal Origin, Ver. 3.5. Чувствительность определения — 15 пкг/мл.

1.7. Оценка конформационных нарушений иммуноглобулинов класса G в сыворотке крови

Конформационные изменения иммуноглобулинов класса G выявляют путем сравнения результатов определения их уровней в исследуемых образцах сыворотки крови тремя методами: турбидиметрическим (см. п.1.2), двуцентровым и конкурентным. Каждый из этих методов основан на взаимодействии молекул IgG через специфические места связывания в области Fc-фрагментов с определенными молекулами (g-специфическими антителами; протеином А стафилококка = СПА). Сопоставление результатов, полученных при оценке связывания тремя методами (двуцентровым, конкурентным и турбидиметрическим), позволяет выявить конформационные нарушения молекул IgG прежде всего в области Fc-фрагментов.

1.7.1. Двухцентровое связывание белка А стафилококка молекулами IgG человека

Метод основан на наличии в молекуле IgG двух потенциальных участков связывания СПА в области контакта между СН2 и СН3 доменами Fc-фрагмента. Для проведения исследования в полипропиленовые пробирки помещают 0,25 мл раствора СПА (4 мкг/мл) в 0,05 моль боратном буфере, рН 8,5, и инкубируют в течение ночи при комнатной температуре. После окончания инкубации пробирки дважды промывают дистиллированной водой, в каждую пробирку вносят по 0,25 мл 0,1 моль ЗФР, содержащего 1% БСА (ЗФР-БСА). Через 1 ч пробирки вновь дважды промывают дистиллированной водой и вносят по 0,25 мл (0,05–8 мкг/мл) IgG1 человека или исследуемые сыворотки крови, разведенные 1:4000 ЗФР-БСА, и инкубируют в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Затем раствор удаляют, пробирки дважды промывают дистиллированной водой, вносят по 200 нг конъюгата СПА-пероксидаза хрена и вновь инкубируют в течение 1,5 ч. Пероксидазную активность выявляют путем внесения субстратной смеси, содержащей ОФД и H_2O_2 . Учет реакции проводят с помощью спектрофотометра при длине волны 492 нм. Содержание IgG в исследуемых образцах определяют по калибровочной кривой.

1.7.2. Конкурентное связывание белка А стафилококка молекулами IgG человека

Метод основан на конкуренции между меченым IgG и стандартным образцом IgG или IgG исследуемого образца сыворотки крови за связывание с СПА. Для этого в полипропиленовые пробирки с иммобилизованным СПА, приготовленные, как описано в п. 1.6.1, вносят по 0,2 мл (0,3–200 мкг/мл) стандартного образца IgG или образец исследуемой сыворотки, разведенной 1:400, и 0,05 мл (25 нг) биотинилированного IgG1 и инкубируют в течение 1,5 ч при комнатной температуре. После окончания инкубации пробирки дважды отмывают дистиллированной водой и вносят по 0,25 мл (250 нг) конъюгата стрептавидин-пероксидазы, инкубируют 1 ч, промывают и измеряют пероксидазную активность образцов, как описано в п. 2.6.1.

1.8. Определение компонентов комплемента С3с и С4 в сыворотке крови

Исследования проводят турбидиметрическим методом с использованием тест-системы «Turbiquant» (Behring, Германия). Учет результатов проводят на анализаторе «Turbitimer» (Behring) при длине волны 340 нм. Концентрация компонентов комплемента рассчитывается в автоматическом режиме в сравнении со стандартным образцом, включаемым в комплект тест-систем.

Для проведения исследований сыворотку крови предварительно разводят изотоническим раствором хлористого натрия в соотношении 1:21. Затем необходимый объем разведенного образца (для С3с–50 мкл, С4–200 мкл) вносят в кювету анализатора при комнатной температуре. После учета фонового уровня оптической плотности к образцам добавляют по 500 мкл специфических антисывороток к С3с и С4. Через 30 с проводят повторное определение оптической плотности. На основании градиента величины оптической плотности автоматически рассчитывается показатель концентрации компонентов комплемента в исследуемом образце (в г/л). Данные представлены как концентрация компонентов комплемента С3с и С4 в г/л.

Суммарную активность комплемента можно оценивать с помощью классического метода по 50% гемолизу (CH_{50}).

2. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ И ИХ КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

2.1. Связь концентрации иммуноглобулинов класса G с частотой инфекционных осложнений у детей с ОЛЛ

Определенные нами показатели нормальных значений концентрации иммуноглобулинов (Ig) классов M, G и A у 46 здоровых детей в возрасте 3–15 лет составляли $1,054 \pm 0,096$ г/л; $9,9 \pm 0,305$ г/л и $1,036 \pm 0,068$ г/л соответственно. У детей в возрасте от 3 до 17 лет ($n = 58$) с В-линейным ОЛЛ, включающим про-B, общий (common) и пре-B иммунофенотипические варианты ОЛЛ, только концентрация IgG была достоверно повышена ($11,28 \pm 0,55$ г/л, $P = 0,03$) по сравнению с нормой. Обращает на себя внимание тот факт, что более чем у половины больных детей уровень IgG значительно отличался от средних значений (рис. 1).

Следует отметить, что концентрация IgG с высокой степенью достоверности коррелировала с концентрацией иммуноглобулинов других классов: IgM ($R = + 0,542$; $P = 0,000005$) и IgA ($R = + 0,685$; $P < 0,000001$).

Для проведения клинико-лабораторного анализа было выделено три подгруппы детей с ОЛЛ, различающихся исходной концентрацией IgG в сыворотке крови. У 28 больных концентрация IgG определялась в нормальном диапазоне (8,225–13,35 г/л, подгруппа IgG-II), у 15 была сниженной ($< 8,225$ г/л, IgG-I) и у 15 — повышенной ($> 13,35$ г/л, IgG-III). На момент диагностики лейкоза у абсолютного большинства детей всех выделенных подгрупп выявлялись признаки инфекционного процесса разной степени тяжести, которые в большинстве случаев представляли собой «маски» острого лейкоза (острые вирусные заболевания верхних дыхательных путей, грипп, очаговая пневмония, остеомиелит, лимфадениты, бронхит). На фоне индукционной терапии с применением преднизолона (по протоколу ALL-BFM-90M) у большинства больных симптомы, обусловленные «масками» лейкозного процесса, исчезали. К 7-му дню симптомы, связанные с действительно имеющим место инфекционным процессом, оставались только у 19,5% больных. При этом в подгруппе с нормальной исходной концентрацией IgG (IgG-II) инфекционная симптоматика выявлялась только у одного больного из 19 (5,6%), тогда как в подгруппах с исходно низкой или высокой концентрацией IgG эти показатели значительно выше: у 4 больных из 11 (36,4%, $P = 0,03$) и у 3 из 11 (27,3%, $P > 0,05$) соответственно.

На фоне последующего проведения интенсивной полихимиотерапии у детей всех выделенных подгрупп примерно с одинаковой частотой появлялись инфекционные осложнения, обусловленные развитием вторичного иммуносупрессивного состояния.

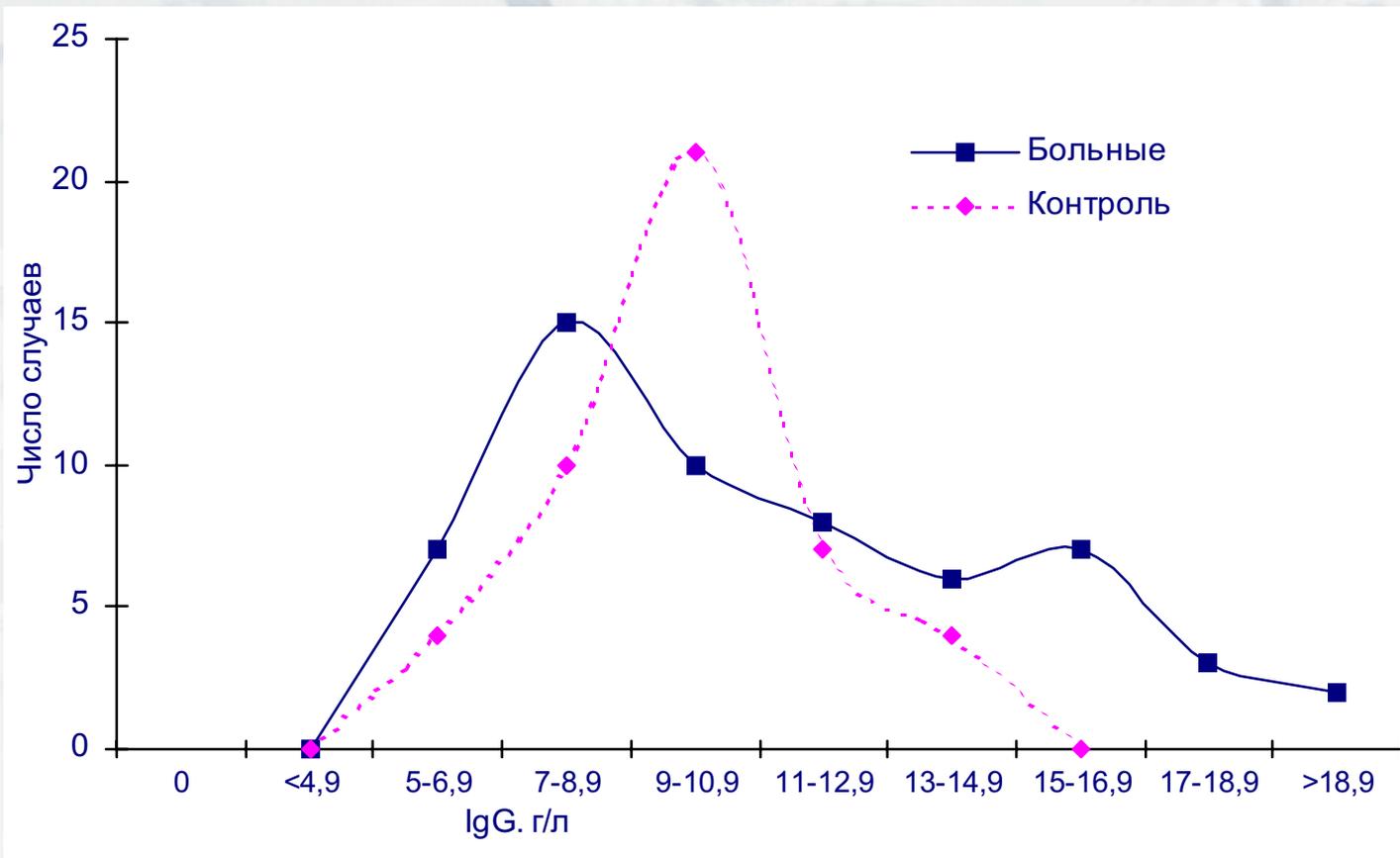


Рис. 1. Распределение уровня IgG у детей с В-линейным ОЛЛ (n = 58) и детей контрольной группы (n = 46)

2.2. Содержание компонентов комплемента, фактора некроза опухолей альфа и уровень бактерицидной активности сыворотки крови у детей с ОЛЛ

Классические представления об активации комплемента при любом патологическом процессе в организме человека подтверждаются при остром лейкозе. Концентрация С3с и С4 компонентов комплемента составила у детей с В-линейным ОЛЛ $1,166 \pm 0,036$ г/л и $0,259 \pm 0,009$ г/л соответственно, что значительно выше, чем у здоровых детей ($0,879 \pm 0,013$ г/л и $0,178 \pm 0,006$ г/л соответственно, $P < 0,001$ для обоих показателей). При этом наиболее значительная активация комплемента наблюдалась у больных детей с исходно нормальной концентрацией IgG в сыворотке крови. Нами это рассматривается как признак адекватной реакции системы комплемента под действием прежде всего инфекционных факторов. У детей, имеющих сниженный или повышенный уровень IgG в сыворотке крови, активация системы комплемента была выражена в меньшей степени.

Бактерицидная активность сыворотки (БАС) крови является результирующим параметром гуморального звена антибактериальной защиты. Она определяется участием различных белков крови иммуноглобулиновой и неиммуноглобулиновой (ферментативной) природы. Нормальные показатели БАС в наших условиях определения составили $46,0 \pm 2,5\%$ для нативной сыворотки крови и $43,25 \pm 3,1\%$ — для термоинактивированной при 56°C в течение 30 мин. На фоне достоверного повышения бактерицидной активности нативных и термоинактивированных сывороток крови больных с ОЛЛ по сравнению с контролем наиболее значительное усиление бактерицидных свойств крови (77–100%) наблюдалось в подгруппе детей с ОЛЛ, имеющих сниженную концентрацию IgG (менее 8,225 г/л). В то же время у больных детей с повышенной концентрацией IgG (более 13,35 г/л) уровень БАС был наименьшим ($< 49,7\%$).

Такая направленность изменения БАС сыворотки крови у больных с ОЛЛ свидетельствует, во-первых, о существовании обратной зависимости этого показателя от концентрации IgG и, во-вторых, о компенсаторном повышении БАС у пациентов со сниженным уровнем IgG. По-видимому, эти два компонента взаимно дополняют друг друга в осуществлении противoinфекционного гуморального иммунитета. В то же время достоверной зависимости частоты инфекционных осложнений от показателей БАС нами не выявлено.

В плазме крови больных с ОЛЛ обычно определяется повышенное содержание цитокина ФНО- α , который является показателем активного патологического процесса в организме. Содержание ФНО- α в плазме обследованных нами здоровых детей составляло примерно 30 пкг/мл (что близко к пределу чувствительности метода), тогда как у больных с ОЛЛ этот показатель оказался повышенным (в среднем в 1,5 раза), особенно в подгруппе больных детей, имеющих высокий уровень IgG в крови. Такое увеличение содержания ФНО- α определяется развитием неспецифической цитокиновой реакции, характеризующей активацию иммунитета при лейкозном процессе. Зависимость содержания ФНО- α от сопутствующих инфекционных процессов на этапе первичного выявления ОЛЛ мы считаем незначительной, что подтверждается другими авторами (Abrahamsson J. et al., 1993).

2.3. Содержание антитоксических и противоопухолевых антител в сыворотке крови больных с ОЛЛ

Иммунизация детей в раннем возрасте определяет развитие стойкого гуморального иммунитета к ряду инфекционных агентов и их токсинов. О состоянии поствакцинального иммунитета позволяет судить уровень антитоксических антител к дифтерийному и столбнячному анатоксинам. У детей с ОЛЛ уровень этих антител был значительно снижен ($3,15 \pm 0,39$ и $2,07 \pm 0,27 \log_2^{-1}$ соответственно), по сравнению с детьми контрольной группы ($4,72 \pm 0,34$, $P = 0,003$ и $4,34 \pm 0,33 \log_2^{-1}$, $P = 0,000002$ соответственно). Такие низкие титры поствакцинальных антител отражают состояние иммуносупрессии, развивающейся как результат прогрессирования основного заболевания у детей с ОЛЛ.

Наличие противоопухолевых антител к близкородственным В-клеточным опухолевым линиям Raji и IM-9 определяли с помощью метода клеточного иммуноферментного анализа (CELISA). Положительными результатами считали значения, превышающие средний уровень связывания с опухолевыми клетками линий IM-9 и Raji иммуноглобулинов сыворотки крови здоровых детей контрольной группы. Среди больных с В-линейными ОЛЛ противоопухолевые антитела, реагирующие с клетками линий IM-9 и/или Raji, были обнаружены у 70% детей с низким содержанием IgG, и у 72,7% детей с высоким содержанием IgG, тогда как в подгруппе детей с нормальным содержанием IgG частота выявления противоопухолевых антител составляла 28,6%.

Выявленные различия представляют интерес прежде всего в связи с различным содержанием лейкозных клеток в периферической крови у детей сопоставляемых подгрупп. Как следует из представленных в **табл. 1** данных, низкая концентрация IgG у больных ОЛЛ ассоциируется с более высоким содержанием опухолевых клеток в периферической крови. Именно в этой подгруппе больных противоопухолевые антитела выявляются наиболее часто. Нормальная концентрация IgG ассоциируется с наиболее низким содержанием опухолевых клеток. Как отмечалось выше, в этой подгруппе больных частота обнаружения противоопухолевых антител самая низкая. Надо отметить, что во всех подгруппах, сформированных в зависимости от концентрации IgG в периферической крови, значения процентного содержания бластных клеток в костном мозге практически не различаются и обычно определяются на уровне выше 80%.

2.4. Структурно-функциональные нарушения молекул IgG в сыворотке крови у детей с ОЛЛ

Одним из современных подходов к оценке нарушений гуморального иммунитета при патологических процессах является изучение конформационных нарушений молекул сыворотки крови. Поэтому мы предлагаем использовать оценку структуры молекул IgG с помощью различных зондов, связывающихся с Fc-участком молекулы IgG. При этом о наличии aberrантных молекул свидетельствует выявление более чем двукратной разницы между значениями, полученными при определении концентрации IgG разными методами, а о наличии гомогенных молекул — отсутствие разницы на 50% и более. Используя этот подход, нам не удалось найти достоверных различий между содержанием aberrантных молекул IgG у детей с ОЛЛ и содержанием aberrантных молекул IgG у здоровых детей контрольной группы. При этом в подгруппе больных с высокой исходной концентрацией IgG в сыворотке крови ($> 13,35$ г/л) aberrантные молекулы IgG не были обнаружены.

Гомогенные формы IgG при ОЛЛ встречались в 3 раза чаще ($P = 0,025$), чем у здоровых детей. Наиболее часто они выявлялись у детей с ОЛЛ, имеющих низкую концентрацию IgG. Гомогенные формы IgG были выявлены более чем у 50% больных детей этой подгруппы, в то время как у здоровых детей с низким уровнем IgG они не встречались. Природа aberrантных и гомогенных форм IgG окончательно не ясна. Выявляемые изменения их содержания при ОЛЛ могут свидетельствовать о различных типах нарушения структуры молекул IgG на посттрансляционном уровне. Следовательно, снижение частоты aberrантных молекул у детей с высоким уровнем IgG и возрастание частоты гомогенных молекул у детей с низким уровнем IgG отражает степень нарушения метаболизма иммуноглобулинов при ОЛЛ у детей.

Количество лейкозных клеток в периферической крови детей с В-линейным ОЛЛ, имеющих различный уровень IgG в крови

Показатель	Значения показателя в зависимости от уровня IgG в сыворотки крови *		
	IgG-I (n = 15)	IgG-II (n = 28)	IgG-III (n = 15)
Количество лейкоцитов в периферической крови ($\times 1000/\text{мм}^3$)	17,1 (2,1–81,1)	4,95 (1,6–76,2)	9,7 (1,5–85)
Содержание бластных клеток в периферической крови (%)	63 (0–91)	11,5 (0–90)	37 (0–95)
Абсолютное содержание бластных клеток в периферической крови ($\times 1000/\text{мм}^3$)	10,2 (0–73,8)	0,51 (0–67,8)	3,6 (0–73,9)

*данные представлены как медиана и диапазон минимальных и максимальных значений

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как известно, оценка состояния больного с острым лейкозом начинается с морфологической, цитохимической и фенотипической характеристики лейкозных клеток, результаты которой являются определяющими для установления диагноза и назначения адекватного протокола терапии. При выборе индивидуальной тактики лечения больного учитывается и ряд прогностических факторов, которые позволяют отнести данного больного к той или иной группе риска (стандартного, промежуточного, высокого). Перечень прогностических факторов, основанных на изучении биологических свойств лейкозных клеток и ответа организма больного на лейкозный процесс, в настоящее время расширяется. Эти факторы влияют на тяжесть течения заболевания, частоту развития осложнений в период его лечения, эффективность химиотерапии, длительность нейтропении, вероятность рецидивов и выживаемость.

Иммунный надзор при острых лейкозах осуществляется как клеточными, так и гуморальными механизмами. В условиях подавления клеточного иммунитета, вызванного лейкозным процессом и последующей циторедуктивной химиотерапией, значение факторов гуморального иммунитета резко возрастает. Именно поэтому мы обращаем внимание на характеристику гуморального иммунитета (прежде всего неспецифического) у больных острым лейкозом. Роль различных его компонентов представляется важной на различных этапах развития лейкозного процесса. Одна их часть (активность компонентов комплемента, бактерицидная активность сыворотки крови, анитоксические антитела) имеет отношение к инфекционным осложнениям, которые часто развиваются на фоне интенсивной химиотерапии и являются ведущей причиной летальных исходов на начальных этапах лечения. Другая часть компонентов гуморального иммунитета (противоопухолевые антитела, нормальные иммуноглобулины) участвует в противоопухолевой защите. Действие многих факторов гуморального иммунитета неспецифично. Такие факторы, как цитокины (включая ФНО- α), иммуноглобулины, комплемент, имеют отношение к иммунной реактивности при патологических процессах как инфекционного, так и неинфекционного происхождения. Отражением нарушения метаболизма иммуноглобулинов при тяжелом патологическом процессе являются обнаруживаемые конформационные изменения молекул IgG.

В качестве одного из ведущих показателей гуморального иммунитета при остром лейкозе у детей нами предлагается уровень сывороточного иммуноглобулина класса G. Как оказалось, дети с измененной по сравнению с нормой концентрацией IgG в сыворотке крови (повышенной или сниженной) отличаются от детей с нормальной концентрацией IgG более высоким содержанием лейкозных клеток в периферической крови на момент диагностики заболевания, а также более высокой частотой сопутствующих инфекционно-воспалительных процессов, выявляемых до начала интенсивной полихимиотерапии. В этих же подгруппах детей (с повышением или снижением концентрации IgG) выявляются значительные отклонения от нормы и других показателей гуморального иммунитета (IgM, IgA, бактерицидная активность сыворотки крови, антитоксические и противоопухолевые антитела, фактор некроза опухолей альфа, конформационные изменения молекул IgG). Это свидетельствует о целесообразности учета концентрации IgG в сыворотке крови как одного из факторов риска при определении прогноза острого лейкоза у детей.

Обычно считается, что иммунологические факторы защиты при острых лейкозах определяют тяжесть и распространенность заболевания, а исход заболевания и возможность рецидивов связаны с биологическими свойствами выживших лейкозных клеток. Прослеженные нами и другими авторами (Welch J.C., Lilleyman L.S., 1995) отдаленные результаты лечения детей с ОЛЛ показывают, что исход заболевания может в определенной степени зависеть и от исходной концентрации IgG. Выживаемость детей, имеющих низкую или высокую концентрацию IgG, хуже, чем выживаемость детей с его нормальной концентрацией. Эти данные заставляют обратить более пристальное внимание на роль гуморальных факторов в противоопухолевом иммунитете и контроле инфекционных осложнений, которая определяет их значение для ближайших и отдаленных результатов лечения острых лейкозов.